

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
CAMPUS DE BOTUCATU**

**CONSTRUÇÃO DE MAPA DE LIGAÇÃO PARA O GENOMA B DE *ARACHIS*
UTILIZANDO MARCADOR RAPD.**

WALDEMIR PINTO DE OLIVEIRA

BOTUCATU – SP

2006

**CONSTRUÇÃO DE MAPA DE LIGAÇÃO PARA O GENOMA B DE *ARACHIS*
UTILIZANDO MARCADOR RAPD.**

WALDEMIR PINTO DE OLIVEIRA

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcos Aparecido Gimenes

**Dissertação apresentada à Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, UNESP, para a obtenção do Título
de Mestre em Ciências Biológicas, Área
de Concentração: Genética**

BOTUCATU – SP

2006

Aos meus pais e irmãos, pelo apoio, carinho, compreensão e confiança,

Aos amigos pelo aprendizado e apoio,

A Deus, pelos amigos, pela minha família e por minha vida.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marcos Aparecido Gimenes, pela orientação, dedicação, apoio e a oportunidade oferecida.

A Dra Catalina Romero Lopes, coordenadora do grupo, pelas contribuições, dedicação e apoio.

Aos pós-graduandos do grupo, Adriana, Akemi, Edna e Marcelo, e a estagiária Luciana (Jambú), pela amizade e colaboração em todo o período em que esse trabalho foi realizado.

Aos pós-graduandos que concluíram seus doutorados nesse período, Andréa, Paula e Tatiany, pelo apoio e amizade.

Ao Eder Jorge de Oliveira do Instituto Agrônomo de Campinas, pela ajuda nas análises dos dados.

Ao pós-graduando Júlio e a estagiaria Vanusa pela amizade e apoio na manutenção de casa de vegetação nesse último ano.

Aos amigos e funcionários do Departamento de Genética, do Departamento de Botânica e do Instituto de Biociências da UNESP – Campus de Botucatu.

Ao CNPq, pela bolsa concedida, à FAPESP e ao PRODETAB, pelo auxílio financeiro na realização do projeto.

| | |
|---|-----------|
| Índice | |
| Resumo..... | 1 |
| Abstract..... | 2 |
| 1. Introdução..... | 3 |
| 1.1. Objetivo..... | 10 |
| 2. Materiais e Métodos | 11 |
| 2.1. Obtenção de material vegetal | 11 |
| 2.2. Extração de DNA | 11 |
| 2.3. Reações de PCR | 11 |
| 2.4. Análise de dados | 13 |
| 2.5. Construção do mapa | 13 |
| 3. Resultados | 14 |
| 3.1. Amplificação de locos de RAPDs..... | 14 |
| 3.2. Mapa de ligação | 15 |
| 4. Discussão | 17 |
| 4.1. Locos distorcidos | 17 |
| 4.2. Mapa de ligação | 20 |
| 5. Conclusões | 24 |
| 6. Referências | 25 |
| 7. Tabelas | 40 |
| Tabela 1..... | 40 |
| Tabela 2..... | 41 |
| Tabela 3 | 42 |
| 8. Figura 1..... | 43 |

| | |
|--|-----------|
| Artigo em inglês..... | 45 |
| Abstract | 46 |
| 1. Introduction | 47 |
| 1.1. Objective | 53 |
| 2. Material and Methods | 54 |
| 2.1. Plant material | 54 |
| 2.2. DNA extraction | 54 |
| 2.3. PCR reactions | 55 |
| 2.4. Data Analyses | 56 |
| 2.5. Linkage map construction | 56 |
| 3. Results | 57 |
| 3.1. RAPD amplifications | 57 |
| 3.2. Linkage map | 58 |
| 4. Discussion | 59 |
| 4.1 Loci distortion | 59 |
| 4.2. Linkage map | 62 |
| 5. Conclusion | 66 |
| 6. References | 67 |
| 7. Tables | 82 |
| Table 1 | 82 |
| Table 2 | 83 |
| Table 3 | 84 |
| 8. Figure 1 | 85 |

Resumo

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é uma espécie tetraplóide (AABB) de grande importância econômica nos trópicos e subtropicais, ficando entre as quatro maiores culturas oleaginosas do mundo. Espécie essa em que o desenvolvimento de mapa de ligação é difícil devido o nível extremamente baixo de polimorfismo detectado. Assim, a alternativa mais adequada tem sido o uso de populações mapa obtidas de cruzamentos entre espécies silvestres diplóides possuidoras de genomas comprovadamente similares aos do amendoim cultivado e que apresentam características de grande interesse para o melhoramento genético do amendoim, como altos níveis de polimorfismo genético e resistência à várias doenças. No presente trabalho, utilizando uma população F_2 de 108 indivíduos do cruzamento entre duas espécies silvestres [*A. ipaënsis* (KG30076) e *A. magna* (KG30097)] do genoma B similar ao de *A. hypogaea*, entre as quais o nível de polimorfismo encontrado ficou bem abaixo do esperado (23,6%), foi gerado um mapa com 139 marcadores RAPDs e oito microssatélites distribuídos em 12 grupos de ligação, cobrindo 2.061,2 cM do genoma e uma distância média entre os marcadores de 12,8 cM. O mapa de ligação apresentado neste trabalho é o primeiro mapa para espécies de genoma B altamente relacionadas ao genoma B de *A. hypogaea*, construído com marcadores RAPD. O desenvolvimento de mapas de ligação para cada um dos genomas de *A. hypogaea* é o primeiro passo na integração de biotecnologia nos programas de melhoramento que visam introgressão de genes das espécies silvestres para o amendoim cultivado.

Abstract

Arachis hypogaea L. (peanut) is one of the four most important oilseed crops in the world. Linkage maps of *A. hypogaea* are difficult to be constructed because this species presents extremely low levels of polymorphism, as detected by the use of several different molecular markers. An alternative to obtain information about its genome is the utilization of wild species of *Arachis* presenting genomes similar to that of *A. hypogaea*. These species present high levels of genetic polymorphism, traits of agronomic interest, such as resistance against important pathogens, and high cross-ability. In this work we present a linkage map constructed based on a F₂ population of 108 individuals resulting from the cross between two wild species of *Arachis* [*A. ipaënsis* (KG30076) e *A. magna* (KG30097)] presenting the B genome similar to that of *A. hypogaea*. This species showed to be very close related, as the polymorphism level observed between than was very low (23.6%). We obtained a linkage map with 139 RAPD markers and 8 microsatellite markers distributed onto 12 linkage groups and covering a distance of 2,061.2 cM of the genome, with an average distance between markers of 12,8 cM. This is the first linkage map of *Arachis* species possessing the B genome and close related to *A. hypogaea* constructed via RAPD markers. The development of linkage maps is a first step in the integration of the biotechnologies to the genetic improvement via wild species of peanuts.

1. Introdução

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) está entre as quatro maiores culturas oleaginosas do mundo. Sua produção ocorre principalmente em países em desenvolvimento da África e Ásia, que são responsáveis por cerca de 80% da produção mundial, que foi de aproximadamente de 34.198 milhões de tonelada em 2004, segundo o Agrianual de 2005. Na safra de 2004/2005, o Brasil plantou 129,5 mil hectares de amendoim (CONAB, 2005), contribuindo com aproximadamente 0,6% da produção mundial.

O amendoim cultivado é uma espécie alotetraplóide (AABB), que se originou de um cruzamento entre duas espécies selvagens, seguido de uma rara e espontânea duplicação de cromossomos (Halward et al., 1991; Shoemaker et al., 1996).

Arachis hypogaea é uma das 31 espécies da seção *Arachis*, uma das nove seções que compõem este gênero, que é composto no total por 80 espécies (Valls & Simpson, 2005). A maioria das espécies da seção *Arachis* é diplóide e com genomas classificados em três tipos (A, B e D). As espécies de genoma A em geral são bastante relacionadas entre si. Por exemplo, híbridos resultantes do cruzamento de acessos das espécies *A. duranensis* e *A. kempff-mercadoi* apresentaram fertilidade de pólen de 72% (Tallury et al., 2005). Na meiose de híbridos interespecíficos entre espécies de genoma A foram encontrados 10 bivalentes (Singh & Moss, 1984; Tallury et al., 2005). Já entre as espécies do grupo de genoma B a cruzabilidade é bastante variável. Cruzamentos entre *A. batizocoi* e *A. ipaënsis* resultaram em híbridos de baixa fertilidade (Tallury et al.,

2005). Já cruzamentos entre *A. ipaënsis* e *A. magna* resultaram em híbridos altamente férteis (Gobbi et al., 2006). Com relação às associações entre as espécies diplóides e *A. hypogaea*, dados citogenéticos (Fernández & Krapovickas, 1994) e moleculares (Gimenes et al., 2000; Jung et al., 2003; Moretzsohn et al., 2004) indicam que estas são bastante variáveis. Entretanto, diferentes tipos de evidências (Kochert et al., 1991; Krapovickas & Gregory, 1994; Fernández & Krapovickas, 1994; Kochert et al., 1996; Jung et al., 2003; Seijo et al., 2004; Fávero, 2004) apontam *A. duranensis* e *A. ipaënsis* como as prováveis doadoras dos genomas A e B de *A. hypogaea*, respectivamente, sendo, portanto, as mais relacionadas a ele.

O melhoramento do amendoim tem sido realizado utilizando-se principalmente seu “pool” gênico primário (linhagens, cultivares), porém o melhoramento por este caminho apresenta algumas limitações como, por exemplo, a baixa variabilidade genética para caracteres de interesse entre linhagens e cultivares (Halward et al., 1991) e o baixo polimorfismo molecular entre acessos de *A. hypogaea* (Grieshammer & Wynne, 1990; Kochert et al., 1991; Halward et al., 1992; He & Prakash, 1997; Singh et al., 1998; Hopkins et al., 1999; Subramanian et al., 2000; Herselman, 2003; Ferguson *et al.*, 2004; Moretzsohn et al., 2004; Herselman et al., 2004; He et al., 2005) o que limita a utilização de marcadores moleculares nesta espécie, e conseqüentemente o desenvolvimento de mapas de ligação e identificação de QTLs. Portanto, no caso do amendoim seu “pool” gênico secundário, que envolve espécies silvestres da mesma seção, assume um papel muito importante em seu melhoramento, pois neste é encontrado altos níveis de resistência a doenças de importância econômica

(Sharma et al., 1999; Pande & Narayana Rao, 2001; Kameswara Rao et al., 2003) e, as espécies que o compõem são estritamente relacionadas ao amendoim cultivado (Krapovickas & Gregory, 1994), podendo assim ser utilizadas em cruzamentos com *A. hypogaea*. O uso do “pool” gênico secundário de *A. hypogaea* ainda tem como vantagem o fato destas espécies apresentarem alto polimorfismo detectável por diferentes marcadores moleculares como, por exemplo, RFLP (Halward et al., 1991), RAPD (Gimenes et al., 2000; Creste et al., 2005), AFLP (Gimenes et al., 2002) e microssatélites (Moretzsohn et al., 2004), o que não acontece em *A. hypogaea*.

A transferência de características das espécies silvestres para o amendoim cultivado pode ser realizada por meio de cruzamentos com espécies diplóides ou com aloploplóides sintéticos, resultantes de cruzamentos entre as espécies diplóides. Entretanto, durante este processo também são transferidas às progênes características indesejáveis, como baixo rendimento e qualidade inferior da semente. Além disso, os genes de interesse podem estar ligados a genes indesejáveis, sendo necessárias muitas gerações de retrocruzamento para separá-los. Por exemplo, segundo Singh et al. (1991) em espécies de *Arachis* a resistência a doenças é normalmente associada a características agronomicamente indesejáveis.

A utilização de espécies silvestres no melhoramento de *A. hypogaea* pode ser facilitada pela identificação de marcadores moleculares ligados a genes ou às regiões cromossômicas de interesse. Além de monitorar a presença do gene ou alelo de interesse, marcadores ainda permitiriam a seleção dos indivíduos mais semelhantes ao genótipo recorrente. Deste modo, o número de ciclos de

retrocruzamentos necessários para a recuperação do genótipo recorrente seria reduzido de forma acentuada, acelerando o desenvolvimento de variedades melhoradas (Openshaw et al., 1994).

O uso de marcadores moleculares na introgressão de genes em *Arachis hypogaea* tem mostrado resultados promissores. Garcia et al. (1995), utilizando marcadores RFLPs e RAPDs, identificaram introgressão de segmentos cromossômicos do genoma AA de *A. cardenasii* para o genoma AA de *A. hypogaea*. Também foram identificados marcadores estritamente ligados a um gene de resistência à nematóide (Garcia et al., 1996). A identificação de marcadores moleculares ligados a genes de interesse pode ser realizada das seguintes maneiras: análise de “bulks” ou mapeamento. O método de “bulks” segregantes (BSA - “Bulked segregant analysis”) foi desenvolvido por Michelmore et al. (1991). Trata-se de um método rápido para identificar marcadores ligados a regiões específicas do genoma, baseado na construção de dois “bulks” de DNA contrastantes de uma população segregante do mesmo cruzamento. Cada “bulk” é constituído de uma mistura de DNAs de indivíduos da população com a característica de interesse em comum entre eles, por exemplo, a construção de um “bulk” de indivíduos resistentes e outro de indivíduos suscetíveis a uma determinada doença, desta forma todos os indivíduos que compõem um “bulk” compartilham uma mesma região genômica que contém o gene de interesse e segregam para as demais regiões. Assim, o marcador que co-segregar com os “bulks” tem uma grande probabilidade de estar ligado à característica avaliada. A outra maneira de identificar marcadores ligados a regiões de interesse do genoma é por meio de mapas de ligação. Esta metodologia tem como desvantagens em

relação ao “Bulk”, a necessidade do uso de um número maior de marcadores para obter um mapa informativo (média de 2,5 a 6,0 cM, entre marcadores) e a necessidade da análise individual de cada integrante dessa população. Porém esse método é considerado uma das aplicações de maior impacto da tecnologia de marcadores moleculares na análise genética de espécies e, potencialmente, no melhoramento de plantas (Faleiro et al., 2003). No contexto do melhoramento de plantas, os mapas genéticos possibilitam a cobertura e análise completa do genomas, a decomposição de características genéticas complexas nos seus componentes mendelianos, a localização de regiões genômicas que controlam caracteres de importância, a quantificação do efeito dessas regiões na característica estudada e a canalização de toda essa informação para uso em programas de melhoramento (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

A obtenção de mapas de ligação por meio do uso de populações segregantes é difícil em *A. hypogaea*, devido ao nível extremamente baixo de polimorfismo detectado nesta espécie pelos diferentes tipos de marcadores moleculares (Grieshammer & Wynne, 1990; Kochert et al., 1991; Halward et al., 1992; He & Prakash, 1997; Singh et al., 1998; Hopkins et al., 1999; Subramanian et al., 2000; Herselman, 2003; Herselman et al., 2004; Ferguson et al., 2004; Moretzsohn et al., 2004; He et al., 2005). Por outro lado, a obtenção de populações segregantes utilizando espécies silvestres de *Arachis* pode ser realizada com relativa facilidade, uma vez que estas apresentam altos níveis de polimorfismo genético (Gimenes et al., 2000; Moretzsohn et al., 2004; Gimenes et al., 2002; Creste et al., 2005), características de grande interesse agrônômico, (Sharma et al., 1999; Pande & Narayana Rao, 2001; Kameswara Rao et al., 2003)

e alta cruzabilidade (Fávero, 2004; Tallury et al., 2005), o que permite a obtenção de populações a partir de parentais altamente contrastantes.

Até o momento poucos mapas de ligação foram publicados para espécies do gênero *Arachis*. Halward et al. (1993) desenvolveram um mapa de ligação baseado em RFLPs usando uma população F_2 derivada de um cruzamento entre duas espécies diplóides possuidoras do genoma AA (*A. stenosperma* e *A. cardenasii*). Um total de 117 locos foi mapeado em 11 grupos de ligação, cobrindo aproximadamente 1063 cM do genoma. Burow et al. (1996) desenvolveram uma linhagem TxAg-7 por meio do cruzamento de *A. hypogaea* var. *Florunner* com [*A. batizocoi* x (*A. cardenasii* x *A. diogoi*)]^{x4}. Esta linhagem TxAg-7 foi utilizada como parental para gerar uma população BC_4F_2 , que foi utilizada para a identificação de três marcadores RAPDs associados à resistência a nematóides.

Burow et al. (2001) utilizando uma população segregante de 78 indivíduos originada a partir de um cruzamento entre um anfidiplóide sintético [*A. batizocoi* x (*A. cardenasii* x *A. diogoi*)] e *A. hypogaea* mapearam 370 locos RFLP em 23 grupos de ligação, cobrindo uma distância de 2.210 cM do genoma. Estes autores observaram que as cromatinas dos dois ancestrais de genoma A formaram cromossomos mosaicos, refletindo a recombinação ocorrida no híbrido interespecífico F_1 . Os dados também mostraram que a recombinação entre os cromossomos na progênie tetraplóide foi similar ao pareamento de cromossomos relatados para *A. hypogaea*, com recombinação entre cromossomos do mesmo genoma.

