

Boletim de Pesquisa 206 **e Desenvolvimento** ISSN 1676 - 340 Dezembro, 2007

Desenvolvimento e utilização de variações em um único nucleotídeo para o mapeamento de marcadores âncoras e de genes candidatos em *Arachis*



Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 206

**Desenvolvimento e utilização de
variações em um único nucleotídeo
para o mapeamento de marcadores
âncoras e de genes candidatos em
*Arachis***

**Dione MT Alves
Rinaldo W Perreira
Soraya CM Leal-Bertioli
Márcio Moretzsohn
Patrícia Guimarães
David J. Bertioli**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Serviço de Atendimento ao Cidadão
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –
Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624
<http://www.cenargen.embrapa.br>
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Sergio Mauro Folle*
Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*
Membros: *Arthur da Silva Marante*
Maria de Fátima Batista
Maurício Machain Franco
Regina Maria Dechechi Carneiro
Sueli Correa Marques de Mello
Vera Tavares de Campos Carneiro
Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*
Normalização Bibliográfica: *Maria Iara Pereira Machado*
Editoração eletrônica: *Daniele Alves Loiola*

1ª edição

1ª impressão (2007):

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

D 451 Desenvolvimento e utilização de variações em um único nucleotídeo para o mapeamento de marcadores âncoras e de genes candidatos em *Arachis* / Dione M. T. Alves ... [et al.]. -- Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.

15 p. -- (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1676 - 1340; 206).

1. *Arachis*. - genes candidatos. 2. Snp. 3. Snapshot. 4. RGA. 5. Mapeamento. I. Alves, Dione M. T. II. Série.

631.5233 - CDD 21.

Desenvolvimento e utilização de variações em um único nucleotídeo para o mapeamento de marcadores âncoras e de genes candidatos em *Arachis*

Dione MT Alves¹

Rinaldo W Perreira¹

Soraya CM Leal-Bertioli²

Márcio Moretzsohn²

Patrícia Guimarães²

David J. Bertioli¹

Resumo

O amendoim cultivado (*Arachis hypogaea* L.) é uma leguminosa de grande importância econômica. É uma espécie alotetraplóide, genoma AABB, com pouco polimorfismo e suscetível a diversas doenças. Em contrapartida, espécies silvestres diplóides com genoma AA ou BB têm diversidade genética superior e são geralmente mais resistentes. O estudo do genoma diplóide de *Arachis* é, portanto atrativo, tanto para simplificar a construção de mapas genéticos e físicos, como para a caracterização de alelos selvagens. Tendo isso em mente, neste trabalho utilizamos variações em um único nucleotídeo (SNP- *Single nucleotide polymorphism*) como marcador molecular para mapear genes candidatos em *Arachis* e a para a transferência de marcadores genéticos baseados em genes de cópia única transferíveis entre Leguminosas (marcadores âncoras), a fim de enriquecer o mapa de ligação do genoma AA. Foi testado o método extensão de uma única base, SNaPSHOT®, que se mostrou eficiente, pouco laborioso e apropriado para a aplicação em grande escala.

Palavras-Chave : genes candidatos, Snp, Snapshot, RGA, mapeamento

¹ Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Campus II, SGAN 916, CEP 70.790-160, Brasília, DF, Brasil

² Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, C.P. 02372, CEP 70.770-900, Brasília, DF, Brasil.

Abstract

The cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) is a legume of economic importance worldwide. It is an allotetraploid, with AABB genome, with low levels of polymorphism and susceptible to several diseases. Conversely, wild species have greater levels of polymorphism and are generally more resistant. The study of diploid *Arachis* genomes is, therefore, attractive, not only to simplify the construction of genetic and physical maps but also to characterize wild alleles. With this in mind, and in order to enrich the *Arachis* AA map, in this work we developed Single nucleotide polymorphisms (SNPs)-based molecular markers to map candidate genes of *Arachis*, and to transfer genetic markers based on single copy genes, that are transferable among legume species (anchor-markers). The method used (single base extension, SNaPShot®) was efficient and simple, thus suitable for large-scale analysis.

Introdução

O amendoim cultivado (*Arachis hypogaea* L.) é uma leguminosa de grande importância econômica por ser rica em proteínas, vitaminas e óleos (Savage and Keenan, 1994).

