**Análise da variabilidade genética de acessos de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) utilizando marcadores microssatélites com detecção fluorescente.**

Flávia Ludmila Ferreira Lustosa

Ediene Galdino de Gouvea

David John Bertioli

Márcio de Carvalho Moretzsohn

Brasília, DF

2009

## SUMÁRIO

### Resumo ............................................................................................................................................................ 03

### Abstract .......................................................................................................................................................... 04

1. **Introdução ............................................................................................................................................. 05**
2. **Material e Métodos ......................................................................................................................... 07**
3. **Resultados e Discussão ................................................................................................................. 08**
4. **Conclusões ............................................................................................................................................. 11**
5. **Referências Bibliográficas ......................................................................................................... 12**
6. **Anexos ...................................................................................................................................................... 15**

**Análise da variabilidade genética de acessos de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) utilizando marcadores microssatélites com detecção fluorescente.**

Flávia Ludmila Ferreira Lustosa1

Ediene Galdino de Gouvea1

David John Bertioli3

Márcio de Carvalho Moretzsohn2

#### RESUMO

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.), leguminosa semi-tropical nativa da América do Sul, é uma importante fonte de óleo comestível e de proteínas. A avaliação da variabilidade genética é essencial para manutenção e uso do germoplasma de uma espécie. No presente estudo, 30 marcadores microssatélites fluorescentes, otimizados em sete sistemas multiplex, foram utilizados para análise da variabilidade genética de 120 acessos de amendoim e um de *A. monticola*. Esses acessos são provenientes de diferentes regiões geográficas da América do Sul, representando as duas subespécies (*fastigiata* e *hypogaea*) e as seis variedades botânicas descritas (*fastigiata*, *vulgaris*, *aequatoriana*, *peruviana*, *hypogaea* e *hirsut*a). As distâncias genéticas entre os acessos foram calculadas pelo método de Rogers modificado e um dendrograma foi construído usando UPGMA. Cinco grupos principais foram formados, reunindo, de maneira geral, os acessos pertencentes à mesma variedade. Esses resultados foram consistentes com a classificação taxonômica atual, exceto para as variedades *peruviana* e *aequatoriana*, que mostraram maior similaridade genética com acessos pertencentes à subespécie *hypogaea* do que com as outras duas variedades da subespécie *fastigiata*. As análises de agrupamento indicaram, ainda, que os acessos coletados no Parque Índigena do Xingu mostraram-se geneticamente próximos da subespécie *hypogaea*, sugerindo que esse material pertence a esta subespécie. Apesar de diversos estudos mostrarem que o amendoim cultivado possui uma estreita base genética, os marcadores SSR utilizados no presente estudo detectaram consideráveis níveis de variabilidade. Além disso, grupos de similaridade entre acessos foram estabelecidos e serão de grande utilidade na seleção de plantas a serem usadas como parentais em programas de melhoramento genético e na construção de mapas genéticos.

1 Biologia, graduada, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

2 Eng. Agrônomo., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

3 Biologia, Ph.D, Universidade de Brasília.

**Analysis of the genetic variability of peanut (*Arachis hypogaea* L.) accessions using**

**fluorescent-labeled microsatellite markers.**

**ABSTRACT**

 Peanut (*Arachis hypogaea* L.), a semi-tropical legume native to South America, is an important source of edible oil and proteins. The evaluation of the genetic variability is an essential tool for the maintenance and use of the germplasm of a species. In the present study, 30 fluorescent-labeled microsatellite markers, optimized in seven multiplex systems, were used for the analysis of the genetic variability of 120 accessions of cultivated peanut and one of *A. monticola*. These accessions are originated from different geographic regions of South America, representing the two subspecies (*fastigiata* and *hypogaea*) and the six described botanical varieties (*fastigiata*, *vulgaris*, *aequatoriana*, *peruviana*, *hypogaea* and *hirsuta*). Genetic distances between all accessions were estimated by the Rogers modified method and a dendrogram was constructed by using UPGMA. Five main clusters were evident, joining in general the accessions belonging to the same botanical variety. These results were consistent with the current taxonomic classification, except for the varieties *peruviana* and *aequatoriana*, which showed higher genetic similarity to the subspecies *hypogaea* accessions than to the other two varieties of the subspecies *fastigiata*. Cluster analysis also indicated that the accessions collected in Xingu Indigenous Park were genetically close to the accessions of the subspecies *hypogaea*, suggesting that they belong to this subspecies. Although several studies have shown that cultivated peanut has a narrow genetic basis, the microsatellite markers included in the present study detected considerable levels of genetic variability. Moreover, similarity groups between accessions were established and they will be very useful for the selection of plants to be used as parents in genetic breeding programs or for the construction of genetic linkage maps.

**1. INTRODUÇÃO**

O gênero *Arachis* (Leguminosae ou Fabaceae) é nativo da América do Sul e o possível centro de origem é a região do Brasil Central (Gregory et al., 1980). Este gênero contém 80 espécies descritas (Krapovickas & Gregory, 1994; Valls & Simpson, 2005), que ocorrem no Brasil, Paraguai, Bolívia, Argentina e Uruguai. O Brasil é o país que abriga o maior número de espécies (63 espécies), com representantes de todas as seções, sendo que 46 são exclusivas do Brasil (Krapovickas & Gregory, 1994).