Recentemente três novos mapas foram construídos para o amendoim com o uso de marcadores AFLPs e microssatélites. Herselman et al. (2004) publicaram

um mapa para o *A. hypogaea* com marcadores AFLPs, que foram utilizado para identificar regiões cromossômicas envolvidas na resistência ao pulgão vetor da roseta do amendoim, a qual é considerada a mais destrutível doença do amendoim na África. Moretzsohn et al. (2005) publicaram um mapa com 170 marcadores microssatélites distribuído em 11 grupos de ligação cobrindo 1230,89 cM do genoma, utilizando uma população F_2 obtida no cruzamento entre duas espécies diplóides do genoma AA (*A. duranensis* e *A. stenosperma*) e Gobbi et al. (2006) construíram o primeiro mapa de ligação para o genoma B do *Arachis* utilizando 94 marcadores microssatélites, que foram distribuído em 11 grupos de ligação cobrindo uma distância de 754,8 cM, usando uma população F_2 de 93 indivíduos, resultante do cruzamento entre duas espécies silvestre de genoma B (*A. ipaënsis* e *A. magna*), que são altamente relacionadas ao amendoim cultivado (Krapovickas & Gregory, 1994). Tanto Moretzsohn et al. (2005) quanto Gobbi et al. (2006) mapearam um número razoável (36 e 24) de marcadores funcionais derivados de ESTs.

O marcador molecular RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) tem sido usado com êxito na construção de mapas de ligação para várias espécies vegetais de importância econômica, como por exemplo, para soja (Ferreira et al., 2000), mostarda (Sharma et al., 2002), sorgo (Agrama et al., 2002), feijão (Faleiro et al., 2003; Santos et al., 2003), eucalipto (Junghans et al., 2003), laranja (Oliveira et al., 2004), ervilha (Koveza et al., 2005), grão-de-bico (Santra et al., 2000; Iruela et al., 2006) entre outros.

O uso da técnica RAPD não requer experiência aprofundada em técnicas de biologia molecular e nem tampouco instalações sofisticadas de laboratório. É

uma tecnologia bastante acessível, de fácil manipulação, e o uso dessa técnica em espécies silvestre do *Arachis* tem mostrado ser bastante informativo (Gimenes et al., 2000; Creste et al., 2005).

1.1 Objetivo

O objetivo deste trabalho foi a construção de mapa de ligação, utilizando-se uma população F_2 resultante do cruzamento entre os acessos de *A. ipaënsis* e *A. magna*, ambas possuidoras de genoma B, com marcadores moleculares do tipo RAPD. Tal mapa será utilizado futuramente na identificação de QTLs (“Quantitative Trait Loci”) relacionados à resistência a doenças de importância econômica, no amendoim.

2. Material e Métodos

2.1 Obtenção do material vegetal

Uma população F₂ de 108 indivíduos foi obtida pela autofecundação de um híbrido interespecífico originado de um cruzamento entre *A. ipaënsis* KG30076 (Parental feminino) e *A. magna* KG30097 (Parental masculino). O cruzamento foi realizado por Andréa Verônica Gobbi Barbosa no Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Estadual 'Júlio de Mesquita Filho' (UNESP), onde foi realizada a pesquisa. Os acessos utilizados foram cedidos pelo Dr. José Francisco Montenegro Valls, curador do Banco Ativo de Germoplasma (CENARGEN-EMBRAPA, Brasília, DF). Essas plantas foram mantidas em casa de vegetação.

2.2. Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada de acordo com Grattapaglia & Sederoff (1994). A concentração do DNA foi estimada em gel de agarose 1%, e realizada uma diluição para concentração de uso a 5ng/μl.

2.3. Reações de PCR

As amplificações dos marcadores RAPDs foram realizadas utilizando-se "primers" de 10 nucleotídeos da Operon (OPERON Technologies) nas seguintes

condições de amplificação: 1 passo inicial de 94°C por 5 minutos, 40 ciclos de 92°C por 1 minuto, 35°C por 1 minuto e 72°C por 3 minutos e um passo final de 72°C por 10 minutos. Cada uma das reações de amplificação foram composta por 0,1 µl de *Taq* DNA polimerase (5 U/µl) (Fermenta), 1,3 µl de tampão 10 X da *Taq* DNA polimerase, 1,04 µl de MgCl₂ (25 mM), 1,04 µl de dNTP (2,5 mM), 3 µl de “primer” (5 ng/µl), 1,04 µl de BSA(10mg/ml), 3 µl DNA a 5 ng/µl e 2,48 µl de água para completar um volume final de 13 µl. Os produtos de cada amplificação foram separados em gel de agarose a 1,5%, e os padrões de bandas foram visualizados corando-se os géis com brometo de etídio e usando-se luz ultravioleta.

Foram utilizados 13 locos (Tabela 1) previamente mapeados por Gobbi et al. (2006). Reações de PCR foram composta de 2,0 µl de DNA genômico a 5ng/µl, 0,1 µl de *Taq* DNA polimerase 5U/µl (Fermenta), 1,0 µl de 10X buffer da *Taq* DNA polimerase 1,0 µl MgCl₂ (25 mM), 1,0 µl dNTP (2,5 mM), e 1,0 µl de BSA (10mg/ml), 0,3 µl de cada um dos “primers” e 3,3 µl de H₂O Milli Q autoclavada para completar 10 µl de volume final da reação, que foram efetuadas em termociclador PTC100 (MJ Research, Inc., Watertown, MA, USA). As condições de amplificação das reações foram: 96 °C por 5 min, seguidos de 32 ciclos de 96 °C por 30 s, X °C (temperaturas de anelamento para cada par de “primers” Tabela 1), por 45 s, 72 °C por 1 min, com uma extensão final de 10 min a 72 °C. Os produtos de PCR (10 µl) sofreram eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 6% (acrilamida/bisacrilamida, 29:1, 5 M uréia em TBE, pH 8,3) corados com prata.

2.3. Análise dos Dados

A identificação de marcadores polimórficos nos parentais foi realizada a partir da análise de 227 “primers” randômicos, sendo selecionados os “primers” que permitiram a amplificação do maior número de locos polimórficos. Os “primers” selecionados foram analisados na população mapa e a presença ou ausência de cada loco em cada indivíduo foi representada numa matriz de dados com h- e kk respectivamente. Para os microssatélites foram observados na população F₂ o genótipo do parental masculino e feminino e o híbrido. O teste de χ^2 foi utilizado para verificar se as frequências genotípicas obtidas estavam de acordo com o esperado, isto é, 3:1 para o RAPD e 1:2:1 para os locos de microssatélites.

2.4. Construção do Mapa

O mapa foi construído utilizando o programa computacional JoinMap (Stam, 1993) usando a função de Kosambi e LOD mínimo de 4,0 e uma taxa de recombinação de 0,30. A nomenclatura dos marcadores RAPD seguiu usando convencional designado nos “primers” em seguida o tamanho do fragmento.

3. Resultados

3.1. Amplificação do locos de RAPDs

Dos 227 “primers” testados, 86 (37,9%) não amplificaram, 15 (6,6%) amplificaram apenas locos monomórficos e 126 (55,5%) amplificaram locos polimórficos. Dentre os 126 “primers” que amplificaram locos polimórficos, 15 amplificaram apenas um loco polimórfico e 111 “primers” (48,89%) permitiram a amplificação no mínimo de dois locos e no máximo de nove locos polimórficos, entre os parentais da população mapa. Desses 111 “primers”, foram selecionados 70 para análise na população mapa, baseando-se principalmente na intensidade do loco e repetibilidade entre os indivíduos da população F_2 . Os selecionados amplificaram em média 3,07 locos polimórficos, cujos tamanhos variaram de 350 a 3000 pb. Os 70 “primers” permitiram a amplificação de 911 locos, sendo que 215 (23,6%) foram polimórficos entre as espécies parentais e apresentaram segregação na população F_2 . Dos 215, em 118 (54,88%) locos os alelos amplificados foram de *A. ipaënsis* e em 97 (45,12%) foram de *A. magna*.

Os locos polimórficos foram de dois tipos: os monoparentais, nos quais apenas o alelo de um dos parentais foi detectado e com segregação de 1:1, e os biparentais, encontrados em ambos os parentais e com segregação esperada de 3:1. O teste de X^2 (qui-quadrado) foi aplicado para os dados de cada um dos 215 locos RAPD para verificar se as freqüências genotípicas observadas estavam dentro do esperado para um loco dominante em uma população F_2 resultante de cruzamento entre parentais homozigotos. Este teste demonstrou que as

freqüências observadas em 190 (88,37%) dos locos não diferiram significativamente da esperada 3:1, com um nível de significância de $\alpha = 0,05$. E entre os demais locos, cinco deles (2,32%) foram locos que apresentaram segregação de 1:1, e 20 (9,30%) apresentaram a segregação distorcida, sendo que em 11 foram alelos observados em *A. ipaënsis* e em nove desses alelos em *A. magna*.

3.2. Mapa de ligação

Com um LOD de 4,0 e uma taxa de recombinação de 0,30, 147 marcadores (139 RAPD e 8 microssatélites) foram mapeados em 12 grupos de ligação (Figura 1). Os grupos foram numerados seqüencialmente daquele com maior número de marcadores para o de menor número. Do total de 215 marcadores RAPD genotipados, 139 (65,04%) foram mapeados, e dos 13 locos microssatélites apenas oito, sendo dois (Seg2G05 e AHSI2D04) no grupo 1, um no grupo 2 (SI7G04), um no grupo 3 (Ah282), três (AH126, Seg4B09 e RN27A10) no grupo 6 e um (Ap175) no grupo 7. Os marcadores microssatélites são aqueles com os nomes sublinhados na Figura 1. Oitenta e um marcadores não foram ligados, sendo 76 de RAPD (47 de *A. ipaënsis* e 29 de *A. magna*) e cinco microssatélites. A origem parental dos 139 marcadores RAPDs mapeados é apresentada na Tabela 2 e, como pode ser observado, no geral, os marcadores de cada um dos parentais estão em freqüências semelhantes em cada um dos grupos de ligação.

Os comprimentos dos principais 10 grupos de ligação variaram de 27,6 cM a 369,6 cM (Tabela 2). O número de marcadores por grupo de ligação variou de

dois nos grupos 11 e 12 a 24 no grupo 1. Alguns marcadores foram mapeados na mesma posição (OPR8-2000 e OPG04-1900, OPAW12-300 e OPAW04-1400 no grupo 1; OPZ03-2300 e OPU12-630 no grupo 2; OPV09-1380 e OPU13-1350 no grupo 3; OPZ105-540 e OPZ09-1900 no grupo 4; OPG03-880 e OPG03-750 no grupo 7; OPG03-1180 e OPG04-380 no grupo 8). Por outro lado, a distância entre alguns marcadores foi bastante alta. Por exemplo, OPB07-450 e OPA15-570 foram mapeados a uma distância de 40 cM. A distância total do mapa foi de 2.061,2 cM e a distância média entre os locos foi de 12,8 cM (Tabela 2). Alguns grupos de ligação apresentaram marcadores ligados a uma distância muito abaixo da média observada (1,5 e 4,6 cM). Estas áreas de agrupamento foram observadas nos grupos de ligação 2 e 4. Nestes casos as médias foram aproximadamente de 6,38 e 6,72 cM, respectivamente.

Três dos cinco marcadores com segregação de 1:1 foram mapeados (Grupo 1, 6 e 7). Dos 21(20 RAPD e um microsatélite) marcadores que apresentaram segregação distorcida, 16 foram mapeado em sete grupos de ligação, sendo que entre os dez grupos principais, as porcentagens desses locos distorcidos variaram de 9,09% no grupo 8 a 33,33% do grupo 10, que é composto por apenas três marcadores. Esses marcadores com segregação distorcida estão identificados no mapa com um ponto (.) depois do nome (Figura 1). Dos 16 locos distorcidos, 10(62,5%) apresentaram o alelo de *A. ipaënsis* em maior frequência e seis (37,5%) apresentaram o de *A. magna* (Tabela 3).

Dos oito marcadores microsatélites mapeados, seis foram mapeados como esperado segundo o mapa desenvolvido por Gobbi *et al.* (2006), isto é, em

grupos de ligação diferentes (Seg2G05, SI2D04, SI7G04, Ah282, RN27A10 e Ap175) ou ligados (Ah126 e o Seq4B09).

4. Discussão

4.1. Distorção de locos

Dos 228 genotipados na população mapa 21 (9,2%) apresentaram distorção, sendo 20 locos de RAPD e um loco de microssatélite (Ah280). A porcentagem de distorção encontrada foi menor do que a observada por Gobbi et al. (2006), que foi de 17,7%, que avaliaram 94 locos de microssatélites em uma população mapa também resultante do cruzamento entre *A. ipaënsis* e *A. magna*. A porcentagem de locos distorcidos também foi menor que as encontradas por Halward et al. (1993) e Burow et al. (2001) (25%), avaliados em populações resultantes de cruzamentos interespecíficos utilizando marcadores RFLPs codominantes. Também foi menor do que os 44,13% de locos distorcidos observados por Moretzsohn et al. (2005), que avaliaram uma população F₂, resultante também de um cruzamento interespecífico (*A. duranensis* x *A. cardenasii*), utilizando marcadores microssatélites. Porcentagens variadas de locos distorcidos também foram observadas em populações mapas de varias espécies (Winter et al., 2000; Atieza et al. 2002, Thoquer et al. 2002; Sargent et al., 2004). Em um cruzamento intra-específico de *Mimulus guttatus*, uma planta modelo para estudos de ecologia e de evolução, o número de locos de microssatélites distorcidos (74%) também foi maior que o número de locos RAPDs

distorcidos encontrados (Hall & Wills, 2005). Os autores desse trabalho atribuíram esta diferença ao fato dos marcadores microssatélites serem mais informativos e, portanto, mais sensíveis na detecção de locos distorcidos. Esta sem dúvida também pode ser a razão para a diferença observada entre este trabalho, que foi realizado basicamente com marcadores dominantes, e outros trabalhos de mapeamento realizados em *Arachis*, que foram realizados com marcadores codominantes.

Evidências sugerem uma correlação positiva entre o grau de taxa de distorção de locos em um cruzamento e o nível de divergência genômica (Hall & Willis, 2005). Pelos dados apresentados acima sobre frequência de locos distorcidos em *Arachis*, os níveis de distorção, tanto para marcadores microssatélites (Gobbi et al., 2005) como para os marcadores RAPD obtidos neste trabalho, são os mais baixos observados, sugerindo que as espécies utilizadas para obtenção da população mapa (*A. ipaënsis* x *A. magna*) apresentam menor divergência genômica, quando comparada a outras espécies de *Arachis* utilizadas em cruzamentos para obtenção de populações mapa (*A. stenosperma* x *A. cardenasii*), Halwart et al., 1993; [*A. batizocoi* x (*A. cardenasii* x *A. diogoi*)] e *A. hypogaea* Burow et al., 2001; (*A. stenosperma* x *A. duranensis*), Moretzsohn et al., 2005). Segundo Krapovickas & Gregory (1994) *A. ipaënsis* e *A. magna* são espécies muito relacionadas. Já Valls (comunicação pessoal, 2005) considera que sejam genótipos de uma única espécie, hipótese essa que foi reforçada por Gobbi et al. (2006), que produziram híbridos férteis no cruzamento entre essas duas espécies e detectaram baixo polimorfismo entre as duas (39,7%). O baixo polimorfismo entre *A. ipaënsis* e *A. magna* também foi confirmado no presente

trabalho, uma vez que foram encontrados apenas 23,6% de locos polimórficos entre as duas, sendo considerada uma proporção baixa em relação ao polimorfismo encontrado entre os parentais de outras populações mapas construídos para espécies de *Arachis*. Por exemplo, 51,25% de locos RFLP polimórficos foram observados por Halward et al. (1993) entre *A. stenosperma* e *A. cardenasii*, e 46,8% de locos microssatélites polimórficos foram observados por Moretzsohn et al. (2005) entre *A. stenosperma* e *A. duranensis*, que foram utilizados para obtenção de uma população mapa F₂.

No presente estudo, dos 21 locos que apresentaram distorção, cinco não foram mapeados e 16 sim, e foram distribuídos em oito grupos de ligação. Evidências mostraram que marcadores distorcidos não agrupam aleatoriamente nos mapas de ligação sugerindo que alguns locos estão envolvidos neste padrão (Thoquet et al., 2002). Gobbi et al. (2006) encontraram 18 locos distorcidos e estes foram concentrados em seis grupos de ligação, sendo que no grupo de ligação 1, cinco dos seis locos distorcidos foram mapeados consecutivamente na região mediana, indicando agrupamento destes locos.

Os padrões de segregação não-mendelianas, segundo Halward et al. (1993) e Burow *et al.* (2001), podem ser reflexo da fixação de alelos deletérios, divergências estruturais ou gênicas associadas com a especiação. Outras hipóteses sobre as causas de distorção sugeridas são rearranjos estruturais (Quillet et al., 1995), ligação a genes de auto-incompatibilidade (Berzen et al., 1995; Sargent et al., 2004), ligação a alelos recessivos deletérios (Oliveira et al., 2004), diferenças no conteúdo de DNA (Thoquet et al., 2002) e interação entre genomas divergentes. As interações podem acontecer em diferentes fases do

desenvolvimento e podem alterar as freqüências genotípicas em populações F_2 das seguintes maneiras: "meiotic drive" podem distorcer as freqüências alélicas entre os gametófitos F_1 viáveis, competição gametofítica ou interação pólen-pistilo podem também distorcer as freqüências alélicas entre os gametas que alcançam a fertilização, ou viabilidade diferencial das classes genotípicas entre os zigotos da F_2 (Hall & Willis, 2005). Devido ao fato das espécies serem autógamas e, portanto, altamente homozigotas, as prováveis causas são alterações estruturais e divergências gênicas.

