



## CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE GENITORES DE AMENDOIM FORRAGEIRO POR MEIO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES.

**Resumo:** O amendoim forrageiro é uma leguminosa herbácea tropical com destaque em sua utilização na agropecuária. Este trabalho teve o objetivo de caracterizar molecularmente nove acessos do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Acre utilizados como genitores em cruzamentos de *Arachis* spp. por meio de marcadores microssatélites. Foram utilizados seis locos microssatélites para a caracterização dos acessos de *A. pintoi* e *A. repens*. Através da genotipagem molecular dos locos foi possível caracterizar os nove genitores, estimar a distância genética entre eles e agrupá-los em um dendrograma. Os acessos mais similares foram Ap53 e Ap75, e o que mais apresentou isolamento no agrupamento foi Ar67 único representante da espécie *A. repens*. A utilização de marcadores moleculares se mostrou eficiente na caracterização desses genitores e será importante na geração de novas combinações híbridas entre os acessos utilizados no programa de melhoramento da espécie.

**Palavras-chave:** *Arachis pintoi*, *Arachis repens*, genotipagem

### Introdução

O amendoim forrageiro, pertencente às espécies *Arachis pintoi* Krapov. & W.C. Greg. e *Arachis repens* Handro (KRAPOVICKAS & GREGORY, 1994), possui alto valor forrageiro e vem se destacando nos sistemas agropecuários. É principalmente utilizado na recuperação de pastagens degradadas, em consórcio com gramíneas forrageiras, trazendo diversos benefícios, entre eles, o aumentando da incorporação do nitrogênio atmosférico ao sistema, a elevação do teor de matéria orgânica no solo e o aumento de teor de proteína oferecido aos animais (ASSIS & VALENTIM, 2009). Porém, existem poucas opções de cultivares de amendoim forrageiro no mercado nacional e internacional disponíveis para o produtor (PAGANELLA & VALLS, 2002). A realização de cruzamentos artificiais para a geração de combinações híbridas por meio de genitores contrastantes é de grande interesse para o melhoramento genético da espécie. Uma das técnicas mais indicadas para se estudar polimorfismo entre seqüências de DNA é através dos microssatélites ou SSR (“Simple Sequence Repeats”, TAUTZ & RENS, 1984). São marcadores codominantes e multialélicos e estão amplamente distribuídos no genoma eucarioto (TÓTH *et al.*, 2000). Este trabalho teve como objetivo a



caracterização da diversidade genética de genótipos de amendoim forrageiro utilizados em programas de hibridação.

### Material e Métodos

Foram utilizados nove genótipos (Ap1, Ap8, Ap53, Ap56, Ap61, Ap64, Ap75, Ap77 e Ar67) do Banco de Germoplasma da Embrapa Acre, potenciais genitores selecionados para ensaios de hibridação e geração de novas cultivares. Para a extração do DNA foram coletadas folhas jovens em tubos de 2ml, em que o procedimento de extração seguiu a descrição de Hoisington *et al* (1994) modificado. Seis locos microssatélites descritos na literatura foram utilizados para a caracterização molecular dos genitores. As reações de amplificação seguiram as seguintes condições: 1 minuto a 94°C 30 ciclos de [1 min. 94°C, 1 min. a *Ta* específica, 1 min a 72°C], seguidos de 5 min a 72°C. Os produtos de amplificação foram visualizados em agarose (3%) e aplicados em gel de poliacrilamida desnaturante (6%) p/v, usando *ladder* de 10 pb (Invitrogen) como marcador de peso molecular. Em seguida, foi realizada a coloração de nitrato de prata. As estimativas de heterozigosidade esperada ( $H_E$ ) e observada ( $H_O$ ), distâncias genéticas e agrupamento UPGMA (*Unweighed Pair Group Method Arithmetic Average*) foram analisados no *software* TFPGA.

### Resultados e Discussão

O número total de alelos por loco variou de 6 a 10 alelos/loco. Os valores de heterozigosidade esperada variaram de 0,633 a 0,915 e os de heterozigosidade observada variaram de 0,750 a 0,875. Os locos microssatélites polimórficos foram utilizados para o cálculo de distância genética entre os acessos (Tabela 1) segundo o método de Rogers modificado, e posteriormente foram agrupados em um dendrograma. A menor distância genética foi entre o acesso Ap53 e Ap75 que apresentaram distância= 0,3536, e os de maior distância genética foram entre os acessos Ar67 e Ap77, Ap1 e Ap56 apresentando distância= 0,7071. Através do agrupamento gerado pelo dendrograma (Figura 1) foi possível observar a formação de três grupos distintos, sendo que os grupos mais próximos são o A e B, evidenciando que os acessos que os compõem possuem uma maior similaridade genética. O grupo C possui os acessos mais divergentes dos demais. O acesso Ar67 único representante da espécie *A. repens*, foi o mais divergente de todos.



Tabela 1: Distâncias genéticas obtidas pelo método de Rogers modificado e calculadas a partir de seis locos microssatélites.