O amendoim é uma cultura importante internacionalmente, tanto para produção de óleo, como para consumo direto, constituindo uma das principais fontes de proteínas e vitaminas em diversos países em desenvolvimento da Ásia, África e América do Sul (Savage & Keenan, 1994, citado por Moretzsohn, 2006). Seus grãos contêm cerca de 45% de óleos, 25% de proteínas e 20% de carboidratos (Godoy et al., 1999; Holbrook & Stalker, 2003). Entre as plantas oleaginosas, o amendoim é a quinta mais produzida internacionalmente, perdendo apenas para a soja, dendê, colza e girassol (FAO, 2006), sendo responsável por 10% da produção mundial de óleo comestível (Canziani, 1995).

 O amendoim é cultivado em mais de 100 países (Holbrook & Isleib, 2001) e os países em desenvolvimento são responsáveis por 80% da produção, sendo que, aproximadamente, 67% são originários dos trópicos semi-áridos (Santos, 1996). Os maiores exportadores são China, Índia, Estados Unidos e Argentina e a União Européia, Indonésia, México e Canadá, os principais importadores (FAO, 2006).

*Arachis hypogaea* é classificado em duas subespécies, com base em características morfológicas e nos hábitos de crescimento da planta (Krapovickas & Gregory, 1994). Uma das principais diferenças é a presença (subsp. *fastigiata*) ou ausência (subsp. *hypogaea*) de flores no eixo principal. Além disso, a subespécie *hypogaea* apresenta ciclo longo, hábito rasteiro e sementes com dormência. Em contraste, a subespécie *fastigiata* apresenta ciclo mais curto, sementes sem dormência e um hábito de crescimento ereto. Outra diferença notável é a coloração das folhas, verde escuro na subespécie *hypogaea* e verde claro na *fastigiata* (Krapovickas & Gregory, 1994). Estas duas subespécies foram classificadas em seis variedades botânicas. A subespécie *hypogaea* foi dividida nas variedades *hypogaea* e *hirsuta*, enquanto a subespécie *fastigiata* nas variedades *fastigiata, vulgaris, aequatoriana* e *peruviana*. Agronomicamente, o amendoim tem sido classificado em diferentes grupos, sendo os principais: Valência, Spanish e Virgínia.

 O amendoim cultivado é um alotetraplóide (tem quatro conjuntos de cromossomos, dois conjuntos do chamado genoma A e dois conjuntos do genoma B). A sua origem parece estar associada a um eventual cruzamento entre duas espécies silvestres diplóides, que teria resultado em um híbrido estéril (AB), cujos cromossomos foram duplicados espontaneamente, restaurando a fertilidade (Simpson et al., 2001).

A identidade das espécies progenitoras do amendoim cultivado tem sido de grande interesse. Várias espécies têm sido sugeridas como possíveis doadoras dos genomas A e B (revisto por Fávero et al., 2006). Com base em dados de marcadores moleculares, de distribuição geográfica e de FISH (“Fluorescent In Situ Hybridization”), acredita-se que o amendoim seja resultante de um cruzamento entre *A. ipaënsis* Krapov. & W.C. Gregory, doadora do genoma BB, e *A. duranensis* Krapov. & W.C. Gregory, doadora do genoma AA (Kochert et al., 1991; 1996; Seijo et al., 2004; 2007).

Marcadores microssatélites ou SSR (“Simple Sequence Repeats”) constituem a ferramenta ideal para diversos estudos genéticos, por serem multi-alélicos, codominantes e baseados em PCR e eletroforese em gel. Estudos comparativos, em plantas, mostraram que marcadores SSR são mais polimórficos do que outros tipos de marcadores moleculares (Powell et al., 1996; Milbourne et al., 1997; Bohn et al., 1999). Microssatélites têm sido utilizados em diversos estudos em plantas, incluindo a análise da variabilidade genética de coleções de germoplasma (revisto por Gupta & Varshney, 2000). Uma vantagem adicional é que esses marcadores apresentam, em geral, alta taxa de transferência entre espécies aparentadas e até mesmo entre gêneros da mesma família (Choumane et al., 2004; Gutierrez et al*.*, 2005). De um modo geral, o sistema automatizado de determinar o tamanho dos alelos SSR marcados com fluorescência aumenta a velocidade e a acurácia da coleta de dados e o processamento da informação. A alta sensibilidade da detecção com fluorescência também reduz o volume necessário (e, sobretudo, o custo) da reação de PCR e permite a detecção dos locos que apresentam amplificação mais difícil (Mitchell et al., 1997; Coburn et al., 2002). Os objetivos do presente trabalho foram: (1) analisar a variabilidade genética do amendoim cultivado (*Arachis hypogaea* L.) utilizando marcadores microssatélites marcados com fluorescência (2) obter sistemas multiplex de marcadores SSR, que permitam a análise concomitante de pelo menos três locos SSR em apenas uma reação de amplificação e em um mesmo gel de eletroforese.

#### 2. MATERIAL E MÉTODOS

**Material vegetal:**Foram utilizados 89 acessos de *Arachis hypogaea*, representando as duas subespécies (*hypogaea* e *fastigiata*) e as seis variedades descritas por Krapovickas & Gregory (1994). Esse material inclui acessos coletados em diversos estados brasileiros, bem como na Argentina, Bolívia, Uruguai e Paraguai. Além de representantes das seis variedades conhecidas, foram incluídas 31 amostras de *A. hypogaea* coletadas no Parque Indígena do Xingu, que possuem características morfológicas que não se enquadram em nenhuma dessas variedades. Além disso, foi incluído um acesso de *A. monticola*. Essas plantas foram obtidas na coleção brasileira de germoplasma, mantida na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – Cenargen (Brasília); na coleção do Instituto Agronômico de Campinas (IAC, Campinas) e na coleção argentina, mantida na Estación Experimental Agropecuária de Manfredi (EEA-INTA Manfredi, Córdoba, Argentina). Foi incluída, ainda, uma planta anfidiplóide sintética, obtida do cruzamento entre *A. ipaënsis* e *A. duranensis*, que são as prováveis espécies doadoras dos genomas B e A para o amendoim, respectivamente. O híbrido F1, resultante desse cruzamento foi tratado com colchicina (c) para duplicação dos cromossomos e restauração da fertilidade. No total, foram analisados 122 acessos (Tabela 1).