4.2. Mapa de ligação

O número de grupos de ligação encontrados neste trabalho é maior que o número haplóide de cromossomos encontrados nas duas espécies parentais ($x=10$). Entretanto, alguns grupos foram formados por pouco marcadores (10, 11 e 12). Por exemplo, o grupo 10 foi formado por três marcadores, sendo dois de *A. ipaënsis* e um do *A. magna*. Portanto, mais marcadores são necessários para ligá-los aos outros grupos.

A distância entre alguns marcadores em alguns grupos de ligação foi muito menor que a média observada (12,8 cM) se levado em consideração todo o conjunto de dados, Thuriaux et al. (1997) sugerem que a recombinação é concentrada em genes estruturais e há supressão de recombinação em regiões centroméricas e teloméricas (Tanksley et al., 1992).

A distância média entre os marcadores de 12,8 cM, indica que o mapa apresenta uma saturação baixa quando comparada a outros mapas altamente

saturados, como o de *Lotus japonicus*, que é composto por 595 marcadores, que cobrem 376 cM do genoma, e cuja distância média entre marcadores é de 0,6 cM e a distância máxima encontrada entre marcadores foi de 11 cM (Sandal et al., 2002). Entretanto, a distancia média entre marcadores é semelhante aos de outros mapas que foram utilizados com sucesso na identificação de QTLs. Por exemplo, o mapa utilizado para identificar QTLs de resistência á *Ascochyta rabiei* em grão-de-bico, construído com 106 marcadores e cobriu 981,6 cM do genoma, e distância média entre os marcadores foi de 8,4 cM. (Santra et al., 2002). Outro exemplo é o mapa utilizado para identificação de QTLs associados à resistência ao pulgão-verde em sorgo, que foi construído utilizando-se 113 marcadores que foram mapeados em uma área de 1530 cM, com uma distância média entre os marcadores de 13,53 cM (Agrama et al., 2002).

O comprimento total do mapa foi de 2.061,2 cM. O primeiro mapa de ligação para o gênero *Arachis* (Halward et al., 1993) foi desenvolvido utilizando uma população F₂ resultante do cruzamento de *A. stenosperma* e *A. cardenasii*, ambas espécies de genoma A, cobriu uma distância aproximada de 1.063 cM e a distância média entre os marcadores foi de aproximadamente 9,1 cM. Burow et al. (2001), utilizando uma população tetraplóide (AABB), construíram um mapa formado por 23 grupos de ligação, com 370 marcadores RFLP cobrindo uma distância total de 2.210 cM e, como uma distância média de 6 cM entre os marcadores. Moretzsohn et al. (2005) utilizando uma população F₂ obtida no cruzamento entre duas espécies diplóides do genoma AA (*A. stenosperma* e *A. duranensis*), construíram um mapa com 170 marcadores microsatélites distribuído em 11 grupos de ligação cobrindo 1230,89 cM do genoma e com

distância média de 7,24 cM. A distância coberta no presente estudo foi proporcionalmente maior que a distância coberta no mapa de genoma B construído a partir do mesmo cruzamento (754,8 cM) com marcadores microssatélites e que os demais mapas construídos para *Arachis*. Brondani et al. (2002) observaram um aumento de 22% e 36% nos mapas de *E. grandis* e *E. urophylla* quando da inclusão de marcadores microssatélites na estrutura do mapa construída com RAPD. Agrama et al. (2002) observaram um aumento de 42,61% e 36,14% no comprimento de um mapa construído com marcadores SSRs e RAPD em relação a outros dois mapas de sorgo construído com marcadores RFLP. Estas variações nas estimativas de tamanho de genoma são provavelmente devidas às diferenças nos tamanhos das populações mapas e nos níveis de estringências adotados para estabelecer a ordem dos locos (Brondani et al., 2002). Além disso, mapas genéticos baseados em populações F_2 , são difíceis de serem construídos porque recombinação entre marcadores pode somente ser estimada quando marcadores estão em acoplamento de locos (Thoquet et al., 2002).

Os parâmetros para determinação do nível de saturação e valor de um mapa de ligação são vários. Casasoli et al. (2001) concluíram que o mapa por eles obtidos teve um bom nível de saturação, uma vez que encontraram o mesmo número de grupos de ligação que o número haplóide de cromossomos de *Castanea sativa* Mill e um baixo número de marcadores não ligados. Já Thoquet et al. (2002), além dos parâmetros descritos acima, levam em consideração também o nível de discrepância entre o mapa F_2 e os mapas individuais de cada um dos parentais e, a baixa frequência de agrupamentos. Se levarmos em consideração

os parâmetros descritos acima, a obtenção de um número de grupos de ligação maior que número haplóide de cromossomos das duas espécies genitoras da população e o número de marcadores não ligados sugerem que o nível de saturação do mapa apresentado neste trabalho ainda necessita ser aumentado. Uma vez que já existem disponíveis muitos marcadores microssatélites para *A. hypogaea* (He et al., 2003; Ferguson et al., 2004; Palmieri et al., 2004; Moretzsohn et al., 2005; Gobbi et al., 2006) e o nível de transferência destes marcadores para espécies relacionadas é alto (Hopkins et al., 1999; Moretzsohn et al., 2004; Moretzsohn, 2005; Gobbi et al., 2006) a saturação deste mapa será realizada utilizando este tipo de marcador, que pelo fato de ser codominante é muito mais informativo. Pretende-se também a inclusão de marcadores âncoras de outras leguminosas como, por exemplo, *Lotus japonica* e *Medicago sativa*, utilizadas como plantas modelo e para as quais várias ferramentas genéticas já foram obtidos, incluindo mapas de ligação (Sagan et al. 1995; Penmetsa & Cook, 1997; Perry et al., 2003; Kawaguchi et al., 2002), bibliotecas de cDNA (Cowitz et al., 1998; Gama et al., 1996; Györgyey et al., 2000; Asamizu et al., 2004), bibliotecas de insertos longos (Nam et al., 1999; Men et al., 2001; Nakamura et al., 2002; Choi et al., 2004) e métodos eficiente de transformação (Chabaud et al., 1996; Trinh et al., 1998; Trieu et al., 2000).

5. Conclusões

O mapa de ligação apresentado neste trabalho é o primeiro mapa para espécies de genoma B altamente relacionadas ao genoma B de *A. hypogaea*, construído com marcadores RAPD. Um mapa único foi construído utilizando-se principalmente marcadores biparentais (3:1). Portanto, este mapa é bem balanceado uma vez que ambos os parentais contribuíram com aproximadamente os mesmos números de marcadores (71 marcadores de *A. ipaënsis* e 68 de *A. magna*). O desenvolvimento de mapas de ligação para cada um dos genomas de *A. hypogaea* é o primeiro passo na integração de biotecnologia nos programas de melhoramento que visam introgressão de genes das espécies silvestres para o amendoim cultivado. Além de permitir a detecção de genes que contribuem para a variação em características agronômicas, mapas permitirão a seleção mais facilmente de genótipos de uma progênie que tenham maior porcentagem do genótipo do parental recorrente, reduzindo dessa maneira o tempo do programa de seleção. Este mapa também é o ponto inicial para o estudo de algumas características importantes para o melhoramento de *A. hypogaea*, como por exemplo, a resistência ao fungo *Puccinia arachidis* causador da ferrugem, uma das principais doenças foliares do amendoim (Pande & Narayana Rao, 2001).

6. Referências

- Agrama, H.A., G.E. Widle, J.C. Reese, L.R. Campbell & M. R. Tuinstra, 2002. Genetic mapping of QTLs associated with greenbug resistance and tolerance in *Sorghum bicolor*. *Theor Appl Genet* 104: 1373-1378.
- Agrianual, 2005. FNP Consultoria & AgroInformativos. www.fnp.com.br
- Asamizu, E., Y. Nakamura, S. Sato & S. Tabata, 2004. Characteristics of the *Lotus Japonicus* Gene Repertoire Deduced from Large-Scale Expressed Sequence Tag (EST) Analysis. *Plant Molecular Biology* 54(3): 405 - 414.
- Atienza, S.G., Z. Satovic, K.K. Petersen, O. Doistra & A. Martin, 2002. Preliminary genetic linkage map of *Miscanthus sinensis* with RAPD markers. *Theor Appl Genet* 105: 946-952.
- Barzen, E., W. Mechelke, E. Ritter, E. Schulte-Kappert & F. Salamini, 1995. An extended map of the sugar beet genome containing RFLP and RFLP loci. *Theor Appl Genet* 90:189–193.
- Brondani, R.P.V., C. Brondani & D. Grattapaglia, 2002. Towards a genus-wide reference linkage map for *Eucalyptus* based exclusively on highly informative microsatellite markers. *Mol Genet Genomics* 267: 338–347.

- Burow, M.D., C.E. Simpson, A.H. Paterson & J.L. Starr, 1996. Identification of peanut (*Arachis hypogaea* L.) RAPD markers diagnostic of root-knot nematode (*Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood) resistance. *Mol Breed* 2: 369-379.
- Burow, M.D., C.E. Simpson, J.L. Starr & A.H. Paterson, 2001. Transmission Genetics of Chromatin From a Synthetic Amphidiploid to Cultivated Peanut (*A. hypogaea* L.): Broadening the Gene Pool of a Monophyletic Polyploid Species. *Genetics* 159: 823-837.
- Casasoli, M., C. Mattioni, M. Cherubini & F. Villani, 2001. A genetic linkage map of european chestnut (*Castanea sativa* Mill) based on RAPD, ISSR and isozyme markers. *Theor Appl Genet* 102: 1190-1199.
- Chaubaud, M., C. Larssonnaud, C. Marmouget & T. Huguet, 1996. Transformation of Barrel Medic (*Medicago truncatula* Gaertn.) by *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration via somatic embryogenesis of transgenic plants with the MTENOD12 nodulin promoter fused to the GUS gene. *Plant Cell Report* 15: 305-310.
- Choi, H.K., D. Kim, T. Uhm, E. Limpens, H. Lim, J.H. Mun, P. Kalo, R.V. Penmetsa, A. Seres, O. Kulikova, B.A. Roe, T. Bisseling, G.B. Kiss & D.R.

Cook, 2004. A Sequence-Based Genetic Map of *Medicago truncatula* and Comparison of Marker Colinearity with *M. sativa*. *Genetics* 166: 1463–1502.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento, Disponível em:
[\[http://www.conab.gov.br/download/safra/AmendoimTotalSerieHist.xls\]](http://www.conab.gov.br/download/safra/AmendoimTotalSerieHist.xls)

Acesso em 11 fev.2005.

Cowtiz, PA., L.S. Smith & S.R. Long, 1998. Expressed sequence tags from a root-hair enriched *Medicago truncatula* cDNA library. *Plant Physiology* 117: 1325-1332.

Creste, S., S. Mui Tsai, J.F.M. Valls, M.A. Gimenes & C.R. Lopes, 2005. Genetic characterization of Brazilian annual *Arachis* species from sections *Arachis* e *Heterantheae* using RAPD Markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 52: 1079-1086.

Faleiro, F.G., V.A. Ragagnin, I. Schuster, R.X. Corrêa, P.I. Good-God, S.H. Brommonshenkel, M.A. Moreira & E.G. Barros, 2003. Mapeamento de genes de resistência do feijoeiro à ferrugem, antracnose e mancha-angular usando marcadores RAPD. *Fitopatologia Brasileira* 28: 059-066.

Fávero, A. P., 2004. Cruzabilidade entre espécies silvestres de *Arachis* visando a introgressão de genes de resistência a doenças no amendoim cultivado.

Piracicaba, 165 p. Tese (Doutorado) Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Universidade de São Paulo.

Ferguson, M.E., M.D. Burow, S.R. Schulze, P.J. Bramel, A.H. Paterson, S. Kresovich & S. Mitchell, 2004. Microsatellite identification and characterization in peanut (*A. hypogaea* L.). *Theor Appl Genet* 108: 1064-1070

Ferreira, A.R., K.R. Foutz & P. Kein, 2000. Soybean genetic map of RAPD markers assigned to an existing scaffold RFLP map. *The American Genetic Association* 91: 392-396.

Ferreira, M. E. & D. Grattapaglia, 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Embrapa. 3ª.Ed. Brasília: Embrapa-CENARGEN.

Fernández, A. & A. Krapovickas, 1994. Cromosomas y evolucion em *Arachis* (Leguminosae). *Bonplandia* 8: 127-220.

Gamas, P., F.D. Niebel, N. Lescure & J.V Cullimore, 1996. Use of a subtractive hybridization approach to identify new *Medicago truncatula* genes induced during root nodule development. *Mol Microbe Interact* 9: 233-242.

- Garcia, G.M., H.T. Stalker & G. Kochert, 1995. Introgression analysis of an interspecific hybrid population in peanuts (*Arachis hypogaea*L.) usando RFLP and RAPD markers. *Genome* 38: 166-176.
- Garcia, G.M., H.T. Stalker, E. Shoroeder & G. Kochert, 1996. Identification of RAPD, SCAR, and RFLP markers tightly linked to nematode resistance genes introgressed from *Arachis cardenasii* into *Arachis hypogaea*. *Genome* 39: 836-845.
- Gimenes, M.A., C.R. Lopes, M.L. Galgaro, J.F.M. Valls & G. Kochert, 2000. Genetic variation and phylogenetic relationships based on RAPD analysis in *Caulorrhizae*, genus *Arachis* (Leguminosae). *Euphytica* 116: 187-195.
- Gimenes, M.A., C.R. Lopes, M.L. Galgaro & J.F.M. Valls, 2002. Genetic relationships among *Arachis* species based on AFLP. *Genetics and Molecular Biology* 25 (3): 349-353.
- Gobbi., A., C. Texeira, M. Moretzsohn, P. Guimarães, S. Leal-Bertioli, D. Bertioli, C.R. Lopes & M. Gimenes, 2006. Development of a linkage map to species of B genome related to the peanut (*Arachis hypogaea* – AABB). Artigo em elaboração

- Grattapaglia, D. & R. Sederoff, 1994. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD markers. *Genetics* 137: 1121-1137.
- Grieshammer, U. & J.C. Wynne, 1990. Isozyme variability in mature seeds of U.S. peanut cultivars and collections. *Peanut Sci* 18: 72–75.
- Györgyey, J., D. Vaubert, J.I. Jimenez'Zurdo, C. Charon, L. Troussard, A. Kondorosi & E. Kondorosi, 2000. Analysis of *Medicago trunculata* nodule expresses tags. *Mol Plant Microbe Interact* 13: 62-71.
- Hall, M.C. & J.H. Willis, 2005. Transmission ratio distortion in intraspecific hybrids of *Mimulus guttatus*: Implication for genomic divergence. *Genetics* 170: 373-386.
- Halward, T.M., H.T. Stalker, E.A. Larue & G. Kochert, 1991. Genetic variation detectable with molecular markers among unadapted germplasm resources of cultivated peanut and wild species. *Genome* 34: 1013-1020.
- Halward, T., T. Stalker, E. LaRue & G. Kochert, 1992. Use of singleprimer DNA amplifications in genetic studies of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Mol Biol* 18: 315– 325.

- Halward, T., H.T. Stalker & G. Kochert, 1993. Development of an RFLP linkage map in diploid peanut species. *Theor Appl Genet* 87: 379-384.
- He, G. & C.S. Prakash, 1997. Identification of polymorphic DNA markers in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Euphytica* 97: 143-149.
- He, G., R. Meng, H. Gao, B. Guo, G. Gao, M. Newman, R. Pittman & C.S. Prakash, 2005. Simple sequence repeat markers for botanical varieties of cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Euphytica* 142: 131-136.
- Herselman, L., 2003. Genetic variation among Southern African cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes as revealed by AFLP analysis. *Euphytica* 133: 319-327.
- Herselman, L., R. Thwaites, F.M. Kimmins, B. Courtois, P.J.A. Van Der Merwe & S.E. Seal, 2004. Identification and mapping of AFLP markers linked to peanut (*Arachis hypogaea* L.) resistance to the aphid vector of groundnut rosette disease. *Theor Appl Genet* 109: 1426-1433.
- Hopkins, M.S., A.M. Casa, T. Wang, S.E. Mitchell, R.E. Dean, G.D. Kochert & S. Kresovich, 1999. Discovery and characterization of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in peanut. *Crop Sci* 39: 1243-1247.

- Iruela, M., J. Rubio, F. Barro, J.I. Cubero, T. Millán & J. Gil, 2006. Detection of two an intra-specific cross of chickpea (*Cicer arietinum* L.): development of SCAR markers associated with resistance. *Theor Appl Genet* 112: 278-287.
- Jung, S., P.L. Tate, R. Horn, G. Kochert, K. Moore & A.G. Abbott, 2003. The phylogenetic relationship of possible progenitors of the cultivated peanut. *Journal of Heredity* 94(4): 334-340.
- Junghans, D.T., A.C. Alfenas, S.H. Brommonschenkel, S. Oda, E.J. Melo & D. Grattapaglia, 2003. Resistance to rust (*Puccinia psidii* Winter) in *Eucalyptus*: mode of inheritance and mapping of a major gene with RAPD markers. *Theor Appl Genet* 108: 175-180.
- Kameswara Rao, N., L.J. Reddy & P.J. Bramel, 2003. Potential of wild species for genetic enhancement of some semi-arid food crops. *Genetic Resources and Crop Evolution* 50: 707-721.
- Kawaguchi M., H. Imaizumi-Anraku, H. Koiwa, S. Niwa, A. Ikuta, K. Syono & S. Akao, 2002. Root, Root Hair, and Symbiotic Mutants of the Model Legume *Lotus japonicus*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 1: 17-26.
- Kochert, G., T. Halward, W.D. Branch & C.E. Simpson, 1991. RFLP variability in peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars and wild species. *Theor Appl Genet.* 81: 565-570.