O amendoim cultivado é suscetível a diversas doenças que geram perdas econômicas para os produtores. Sua base genética é bastante estreita (Kochert et al., 1991) provavelmente devido a um evento único de alotetraploidização entre duas espécies silvestres diplóides (*A. duranensis* e *A. ipaënsis*) gerando um alotetraplóide (Seijo et al., 2004; Seijo et al., 2007). A planta resultante, contendo dois genomas distintos, conhecidos como AA e BB, é reprodutivamente isolada dos seus parentais silvestres, impedindo o fluxo do gene e a introgressão de alelos selvagens. Essa baixa variabilidade genética dificulta também o desenvolvimento de mapas genéticos, e de ferramentas necessárias para a caracterização genômica e o melhoramento molecular (Halward et al., 1991; Kochert et al., 1996; Herselman et al., 2003; Moretzsohn et al., 2004).

Por outro lado, espécies silvestres diplóide apresentam maior variabilidade genética, acumulados em milhões de anos de evolução (Burow et al., 2001; Moretzsohn et al., 2004; Milla et al., 2005), sendo rica fonte de resistência a doenças, e de alelos para a adaptação a diversos ambientes (Stalker and Simpson, 1995; Rao et al., 2003; Dwivedi et al., 2003; 2006). O estudo do genoma diplóide de *Arachis* é, portanto atrativo, tanto para simplificar a construção de mapas genéticos e físicos, como para a caracterização de alelos selvagens (Stalker et al., 1997; Guimarães et al., 2007). Pensando nisso, publicamos recentemente um mapa baseado em microssatélites para o genoma AA de *Arachis*, baseado no cruzamento entre duas espécies diplóides silvestres, *A. stenosperma* e *A. duranensis* (Moretzsohn et al., 2005). Escolhemos microssatélites por serem co-dominantes e por serem altamente transferíveis entre as espécies de *Arachis*. Outro mapa, baseado no cruzamento entre espécies silvestres diplóides com genoma BB (*A. magna* x *A. ipaënsis*) está sendo desenvolvido (não publicado).

As informações contidas nesses mapas seriam enriquecidas com o mapeamento de genes candidatos e a transferência de marcadores genéticos baseados em genes de cópia única transferíveis entre Leguminosas (marcadores âncoras). Genes candidatos são os genes que, pela homologia, expressão ou outros dados são mais prováveis de estarem localizados em regiões que controlam características de interesse agrônômicas. Embora os genes candidatos tenham valor elevado, freqüentemente apresentam níveis baixos do polimorfismo, exatamente por serem relativamente conservados.

Tendo isso em mente, neste trabalho escolhemos variações em um único nucleotídeo (SNP- *Single nucleotide polymorphism*), o mais abundante de todos os tipos de marcadores (Douabin-Gicquel et al., 2001). Embora o desenvolvimento de marcadores SNP esteja no princípio, é possível usar vários métodos, entretanto, eles tendem a ser trabalhosos, caros e difíceis de aplicar eficientemente em multiplex. Talvez para estas razões, eles foram relativamente pouco usados em genética de plantas. Neste trabalho nós testamos o método extensão de uma única base conhecida também como SNaPShot®, SNUPe, ou mini-sequenciamento (Murphy et al.,

2003) para o desenvolvendo de marcadores SNP, na qual mostramos que é eficiente e apropriado para a aplicação em grande escala.

Material e Métodos

Extração de DNA

Amostras de DNA de *A. stenosperma* V10309, *A. duranensis* K7988, do híbrido F₁ e de 93 indivíduos F₂ foram extraídos utilizando o método de Doyle and Doyle (1991) com poucas modificações. Foram extraídas também amostras de DNA de *A. magna* KG30097, *A. ipaënsis* KG30076, do híbrido F₁ e de 150 indivíduos F₂ utilizando o mesmo método.

A concentração de DNA de cada tubo foi estimada por eletroforese em gel de agarose a 1,5% de concentração, comparando-se as intensidades de fluorescência de cada amostra corada com brometo de etídio com diferentes padrões de DNA Lambda.

Amplificação por PCR

Foram amplificadas por PCR 50 seqüências EST (Expressed Sequence Tags) de *Arachis* com homologies a genes de interesse. As homologies foram selecionadas usando Blastx.