**Extração de DNA e PCR dos locos SSR:**DNA total foi extraído de folhas jovens com nitrogênio líquido, de acordo com o protocolo descrito por Ferreira & Grattapaglia (1998), com uma modificação: inclusão de uma precipitação de polissacarídeos com NaCl 2M. As PCRs foram realizadas com o Kit Qiagen Multiplex PCR (Qiagen), em volumes de 5 µL, contendo 2,5 µL de Master Mix (*Taq* DNA Polimerase, tampão de PCR e dNTPs), 0,5 µL de Solução Q (5x) e 0,4-0,7 µL de água destilada ultra pura (dependendo do número de primers); 0,1 µL de cada primer (a 10 µM) e 1 µL de DNA genômico (a 2,5 ng/µL). As amplificações foram realizadas em termocicladores ABI 9700 (Applied Biosystems), nas seguintes condições: 95oC por 15 minutos (1 ciclo), 94oC por 30 seg, 52-60oC por 1:30 min, 72oC por 1:30 min (35 ciclos); e uma extensão final a 72oC por 10 minutos (1 ciclo). A montagem dos sistemas multiplex (Tabela 2) foi feita de forma a evitar a amplificação de alelos de tamanhos similares marcados com a mesma fluorescência**.** As temperaturas de anelamento foram otimizadas para cada par de primers, individualmente, visando à obtenção de melhor resolução e maior especificidade dos produtos de PCR.

**Análise dos dados:**Para genotipagem, foram adicionados a 1µL do produto de PCR diluído 1:8 em água MilliQ, 8,7 µL de Hi-Di formamida e 0,3 µL do padrão com comprimentos de fragmentos conhecidos, marcado com fluorescência ROX. Essas amostras foram submetidas a eletroforese em sequenciador automático de DNA ABI 3700 (Applied Biosystems), localizado no Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Os dados obtidos após eletroforese foram analisados pelos programas GeneScan 3.7 e Genotyper 3.7 (Applied Biosystems). A partir da planilha com os genótipos (comprimento dos alelos em pares de bases) de cada acesso, foram estimadas as distâncias genéticas entre cada par de acessos, pelo método de Rogers modificado (Wright, 1978), usando-se o programa bood, desenvolvido pelo Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho da Universidade Federal de Goiás. A matriz de distâncias resultante foi submetida à análise de agrupamento usando UPGMA (“unweighted pair-group method analysis”). A fim de verificar a consistência dos agrupamentos obtidos a partir dos dados de distâncias genéticas, a correlação cofenética (*r*) foi estimada (Mantel, 1967). Para isso, a matriz de distâncias genéticas foi comparada com a matriz cofenética, gerada pelo programa MXCOMP. Essas análises foram realizadas usando-se o programa NTSYS, versão 2.1 (Rohlf, 2000).

**3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Para genotipagem dos acessos de amendoim, diversos sistemas multiplex foram construídos e otimizados, levando-se em consideração as temperaturas de anelamento dos primers e a faixa de comprimento dos alelos amplificados. Para análise da variabilidade genética dos acessos de amendoim, foram utilizados sete sistemas (Tabela 2), dos quais dois foram constituídos de três locos; dois de quatro, dois de cinco e um de seis locos.

As distâncias genéticas entre os 120 acessos de *A. hypogaea*, o acesso de *A. monticola* e a planta anfidiplóide sintética foram calculadas pelo método de Rogers modificado (1978), usando 30 marcadores microssatélites com detecção fluorescente. Uma matriz de distâncias genéticas entre cada par de acessos foi obtida. A partir dessa matriz, um dendrograma foi construído para os 122 acessos, baseado no método UPGMA (Figura 1). Cinco grupos principais foram formados. O primeiro grupo (Gr I) foi constituído por 27 dos 31 acessos coletados no Parque Indígena do Xingu, além de seis acessos de diferentes variedades, que agruparam sem uma razão aparente. Três pequenos subgrupos formaram o Grupo II, que incluiu quatro acessos de *hypogaea/hypogaea* (IAC5024, IAC69005, IAC5559, IAC69002), quatro dos cinco acessos de *hypogaea/hirsuta* analisados e alguns acessos pertencentes a outras variedades (Mf1855\_FF, Mf788\_FF, IAC2036\_FA/FP, Mf2517\_FP). O Grupo III foi constituído quase exclusivamente de acessos de *fastigiata/aequatoriana* e *fastigiata/peruviana*. A exceção foi o acesso IAC88-1 identificado como FF/FV. O Grupo IV foi constituído pela maioria dos acessos de *hypogaea/hypogaea* incluídos, quatro acessos coletados no Parque Indígena do Xingu e, ainda, por três acessos de *fastigiata/aequatoriana* (Mf2352, Mf2426, Mf2389). O Grupo V foi formado por 20 dos 25 acessos de *fastigiata/fastigiata* e *fastigiata/vulgaris* incluídos na análise, junto a dois acessos classificados como *hypogaea/hypogaea* (LTVM e TDPT) e três acessos de *fastigiata/aequatoriana* e *fastigiata/peruviana* (IAC2170, IAC5409, IAC622). Externamente a esses grupos ficou localizado o acesso de *A. monticola* (V14165). A planta anfidiplóide sintética (K30076 x V14167)c foi o acesso mais diverso, com uma distância de 0,66 do grupo formado pelos demais 121 acessos.