- Kochert, G., H.T. Stalker, M. Gimenes, L. Galgaro, C.R. Lopes & K. Moore, 1996. RFLP and cytogenetic evidence on the origin and evolution of allotetraploid domesticated peanut *Arachis hypogaea* (Leguminosae). *Amer Jour Bot* 83: 1282-1291.
- Koveza, O., Z. Kokaeva, F. Konovalov & S. Gostimsky, 2005. Identification and mapping of polymorphic RAPD markers of pea (*Pisum sativum* L.) genome. *Russian Journal of Genetics* 41: 262-268.
- Krapovickas, A. & W.C. Gregory, 1994. Taxonomia del genero *Arachis* (Leguminosae). *Bonplandia* 8: 1-186.
- Men, A.E., K. Meksem, M.A. Kassem, D. Lohar, J. Stiller D. Lightfoot & P.M. Greeshoff, 2001. A Bacterial Artificial Chromosome Library of *Lotus japonicus* Constructed in an *Agrobacterium tumefaciens*-Transformable vector. *Molecular Plant Microbe Interactions* 14: 422-425.
- Michelmore, R.W., I. Paran & R.V. Kesseli, 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 9828-9832.

- Moretzsohn, M.C., M.S. Hopkins, S.E. Mitchell, S. Kresovich, J.F.M. Valls & M.E. Ferreira, 2004. Genetic diversity of peanut (*Arachis hypogaea* L.) and its wild relatives based on the analysis of hypervariable regions of the genome. *BMC Plant Biol* 4(11): 1-10.
- Moretzsohn, M.C., L. Leoi, K. Proite, P.M. Guimarães, S.C.M. Leal-Bertioli, M.A. Gimenes, W.S. Martins, J.F.M. Valls, D. Grattapaglia & D.J. Bertioli, 2005. A microsatellite-based, gene-rich linkage map for the AA genome of *Arachis* (Fabaceae). *Theor Appl Genet* 111: 1060-1071.
- Nakamura, Y., T. Kaneko, E. Asamizu, T. Kato, S. Sato & S. Tabata, 2002. Structural Analysis of a *Lotus japonicus* Genome. II. Sequence Features and Mapping of Sixty-five TAC Clones Which Cover the 6.5-Mb Regions of the Genome. *DNA Research* 9: 63–70.
- Nam, YW., R.V. Penmetsa, G. Endre, P. Uribe, D.J. Kim & D.R. Cook, 1999. Construction of a bacterial artificial chromosome library of *Medicago truncatula* and identification of clones containing ethylene-response genes. *Theor Appl Genet* 98: 638-646.
- Oliveira, R.P., M. Cristofani & M.A. Machado, 2004. Genetic linkage maps of 'Pêra' sweet orange and 'Cravo' mandarin with RAPD markers. *Pesq Agropec Bras* 39: 159-165.

- Openshaw, S.J., S.G. Jarboe & W.D. Beavis, 1994. Marker-assisted selection in backcross breeding. In: ASHS/CSSA Joint Plant Breeding Symposium, 2, Corvallis Proceedings. Corvallis: Oregon State University.
- Palmieri, D.A.; M.D. Bechara, R.A. Curi, M.A. Gimenes & C.R. Lopes, 2004. Isolation and characterization of microsatellite loci from forage species *Arachis pintoi* (Genus *Arachis*). Mol Ecol Notes 1–3.
- Pande, S. & J. Narayana Rao, 2001. Resistance of wild *Arachis* species to late leaf spot and rust in greenhouse trials. Plant Diseases. 85: 851-855.
- Penmetsa, R.V. & D.R. Cook, 1997. A legume ethylene insensitive mutant hyperinfected by its rhizobial symbiont. Science 1997, 225: 527-530.
- Perry, JA., T.L. Wang, T.J. Welahm, S. Gardner, J.M. Pike, S. Yoshida & M. Parniske, 2003. A tilling reverse genetics tool and a web-accessible collection of mutants of the legume *Lotus japonicus*. Plant Physiology 131: 866-871.
- Quillet, MC., N. Madjidian, Y. Griveau, H. Serieys, M. Tersac, M. Lorieux & A. Berville 1995. Mapping genetic factors controlling pollen viability in an interspecific cross in *Helianthus* sect. *Helianthus*. Theor Appl Genet 91:1195–1202.

- Sagan, M., D. Morandi, E. Tarngi & G. Duc, 1995. Selections of nodulation and mycorrhizal mutants in the model plant *Medicago truncatula* Gaerth after gamma rays mutagenesis. *Plant Science* 111: 63-71.
- Sandal, N., L. Krusell, S. Radutoiu, M. Olbyrt, A. Pedrosa, S. Stracke, S. Sato, T. kato, S. Tabata M. Parniske A. Bachmair T. Ketelsen & J. Stougaard, 2002. A genetic linkage map of the model legume *Lotus japonicus* and strategies for fast mapping of new loci. *Genetics* 161: 1673-1683.
- Santos, A.S., R.E. Bressan-Smith, M.G. Pereira, R. Rodrigues & C.F. Ferreira, 2003. Genetic linkage map of *Phaseolus vulgaris* and identification of QTLs responsible for resistance to *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli*. *Fitopatologia Brasileira* 28: 5-10.
- Santra, D.K., M. Tekeoglu, M. Ratnaparkhe, W.J. Kaiser & F.J. Muehlbauer, 2000. Identification and mapping of QTLs conferring resistance to aschyta blight in chickpea. *Crop Sci.* 40: 1606-1612.
- Sargent, D.J.; T.M. Davis, K.R. Tobutt, M.J. Wilkinson, N.H. Battey & D.W. Simpson, 2004. A genetic linkage map of microsatellite, gene-specific and morphological markers in diploid *Fragaria*. *Theor Appl Genet* 109: 1385-1391.

- Seijo, J.G., G.I. Lavia, A. Fernandez, A. Krapovickas, D. Ducasse & E.A. Moscone, 2004. Physical mapping of the 5s and 18s-25s rRNA genes by FISH as evidence that *Arachis duranensis* and *A. ipaënsis* are the wild diploid progenitors of *A. hypogaea* (Leguminosae). *Amer Jour Bot* 91(9): 1294-1303.
- Sharma, R., R.A.K. Aggarwal, R. Kumar, T. Mohapatra & R.P. Sharma, 2002. Construction of an RAPD linkage map and localization of QTLs for oleic acid level using recombinant inbreds in mustard (*Brassica juncea*). *Génome* 45(3): 467-472.
- Sharma, S.B., M.A. Ansari, K.S. Varaprasad, A.K. Singh & L.J. Reddy, 1999. Resistance to *Meloidogyne javanica* in wild *Arachis* species. *Genetic Resources and Crop Evolution* 46: 557-568.
- Shoemaker, R.C., K. Polzin, J. Labate, J. Specht, E.C. Brummer, T. Olson, N. Young, V. Concibido, J. Wilcox, J.P. Tamulonis, G. Kochert & H.R. Boerma, 1996. Genome duplication in soybean (*Glycine* subgenus soja). *Genetics* 144: 329-338.
- Singh, A.K. & J.P. Moss, 1984. Utilization of wild relatives in genetic improvement of *Arachis hypogaea* L. 5. Genome analysis in section *Arachis* and its implications in gene transfer. *Theor Appl Genet* 68: 355–364.

- Singh, A.K., H.T. Stalker & J.P. Moss, 1991. Cytogenetics and use of alien genetic variation in groundnut improvement. In: Tsuchiya, T.; Gupta, P.K. (Eds.). Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution. Part B. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V: 65-77.
- Singh, A.K., J. Smartt, C.E. Simpson & S.N. Raina, 1998. Genetic variation vis-à-vis molecular polymorphism in groundnut, *Arachis hypogaea* L. Genetic Resources and Crop Evolution 45: 1119-126.
- Singh, A.K. & J. Smartt, 1998. The genome donors of the groundnut/peanut (*Arachis Hypogaea* L.) revisited. Genetic Resources and Crop Evolution 45: 113-118.
- Subramanian, V., S. Gurtu, R.C. Nageswara Rao & S.N. Nigam, 2000. Identification of DNA polymorphism in cultivated groundnut using random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. Genome 43: 656–660.
- Stam, P., 1993. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap. Plant J 3:739-744.
- Tallury, S.P., K.W. Hilu, S.R. Milla, S.A. Friend, M. Alsaghir, H.T. Stalker & D. Quandt, 2005. Genomic affinities in *Arachis* section *Arachis*(Fabaceae): molecular and cytogenetic evidence. Theor Appl Genet 111: 1229-1237.

Tanksley, S.D., M.W. Ganai J.P. Prince, M.C. de Vicente, M.W. Bonierbale, P. Broun, T.M. Fulton, J.J. Giovannoni, S. Grandilo, G.B. Martin, R. Messeguer, J.C. Miller, L. Miller, A.H. Paterson, O. Pineda, M.S. Roder, R.A. Wing, W. Wu & N.D. Yong, 1992. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics* 132: 1141-1160.

Thoquet, P., M. Gherardi, E-P. Journet, A. Kereszt, J-M. Ane, J-M. Prospero & T. Huguet, 2002. The molecular genetic linkage map of the model legume *Medicago truncatula*: an essential tool for comparative legume genomics and the isolation of agronomically important genes. *BMC Plant Biology* 2: 1-13.

Thuriaux, P., 1977. Is recombination confined to structural gene on the eukaryotic genome? *Nature* 268: 460-462.

Trieu, A.T., S.H. Burleigh, I.V. Kardailsky, I.E. Maldonado-Mendoza, W.K. Versaw, L.A. Blaylock, H. Shin, T.J. Chiou, H. Katagi, G.R. Dewbre, D. Weige & M.J. Harrison, 2000. Transformation of *Medicago truncatula* via infiltration of seedlings or flowering plants with *Agrobacterium*. *Plant Journal* 22: 531-541.

Trinh, T.H., P. Ratet, E. Kondorosi, P. Duarnd, K. Kamate, P. Bauer & A. Kondorosi, 1998. Rapid and efficient transformation of diploid *Medicago*

truncatula and *Medicago sativa* spp falcate lines improved in somatic embryogenesis. Plant Cell Report 17: 345-355.

Valls, J.F.M. & C.E. Simpson, 2005. New species of *Arachis* (Leguminosae) from Brazil, Paraguay and Bolivia. Bonplandia 14(1-2): 35-63.

Winters, C.J., L. Zimniak, M.V. Mikhailova, W.B. Reeves & T.E. Andreoli, 2000. Cl⁻ Channels in Basolateral TAL Membranes XV. Molecular Heterogeneity Between Cortical and Medullary Channels. J. Membrane Biol 177: 221–230.

Tabela 1. Seqüências e temperatura de anelamento dos “primers” microssatélites utilizados na genotipagem dos indivíduos da população mapa.

| Locos | Primer Forward (5´-3´) | Primer reverse (5´-3´) | Motivo | T.A. | Referências |
|---------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------|-------------|-------------------------|
| Ah282 | gccaaacacaccacatttca | Gcctccaatcccaaacta | (CCA)6..(AAG)6 | 50°C | Gimenes (não publ) |
| IBGSI1007G04 | tgcaagaagatcaaaaagca | Tctgcacaacctgtttca | | 52°C | Gimenes (não publ) |
| Ap175 | cccaataggctaattcagaagg | gccttatttgcgactgagg | (CT)15 | 52°C | Palmiere et al., 2004 |
| GPSeg2G05 | aggaggaacaatcccatagaa | tacattacgcccttttggtg | (TAA)9 + (CAA)5 | 60°C | Moretzsohn at al., 2005 |
| Ah280 | cgtcctcgttattctctgaa | tctctgaattgaagaagagttatg | (CA)14..(CA)5 | 52°C | Gimenes (não publ) |
| Ap152 | agaggatgcagcggagtaga | ctggccaattcctatgatcg | (AG)23 | 50°C | Gimenes (não publ) |
| Ah1TC1G04 | tgctgtgagagaaatggcag | gcgcattctcgattaaagg | (TTC)5 + (TC)33 | 56°C | Moretzsohn (prelo) |
| AHBGSI1002D04 | cggggatgttgctcatgctc | atggctccaagcagtgtagaa | | 52°C | Gimenes (não publ) |
| AS1RN27A10 | | | | 52°C | Moretzsohn (não publ) |
| Ah35 | gtaaagtctaacaataaccacaa | ccccaaggggaatagtggtgta | (AT)19(GA)16 | 52°C | Gimenes (não publ) |
| Ah126 | ccctgccactctcactcact | cgtacaagtcagggggtgac | (GA)8..(GA)9 | 50°C | Gimenes (não publ) |
| Ah21 | cttgagtgagggatgaaa | ctcactcactcgacctaacc | (GAA)9 | 50°C | Moretzsohn at al., 2005 |
| PPGPSeg4B09 | aaacatccagcaaacgaaga | gacaactaaatcctgttcttagc | (CA)7 | 56°C | Moretzsohn (não publ) |

Tabela 2. Informações sobre cada um dos 12 grupos de ligação obtidos com um "LOD score" de 4,0 e recombinação de 0,3.

| Grupos de ligação (GL) | Número de marcadores | Marcadores de segregação (3:1) | Marcadores de segregação (1:1) | Marcadores microsatélites | Marcadores distorcidos | Nº. de marcadores (RAPDs) do parental feminino A. <i>ipaënsis</i> | Nº. de marcadores (RAPDs) do parental masculino A. <i>magna</i> | Distância média entre os marcadores (cM) | Comprimento do grupo (cM) |
|------------------------|----------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------|------------------------|---|---|--|---------------------------|
| 1 | 24 | 18 | 1 | 2 | 3 | 16 | 6 | 15,4 | 369,6 |
| 2 | 22 | 17 | 0 | 1 | 4 | 10 | 11 | 14,8 | 326,0 |
| 3 | 17 | 14 | 0 | 1 | 2 | 8 | 8 | 15,5 | 265,7 |
| 4 | 16 | 16 | 0 | 0 | 0 | 10 | 6 | 14,2 | 228,3 |
| 5 | 14 | 14 | 0 | 0 | 0 | 5 | 9 | 15,5 | 217,4 |
| 6 | 14 | 8 | 1 | 3 | 2 | 5 | 6 | 13,8 | 194,3 |
| 7 | 15 | 11 | 1 | 1 | 2 | 9 | 5 | 12,3 | 185,5 |
| 8 | 11 | 10 | 0 | 0 | 1 | 3 | 8 | 10,1 | 110,8 |
| 9 | 7 | 7 | 0 | 0 | 0 | 2 | 5 | 13,8 | 97,2 |
| 10 | 3 | 2 | 0 | 0 | 1 | 1 | 2 | 9,2 | 27,6 |
| 11 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 13,4 | 26,9 |
| 12 | 2 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 5,9 | 11,9 |
| | 147 | 120 (80,95%) | 3 (2,04 %) | 8 (5,44%) | 16 (10,88%) | 71 (51,07%) | 68 (48,93%) | x =12,8 | 2.061,2 |

Tabela 3. Informações sobre os marcadores RAPD e microssatélites distorcidos.

| GL | Número de marcadores | Marcadores RAPD | Marcadores microssatélites | Marcadores distorcidos | Marcadores (RAPDs) distorcidos em <i>A. ipaënsis</i> | Marcadores (RAPDs) distorcidos em <i>A. magna</i> | Marcadores microssatélite distorcidos |
|----|----------------------|-----------------|----------------------------|------------------------|--|---|---------------------------------------|
| 1 | 24 | 22 | 2 | 3 | 2 | 1 | 0 |
| 2 | 22 | 21 | 1 | 4 | 3 | 1 | 0 |
| 3 | 17 | 16 | 1 | 3 | 1 | 1 | 0 |
| 4 | 16 | 16 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | 14 | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | 14 | 11 | 3 | 2 | 2 | 0 | 0 |
| 7 | 15 | 14 | 1 | 2 | 1 | 1 | 0 |
| 8 | 11 | 11 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 9 | 7 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 3 | 3 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 11 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 12 | 2 | 2 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| | 147 | 139(94,56%) | 8(5,44%) | 16 (10,88%) | 10 (62,5%) | 6 (37,5%) | 0% |