A amplificação foi realizada em um termociclador modelo Eppendorf MastersCycle com o protocolo de amplificação touchdown: 12 minutos a 95°C, seguidos inicialmente de 11 ciclos de 15 segundos a 95°C, 15 segundos a 62°C, 30 segundos a 72°C, diminuindo 1°C a cada ciclo, seguido de 20 ciclos de 15 segundos a 95°C, 15 segundos a 52°C, 30 segundos a 72°C, finalizando a reação de amplificação com 10 minutos a 72°C. Nas soluções de PCR foram utilizados 5,0 ng de DNA; 1x PCR buffer; 1,5 mM de MgCl₂; 0,2 mM do primer direto 0,2 mM do primer reverso; 0,25mM de dNTPs; 0,4U de Taq platinum DNA polimerase e o volume final foi ajustado, com água Milli-Q autoclavada, para 12 µL. Inicialmente foi amplificado somente o DNA dos parentais da população de mapeamento de genoma AA para verificar a presença de polimorfismo entre eles.

Trinta e cinco marcadores de cópia única, transferíveis entre leguminosas, presentes no mapa AA, foram amplificadas por PCR. Foram selecionados marcadores distribuídos entre os 10 grupos de ligação do mapa genético AA de *Arachis*. Esses marcadores foram selecionados visando sua transferência, como marcadores âncoras, para a população de mapeamento BB. A amplificação foi realizada em um termociclador modelo Eppendorf MastersCycle utilizando o seguinte perfil térmico de amplificação: 12 minutos a 95°C, seguidos de 35 ciclos de 15 segundos a 95°C, 20 segundos a temperatura específica de cada marcador, 30 segundos a 72°C, finalizando a reação de amplificação, 10 minutos a 72°C. Nas soluções de PCR foram

utilizados 7,5 ng de DNA; 1x PCR buffer; 1,5 mM de $MgCl_2$; 0,3 mM do primer direto 0,3 mM do primer reverso; 0,25mM de dNTPs; 0,4U de *Taq* platinum DNA polimerase e o volume final foi ajustado, com água Milli-Q autoclavada, para 12 μ L.

Detecção do polimorfismo

Cinco μ L da reação de amplificação foi misturada com 2.5 μ L de tampão de amostra e aplicado em gel de poliacrilamida 6%, não desnaturante (Sambrook and Russell, 2001). Após eletroforese, o gel foi corado com Nitrato de Prata (Creste et al., 2001). Os produtos amplificados que foram monomórficos em tamanho entre os parentais foram selecionados para seqüenciamento.

Seqüenciamento e detecção de SNP

Bandas que foram monomórficas em tamanho entre os parentais de mapeamento foram selecionadas para sequenciamento. O sequenciamento foi feito diretamente do produto da PCR utilizando 1ul de PCR, 1ul de 3,2uM primer, 2ul de BigDye Terminator sequencing kit (Applied Biosystems, CA, USA), e 6ul H_2O . O sequenciamento foi realizado no ABI377 (Applied Biosystems).

As seqüências foram processadas utilizando a ferramenta Staden Package com valores de qualidade de Phred (Ewing and Green, 1998; Staden et al., 2003). As seqüências dos dois alelos parentais foram incluídas no mesmo contig. O SNPs foi detectado pela opção detectar SNP candidato e pela inspeção manual.

Genotipagem por SNaPShot® - Single Nucleotide Primer Extension

Para a genotipagem dos SNPs foram desenvolvidos iniciadores que permitiram a genotipagem em multiplex utilizando a extensão de um único nucleotídeo. Estas genotipagens foram realizadas utilizando o sistema comercial SNaPShot® Single Base Extension Multiplex System - SBE (Applied Biosystems) e eletroforese em seqüenciadores automáticos ABI3100.

Para a técnica, os primer são desenhados para anelarem imediatamente próximo ao sítio do SNP (Figura 1). Uma “cauda” consistindo de $(dGACT)_n$ é adicionada à extremidade 5'-final do primer, variando entre 25 à 56pb. As diferenças nos tamanhos dos primers, que se ligam a diferentes SNPs, permitem que sejam processados em multiplex. Durante a reação os terminadores ddNTP correspondentes aos alelos presentes são incorporados e o genótipo é lido como um pico de fluorescência. Os alelos são diferenciados pelo tamanho e pela cor da fluorescência como detectados na eletroforese capilar. Os primer são desenhados em apenas uma direção utilizando o programa Primo SNP 3.4: SNP PCR Primer Design disponível livremente na internet no site <http://www.changbioscience.com/primo/primosnp.html> (Chang Bioscience).

Mapeamento

A análise de ligação foi feita utilizando Macintosh version 2.0 (Lander et al., 1987) essencialmente como descrito em Moretzsohn et al. (2005).

Resultados

Detecção do polimorfismo

Baixos níveis de polimorfismos de tamanho entre parentais da população de mapeamento AA foram detectados em gel de poliacrilamida. Dos 50 produtos de PCR amplificados, 10 foram polimórficos em tamanho, 25 foram monomórficos em tamanho e 15 não amplificaram (dados não mostrados).