Para testar a consistência do agrupamento, o coeficiente de correlação cofenético *r* foi calculado, resultando em um valor igual a 0,79. Portanto, a matriz cofenética e a matriz de distâncias genéticas mostraram uma correlação significativa de 79%.

Os sete sistemas multiplex de primers microssatélites marcados com fluorescência desenvolvidos e utilizados no presente estudo possibilitaram a análise de um grande número de acessos, de forma rápida, por permitirem a análise simultânea de vários locos, e eficiente, pela acurácia na mensuração dos tamanhos dos alelos amplificados. Esses sistemas representam uma ferramenta útil para a análise genética e constituem um método rápido e eficiente para a caracterização de germoplasma de amendoim.

As análises de relações genéticas entre os 122 acessos mostraram, de maneira geral, o agrupamento dos acessos pertencentes à mesma variedade e dos acessos mantidos pelos índios Kayabi coletados no Parque Indígena do Xingu. Como esperado, os acessos das variedades *fastigiata* e *vulgaris* mostraram-se bastante semelhantes, formando o Grupo V. Uma vez que o material recebido do Instituto Agronômico de Campinas (IAC) veio classificado como pertencente a uma dessas duas variedades, sem diferenciá-las, não foi possível saber se os marcadores utilizados puderam distinguir essas variedades. Plantas desses acessos estão sendo cultivadas, o que permitirá sua classificação morfológica e um melhor entendimento dos resultados aqui obtidos.

Acessos coletados no Parque Indígena do Xingu apresentaram uma maior similaridade com acessos de *hypogaea/hirsuta* e *hypogaea/hypogaea* (Grupos II e IV) do que com as demais variedades (Figura 1). Apesar do maior número de marcadores microssatélites utilizados no presente estudo, em relação a um trabalho anterior que utilizou 13 marcadores microssatélites (Freitas et al., 2007), a comparação do material coletado no Parque Indígena do Xingu com as seis variedades conhecidas de amendoim, não possibilitou sua classificação, uma vez que agruparam tanto com acessos da variedade *hypogaea* quanto de *hirsuta*. No entanto, os acessos classificados como Xingu mostraram-se mais próximos da subespécie *hypogaea*.Com base nesses resultados, pode-se sugerir que o material mantido pelos índios Kayabi pertence a esta subespécie, embora tenham expandido a variabilidade genética conhecida para esta subespécie.

Foi observado que as variedades *peruviana* e *aequatoriana* apresentaram maior similaridade com acessos de *hypogaea/hirsuta*, *hypogaea/hypoagaea* e Xingu do que com os acessos de *fastigiata/fastigiata* e *fastigiata/vulgaris*. Resultados similares foram obtidos em outros estudos, baseados em marcadores microssatélites (Ferguson *et al*., 2004; He *et al*., 2005; Moretzsohn et al., 2006), AFLP (He & Prakash, 2001; Tallury *et al*., 2005) e RAPD e ISSR (Raina *et al*., 2001). Esses autores sugeriram que a variedade *peruviana*, que se mostrou mais distante das demais variedades de *fastigiata*, em alguns desses estudos, fosse classificada como uma terceira subespécie. No presente trabalho, novamente o material recebido do Instituto Agronômico de Campinas (IAC) veio classificado como pertencente a uma dessas duas variedades, sem diferenciá-las. Isso impossibilitou uma análise mais precisa destas duas variedades. Apesar disso, os resultados obtidos dão suporte a essa hipótese e levantam dúvidas quanto à classificação taxonômica atual.

**4. CONCLUSÕES**

1. O uso de sistemas multiplex de primers microssatélites marcados com fluorescência pode contribuir significativamente para um melhor conhecimento e manejo de coleções de germoplasma.
2. Os sistemas aqui desenvolvidos representam uma ferramenta útil para análises genéticas, constituindo um método rápido e eficiente para a caracterização de germoplasma de amendoim.
3. A coleção de germoplasma de amendoim mantida na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia apresenta consideráveis níveis de variabilidade genética. Além disso, grupos de similaridade entre acessos foram estabelecidos e serão de grande utilidade na seleção de plantas a serem usadas como parentais em programas de melhoramento genético e na construção de mapas genéticos.
4. As análises de agrupamento mostraram a formação de cinco principais grupos de similaridade, como esperado e confirmado por outros trabalhos e levantaram dúvidas quanto à classificação taxonômica das variedades *peruviana* e *aequatoriana*. Finalmente, foi demonstrado que os acessos do Parque Indígena do Xingu, apesar de não terem sido classificados quanto à variedade, são mais próximos da subespécie *hypogaea*.

# 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOHN, M.; UTZ, H.F.; MELCHINGER, A.E. Genetic similarities among winter wheat cultivars determined on the basis of RFLPs, AFLPs, and SSRs and their use for predicting progeny variance. **Crop Science**, v.39, p.228-237, 1999.

CANZIANI, J.R.F. Óleos vegetais: produção mundial deve crescer 5,7%. **Óleos e Grãos**, v.5, n.23, p.39-40, 1995.

CHOUMANE, W.; WINTER, P.; BAUM, M.; KAHL, G. Conservation of microsatellite flanking sequences in different taxa of Leguminosae. **Euphytica**, v.138, p.239-245, 2004.

COBURN, J.R.; TEMNYKH, S.V.; PAUL E.M.; McCOUCH, S.R. Design and application of microsatellite marker panels for semiautomated genotyping of rice (*Oryza sativa* L.) **Crop Science**, v.42, p. 2092-2099, 2002.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations (2006). Disponível em http://faostat.fao.org. Acesso em 10 maio 2008.