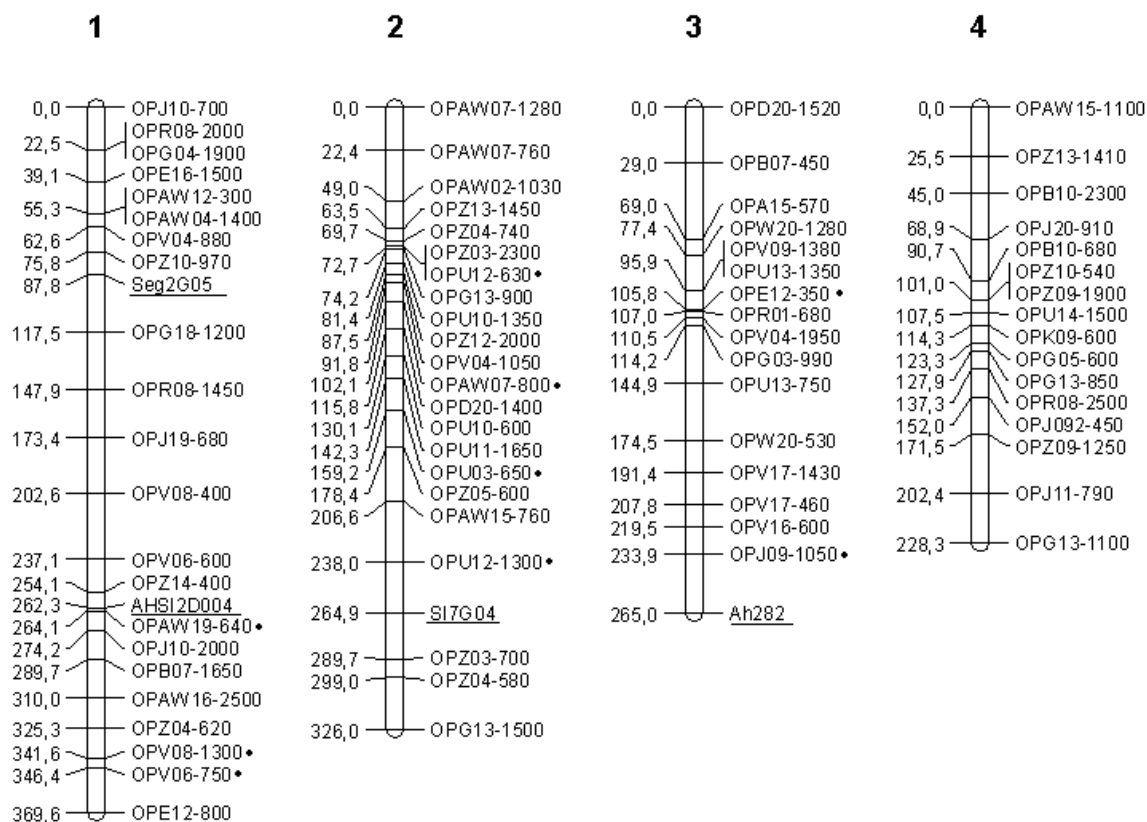
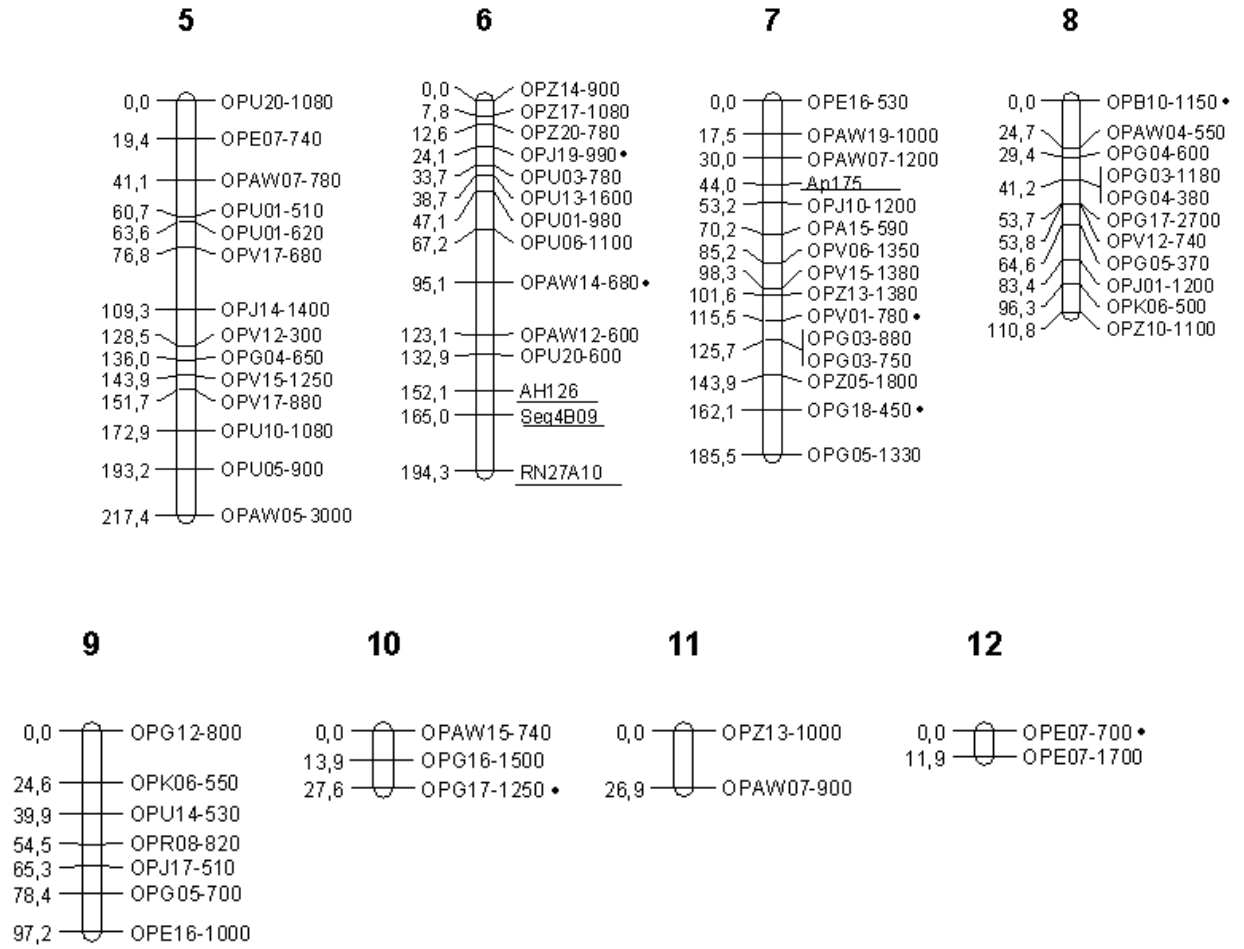


Figura 1. Mapa de ligação desenvolvido para genoma B do amendoim utilizando marcadores moleculares RAPD em uma população F_2 de 108 indivíduos obtida pela autofecundação de um híbrido F_1 resultante do cruzamento entre duas espécies silvestres (*A. ipaënsis* e *A. magna*). Um total de 147 marcadores (139 RAPDs e 8 microssatélites) foi mapeado em 12 grupos de ligação, cobrindo 2.061,2 cM do genoma, utilizando um LOD score de 4.0 e uma frequência de recombinação de 0,30. Os marcadores foram identificados usando a nomenclatura tradicional para o RAPD que é o nome do “primer” seguido do tamanho do fragmento. Os marcadores com segregação distorcida foram identificados no mapa com um ponto (•) e os marcadores microssatélites foram sublinhados.



Continuação figura 1.

Artigo em inglês

Abstract

Arachis hypogaea L. (peanut) is one of the four most important oilseed crops in the world. Linkage maps of *A. hypogaea* are difficult to be constructed because this species presents extremely low levels of polymorphism, as detected by the use of several different molecular markers. An alternative to obtain information about its genome is the utilization of wild species of *Arachis* presenting genomes similar to that of *A. hypogaea*. These species present high levels of genetic polymorphism, traits of agronomic interest, such as resistance against important pathogens, and high cross-ability. In this work we present a linkage map constructed based on a F₂ population of 108 individuals resulting from the cross between two wild species of *Arachis* [*A. ipaënsis* (KG30076) e *A. magna* (KG30097)] presenting the B genome similar to that of *A. hypogaea*. This species showed to be very close related, as the polymorphism level observed between than was very low (23.6%). We obtained a linkage map with 139 RAPD markers and 8 microsatellite markers distributed onto 12 linkage groups and covering a distance of 2,061.2 cM of the genome, with an average distance between markers of 12,8 cM. This is the first linkage map of *Arachis* species possessing the B genome and close related to *A. hypogaea* constructed via RAPD markers. The development of linkage maps is a first step in the integration of the biotechnologies to the genetic improvement via wild species of peanuts.

1. Introduction

Arachis hypogaea L. (peanut) is one of the four most important oilseed crops in the world. It is mainly cultivated in developing countries from Africa and Asia. These countries are responsible for approximately 80% of world's production, which was estimated in 34,198 million tons in the year of 2004 (Agriannual, 2005). In 2004 and 2005, Brazil cultivated 129.5 thousands of hectares of peanut (CONAB, 2005), contributing with 0.6% of world's production.

The cultivated peanut is an allotetraploid (AABB). It was originated via hybridization of two diploid wild species, followed by a rare spontaneous duplication of chromosomes (Halward et al., 1991; Shoemaker et al., 1996).

The genus *Arachis* contains 80 species (Valls & Simpson, 2005) assembled into nine sections. *Arachis hypogaea* belongs to the section *Arachis*, which encompasses 31 species, most of them diploid, with genomes classified as A, B or D. The species presenting the A genome are very close related to each other. For example, hybrids between *A. duranensis* x *A. kempff-mercadoi* presented 72% of pollen fertility (Tallury et al., 2005). Interspecific hybrids between A genome species presented 10 bivalents in the meiosis (Singh & Moss, 1984; Tallury et al., 2005). However, within the B genome species, the crossability is very variable. Crossings between *A. batizocoi* and *A. ipaënsis* resulted in low fertility hybrids (Tallury et al., 2005), while crossings between *A. ipaënsis* and *A. magna* produced highly fertile hybrids (Gobbi et al., 2006).

Cytogenetic (Fernández & Krapovickas, 1994) and molecular data (Gimenes et al., 2000; Jung et al., 2003; Moretzsohn et al., 2004) suggest that the

relationships among the wild diploid species and *A. hypogaea* are very variable. However, different kind of evidences (Kochert et al., 1991; Krapovickas & Gregory, 1994; Fernández & Krapovickas, 1994; Kochert et al., 1996; Jung et al., 2003; Seijo et al., 2004; Fávero, 2004) indicates that *A. duranensis* and *A. ipaënsis* as the putative donors of the A and B genomes of *A. hypogaea*, respectively, being, this way, the species most closely related to the cultivated peanut.

Genetic improvement of peanut has been made through its primary gene pool (lineages, cultivars), however these processes presents some limitations, such as the low genetic variability for valuable agronomic traits (Halward et al., 1991) and the low molecular polymorphism among the accessions of *A. hypogaea* (Grieshammer & Wynne, 1990; Kochert et al., 1991; Halward et al., 1992; He & Prakash, 1997; Singh et al., 1998; Hopkins et al., 1999; Subramanian et al., 2000; Herselman, 2003; Ferguson et al., 2004; Moretzsohn et al., 2004; Herselman et al., 2004; He et al., 2005). This severely reduces the utilization of molecular markers to development of linkage maps and the identification of QTLs in this species. This way, the secondary gene pool of *A. hypogaea*, which encompasses the wild species of the section *Arachis*, and where high levels of resistance against economically important pathogens can be found (Sharma et al., 1999; Pande & Narayana Rao, 2001; Subrahmanyam et al., 2001; Kameswara Rao et al., 2003), is of great importance for peanut genetic improvement. As these species are closely related to *A. hypogaea* (Krapovickas & Gregory, 1994), interspecific crosses are facilitated. The secondary gene pool presents high levels of polymorphism, which are easily detected by different molecular markers such as

RFLP (Halward et al., 1991), RAPD (Gimenes et al., 2000; Creste et al., 2005), AFLP (Gimenes et al., 2002) and microsatellites (Moretzsohn et al., 2004).

The transferability of desired traits from wild species to the cultivated peanut can be achieved by crossings with diploid species or synthetic allopolyploids from crossings among diploid species. However, undesirable traits, such as low yielding and low seed quality, are also transferred to the progenies. Moreover, genes of interest and undesirable genes can be linked, and several generations would be necessary to break these linkages. In *Arachis*, the resistance against pathogens is usually associated to undesirable agronomic traits (Singh et al., 1991).

The utilization of wild *Arachis* species in the peanut genetic improvement can be facilitated by the identification of molecular markers linked to genes or chromosome regions of interest. This would allow the monitoring of the presence of the gene or allele of interest and the selection of individuals more similar to the recurrent genotype. The number of backcrosses necessary to the recovering of the recurrent genotype would be greatly reduced, facilitating the development of new varieties (Openshaw et al., 1994).

The use of molecular markers for gene introgression in *Arachis hypogaea* has been showing promising results. Garcia et al. (1995), utilizing RFLPs and RAPDs markers, identified the introgression of chromosomes segments of AA genome from *A. cardenasii* in *A. hypogaea*. Markers linked to resistance genes against nematodes were also identified (Garcia et al., 1996).

The identification of molecular markers linked to interest genes can be achieved by bulk analyses or linkage mapping. The “Bulked segregant analysis” (BSA) method was developed by Michelmore et al. (1991). It is a fast method for

the identification of markers linked to specific regions of the genome, based on the construction of two bulks of contrasting DNA, obtained from a segregant population of the same crossing. One bulk is composed of an assemblage of individuals presenting the desirable trait, and the other is composed of individuals that did not present the desirable trait. All the individuals of a bulk share the same genomic region that contain the gene of interest, and are segregant for the other regions. The marker that co-segregates with the bulks will probably be linked to the evaluated trait.

Linkage maps require a higher number of markers (on the average, 2.5 to 6.0cM between markers) and the analysis of each individual of the population. However, this method is considered a very powerful tool in plant breeding (Faleiro et al., 2003). Linkage maps allow the complete analyses of genomes, the decomposition of complex traits in its Mendelian components, the localization of genomic regions that regulates important traits, the quantification of the effects of each region over the studied characteristic and the use of all this information for breeding programs (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Despite its usefulness, it is difficult to obtain linkage maps of *A. hypogaea*, as it presents extremely low levels of polymorphism, as detected by the use of several different molecular markers (Grieshammer & Wynne, 1990; Kochert et al., 1991; Halward et al., 1992; He & Prakash, 1997; Singh et al., 1998; Hopkins et al., 1999; Subramanian et al., 2000; Herselman, 2003; Herselman et al., 2004; Ferguson et al., 2004; Moretzsohn et al., 2004; He et al., 2005). The alternative is the utilization of wild species of *Arachis* presenting genomes similar to that of *A. hypogaea*, once these species present high levels of genetic polymorphism

(Gimenes et al., 2000; Moretzsohn et al., 2004; Gimenes et al., 2002; Creste et al., 2005), traits of agronomic interest (Sharma et al., 1999; Pande & Narayana Rao, 2001; Kameswara Rao et al., 2003), and high cross-ability (Fávero, 2004; Tallury et al., 2005), providing a F₂ population useful to linkage maps construction, obtained from highly contrasting parentals.

In *Arachis*, a few linkage maps have been published. Halward et al. (1993) developed an RFLP-based map using an F₂ population derived from a cross between two diploid wild species with A genome (*A. stenosperma* and *A. cardenasii*). A total of 117 loci were mapped in 11 linkage groups. Burow et al. (1996) developed a lineage (TxAg-7) by crossing *A. hypogaea* var. *Florunner* with [*A. batizocoi* x (*A. cardenasii* x *A. diogoi*)]x4. This lineage was used as parental to generate a population (BC4F₂), which was utilized to identify three RAPD markers associated to the resistance against nematodes.

Another RFLP-based map was published for a tetraploid population (Burow et al., 2001). A synthetic amphidiploid *A. batizocoi* x (*A. cardenasii* x *A. diogoi*), was used as donor parent, and crossed with *A. hypogaea* to generate a population of 78 individuals. Three hundred seventy RFLP loci were mapped onto 23 linkage groups, covering 2,210 cM of the genome. The authors observed that the chromatin from the A genome formed mosaic chromosomes, reflecting the recombination that occurred in the interspecific F₁ hybrid. The data showed also that the recombination among the chromosomes in the tetraploid progeny was similar to the chromosome pairing among chromosomes of the same genome reported to *A. hypogaea*.

Recently, AFLP and microsatellite (SSR) markers were used to construct three peanut linkage maps. Herselman et al. (2004) utilized AFLP markers to map genes of resistance to the aphid vector of groundnut rosette disease, which is the most destructive viral disease of peanut in Africa (Herselman et al., 2004). Moretzsohn et al. (2005) published a map with 170 SSR markers distributed onto 11 linkage groups and covering 1230.89 cM of the genome. They utilized a F₂ population obtained from the crossing between two diploid species with the AA genome (*A. duranensis* and *A. stenosperma*). Gobbi et al. (2005) constructed the first linkage map of the B genome of *Arachis* by the use of 94 SSR markers distributed onto 11 linkage groups and covering 754.8 cM of the genome. They utilized a F₂ population composed of 93 individuals obtained from a cross between two wild B-genome species (*A. ipaënsis* e *A. magna*). These species are closely related to the cultivated peanut (Krapovickas & Gregory, 1994). Moretzsohn et al. (2005) and Gobbi et al. (2006) mapped a significant number (36 and 24) of functional markers derived from ESTs.