Assim como na população de mapeamento AA, baixos níveis de polimorfismos também foram identificados na população de mapeamento BB. Dos 35 marcadores amplificados, seis foram polimórficos em tamanho, 25 monomórficos em tamanho e quatro não amplificaram (dados não mostrados).

Identificação de SNPs

Foram identificados SNPs em todas as 25 seqüências de DNA monomórficos em tamanho amplificadas dos parentais da população de mapeamento AA. Em contrapartida, na população de mapeamento BB das 25 seqüências de DNA monomórficos em tamanho amplificadas dos parentais, nove não foram variáveis em um único nucleotídeo.

Os 25 SNPs da população de mapeamento AA e os 16 SNPs da população mapeamento BB, com a maior confiança foram selecionado para desenhar os primer para a genotipagem em multiplex utilizando o método extensão de única base (Tabela 1). Todos os primers foram calculados estando livres de “*hairpins*” e de formação dímero utilizando Autodimer.

Genotipagem

Até o momento, de todos os SNPs identificados, oito seqüências da população de mapeamento AA foram genotipadas utilizando a técnica de extensão de única base. Desses oito, apenas um SNP não funcionou de acordo com o método (AS1RN39A08). Os outros sete foram genotipados em uma única corrida. A identificação dos picos e o tamanho dos fragmentos de cada alelo dos sete SNPs genotipados estão mostrados na Figura 2.

A seqüência polimórfica AHBGSI1001D05_I1 da população de mapeamento AA foi genotipada.

Mapeamento

Dos oito marcadores genotipados cinco foram incorporados ao mapa de ligação do genoma AA, AS1RN7G02, AS1RN36B01, AS1RN25D07, AS1RN0x727 e AHBGSI1001D05_I1 (Figure 3). Os outros três marcadores permanecem não ligados.

Discussão

O mapeamento de genes candidatos acrescentará a informação ao mapa de *Arachis*. Genes candidatos apresentam frequentemente níveis baixos de polimorfismo por serem relativamente conservados e, na maioria das vezes, são difíceis de mapear utilizando marcadores baseados em polimorfismo do tamanho. O SNP constitui o marcador molecular mais abundante (Douabin-Gicquel et al., 2001). O uso de SNPs em combinação com uma população altamente polimórfica tal como a população do genoma do AA, baseada em um cruzamento interespecífico usada aqui, deve permitir que quase todas as seqüências de interesse sejam mapeadas. Nessa população, foram identificados polimorfismos de SNP para todas as seqüências de interesse, mesmo que fossem fragmentos curtos de regiões codificantes, mas para a população do genoma BB nem todas as seqüências foram variáveis em um único nucleotídeo.

Como esperado, o polimorfismo de tamanho nas regiões codificantes de interesse entre genótipos de *Arachis* foram baixas. Apenas dez seqüências foram polimórficas entre os parentais do mapa AA. Entretanto, em todas as 25 seqüências monomórficas em tamanho foram identificados SNPs. Em contrapartida, das 35 seqüências dos parentais do mapa BB, 15 foram monomórficas tanto para tamanho como para SNP. Esse baixo nível de variação é devido os parentais do mapa BB serem próximos geneticamente.

A princípio utilizamos CAPs e dCAPs (Bertioli D, Moretzsohn M, Madsen L, Sandal N, et al., resultados não publicados) para mapear polimorfismos de SNP em *Arachis*, mas a insuficiência de enzimas de restrição fazem com que esses métodos sejam caro e lento, especialmente considerando a longa demora para a entrega de enzimas menos comuns em Brasília, nosso lugar de trabalho. Assim, procuramos testar um método de genotipagem de SNP sem necessitar de enzimas de restrição, como o método de extensão de única base (SBE -*Single Base Primer Extension*).

Esse método se mostrou eficiente e pouco trabalhoso. Apenas um dos oito SNPs genotipados não funcionou como esperado. Os outros sete foram genotipados em uma única corrida na máquina de genotipagem (Figura 2). A altura dos picos e o tamanho dos fragmentos de cada alelo foi ideal para a identificação dos alelos, observar sua segregação, validar o SNP e genotipá-los.