FÁVERO, AP.; SIMPSON, C.E.; VALLS, J.F.M.; VELLO, N.A. Study of the evolution of cultivated peanut through crossability studies among *A*. *ipaënsis*, *A*. *duranensis,* and *A*. *hypogaea*. **Crop Science**, v.46, p.1546-1552, 2006.

FERGUSON, M.E.; BRAMEL, P.J.; CHANDRA, S. Gene Diversity among Botanical Varieties in Peanut (*Arachis hypogaea* L.)**.** **Crop Science**, v.44, p.1847-1854, 2004.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. **Embrapa- Cenargen**, 3ª ed., 220p., 1998.

FREITAS, F.O.; MORETZSOHN, M.C.; VALLS, J.F.M. Genetic variability of Brazilian Indian landraces of *Arachis hypogaea* L. **Genetics and Molecular Research***.*, v.6, p.675-684, 2007.

GODOY, I.J.; MORAES, S.A.; ZANOTTO, M.D.; SANTOS, R.C. Melhoramento do amendoim. In**: BORÉM, A. (Ed.). Melhoramento de espécies cultivadas**, Viçosa, UFV; p.51-94, 1999.

GREGORY, W.C.; KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, M.P. Structure, variation, evolution, and classification in *Arachis*. In: SUMMERFIELD, RJ.; BUNTING, AH. (Ed.) **Advances in Legume Science**. Kew, Royal Botanical Garden, p.469-481, 1980.

GUPTA, P.K.; VARSHNEY, R.K. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. **Euphytica**, v.113, p.163-185, 2000.

GUTIERREZ, M.V.; VAZ PATTO, M.C.; HUGHET, T.; CUBERO, J.I.; MORENO, M.T.; TORRES, A.M. Cross-species amplification of *Medicago truncatula* microsatellites across three major pulse crops. **Theoretical and Applied Genetics**, v.110, p.1210-1217, 2005.

HALWARD, T.M.; STALKER, H.T.; LARUE, E.A.; KOCHERT, G. Genetic variation detectable with molecular markers among unadapted germplasm resources of cultivated peanut and related wild species. **Genome**, v.34, p.1013-1020, 1991.

HE G.; PRAKASH C.S. Evaluation of genetic relationships among botanical varieties of cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) using AFLP markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.48, p.347-352, 2001.

HE, G.; MENG, R.; GAO, H.; GUO, B.; GAO, G.; NEWMAN, M.; PITTMAN, R.N.; PRAKASH, C.S. Simple sequence repeat markers for botanical varieties of cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Euphytica**, v.142, p.131–136, 2005.

HILU K.W.; STALKER H.T. Genetic relationships between peanut and wild species of *Arachis* sect. *Arachis* (Fabaceae): evidence from RAPDs. **Plant Systematics and Evolution**, v.198, p. 167-178, 1995.

HOLBROOK, C.C.; ISLEIB, T.G. Geographical distribution and genetic diversity in *Arachis hypogaea*. **Peanut Science**, v.28, p.80-84, 2001.

HOLBROOK, C.C.; STALKER, H.T. Peanut Breeding and Genetic Resources. In: JANICK, J. (Ed.). **Plant Breeding**, v.22, p.297-355, 2003.

KOCHERT, G.; HALWARD, T.; BRANCH, W.D.; SIMPSON, C.E. RFLP variability in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and wild species. **Theoretical and Applied Genetics**, v.81, p.565-570, 1991.

KOCHERT, G.; STALKER, H.T.; GIMENES, M.; GALGARO, L.; LOPES, CR.; MOORE, K. RFLP and cytogenetic evidence on the origin and evolution of allotetraploid domesticated peanut, *Arachis hypogaea* (Leguminosae). **American Journal of Botany**, v.83, p.1282-1291, 1996.

KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, W.C. Taxonomía del género *Arachis* (Leguminosae). **Bonplandia**, v.8, p.1-186, 1994.

LIU, K.; MUSE, S.V. Power Marker: an integrated analysis environment for genetic marker analyses. **Bioinformatics**, v. 21, p.2128-2129, 2005.

MANTEL, N.A. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research**, v.27, p. 209-220, 1967.

MILBOURNE, D.; MEYER, R.; BRADSHAW, J.E.; BAIRD, E.; BONAR, N.; PROVAN, J.; POWEL, W.; WAUGH, R. Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. **Molecular Breeding**, v.3, p.127-136, 1997.

MITCHELL, S.E.; KRESOVICH, S.; JESTER, C.A.; HERNANDEZ, C.J.; SZEWC-McFADDEN, A.K. Application of multiplex PCR and fluorescence-based, semi-automated allele sizing technology for genotyping plant genetic resources. **Crop Science**, v.37, p. 617-624, 1997.

MORETZSOHN, M.C.; HOPKINS, M.S.; MITCHELL, S.E.; KRESOVICH, S.; VALLS, J.F.M.; FERREIRA, M.E. Genetic diversity of peanut (*Arachis hypogaea* L.) and its wild relatives based on the analysis of hypervariable regions of the genome. **BMC Plant Biology,** v.4, p.11 [http://www.biomedcentral.com/1471-2229/4/11]. 2004.

MORETZSOHN, M.C. **Desenvolvimento e mapeamento de marcadores microssatélites e identificação de QTLs ligados à produtividade e à resistência à mancha preta em *Arachis* spp.** 127p. (Tese de Doutorado) - Universidade de Brasília, Brasília. 2006.

POWELL, W.; MORGANTE, M.; ANDRE, C.; HANAFEY, M.; VOGEL, J.; TINGEY, S.; RAFALSKI, A. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. **Molecular Breeding**, v.2, p.225-238, 1996.