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) has been used in linkage map construction in a wide range of economically important plant species, such as soybeans (Ferreira et al., 2000), mustard (Sharma et al., 2002), sorghum (Agrama et al., 2002), beans (Faleiro et al., 2003; Santos et al., 2003), eucalypt (Junghans et al., 2003), citrus (Oliveira et al., 2004), pea (; Koveza et al., 2005) and chickpea (Santra et al., 2000; Iruela et al., 2006).

The RAPD technique does not require sophisticated laboratory facilities neither previous experience in molecular techniques. However, this simple

methodology has showed to be very informative in wild species of *Arachis* (Gimenes et al., 2000; Creste et al., 2005).

1.1. Objective

The aim of this work was to construct a linkage map with RAPD markers, utilizing a F2 population obtained from the cross between *A. ipaënsis* and *A. magna* accessions, both presenting the B genome of *Arachis*. This linkage map will be utilized in the identification of QTLs (Quantitative Trait Loci) related to the resistance against economically important peanut pathogens.

2. Material and Methods

2.1. Plant material

A 108 individuals F₂ population, resulting from a self cross of an interspecific hybrid between *A. ipaensis* (KG30076, female parental) and *A. magna* (KG30097, male parental) was obtained and utilized for this study. The crosses were made by Andréa Verônica Gobbi Barbosa at the Genetic Department, Instituto de Biociências, Universidade Estadual “Julio de Mesquita Filho” (UNESP), where the research was done.

The accessions were kindly provided by Dr. José Francisco Montenegro Valls, from the Banco de Germoplasma de Espécies Silvestres de *Arachis* (wild *Arachis* species germplasm bank) of EMBRAPA-Cenargen, Brasília-FD. Plants were cultivated in greenhouse.

2.2. DNA extraction

The DNA extraction was made following the procedure described by Grattapaglia and Sederoff (1994). The concentration of the DNA was estimated through visualization on 1% agarose gels. A dilution of 5ng/μl was utilized.

2.3. PCR reactions

RAPD amplification reactions were performed in a final volume of 13 μ l, containing 3 μ l of DNA (5 ng/ μ l), 3 μ l (5 ng/ μ l) of a 10-base pair random primer (*Operon Technologies*), 0,1 μ l (5 U/ μ l) of *Taq* DNA polymerase (*Fermentas Life Sciences*), 1,04 μ l of dNTP (2,5 mM), 1,04 μ l (25 mM) of MgCl₂, 1,3 μ l of 10X *Taq* Buffer and 1,04 μ l (10mg/ml)of BSA. Reactions were performed in a PTC100 thermocycler (MJ Research, Inc., Watertown, MA, USA) with a 5-min denaturation step at 94°C followed by 40 cycles of 1-min denaturation at 92°C, 1 min annealing at 35°C, and 3 min extension at 72°C, and a final 10-min elongation step at 72°C.

Amplification products were separated by electrophoresis in 1.5% w/v agarose gels with 1x TBE buffer, stained with ethidium bromide. The gels were visualized by illumination with ultraviolet light.

Thirteen SSR markers were also used to genotype the map populations (Table 1). The markers were chosen based on the map developed by Gobbi et al. (2006). PCR reactions were performed in a final volume of 10 μ l, containing 2,0 μ l (5ng/ μ) of genomic DNA, 0,1 μ l (5 U/ μ l) of *Taq* DNA polymerase (*Fermentas Life Sciences*), 1 μ l of 10X *Taq* Buffer, 1,0 μ l of MgCl₂ (25 mM), 1 μ l of dNTP (2.5 mM), 1 μ l (10mg/ml)of BSA, 0,3 μ l of each primer. Reactions were performed in a PTC100 thermocycler (MJ Research, Inc., Watertown, MA, USA) with a 5-min denaturation step at 96°C followed by 32 cycles of 30 s denaturation at 96°C, 45 s annealing at X°C (Table 1), and 1 min extension at 72°C, and a final 10-min elongation step at 72°C.

PCR products (10 μ l) were eletrophoresed on denaturing polyacrylamide gels (6% acrylamide/bisacrylamide, 29:1, 5 M urea in TBE, pH 8.3). The gels were silver stained.

2.4. Data Analyses

The identification of polymorphic markers in the parental individuals was made through the analyses of 227 random primers. Primers that allowed the amplification of the higher polymorphic loci numbers were selected. Selected primers were analyzed in the map population. The presence/absence of each locus in each individual was represented in a data matrix as h- and kk respectively. To the SSR markers, the genotype of the parentals and of the hybrids was observed in the F2 population. The χ^2 test was utilized to verify if the genotypic frequencies obtained were according to 3:1 for RAPD and 1:2:1 for the SSR loci.

2.5. Linkage map construction

The software JoinMap (Stam, 1993) were utilized with the Kosambi function, to obtain the linkage map. We utilized a minimal LOD of 4.0 and a recombination tax of 0.30. The nomenclature of the RAPD markers was made as the usual, followed by the fragment size.

3. Results

3.1. RAPD amplifications.

Of the 227 primers tested for amplification, 86 (37.9%) do not amplified, 15 (6.6%) amplified only monomorphic loci and 126 (55.5%) amplified polymorphic loci. Of those that amplified polymorphic loci, 15 amplified only one locus while 111 (48.89%) amplified between 2 and 9 loci. Of these 111 loci, 70 were selected for the analysis in the map population, by its band intensity and repeatability. The selected primers amplified on the average 3.07 polymorphic loci, ranging from 350 to 3000 bp. These 70 primers amplified 911 loci, 215 (23.6%) of then being polymorphic between the parental species and showing segregation in the F₂ population. Of the 215 loci amplified, 118 (54.88%) presented *A. ipaënsis* alleles and 97 (45.12%) presented *A. magna* alleles.

Polymorphic loci showed to be “monoparental” (in which the allele of one of the parental individuals was detected and showed 1:1 segregation) or “biparental” (found in both parentals and showing the expected 3:1 segregation). The X² statistical analysis showed that the differences between the observed and expected frequencies were not statistically significant ($\alpha = 0,050$) in 190 (88.37%) loci. Among the remaining loci, five (2.32%) of then showed 1:1 segregation and 20 (9.30%) of then showed distorted segregation, being 11 of then from *A. ipaënsis* and nine of then from *A. magna*.

3.2. Linkage map

One hundred forty seven markers (139 RAPD and 8 microsatellites) were mapped in 12 linkage groups (Figure 1), with 4 of LOD and 0.3 of recombination. Linkage groups were sequentially numbered according to its number of markers, being the first linkage group the one with the higher number of markers. Of the 215 RAPD markers, 139 (65.04%) were mapped. Of the 13 SSR markers, 8 were mapped, being two of them (Seg2G05 e AHSI2D04) mapped in the linkage group 1, one (SI7G04) in the linkage group 2, one (Ah282) in the linkage group 3, three (AH126, Seg4B09 e RN27A10) in the linkage group 6 and one (Ap175) in the linkage group 7.

The SSR markers are underlined in the Figure 1. eighty one markers were not clustered, being 76 of them RAPD markers (47 *A. ipaënsis* from and 29 from *A. magna*) and 5 of them SSR markers. The parental origin of the 139 mapped RAPD markers is shown in Table 2. It is possible to observe that the markers of the parental individuals are in similar frequencies in each cluster.

The length of the 10 major linkage groups ranged from 27.6 cM to 369.6 cM (Table 2). The number of markers per linkage group ranged from 2 (Linkage groups 11 and 12) to 24 (Linkage group 1). Some of the markers were mapped in the same position (OPR8-2000 and OPG04-1900, OPAW12-300 and OPAW04-1400 in the linkage group 1; OPZ03-2300 and OPU12-630 in the linkage group 2; OPV09-1380 and OPU13-1350 in the linkage group 3; OPZ105-540 and OPZ09-1900 in the linkage group 4; OPG03-880 and OPG03-750 in the linkage group 7; OPG03-1180 and OPG04-380 in the Cluster 8). The distance between some of the

markers was very high. For example, OPB07-450 and OPA15-570 were mapped at a distance of 40 cM. The total distance obtained for the linkage map was 2,061.2 cM and the average distance between loci was 12.8 cM (Table 2). Some linkage groups presented markers linked at a very short distance (1.5 and 4.6 cM). Those links were observed in the linkage groups 2 and 4. In these cases, the average was 6.38 and 6.72 cM, respectively.

Of the 21 markers (20 RAPD and one SSR) that presented distorted segregation, 16 were mapped in 7 linkage group. Among the 10 major linkage groups the percentages of distorted loci ranged from 9.09% (Linkage group 8) to 33.33% (Linkage group 10, which is composed by only 3 markers). Of the 16 distorted loci, 10(62.5%) presented the *A. ipaënsis* allele in higher frequency while six (37.5%) presented the *A. magna* allele (Table 3).

Of the eight SSR markers mapped, six were mapped as expected according to the linkage map developed by Gobbi *et al.* (2006), i.e., in different clusters. (Seg2G05, SI2D04, SI7G04, Ah282, RN27A10 and Ap175) or linked together (Ah126 and Seq4B09).

4. Discussion

4.1 Loci distortion

Of the 228 individuals from the map population genotyped, 21 (9.2%) presented distortion, being 20 RAPD loci and one SSR (Ah280). The percentage of distortion was lower than that one found by Gobbi *et al.* (2006), which was of

17.7% among 94 SSR loci onto a map population also resulting from the cross between *A. ipaënsis* and *A. magna*. The percentage of distorted loci was also lower than that found by Halward et al. (1993) and Burow et al. (2001) (25%), onto populations resulting from interspecific crosses utilizing RFLP markers. It was also lower than that one obtained by Moretzsohn et al. (2005), which were of 44.13% onto a population resulting from *A. duranensis* x *A. cardenasii*, utilizing SSR markers. A wide range of distortion percentage was observed in map populations of various species (Winter et al., 2000; Atieza et al. 2002, Thoquer et al. 2002; Sargent et al., 2004). In an intraspecific cross of *Mimulus guttatus*, a model plant for ecology and evolution studies, the percentage of SSR loci distorted was 74%(Hall & Wills, 2005), higher than the percentage of distorted RAPD loci found for this species. Authors attributed the differences to the fact that SSR markers are more informative, which would make them more sensible in the detection of distorted loci. This could explain the differences observed among the present work, based mainly on RAPDs, and other linkage maps for *Arachis* that utilized codominant markers.

Evidences suggest a positive correlation between the percentage of loci distortion and the level of genomic divergence between the species utilized in the crossing (Hall & Willis, 2005). This suggests that, based on the frequency of distorted loci found in this work (RAPD) and in the work of Gobbi et al., 2005 (SSR), *A. ipaënsis* and *A. magna* are less divergent than other *Arachis* species crossed to generate linkage maps, such as *A. stenosperma* and *A. cardenasii* (Halwart et al., 1993), [*A. batizocoi* x (*A. cardenasii* x *A. diogoi*)] and *A. hypogaea* (Burow et al., 2001) and *A. stenosperma* and *A. duranensis* (Moretzsohn et al.,

2005). According to Krapovickas & Gregory (1994) *A. ipaënsis* and *A. magna* are very close related. However, Valls (personal communication, 2005) consider that *A. ipaënsis* and *A. magna* are accessions of the same species, a hypothesis corroborated by Gobbi et al. (2006), which obtained fertile hybrids by crossing these species, and detected low polymorphism between than (39.7%). Low polymorphism between these species was also found in the present work, where only 23.6% polymorphic loci were found between than. This can be considered a low polymorphism in view of the polymorphism found between other *Arachis* species utilized to construct linkage maps. For example, 51.25% of RFLP polymorphic loci were observed by Halward et al. (1993) between *A. stenosperma* and *A. cardenasii*, and 46.8% of SSR polymorphic loci were observed by Moretzsohn et al. (2005) between *A. stenosperma* and *A. duranensis*.

In the present study, of the 21 distorted loci, five were not linked to the linkage map. The other 16 loci were distributed in eight linkage groups. Evidences show that distorted markers do not cluster randomly in linkage maps, suggesting that some loci are involved in this pattern (Thoquet et al., 2002). Gobbi et al. (2006) found 18 distorted loci in 6 linkage groups, and in one of these linkage groups, five of the six distorted loci were consecutively linked.

The non-mendelian segregation patterns can reflect the fixation of deleterious alleles or structural or genetic divergences related to speciation (Halward et al., 1993); Burow et al., 2001). Alternative hypothesis are structural arrangements (Quillet et al., 1995), linkage to self-incompatibility genes (Berzen et al., 1995; Sargent *et al.*, 2004), linkage to recessive deleterious alleles (Oliveira et al., 2004), DNA-content differences (Thoquet et al., 2002) and interaction between

divergent genomes. The interactions can occur in different phases of the development and can alter genotypic frequencies of F_2 populations through meiotic drive (distortion among the viable F_1 gametophytes), gametophytes competition or pollen-pistil interaction, or differential viability of genotypic classes of F_2 zygotes (Hall & Willis, 2005). As the species utilized are autogamous (and consequently highly homozygous), the most probable causes of distortion here are structural alterations and gene divergences.

4.2. Linkage map

The number of linkage groups obtained in this work is larger than the haploid number of chromosomes found in both the parental species ($x = 10$). However, some linkage groups (10, 11 and 12) are composed by few markers and they will certainly be linked to other groups when more markers be added to this map. For example, the linkage group 10 is composed by 3 markers, being two of them from *A. ipaënsis* and one from *A. magna*.

The distance between some markers in some linkage groups were much shorter than the average distance between markers (12.8 cM). Thuriaux et al. (1997) suggests that the recombination is more intense among structural genes. Moreover, there is a suppression of recombination in telomeric and centromeric regions (Tanksley et al., 1992).

The average distance between markers (12.8 cM) indicates that the linkage map obtained presents a low saturation when compared to linkage maps of high saturation, e.g, the linkage map of *Lotus japonicus*, which is composed by 595

markers covering 376 cM, with an average distance between markers of 0.6 cM and a maximum distance between markers of 11 cM (Sandal et al., 2002). However, the average distance between markers is similar to that of some linkage maps successfully utilized for the identification of QTLs. One example is the linkage map that allowed the identification of *Ascchyta rabiei* resistance's QTLs (Santra et al., 2002). This linkage map was constructed with 106 markers, covering 981.6 cM with an average distance between markers of 8.4 cM. Another example is the linkage map that allowed the identification of QTLs related to aphid resistance in sorghum, which was constructed with 113 markers, covering 1530 cM with an average distance between markers of 13.53 cM (Agrama et al., 2002).

The linkage map obtained here presents a total length of 2,061.2 cM. The first linkage map obtained for the genus *Arachis* covered a distance of 9.1 cM, and was developed utilizing a F₂ population from *A. stenosperma* x *A. cardenasii*, both species with the A genome (Halward et al., 1993). Burow et al. (2001), utilizing a tetraploid population (AABB), constructed a linkage map composed of 23 linkage groups. This linkage map covered a distance of 2,210 cM with an average distance between markers of 6 cM. Moretzsohn et al. (2005), utilizing a F₂ population from *A. stenosperma* x *A. duranensis*, both species diploid with the A genome, constructed a linkage map with 170 SSR markers distributed in 11 linkage groups and covering a distance of 1230,89 with an average distance between markers of 7.24 cM. The distance covered in the present study was higher than the distance covered in the linkage map of the B genome constructed with the same cross utilizing SSR markers (754.8 cM) and than the other linkage maps constructed for *Arachis*. Brondani et al. (2002) observed an increase of 22% and 36% after the

inclusion of SSR markers in linkage maps of *E. grandis* and *E. urophylla* constructed through RAPD markers. Agrama et al. (2002) observed an increase of 42.61% and 36.14% in the length of a linkage map of sorghum constructed using RFLP markers after the inclusion of SSRs and RAPD. These variations in the estimation of genome size probably are due differences in the size of the populations utilized and in the criteria adopted to define the loci order (Brondani et al., 2002). Moreover, linkage maps based on F₂ populations are difficult to be constructed because the recombination among markers can only be estimated when markers are in coupling phase (Thoquet et al., 2002).

The parameters to the determinate the level of saturation and the value of a linkage map are various. Casasoli et al. (2001) concluded that the linkage map that they obtained presented a high level of saturation, once they found one cluster for each chromosome of *Castanea sativa* Mill, plus a low number of markers not linked. Thoquet et al. (2002), however, considered also the discrepancy between the F₂ map and the maps of each one of the parentals, plus the low frequency of linked. Considering the parameters cited, the results of this work, with a number of linkage groups higher than the haploid number of chromosomes, plus a high number of markers not linked, suggest that the saturation level of the map still needs improvement. Once that there are plenty SSR markers developed for *A. hypogaea* (He et al., 2003; Ferguson et al., 2004; Palmieri et al., 2004; Moretzsohn et al., 2005; Gobbi et al., 2006), and that the level of transferability of these markers for related species is high (Hopkins et al., 1999; Moretzsohn et al., 2004; Moretzsohn et al., 2005; Gobbi et al., 2006), the saturation of this linkage map will be done through this class of marker, a much more informative marker than the

dominant RAPD marker. We intend also to include anchor markers from other Leguminosae, such as *Lotus japonica* and *Medicago sativa*, model plants utilized for a wide range of genetic applications, as linkage maps (Sagan et al. 1995; Penmetsa & Cook, 1997; Perry et al., 2003; Kawaguchi et al., 2002), cDNA libraries (Cowntiz et al., 1998; Gama et al., 1996; Györgyey et al., 2000; Asamizu et al., 2004), long-insert libraries (Nam et al. 1999; Men et al., 2001; Nakamura et al., 2002; Choi et al., 2004) and efficient methods of transformation (Chabaud et al. 1996; Trinh et al., 1998; Trieu et al., 2000).