	Ap8	Ar67	Ap1	Ap77	Ap61	Ap64	Ap56	Ap75	Ap53
Ap8	0								
Ar67	0,6770	0							
Ap1	0,4564	<b>0,7071</b>	0						
Ap77	0,6124	<b>0,7071</b>	0,5774	0					
Ap61	0,4564	0,6770	0,5774	0,5000	0				
Ap64	0,4082	0,6922	0,5204	0,5204	0,4330	0			
Ap56	0,6124	<b>0,7071</b>	0,5401	0,6455	0,6455	0,6614	0		
Ap75	0,5000	0,6292	0,4787	0,5951	0,5204	0,5401	0,5951	0	
Ap53	0,5000	0,6614	0,4787	0,5951	0,5204	0,5401	0,5590	<b>0,3536</b>	0

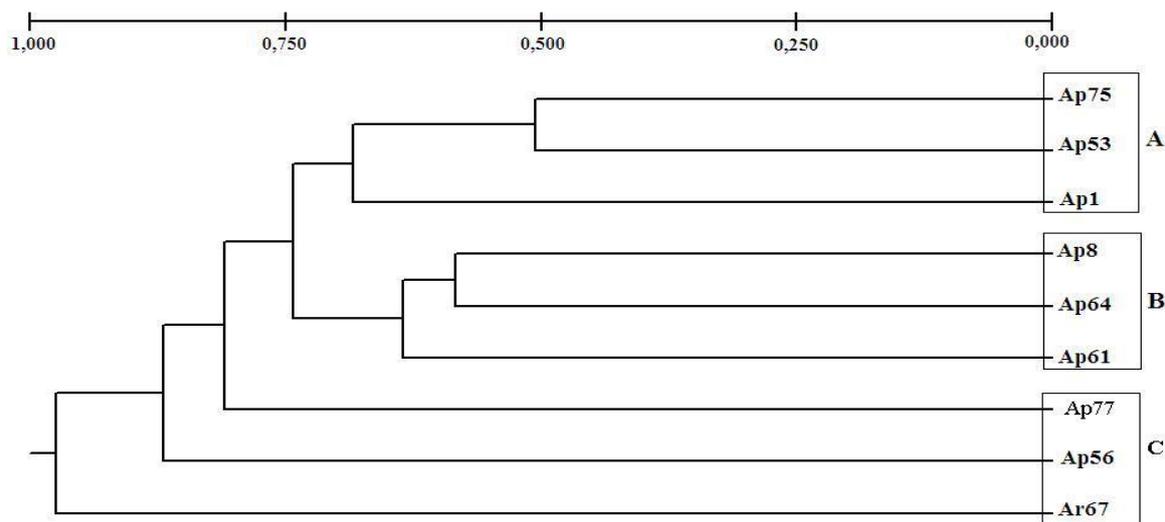


Figura 1: Agrupamento UPGMA de nove genótipos de amendoim forrageiro com seis microssatélites de acordo com as distâncias de Rogers modificado.

## Conclusões

Os marcadores microssatélites utilizados neste trabalho foram extremamente eficientes na análise genética dos genitores, onde foi possível averiguar os mais divergentes entre si. Através dessas informações será possível analisar os genitores com maior distância genética e assim gerar novas combinações híbridas para implementar o programa de melhoramento genético do amendoim forrageiro realizado na Embrapa Acre. Os marcadores moleculares são ferramentas robustas para selecionar e caracterizar genitores contrastantes para auxiliar na realização de cruzamentos.



## Agradecimentos

À UNIPASTO pelo financiamento parcial dos trabalhos realizados e ao CNPq pela bolsa concedida.

## Referências Bibliográficas

- ASSIS, G.M.L. & VALENTIM, J.F. Programa de melhoramento genético do amendoim forrageiro: avaliação agrônômica de acessos no Acre. **Amazônia: Ci. & Desenv.**, v.4, n.8, p. 207-215, 2009.
- HOISINGTON, D.; KHAIRALLAH, M.; GONZÁLEZ-DE-LEÓN, D (1994). Laboratory protocols: CIMMYT applied molecular genetics laboratory, 2<sup>nd</sup> edn. CIMMYT, Mexico, DF.
- KRAPOVICKAS, A. & GREGORY, W. C. Taxonomia del género *Arachis* (Leguminosae). **Bonplandia**, Corrientes, v.8, p. 1-186, 1994.
- PAGANELLA, M. B. & VALLS, J.F.M. Caracterização morfo-agronômica de cultivares e acessos selecionados de *Arachis pinto* Krapov. & W. C. Gregory (Leguminosae). **Pasturas Tropicales**, n. 24, p. 23-30, 2002.
- TAUTZ, D. & RENZ, M. Simple Sequence repeats are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic Acids Research**, v.12, p. 4127-4137, 1984.
- TÓTH, G.; GÁSPARI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. **Genomes Research.**, v.10, p. 81-967, 2000.