ROHLF, F.J. **NTSYS-PC: numerical taxonomy and multivariate analysis system - version 2.1.** Exeter Software, New York. 2000.

SANTOS, R.C. Viabilização tecnológica do amendoim para a região Nordeste. Campina Grande: **EMBRAPA-CNPA**, 46p., 1996.

SAVAGE, G.P.; KEENAN, J.I. The composition and nutritive value of groundnut kernels. In: **SMARTT, J. (Ed.).** The groundnut crop: a scientific basis for improvement. Chapman and Hall, Londres, p.173-213, 1994.

SEIJO, J.G.; LAVIA, G.I.; FERNÁNDEZ, A.; KRAPOVICKAS, A.; DUCASSE, D.; MOSCONE, E.A. Physical mapping of the 5S and 18S–25S rRNA genes by FISH as evidence that *Arachis duranensis* and *A. ipaënsis* are the wild diploid progenitors of *A. hypogaea* (Leguminosae). **American Journal of Botany**, v.91, p.1294-1303, 2004.

SEIJO, J.G.; LAVIA, G.I.; FERNANDEZ, A.; KRAPOVICKAS, A.; DUCASSE, E.; BERTIOLI, D.J.; MOSCONE, E.A. Genomic relationships between the cultivated peanut (*Arachis hypogaea* – Leguminosae) and its close relatives revealed by double GISH. **American Journal of Botany**, v. 94, p.1963-1971, 2007.

SIMPSON, C.E.; KRAPOVICKAS, A.; VALLS, J.F.M. History of *Arachis* including evidence of *Arachis hypogaea* L. progenitors. **Peanut Science**, v.28, n.2, p. 78-80, 2001.

TALLURY, S.P.; HILU, K.W.; MILLA, S.R.; FRIEND, S.A.; ALSAGHIR, M.; STALKER, H.T.; QUANDT, D. Genomic affinities in *Arachis* section *Arachis* (Fabaceae): molecular and cytogenetic evidence**.** **Theoretical and Applied Genetics,** v.111, p.1229-1237, 2005.

Wright, S. (1978) Evolution and the genetics of populations. v. 4. Variability Within and Among Natural Populations. University of Chicago Press, Chicago, 360 p.

**6. ANEXOS**

**Tabela 1 –** Lista dos acessos de *A. monticola* e de *A*. *hypogaea* utilizados na análise da variabilidade genética, representando as duas subespécies (*hypogaea* e *fastigiata*) e as seis variedades (*hypogaea, hirsuta, fastigiata, vulgaris, aequatoriana* e *peruviana***).**