Conclusions

This is the first linkage map *Arachis* species possessing the B genome an close related to *A. hypogaea*, constructed via RAPD markers. The map was constructed mainly through bi-parental markers (3:1). This means that both parentals contributed with approximately the same number of markers (71 markers of *A. ipaënsis* and 68 of *A. magna*). The development of linkage maps is a first step in the integration of the biotechnologies to the genetic improvement via wild species of peanuts. Linkage maps allow the detection of genes of agronomic interest and the selection of progenies containing higher percentage of the recurrent parental genotype. This linkage map is also the first step in the study of important agronomic traits of *A. hypogaea*, such as the resistance to the rust caused by *Puccinia arachidis*, one of the major causes of loss in peanuts production (Pande & Narayana Rao, 2001).

6. References

- Agrama, H.A., G.E. Widle, J.C. Reese, L.R. Campbell & M. R. Tuinstra, 2002. Genetic mapping of QTLs associated with greenbug resistance and tolerance in *Sorghum bicolor*. *Theor Appl Genet* 104: 1373-1378.
- Agriannual, 2005. FNP Consultoria & AgroInformativos. www.fnp.com.br
- Asamizu, E., Y. Nakamura, S. Sato & S. Tabata, 2004. Characteristics of the *Lotus Japonicus* Gene Repertoire Deduced from Large-Scale Expressed Sequence Tag (EST) Analysis. *Plant Molecular Biology* 54(3): 405 - 414.
- Atienza, S.G., Z. Satovic, K.K. Petersen, O. Doistra & A. Martin, 2002. Preliminary genetic linkage map of *Miscanthus sinensis* with RAPD markers. *Theor Appl Genet* 105: 946-952.
- Barzen, E., W. Mechelke, E. Ritter, E. Schulte-Kappert & F. Salamini, 1995. An extended map of the sugar beet genome containing RFLP and RFLP loci. *Theor Appl Genet* 90:189–193.
- Brondani, R.P.V., C. Brondani & D. Grattapaglia, 2002. Towards a genus-wide reference linkage map for *Eucalyptus* based exclusively on highly informative microsatellite markers. *Mol Genet Genomics* 267: 338–347.

- Burow, M.D., C.E. Simpson, A.H. Paterson & J.L. Starr, 1996. Identification of peanut (*Arachis hypogaea* L.) RAPD markers diagnostic of root-knot nematode (*Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood) resistance. *Mol Breed* 2: 369-379.
- Burow, M.D., C.E. Simpson, J.L. Starr & A.H. Paterson, 2001. Transmission Genetics of Chromatin From a Synthetic Amphidiploid to Cultivated Peanut (*A. hypogaea* L.): Broadening the Gene Pool of a Monophyletic Polyploid Species. *Genetics* 159: 823-837.
- Casasoli, M., C. Mattioni, M. Cherubini & F. Villani, 2001. A genetic linkage map of european chestnut (*Castanea sativa* Mill) based on RAPD, ISSR and isozyme markers. *Theor Appl Genet* 102: 1190-1199.
- Chabaud, M., C. Larsson, C. Marmouget & T. Huguet, 1996. Transformation of Barrel Medic (*Medicago truncatula* Gaertn.) by *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration via somatic embryogenesis of transgenic plants with the MTENOD12 nodulin promoter fused to the GUS gene. *Plant Cell Report* 15: 305-310.
- Choi, H.K., D. Kim, T. Uhm, E. Limpens, H. Lim, J.H. Mun, P. Kalo, R.V. Penmetsa, A. Seres, O. Kulikova, B.A. Roe, T. Bisseling, G.B. Kiss & D.R. Cook, 2004. A Sequence-Based Genetic Map of *Medicago truncatula* and Comparison of Marker Colinearity with *M. sativa*. *Genetics* 166: 1463–1502.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento, Disponível em:

[\[http://www.conab.gov.br/download/safra/AmendoimTotalSerieHist.xls\]](http://www.conab.gov.br/download/safra/AmendoimTotalSerieHist.xls)

Acesso em 11 fev.2005.

Cowtiz, PA., L.S. Smith & S.R. Long, 1998. Expressed sequence tags from a root-hair enriched *Medicago truncatula* cDNA library. *Plant Physiology* 117: 1325-1332.

Creste, S., S. Mui Tsai, J.F.M. Valls, M.A. Gimenes & C.R. Lopes, 2005. Genetic characterization of Brazilian annual *Arachis* species from sections *Arachis* e *Heterantheae* using RAPD Markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 52: 1079-1086.

Faleiro, F.G., V.A. Ragagnin, I. Schuster, R.X. Corrêa, P.I. Good-God, S.H. Brommonshenkel, M.A. Moreira & E.G. Barros, 2003. Mapeamento de genes de resistência do feijoeiro à ferrugem, antracnose e mancha-angular usando marcadores RAPD. *Fitopatologia Brasileira* 28: 059-066.

Fávero, A. P., 2004. Cruzabilidade entre espécies silvestres de *Arachis* visando a introgressão de genes de resistência a doenças no amendoim cultivado. Piracicaba, 165 p. Tese (Doutorado) Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Universidade de São Paulo.

- Ferguson, M.E., M.D. Burow, S.R. Schulze, P.J. Bramel, A.H. Paterson, S. Kresovich & S. Mitchell, 2004. Microsatellite identification and characterization in peanut (*A. hypogaea* L.). *Theor Appl Genet* 108: 1064-1070
- Ferreira, A.R., K.R. Foutz & P. Kein, 2000. Soybean genetic map of RAPD markers assigned to an existing scaffold RFLP map. *The American Genetic Association* 91: 392-396.
- Ferreira, M. E. & D. Grattapaglia, 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Embrapa. 3ª.Ed. Brasília: Embrapa-CENARGEN.
- Fernández, A. & A. Krapovickas, 1994. Cromosomas y evolución en *Arachis* (Leguminosae). *Bonplandia* 8: 127-220.
- Gamas, P., F.D. Niebel, N. Lescure & J.V Cullimore, 1996. Use of a subtractive hybridization approach to identify new *Medicago truncatula* genes induced during root nodule development. *Mol Microbe Interact* 9: 233-242.
- Garcia, G.M., H.T. Stalker & G. Kochert, 1995. Introgression analysis of an interspecific hybrid population in peanuts (*Arachis hypogaea*L.) usando RFLP and RAPD markers. *Genome* 38: 166-176.

- Garcia, G.M., H.T. Stalker, E. Shoroeder & G. Kochert, 1996. Identification of RAPD, SCAR, and RFLP markers tightly linked to nematode resistance genes introgressed from *Arachis cardenasii* into *Arachis hypogaea*. *Genome* 39: 836-845.
- Gimenes, M.A., C.R. Lopes, M.L. Galgaro, J.F.M. Valls & G. Kochert, 2000. Genetic variation and phylogenetic relationships based on RAPD analysis in *Caulorrhizae*, genus *Arachis* (Leguminosae). *Euphytica* 116: 187-195.
- Gimenes, M.A., C.R. Lopes, M.L. Galgaro & J.F.M. Valls, 2002. Genetic relationships among *Arachis* species based on AFLP. *Genetics and Molecular Biology* 25 (3): 349-353.
- Gobbi., A., C. Texeira, M. Moretzsohn, P. Guimarães, S. Leal-Bertioli, D. Bertioli, C.R. Lopes & M. Gimenes, 2006. Development of a linkage map to species of B genome related to the peanut (*Arachis hypogaea* – AABB). Artigo em elaboração.
- Grattapaglia, D. & R. Sederoff, 1994. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD markers. *Genetics* 137: 1121-1137.
- Grieshammer, U. & J.C. Wynne, 1990. Isozyme variability in mature seeds of U.S. peanut cultivars and collections. *Peanut Sci* 18: 72–75.

- Györgyey, J., D. Vaubert, J.I. Jimenez'Zurdo, C. Charon, L. Troussard, A. Kondorosi & E. Kondorosi, 2000. Analysis of *Medicago trunculata* nodule expresses tags. *Mol Plant Microbe Interact* 13: 62-71.
- Hall, M.C. & J.H. Willis, 2005. Transmission ratio distortion in intraspecific hybrids of *Mimulus guttatus*: Implication for genomic divergence. *Genetics* 170: 373-386.
- Halward, T.M., H.T. Stalker, E.A. Larue & G. Kochert, 1991. Genetic variation detectable with molecular markers among unadapted germplasm resources of cultivated peanut and wild species. *Genome* 34: 1013-1020.
- Halward, T., T. Stalker, E. LaRue & G. Kochert, 1992. Use of singleprimer DNA amplifications in genetic studies of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Mol Biol* 18: 315–325.
- Halward, T., H.T. Stalker, & G. Kochert, 1993. Development of an RFLP linkage map in diploid peanut species. *Theor Appl Genet* 87: 379-384.
- He, G. & C.S. Prakash, 1997. Identification of polymorphic DNA markers in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Euphytica* 97: 143–149.

- He, G., R. Meng, H. Gao, B. Guo, G. Gao, M. Newman, R. Pittman & C.S. Prakash, 2005. Simple sequence repeat markers for botanical varieties of cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Euphytica* 142: 131-136.
- Herselman, L., 2003. Genetic variation among Southern African cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes as revealed by AFLP analysis. *Euphytica* 133: 319–327.
- Herselman, L., R. Thwaites, F.M. Kimmins, B. Courtois, P.J.A. Van Der Merwe & S.E. Seal, 2004. Identification and mapping of AFLP markers linked to peanut (*Arachis hypogaea* L.) resistance to the aphid vector of groundnut rosette disease. *Theor Appl Genet* 109: 1426-1433.
- Hopkins, M.S., A.M. Casa, T. Wang, S.E. Mitchell, R.E. Dean, G.D. Kochert & S. Kresovich, 1999. Discovery and characterization of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in peanut. *Crop Sci* 39: 1243–1247.
- Iruela, M., J. Rubio, F. Barro, J.I. Cubero, T. Millán & J. Gil, 2006. Detection of two an intra-specific cross of chickpea (*Cicer arietinum* L.): development of SCAR markers associated with resistance. *Theor Appl Genet* 112: 278-287.
- Jung, S., P.L. Tate, R. Horn, G. Kochert, K. Moore & A.G. Abbott, 2003. The phylogenetic relationship of possible progenitors of the cultivated peanut. *Journal of Heredity* 94(4): 334-340.

Junghans, D.T., A.C. Alfenas, S.H. Brommonschenkel, S. Oda, E.J. Melo & D. Grattapaglia, 2003. Resistance to rust (*Puccinia psidii* Winter) in *Eucalyptus*: mode of inheritance and mapping of a major gene with RAPD markers. *Theor Appl Genet* 108: 175-180.

Kameswara Rao, N., L.J. Reddy & P.J. Bramel, 2003. Potential of wild species for genetic enhancement of some semi-arid food crops. *Genetic Resources and Crop Evolution* 50: 707-721.

Kawaguchi, M., H. Imaizumi-Anraku, H. Koiwa, S. Niwa, A. Ikuta, K. Syono & S. Akao, 2002. Root, Root Hair, and Symbiotic Mutants of the Model Legume *Lotus japonicus*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 1: 17-26.

Kochert, G., T. Halward, W.D. Branch & C.E. Simpson, 1991. RFLP variability in peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars and wild species. *Theor Appl Genet.* 81: 565-570.

Kochert, G., H.T. Stalker, M. Gimenes, L. Galgaro, C.R. Lopes & K. Moore, 1996. RFLP and cytogenetic evidence on the origin and evolution of allotetraploid domesticated peanut *Arachis hypogaea* (Leguminosae). *Amer Jour Bot* 83: 1282-1291.

- Koveza, O., Z. Kokaeva, F. Konovalov & S. Gostimsky, 2005. Identification and mapping of polymorphic RAPD markers of pea (*Pisum sativum* L.) genome. Russian Journal of Genetics 41: 262-268.
- Krapovickas, A. & W.C. Gregory, 1994. Taxonomia del genero *Arachis* (Leguminosae). Bonplandia 8: 1-186.
- Men, A.E., K. Meksem, M.A. Kassem, D. Lohar, J. Stiller D. Lightfoot & P.M. Greesshoff, 2001. A Bacterial Artificial Chromosome Library of *Lotus japonicus* Constructed in an *Agrobacterium tumefaciens*-Transformable vector. Molecular Plant Microbe Interactions 14: 422-425.
- Michelmore, R.W., I. Paran & R.V. Kesseli, 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. Proc Natl Acad Sci USA 88: 9828-9832.
- Moretzsohn, M.C., M.S. Hopkins, S.E. Mitchell, S. Kresovich, J.F.M. Valls & M.E. Ferreira, 2004. Genetic diversity of peanut (*Arachis hypogaea* L.) and its wild relatives based on the analysis of hypervariable regions of the genome. BMC Plant Biol 4(11): 1-10.
- Moretzsohn, M.C., L. Leoi, K. Proite, P.M. Guimarães, S.C.M. Leal-Bertioli, M.A. Gimenes, W.S. Martins, J.F.M. Valls, D. Grattapaglia & D.J. Bertioli, 2005. A

microsatellite-based, gene-rich linkage map for the AA genome of *Arachis* (Fabaceae). *Theor Appl Genet* 111: 1060-1071.

Nakamura, Y., T. Kaneko, E. Asamizu, T. Kato, S. Sato & S. Tabata, 2002. Structural Analysis of a *Lotus japonicus* Genome. II. Sequence Features and Mapping of Sixty-five TAC Clones Which Cover the 6.5-Mb Regions of the Genome. *DNA Research* 9: 63–70.

Nam YW., R.V. Penmetsa, G. Endre, P. Uribe, D.J. Kim & D.R. Cook, 1999. Construction of a bacterial artificial chromosome library of *Medicago truncatula* and identification of clones containing ethylene-response genes. *Theor Appl Genet* 98: 638-646.

Oliveira, R.P., M. Cristofani & M.A. Machado, 2004. Genetic linkage maps of 'Pêra' sweet orange and 'Cravo' mandarin with RAPD markers. *Pesq Agropec Bras* 39: 159-165.

Openshaw, S.J., S.G. Jarboe & W.D. Beavis, 1994. Marker-assisted selection in backcross breeding. In: ASHS/CSSA Joint Plant Breeding Symposium, 2, Corvallis Proceedings. Corvallis: Oregon State University.

Palmieri, D.A.; M.D. Bechara, R.A. Curi, M.A. Gimenes & C.R. Lopes, 2004. Isolation and characterization of microsatellite loci from forage species *Arachis pintoi* (Genus *Arachis*). *Mol Ecol Notes* 1–3.

- Pande, S. & J. Narayana Rao, 2001. Resistance of wild *Arachis* species to late leaf spot and rust in greenhouse trials. *Plant Diseases*. 85: 851-855.
- Penmetsa, R.V. & D.R. Cook, 1997. A legume ethylene insensitive mutant hyperinfected by its rhizobial symbiont. *Science* 1997, 225: 527-530.
- Perry, J.A., T.L. Wang, T.J. Welahm, S. Gardner, J.M. Pike, S. Yoshida & M. Parniske, 2003. A tilling reverse genetics tool and a web-accessible collection of mutants of the legume *Lotus japonicus*. *Plant Physiology* 131: 866-871.
- Quillet, M.C., N. Madjidian, Y. Griveau, H. Serieys, M. Tersac, M. Lorieux, A. Berville 1995. Mapping genetic factors controlling pollen viability in an interspecific cross in *Helianthus* sect. *Helianthus*. *Theor Appl Genet* 91:1195–1202.
- Sagan, M., D. Morandi, E. Tarngi & G. Duc, 1995. Selections of nodulation and mycorrhizal mutants in the model plant *Medicago truncatula* Gaerth after gamma rays mutagenesis. *Plant Science* 111: 63-71.
- Sandal, N., L. Krusell, S. Radutoiu, M. Olbyrt, A. Pedrosa, S. Stracke, S. Sato, T. kato, S. Tabata M. Parniske A. Bachmair T. Ketelsen & J. Stougaard, 2002. A genetic linkage map of the model legume *Lotus japonicus* and strategies for fast mapping of new loci. *Genetics* 161: 1673-1683.