Dos oito marcadores genotipados, cinco foram incorporados ao mapa de ligação do genoma AA, AS1RN7G02, AS1RN36B01, AS1RN25D07, AS1RN0x727 e AHBGSI1001D05_I1 (Figura 3). Os outros marcadores permanecem não ligados. Os marcadores AS1RN7G02, AS1RN36B01 e AS1RN25D07 têm homologia a genes análogos a resistência à doença em *Arabidopsis*. É sabido que este tipo de gene ocorre frequentemente em conjunto (Michelmore and Meyers, 1998), e conseqüentemente um deles mapeou próximo a dois outros genes análogos a resistência no final do LG5. Outro dos genes candidatos (AHBGSI1001D05_I1), com homologia a glutathione S-transferase, identificado em estudos de resposta à expressão gênica a *Cercosporidium personatum* foi mapeado próximo a um QTL para resistência a essa

doença (Leal-Bertioli, submetido). Estas observações, embora limitado no número, indicam potencial elevado do mapeamento de genes candidato.

Na conclusão mostramos aqui que mapeamento de genes candidatos selecionados em *Arachis* pode ser feito de uma maneira rápida e eficiente usando SBE. O uso desta metodologia em combinação com uma população de referência altamente polimórfica significa que mapear a grande maioria das seqüências do interesse é praticável. A densidade elevada e a estabilidade mutacional do SNPs, faz dele um marcador de DNA particularmente útil para genética de população e para mapear genes candidatos a resistências a doença e a tolerância a estress abiótico (Brookes, 1999).

Tabela 1 – Seqüência dos primers genotipados na população de mapeamento AA, utilizando o método extensão de única base para genotipagem de SNaPSHOT® em multiplex. Os primers foram desenhados em apenas uma direção utilizando o programa Primo SNP 3.4: SNP PCR Primer Design (<http://www.changbioscience.com/primo/primosnp.html>).

Seqüência	Primer Single-base extension (5' - 3')	Direção do primer	Alelo Genotipado K/V	Tamanho do Primer (bases)	Referência dos Alelos
AS1RM11B11	gactgacGTTTCGGCATGTAGTCATA	Reverso	A/G	25	T/C
AS1RN33D02	gactgactgacGGCTCTGGCTGCCC	Reverso	T/C	25	A/G
AS1RM11G07	gactgactgactgactgaATCGCGCACATCAAGCT	Reverso	C/G	35	G/C
AS1RN39A08	gactgactgactgactgaAACACCGCTGATTACCA	Reverso	T/A	35	A/T
AS1RN7G02	gactgactgactgactgactgaTTTGGCAGTGATCTTGGT	Reverso	G/A	40	C/T
AS1RN36B01	gactgactgactgactgactgacTCCACAACATGATGCTC	Direto	G/A	40	G/A
AS1RN25D07	gactgactgactgactgactgactgaAGTTCCTGTTCTCATGT	Direto	T/C	44	T/C
AS1RN0x727	gactgactgactgactgactgactgactCGGCATACAGATCGGG	Reverso	A/C	48	T/G