| **Acesso** | **Subespécie/ Variedade** | **Origem** |
| --- | --- | --- |
| Al Fazenda B | não identificada | Alagoas, Brasil |
| Cabral  | *hypogaea/hypogaea* | Pará, Brasil |
| cv. Caiapó | *hypogaea/hypogaea* | São Paulo, Brasil |
| cv. Havana | *fastigiata/fastigiata* | Pernambuco, Brasil |
| cv. IAC Runner 886 | *hypogaea/hypogaea* | São Paulo, Brasil |
| cv. Tatu | *fastigiata/fastigiata* | São Paulo, Brasil |
| cv. Tatuí | *fastigiata/fastigiata* | São Paulo, Brasil |
| DA-PR | *hypogaea/hypogaea* | Raças locais de SC |
| DA-PRJ | *hypogaea/hypogaea* | Raças locais de SC |
| DC-PG | *hypogaea/hypogaea* | Raças locais de SC |
| IAC1174 | *fastigiata/fastigiata-fastigiata/vulgaris* | IA Campinas |
| IAC2035 | *fastigiata/aequatoriana-fastigiata peruviana* | IA Campinas |
| IAC2036 | *fastigiata/aequatoriana-fastigiata peruviana* | IA Campinas |
| IAC2112 | *fastigiata/aequatoriana-fastigiata peruviana* | IA Campinas |
| IAC2113 | *fastigiata/aequatoriana-fastigiata peruviana* | IA Campinas |
| IAC2114 | *fastigiata/aequatoriana-fastigiata peruviana* | IA Campinas |
| IAC2163 | *fastigiata/aequatoriana-fastigiata peruviana* | IA Campinas |
| IAC2167 | *fastigiata/aequatoriana-fastigiata peruviana* | IA Campinas |
| IAC2170 | *fastigiata/aequatoriana-fastigiata peruviana* | IA Campinas |
| IAC2173 | *fastigiata/aequatoriana-fastigiata peruviana* | IA Campinas |
| IAC2174 | *fastigiata/aequatoriana-fastigiata peruviana* | IA Campinas |
| IAC2175 | *fastigiata/aequatoriana-fastigiata peruviana* | IA Campinas |
| IAC2176 | *fastigiata/aequatoriana-fastigiata peruviana* | IA Campinas |
| IAC2177 | *fastigiata/aequatoriana-fastigiata peruviana* | IA Campinas |
| IAC2178 | *fastigiata/aequatoriana-fastigiata peruviana* | IA Campinas |
| IAC2179 | *fastigiata/aequatoriana-fastigiata peruviana* | IA Campinas |
| IAC2251 | *hypogaea/hypogaea* | IA Campinas |
| IAC2270 | *hypogaea/hypogaea* | IA Campinas |
| IAC2434 | *hypogaea/hypogaea* | IA Campinas |
| IAC2447 | *hypogaea/hypogaea* | IA Campinas |
| IAC2564 | *fastigiata/fastigiata-fastigiata/vulgaris* | IA Campinas |
| IAC2569 | *fastigiata/fastigiata-fastigiata/vulgaris* | IA Campinas |
| IAC2570 | *fastigiata/fastigiata-fastigiata/vulgaris* | IA Campinas |
| IAC2574 | *fastigiata/fastigiata-fastigiata/vulgaris* | IA Campinas |
| IAC5024 | *hypogaea/hypogaea* | IA Campinas |
| IAC5123 | *fastigiata/fastigiata-fastigiata/vulgaris* | IA Campinas |
| IAC5409 | *fastigiata/aequatoriana-fastigiata peruviana* | IA Campinas |
| IAC5474 | *hypogaea/hypogaea* | IA Campinas |
| IAC5559 | *hypogaea/hypogaea* | IA Campinas |
| IAC5567 | *fastigiata/fastigiata-fastigiata/vulgaris* | IA Campinas |
| IAC622 | *fastigiata/aequatoriana-fastigiata peruviana* | IA Campinas |
| IAC69002 | *hypogaea/hypogaea* | IA Campinas |
| IAC69005 | *hypogaea/hypogaea* | IA Campinas |
| IAC8112 | *fastigiata/fastigiata-fastigiata/vulgaris* | IA Campinas |
| IAC88.1 | *fastigiata/fastigiata-fastigiata/vulgaris* | IA Campinas |
| LC-PG | *hypogaea/hypogaea* | Raças locais de SC |
| LT-VM | *fastigiata/fastigiata* | Raças locais de SC |
| MC-PG | *hypogaea/hypogaea* | Raças locais de SC |
| Mf1208 | *fastigiata/fastigiata* | BAG - Manfredi (Argentina) |
| Mf1538 | *hypogaea/hirsuta* | BAG - Manfredi (Argentina) |
| Mf1560 | *fastigiata/peruviana* | BAG - Manfredi (Argentina) |
| Mf1678 | *fastigiata/aequatoriana* | BAG - Manfredi (Argentina) |
| Mf1855 | *fastigiata/fastigiata* | BAG - Manfredi (Argentina) |
| Mf1859 | não identificada | BAG - Manfredi (Argentina) |
| Mf210 | *fastigiata/fastigiata* | BAG - Manfredi (Argentina) |
| Mf2352 | *fastigiata/aequatoriana* | BAG - Manfredi (Argentina) |
| Mf2389 | *fastigiata/aequatoriana* | BAG - Manfredi (Argentina) |
| Mf2426 | *fastigiata/aequatoriana* | BAG - Manfredi (Argentina) |
| Mf2517 | *fastigiata/peruviana* | BAG - Manfredi (Argentina) |
| Mf2534 | *hypogaea/hirsuta* | BAG - Manfredi (Argentina) |
| Mf2535 | *hypogaea/hirsuta* | BAG - Manfredi (Argentina) |
| Mf2681 | *fastigiata/vulgaris* | BAG - Manfredi (Argentina) |
| Mf291 | *fastigiata/vulgaris* | BAG - Manfredi (Argentina) |
| Mf3207 | *fastigiata/vulgaris* | BAG - Manfredi (Argentina) |
| Mf3238 | não identificada | BAG - Manfredi (Argentina) |
| Mf3617 | *hypogaea /hirsuta* | BAG - Manfredi (Argentina) |
| Mf3764 | *fastigiata/peruviana* | BAG - Manfredi (Argentina) |
| Mf3892 | *fastigiata/aequatoriana* | BAG - Manfredi (Argentina) |
| Mf3911 | *hypogaea/hirsuta* | BAG - Manfredi (Argentina) |
| Mf513 | *hypogaea/hypogaea* | BAG - Manfredi (Argentina) |
| Mf574 | *hypogaea/hypogaea* | BAG - Manfredi (Argentina) |
| Mf698 | *hypogaea/hypogaea* | BAG - Manfredi (Argentina) |
| Mf788 | *fastigiata/fastigiata* | BAG - Manfredi (Argentina) |
| Mf812 | *hypogaea/hypogaea* | BAG - Manfredi (Argentina) |
| Of103 | *hypogaea* tipoXingu | Parque Indígena do Xingu |
| Of104 | *hypogaea* tipoXingu | Parque Indígena do Xingu |
| Of106 | *hypogaea* tipoXingu | Parque Indígena do Xingu |
| Of107 | *hypogaea* tipoXingu | Parque Indígena do Xingu |
| Of108 | *hypogaea* tipoXingu | Parque Indígena do Xingu |
| Of109 | *hypogaea* tipoXingu | Parque Indígena do Xingu |
| Of111 | *hypogaea* tipoXingu | Parque Indígena do Xingu |
| Of113 | *hypogaea* tipoXingu | Parque Indígena do Xingu |
| Of114 | *hypogaea* tipoXingu | Parque Indígena do Xingu |
| Of116 | *hypogaea* tipoXingu | Parque Indígena do Xingu |
| Of117 | *hypogaea* tipoXingu | Parque Indígena do Xingu |
| Of118 | *hypogaea* tipoXingu | Parque Indígena do Xingu |
| Of119 | *hypogaea* tipoXingu | Parque Indígena do Xingu |
| Of120 | *hypogaea* tipoXingu | Parque Indígena do Xingu |
| Of121 | *hypogaea* tipoXingu | Parque Indígena do Xingu |
| Of122 | *hypogaea* tipoXingu | Parque Indígena do Xingu |
| Of123 | *hypogaea* tipoXingu | Parque Indígena do Xingu |
| Of124 | *hypogaea* tipoXingu | Parque Indígena do Xingu |
| Of126 | *hypogaea* tipoXingu | Parque Indígena do Xingu |
| Of131A | *hypogaea* tipoXingu | Parque Indígena do Xingu |
| Of131B | *hypogaea* tipoXingu | Parque Indígena do Xingu |
| Of267 | *hypogaea* tipoXingu | Parque Indígena do Xingu |
| Of268 | *hypogaea* tipoXingu | Parque Indígena do Xingu |
| Of269 | *hypogaea* tipoXingu | Parque Indígena do Xingu |
| Of271 | *hypogaea* tipoXingu | Parque Indígena do Xingu |
| Of272 | *hypogaea* tipoXingu | Parque Indígena do Xingu |
| Of273 | *hypogaea* tipoXingu | Parque Indígena do Xingu |
| Of274 | *hypogaea* tipoXingu | Parque Indígena do Xingu |
| Of292 | *hypogaea* tipoXingu | Parque Indígena do Xingu |
| Of302 | *hypogaea* tipoXingu | Parque Indígena do Xingu |
| Of303 | *hypogaea* tipoXingu | Parque Indígena do Xingu |
| Paraguaio | *fastigiata/fastigiata* | Rio Grande do Sul, Brasil |
| Pd2622  | *fastigiata/fastigiata* | Bahia, Brasil |
| Pd3146 | *hypogaea/hypogaea* | Rio Grande do Sul, Brasil |
| PM-CM | não identificada | Raças locais de SC |
| PM-P | *hypogaea/hypogaea* | Raças locais de SC |
| ScJs341  | *fastigiata/fastigiata* | Paraíba, Brasil |
| ScJs476  | *hypogaea/hypogaea* | Rio Grande do Sul, Brasil |
| Sv429  | f*astigiata/peruviana* | Yurimáguas, Peru |
| TDPP | *hypogaea/hypogaea* | Raças locais de SC |
| TD-PT | *fastigiata/fastigiata* | Raças locais de SC |
| TO | *hypogaea/hypogaea* | Tocantins, Brasil |
| V12548  | *hypogaea/hypogaea* | Mato Grosso, Brasil |
| V12896  | *fastigiata/fastigiata* | Tocantis, Brasil |
| V13086  | *fastigiata/fastigiata* | Minas Gerais, Brasil |
| V14078  | *hypogaea/hypogaea* | Rio Grande do Sul, Brasil |
| V14165 | *A. monticola* | Jujuy, Argentina |
| (K30076xV14167)c | *A. ipaënsis* x *A. duranensis* | Cenargen, Brasília |