- Santos, A.S., R.E. Bressan-Smith, M.G. Pereira, R. Rodrigues & C.F. Ferreira, 2003. Genetic linkage map of *Phaseolus vulgaris* and identification of QTLs responsible for resistance to *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli*. Fitopatologia Brasileira 28: 5-10.
- Santra, D.K., M. Tekeoglu, M. Ratnaparkhe, W.J. Kaiser & F.J. Muehlbauer, 2000. Identification and mapping of QTLs conferring resistance to aschyta blight in chickpea. Crop Sci. 40: 1606-1612.
- Sargent, D.J.; T.M. Davis, K.R. Tobutt, M.J. Wilkinson, N.H. Battey & D.W. Simpson, 2004. A genetic linkage map of microsatellite, gene-specific and morphological markers in diploid *Fragaria*. Theor Appl Genet 109: 1385-1391.
- Seijo, J.G., G.I. Lavia, A. Fernandez, A. Krapovickas, D. Ducasse & E.A. Moscone, 2004. Physical mapping of the 5s and 18s-25s rRNA genes by FISH as evidence that *Arachis duranensis* and *A. ipaënsis* are the wild diploid progenitors of *A. hypogaea* (Leguminosae). Amer Jour Bot 91(9): 1294-1303.
- Sharma, R., R.A.K. Aggarwal, R. Kumar, T. Mohapatra, & R.P. Sharma, 2002. Construction of an RAPD linkage map and localization of QTLs for oleic acid

- level using recombinant inbreds in mustard (*Brassica juncea*). *Génome* 45(3): 467-472.
- Sharma, S.B., M.A. Ansari, K.S. Varaprasad, A.K. Singh & L.J. Reddy 1999. Resistance to *Meloidogyne javanica* in wild *Arachis* species. *Genetic Resources and Crop Evolution* 46: 557-568.
- Shoemaker, R.C., K. Polzin, J. Labate, J. Specht, E.C. Brummer, T. Olson, N. Young, V. Concibido, J. Wilcox, J.P. Tamulonis, G. Kochert & H.R. Boerma, 1996. Genome duplication in soybean (*Glycine* subgenus *soja*). *Genetics* 144: 329-338.
- Singh, A.K. & J.P. Moss, 1984. Utilization of wild relatives in genetic improvement of *Arachis hypogaea* L. 5. Genome analysis in section *Arachis* and its implications in gene transfer. *Theor Appl Genet* 68: 355–364.
- Singh, A.K., H.T. Stalker & J.P. Moss, 1991. Cytogenetics and use of alien genetic variation in groundnut improvement. In: Tsuchiya, T.; Gupta, P.K. (Eds.). *Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution. Part B.* Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V: 65-77.
- Singh, A.K., J. Smartt, C.E. Simpson & S.N. Raina, 1998. Genetic variation vis-à-vis molecular polymorphism in groundnut, *Arachis hypogaea* L. *Genetic Resources and Crop Evolution* 45: 1119-126.

- Singh, A.K. & J. Smartt, 1998. The genome donors of the groundnut/peanut (*Arachis Hypogaea L.*) resiset. Genetic Resources and Crop Evolution 45: 113-118.
- Subramanian, V., S. Gurtu, R.C. Nageswara Rae & S.N. Nigam, 2000. Identification of DNA polymorphism in cultivated groundnut using random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. Genome 43: 656–660.
- Stam, P., 1993. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap. Plant J 3:739-744.
- Tallury, S.P., K.W. Hilu, S.R. Milla, S.A. Friend, M. Alsaghir, H.T. Stalker & D. Quandt, 2005. Genomic affinities in *Arachis* section *Arachis*(Fabaceae): molecular and cytogenetic evidence. Theor Appl Genet 111: 1229-1237.
- Tanksley, S.D., M.W. Ganai J.P. Prince, M.C. de Vicente, M.W. Bonierbale, P. Broun, T.M. Fulton, J.J. Giovannoni, S. Grandilo, G.B. Martin, R. Messeguer, J.C. Miller, L. Miller, A.H. Paterson, O. Pineda, M.S. Roder, R.A. Wing, W. Wu & N.D. Yong, 1992. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. Genetics 132: 1141 1160.
- Thoquet, P., M. Gherardi, E-P. Journet, A. Kereszt, J-M. Ane, J-M. Prospero & T. Huguet, 2002. The molecular genetic linkage map of the model legume *Medicago truncatula*: an essential tool for comparative legume genomics

and the isolation of agronomically important genes. BMC Plant Biology 2: 1-13.

Thuriaux, P., 1977. Is recombination confined to structural gene on the eukaryotic genome? Nature 268: 460-462.

Trieu, A.T., S.H. Burleigh, I.V. Kardailsky, I.E. Maldonado-Mendoza, W.K. Versaw, L.A. Blaylock, H. Shin, T.J. Chiou, H. Katagi, G.R. Dewbre, D. Weige & M.J. Harrison, 2000. Transformation of *Medicago truncatula* via infiltration of seedlings or flowering plants with *Agrobacterium*. Plant Journal 22: 531-541.

Trinh TH., P. Ratet, E. Kondorosi, P. Duarnd, K. Kamate, P. Bauer & A. Kondorosi, 1998. Rapid and efficient transformation of diploid *Medicago truncatula* and *Medicago sativa* spp falcate lines improved in somatic embryogenesis. Plant Cell Report 17: 345-355.

Valls, J.F.M. & C.E. Simpson, 2005. New species of *Arachis* (Leguminosae) from Brazil, Paraguay and Bolivia. Bonplandia 14(1-2): 35-63.

Winters, C.J., L. Zimniak, M.V. Mikhailova, W.B. Reeves & T.E. Andreoli, 2000. Cl⁻ Channels in Basolateral TAL Membranes XV. Molecular Heterogeneity Between Cortical and Medullary Channels. J. Membrane Biol 177: 221-230.

Table 1 - Sequence and annealing temperature of the SSR primers utilized to genotype the individuals of the map population

| Loci | Primer Forward (5'-3') | Primer reverse (5'-3') | Motif | T.A. | References |
|---------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------|-------------|-------------------------|
| Ah282 | gccaaacacaccacatttca | Gcctccaatcccaaacta | (CCA)6..(AAG)6 | 50°C | Gimenes (no publ.) |
| IBGSI1007G04 | tgcaagaagatcaaaaagca | Tctgcacaacctgttttca | | 52°C | Gimenes (no publ.) |
| Ap175 | cccaataggctaattcagaagg | gccttattttgcgactgagg | (CT)15 | 52°C | Palmiere et al., 2004 |
| GPSEG2G05 | aggaggaacaatcccatagaa | tacattacgcccttttggtg | (TAA)9 + (CAA)5 | 60°C | Moretzsohn et al., 2005 |
| Ah280 | cgctctcgttattctctgaa | tctctgaattgaagaagagttatg | (CA)14..(CA)5 | 52°C | Gimenes (no publ.) |
| Ap152 | agaggatgcagcggagtaga | ctggccaattcctatgatcg | (AG)23 | 50°C | Gimenes (no publ.) |
| Ah1TC1G04 | tgctgtgagagaaatggcag | gcgcattcttcgattaaagg | (TTC)5 + (TC)33 | 56°C | Moretzsohn et al., 2005 |
| AHBGSI1002D04 | cggggatgttctcatgctc | atggctccaagcagtgtaa | | 52°C | Gimenes (no publ.) |
| AS1RN27A10 | | | | 52°C | Moretzsohn (no publ.) |
| Ah35 | gtaaagctacaataaccacaa | ccccaaggggaatagtgga | (AT)19(GA)16 | 52°C | Gimenes (no publ.) |
| Ah126 | ccctgccactctcactcact | cgtacaagtcagggggtgac | (GA)8..(GA)9 | 50°C | Gimenes (no publ.) |
| Ah21 | cttgagtgaggatgaaa | ctcactcactcgacctaacc | (GAA)9 | 50°C | Moretzsohn et al., 2005 |
| PPGPSEG4B09 | aaacatccagcaaacgaaga | gacaactaaatcctgttcttagc | (CA)7 | 56°C | Moretzsohn (no publ.) |

Table 2. Information about the 12 linkage group obtained.

| Linkage group | Number of markers | (3:1) segregation markers | (1:1) segregation markers | SSR markers | Distorted markers | Number of RAPD markers of the female parental A. <i>ipaënsis</i> | Number of RAPD markers of the male parental A. <i>magna</i> | Average distance between markers (cM) | Linkage group length (cM) |
|---------------|-------------------|---------------------------|---------------------------|-------------|-------------------|--|---|---------------------------------------|---------------------------|
| 1 | 24 | 18 | 1 | 2 | 3 | 16 | 6 | 15.4 | 369.6 |
| 2 | 22 | 17 | 0 | 1 | 4 | 10 | 11 | 14.8 | 326.0 |
| 3 | 17 | 14 | 0 | 1 | 2 | 8 | 8 | 15.5 | 265.7 |
| 4 | 16 | 16 | 0 | 0 | 0 | 10 | 6 | 14.2 | 228.3 |
| 5 | 14 | 14 | 0 | 0 | 0 | 5 | 9 | 15.5 | 217.4 |
| 6 | 14 | 8 | 1 | 3 | 2 | 5 | 6 | 13.8 | 194.3 |
| 7 | 15 | 11 | 1 | 1 | 2 | 9 | 5 | 12.3 | 185.5 |
| 8 | 11 | 10 | 0 | 0 | 1 | 3 | 8 | 10.1 | 110.8 |
| 9 | 7 | 7 | 0 | 0 | 0 | 2 | 5 | 13.8 | 97.2 |
| 10 | 3 | 2 | 0 | 0 | 1 | 1 | 2 | 9.2 | 27.6 |
| 11 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 13.4 | 26.9 |
| 12 | 2 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 5.9 | 11.9 |
| | 147 | 120 (81.63%) | 3 (2.04% %) | 8 (5.44%) | 16 (10.88%) | 71 (51.07%) | 68 (48.93%) | x =12.8 | 2.061.2 |

Table 3. Information about the distorted RAPD and SSR markers.

| Linkage group | Number of markers | RAPD markers | Microsatélites markers | Distorted markers | Distorted RAPD markers in A. | | Distorted SSR markers |
|---------------|-------------------|--------------|------------------------|-------------------|------------------------------|--------------|-----------------------|
| | | | | | <i>ipaënsis</i> | <i>magna</i> | |
| 1 | 24 | 22 | 2 | 3 | 2 | 1 | 0 |
| 2 | 22 | 21 | 1 | 4 | 3 | 1 | 0 |
| 3 | 17 | 16 | 1 | 2 | 1 | 1 | 0 |
| 4 | 16 | 16 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | 14 | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | 14 | 11 | 3 | 2 | 2 | 0 | 0 |
| 7 | 15 | 14 | 1 | 2 | 1 | 1 | 0 |
| 8 | 11 | 11 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 9 | 7 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 3 | 3 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 11 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 12 | 2 | 2 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| | 147 | 139 (94.56%) | 8 (5.44%) | 16 (10.88%) | 10 (62.5%) | 6 (37.5%) | 0 |

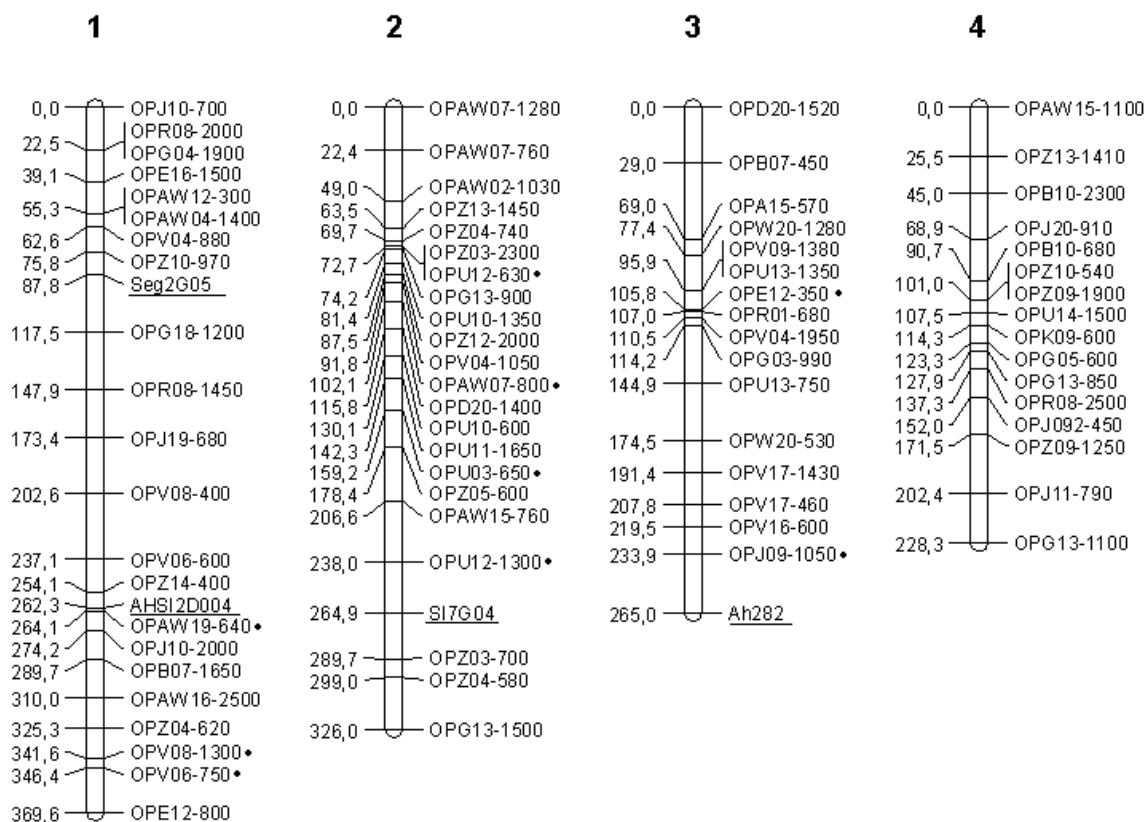
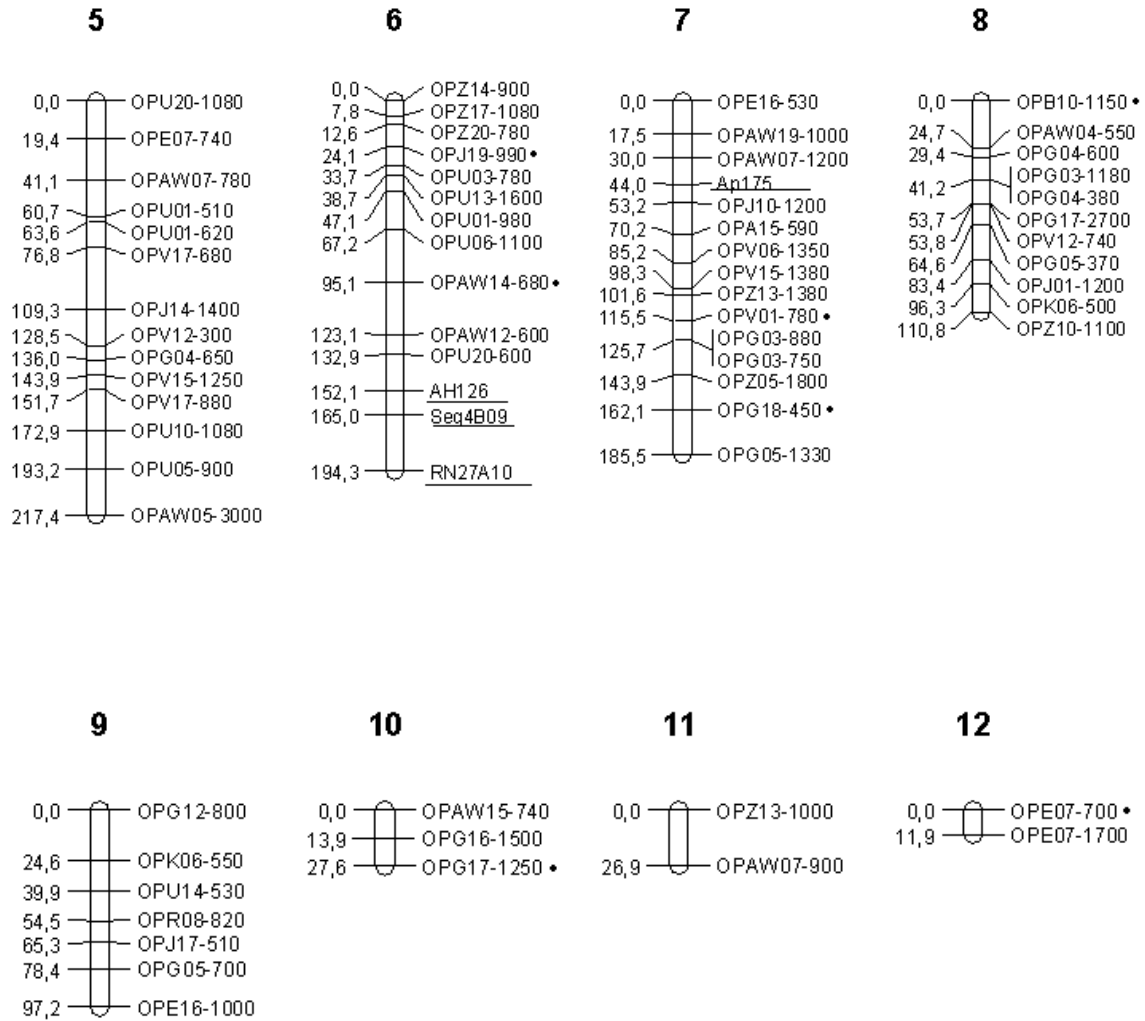


Figure 1. Linkage map developed for the B genome of peanut. A total of 147 markers (139 RAPD and 8 SSR) were mapped in 12 linkage groups, covering 2,061.2 cM of the genome, utilizing a 4.0 LOD score and a recombination frequency of 0.3. Markers are identified according to the usual nomenclature (number of the primer followed by the size of the fragment). Markers with distorted segregation are identified with a dot (•) and SSR markers are underlined.



Continuation figure 1.