K/V = *A. duranensis* - K7988/ *A. stenoperma* - V10309

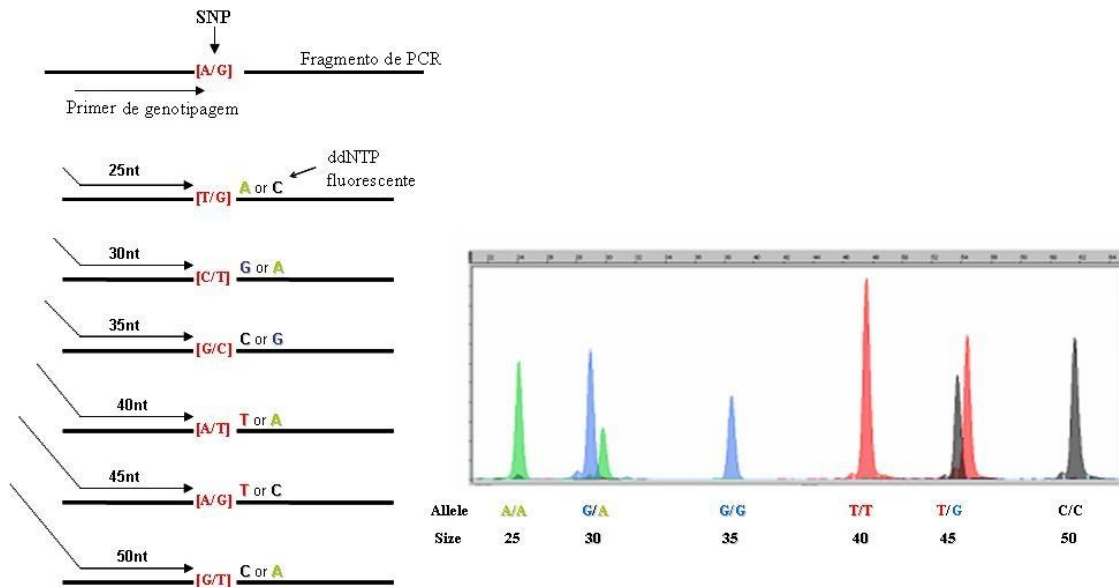


Figura 1 - Figura ilustrativa da genotipagem do SNP utilizando o método extensão de uma única base. Nessa técnica, os primers são desenhados para ligarem-se ao DNA imediatamente próximo ao sítio do SNP. Uma cauda (dGACT)_n é adicionada a extremidade 5'-final do primer, variando em tamanho. O terminador ddNTP correspondente ao alelo é incorporado e o genótipo é lido como um pico de fluorescência. Os alelos são diferenciados pelo tamanho e pela cor da fluorescência detectados na eletroforese de capilaridade.

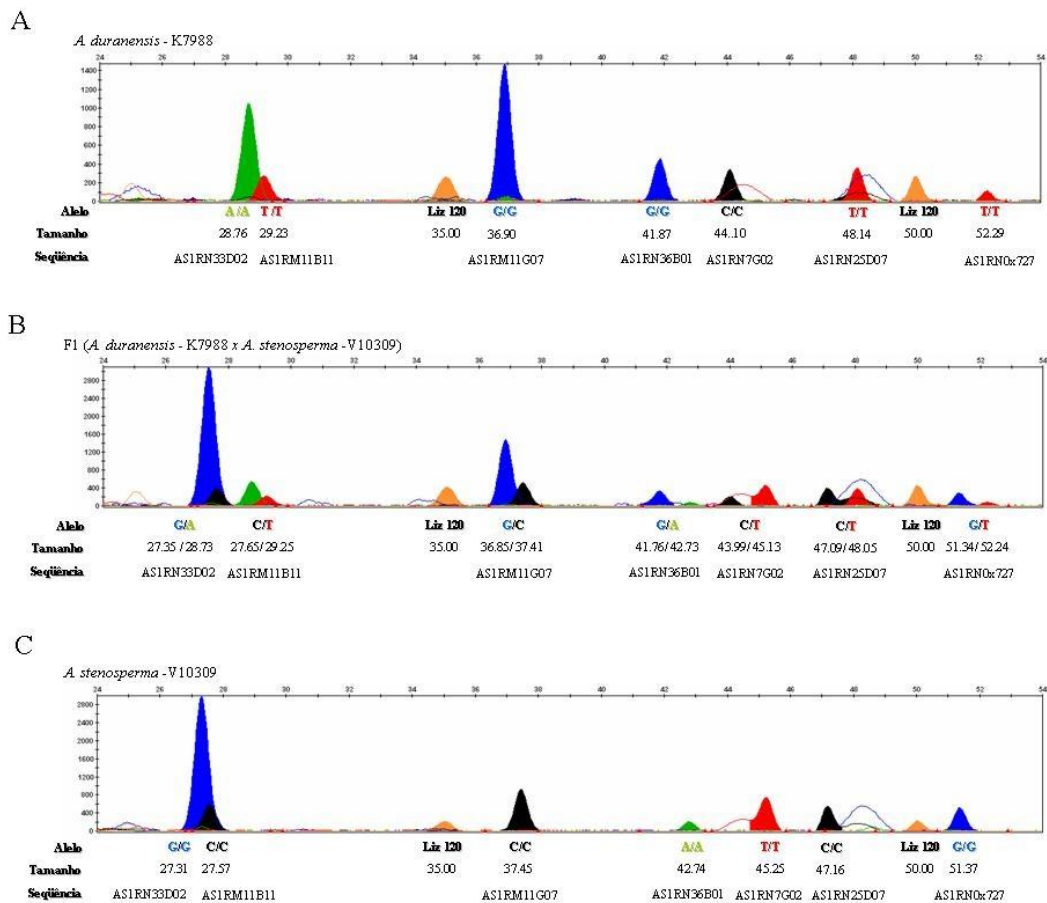


Figura 2 – Eletroferograma da genotipagem em multiplex com o método SEB SNaPShot®. Abaixo dos picos há informação dos alelos e seus respectivos tamanhos. **A** – genotipagem do parental *A. duranensis* – K7988. **B** – Genotipagem do hybrid F₁ (*A. duranensis* - K7988 x *A. stenosperma* -V10309). **C** – Genotipagem do parental *A. stenosperma* -V10309.