**Tabela 2 –** Sistemas multiplex, incluindo primers marcados com fluorescências 6-FAM (azul), HEX (verde) e NED (amarela), montados a partir do programa Multiplexer 4.0.

| **Multiplex** | **Primers** | **Fluorescência** | **pb** | **Temp. (°C)** |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | TC4D02 | verde | 85-113 | 54 |
|   | PM210 | amarelo | 180-220 | 54 |
|   | TC1A02 | azul | 222-248 | 54 |
|   | RN0x681 | verde | 363-377 | 54 |
|  | TC7E04 | azul | 271-293 | 54 |
|  |  |  |  |  |
| 2 | PM137 | amarelo | 120-160 | 54 |
|   | TC3G05 | azul | 130-135 | 54 |
|   | PM201 | amarelo | 210-250 | 54 |
|  | Seq14G03 | verde | 230-260 | 54 |
|   | PM204 | azul | 215-229 | 54 |
|  | TC9F04 | verde | 122-142 | 54 |
|  |  |  |  |  |
| 3 | PM200 | amarelo | 133-207 | 54 |
|  | Seq4E08 | verde | 100-116 | 54 |
|  | PM3 | azul | 190-216 | 54 |
|  | TC3H02 | azul | 280-300 | 54 |
|  |  |  |  |  |
| 4 | Seq16C07 | azul | 214-274 | 56 |
|  | TC4G10 | amarelo | 199-219 | 56 |
|  | TC9B08 | verde | 90-110 | 56 |
|  |  |  |  |  |
|  5 | TC4E10 | azul | 298-360 | 60 |
|   | Seq15C10 | amarelo | 218-276 | 60 |
|  | pPGPseq3D9 | verde | 291-293 | 60 |
|  | TC4F12 | azul | 213-249 | 60 |
|  | TC7G10 | azul | 118-136 | 60 |
|  |  |  |  |  |
| 6 | TC4D09 | azul | 214-218 | 60 |
|   | Seq18G9 | amarelo | 190-240 | 60 |
|   | Seq19D9 | azul | 243-273 | 60 |
|  | TC3G01 | verde | 250-256 | 60 |
|   |  |  |  |  |
|  7 | RN25B01 | verde | 100-116 | 52 |
|   | PM36 | amarelo | 190-210 | 52 |
|  | TC1E01 | azul | 204-238 | 52 |





**Figura 1 (cont.)** - Dendrograma, obtido pelo método UPGMA, baseado nas distâncias de Rogers modificado (1978), entre 120 acessos de *A. hypogaea*, um acesso de *A. monticola* (V14165) e uma planta anfidiplóide sintética (Tabela 1). As letras após cada acesso correspondem às subespécies e variedades: FF-*fastigiata/fastigiata*; FV-*fastigiata/vulgaris*; FA-*fastigiata/aequatoriana*; FP-*fastigiata/peruviana*; HH-*hypogaea/hypogaea*; HHi-*hypogaea/hirsuta*. Acessos provenientes do Instituto Agronômico de Campinas apresentam IAC seguido de um número de identificação; Mf identifica os acessos do EEA-INTA Manfredi e Of, os do Parque Indígena do Xingu. Os demais são acessos provenientes do BAG-Cenargen.