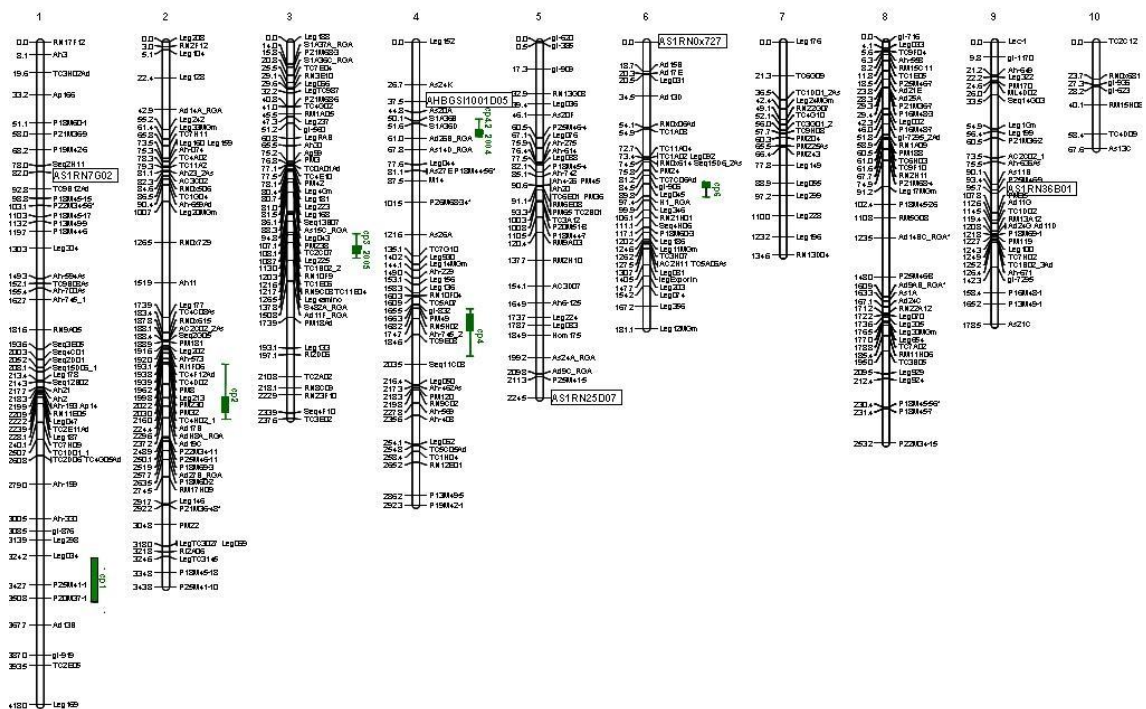


Figura 3 – Mapa de ligação genético de *Arachis* obtido pela análise de 93 indivíduos F₂, gerado pelo cruzamento entre duas espécies silvestres diplóide com genoma AA, *A. duranensis* x *A. stenosperma* (Moretzsohn et al., 2005). Cinco marcadores SNPs genotipados em multiplex com o método SEB SNaPShot® foram incorporados a esse mapa. Em verde: marcadores QTL para resistência a *Cercosporidium personatum*.

Referências

Bertioli D, Moretzsohn M, Madsen L, Sandal N, et al. (2008) A comparison of genome synteny of *Arachis* with the model legumes *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula* reveals a new feature of legume genomes. In preparation.

Brookes A J (1999). The essence of snps. *Gene* 234: 177-186.

Burow MD, Simpson CE, Starr JL and Paterson AH (2001). Transmission genetics of chromatin from a synthetic amphidiploid to cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.): Broadening the gene pool of a monophyletic polyploid species. *Genetics*.159: 823-837.

Creste S, Tulmann Neto A and Figueira A (2001). Detection Of Single Sequence Repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molec. Biol. Repor.* 19: 299-306.

Douabin-Gicquel V, Soriano N, Ferran H, Wojcik F, et al. (2001). Identificaition of 96 single nucleotide polymorphisms in eight genes involved in iron metabolism: efficiency of bioinformatic extraction compared with a systematic sequencing approach. *Human Genet* 109: 393-401.

- Doyle JJ and Doyle JL (1991). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Dwivedi SL, Bertioli DJ, Crouch JH, Valls JFM, et al. (2006). Peanut Genetics and Genomics: Toward Marker-assisted Genetic Enhancement in Peanut (*Arachis hypogaea* L.). In: KOLE C. (Ed.). Oilseeds. Series: Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants 2: 302.
- Dwivedi SL, Crouch JH, Nigam SN, Ferguson ME and Paterson AH (2003). Molecular breeding of groundnut for enhanced productivity and food security in the semi-arid tropics: Opportunities and challenges. *Advances in Agronomy* 80: 153–221.
- Ewing B and Green P (1998). Base-calling of automated sequencer traces using *Phred* II. Error probabilities. *Genome Research* 8: 186-194.
- Guimarães PM, Garsmeur O, Proite K, Leal-Bertioli SCM, et al. (2007). BAC libraries construction from the ancestral diploid genomes of the allotetraploid cultivated peanut. *BMC Plant Biology* in-press.
- Halward TM, Stalker HT, Larue EA and Kochert G (1991). Genetic variation detectable with molecular markers among unadapted germ-plasm resources of cultivated peanut and related wild species. *Genome* 34: 1013-1020.
- Herselman L (2003). Genetic variation among Southern African cultivated peanut (*A. hypogaea* L.) genotypes as revealed by AFLP analysis. *Euphytica*.133: 319-327.
- Kochert G, Halward T, Branch WD and Simpson CE (1991). RFLP variability in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and wild species. *Theor. and Applied Genet.* .81: 565-570.
- Kochert G, Stalker HT, Gimenes M, Galgaro L, et al. (1996). RFLP and cytogenetic evidence on the origin and evolution of allotetraploid domesticated peanut, *Arachis hypogaea* (Leguminosae). *Amer. J. of Botany* 83: 1282-1291.
- Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, et al. (1987). Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174-181.
- Leal-Bertioli, SCM, José ACVF, , Moretzsohn MC, Guimarães PM, Bertioli DJ. Co-localization of RGAs and QTLs for resistance to *Cercosporidium personatum* (Berk and Curt) in *Arachis*. submetido para TAG.
- Michelmore RW and Meyers BC (1998). Clusters of resistance genes in plants evolve by divergent selection and a birth-and-death process. *Genome Res* 11: 1113–30.
- Milla SR, Isleib TG and Stalker HT (2005). Taxonomic relationships among *Arachis* sect. *Arachis* species as revealed by AFLP markers. *Genome*.48: 1-11.
- Moretzsohn M, Leoi L, Proite K, Guimarães P, et al. (2005). A microsatellite based, gene-rich linkage map for the AA genome of *Arachis* (Fabaceae). *Theor.and Appl.Genet.*111: 1060-1071.
- Moretzsohn MC, Hopkins MS, Mitchell SE, Kresovich S, et al. (2004). Genetic diversity of peanut (*Arachis hypogaea* L.) and its wild relatives based on the analysis of hypervariable regions of the genome. *BMC Plant Biology* .4: 11. [<http://www.biomedcentral.com/1471-2229/4/11>].
- Murphy KM, Geiger T, Hafez MJ, Eshleman JR, et al. (2003). A single nucleotide primer extension assay to detect the APC I137K gene variant. *J. of molec. diagn.* 5, No. 4 .
- Rao NK, Reddy LJ and Bramel PJ (2003). Potential of wild species for genetic enhancement of some semi-arid food crops. *Gen. Resour. and Crop Evol.*.50: 707–721.

Sambrook J and Russell DW (2001). *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. New York.

Savage GP and Keenan JI (1994). The composition and nutritive value of groundnut kernels. In: Smartt J. (Ed.). *The groundnut crop: a scientific basis for improvement*. Chapman and Hall, Londres, 173-213.

Seijo JG, Lavia GI, Fernández A, Krapovickas A, et al. (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). *Am. J. of Bot* 91: 1294-1303.

Seijo GJ, Lavia GI, Fernandez A, Krapovickas A, et al. (2007). Genomic relationships between the cultivated peanut (*Arachis hypogaea* – Leguminosae) and its close relatives revealed by double GISH. *Am J Bot* in press.

Staden R, Judge DP and Bonfield JK (2003). Managing sequencing projects in the GAP4 environment. In: Krawetz SA, Womble DD. *Introduction to Bioinformatics. A Theoretical and practical approach*. Human Press Inc, Totawa.

Stalker HT (1997). Peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Field Crops Research* 53 205-217.

Stalker HT and Simpson CE (1995). Germplasm resources in *Arachis*. In: Pattee HE, Stalker H.T. (Eds). *Advances in Peanut Science*, APRES, Stillwater, OK, Cap. 2, 14-53.