

## SIMILARIDADE GENÉTICA DE ACESSOS DE AMENDOIM RESISTENTES À SECA COM BASE EM MARCADORES RAPD

ROSEANE CAVALCANTI DOS SANTOS<sup>1</sup>, FABIANA APARECIDA CAVALCANTE SILVA<sup>2</sup>, ELIZABETH AMÉLIA ALVES DUARTE<sup>2</sup>, REGINALDO CARVALHO<sup>3</sup>, REJANE JUREMA MANSUR CUSTÓDIO NOGUEIRA<sup>3</sup> e PÉRICLES DE ALBUQUERQUE MELO FILHO<sup>2</sup>

**RESUMO:** A similaridade genética entre sete genótipos de amendoim tolerantes e sensíveis ao estresse hídrico foi avaliada baseando-se em marcadores moleculares do tipo RAPD. Doze oligonucleotídeos randomizados foram utilizados como iniciadores para os testes de PCR. As bandas foram submetidas a eletroforese em gel de agarose (1,2%), visualizadas sob luz ultravioleta e fotodocumentadas. Foram observadas 104 regiões genômicas, sendo os oligonucleotídeos AH 06, AH 13, G 09 e AH 16 de maior resposta na obtenção de bandas polimórficas. No dendrograma obtido a partir dos coeficientes de similaridade calculados com base nos padrões de bandas verificou-se a formação de dois grupos distintos, sendo o primeiro formado pelos acessos tolerantes ao estresse hídrico e o segundo, pela cultivar sensível IAC Caiapó. A análise dos dados permite concluir que as linhagens L 100, L 137 e L 55 são de alta similaridade genética, podendo ser avançadas como um bulk de modo a acelerar o processo de seu melhoramento para resistência a seca e que IAC Caiapó, dada à sua divergência, pode ser empregada para ampliar a base genética de futuras cultivares via hibridação.

Termos para indexação: estresse hídrico, divergência genética, oleaginosa

### GENETIC SIMILARITY IN PEANUT ACCESSES RESISTANT TO DROUGHT BASED ON RAPD MARKERS

**ABSTRACT:** Seven tolerant and sensible peanut genotypes were evaluated as to genetic similarity based on RAPD molecular markers. Twelve randomized oligonucleotides were used as primers to PCR assays. Bands were submitted to electrophoresis in agarose gel (1.2%), visualized under ultraviolet light and photo documented. One hundred and four genomic regions were verified and AH 06, AH 13, G 09, AH 16 primers were the best as to obtaining polymorphic bands. Two distinct groups were clustered in dendrogram, based on similarity coefficients gotten by band patterns; the first one was compound for water stress tolerant accesses and the second with just sensible cultivar IAC Caiapó. We concluded that L 100, L 137 and L 55 lines showed high genetic similarity and could be compound as a pool aiming to accelerate the improvement to drought resistance and the genetic divergence verified in IAC Caiapó could be useful to enlarge the genetic base of the further cultivar by hybridization.

Index terms: water stress, genetic divergence, oleaginous

<sup>1</sup>Pesquisadora da Embrapa Algodão, CP. 174, Campina Grande, PB, 58107-720, E-mail: caval@cnpa.embrapa.br,

<sup>2</sup>Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, R. Don Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife-PE, 52171-900, E-mails: fabiana.acs@gmail.com, elizabethad@gmail.com, pericles@depa.ufrpe.br,

<sup>3</sup>Departamento de Botânica, UFRPE, E-mails: reginaldo.ufrpe@gmail.com, rjmansur@terra.com.br

## INTRODUÇÃO

O amendoim é uma oleaginosa de grande importância no mercado mundial de grãos, sendo amplamente cultivado nas regiões semi-árida da Ásia e da África, liderado pela China e pela Índia,

que detêm, juntas, mais de 50% do total de 33 milhões de toneladas produzidas mundialmente (FREITAS et al., 2005). Para o Nordeste brasileiro, onde as condições frequentes de estresse hídrico são limitantes para o bom desempenho agrícola, o amendoim torna-se uma excelente opção por ser de ciclo curto e por possuir mecanismos fisiológicos que capacitam a planta a sobreviver em ambientes com estas características.

A Embrapa Algodão tem desenvolvido pesquisas com amendoim desde a década de 80, dando maior ênfase ao melhoramento para obtenção de cultivares tolerantes ou resistentes ao estresse hídrico (SANTOS, 2005). Para tanto, têm sido utilizados na formação das populações-base, acessos internacionais obtidos do International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, ICRISAT, na Índia, com comprovada resistência para este caráter. As linhagens são avaliadas nos aspectos agrônomo e fisiológico, em regime de sequeiro e em casa de vegetação, respectivamente. Recentemente, têm sido adicionadas aos processos de avaliação as ferramentas da biologia molecular, de modo a elevar a precisão na seleção dos materiais de elite, através do uso de marcadores genéticos.

Relações filogenéticas, taxonômicas e de distâncias genéticas intra e inter-específicas em vários grupos vegetais têm sido estabelecidas com base em marcadores moleculares; entre eles, cita-se o RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA), que é considerado uma ferramenta importante para auxiliar os programas de caracterização e uso de gremoplasma e trabalhos de melhoramento genético. Em *Arachis* este tipo de marcador tem sido amplamente utilizado na detecção da diversidade genética intra e inter específica (GAGLIARDI, 2004).

Em meados da década de 90, uma população F2 de amendoim gerada pelo ICRISAT foi cedida

à Embrapa Algodão para ser avaliada nas condições do Nordeste brasileiro. Esta população, composta de 200 linhagens, foi obtida por meio de cruzamento piramidal, envolvendo oito progenitores divergentes geneticamente, entre eles, o acesso africano 55 437, reconhecidamente resistente à seca (NOGUEIRA et al., 1998). Com o avanço das gerações e dos ciclos de seleção, cinco linhagens foram selecionadas e estão sendo utilizadas como progenitores em cruzamentos com variedades brasileiras, visando à transferência do caráter de resistência à seca.

Neste trabalho procedeu-se a um estudo molecular entre esses acessos com o objetivo de verificar a similaridade mantida entre elas após os vários processos de seleção aos quais foram submetidas, durante três anos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Extração de DNA

Para o presente estudo, utilizaram-se sete genótipos, dentre os quais, cinco linhagens avançadas resistentes à seca e as cultivares 55 437 e IAC Caiapó, resistente e sensível, respectivamente. Uma síntese de alguns descritores agrônômicos dos materiais encontra-se na Tabela 1.

O DNA genômico foi extraído a partir de folhas cotiledonares de cada genótipo, seguindo o protocolo modificado de Dellaporta, descrito em Romano (1988). A quantificação foi feita em gel de agarose (0,8%), utilizando o marcador High Mass (Invitrogen) como controle. Todas as amostras foram padronizadas para 10 ng/ L para a obtenção dos marcadores RAPD.

### Reações de amplificação via RAPD

As reações de amplificação foram conduzidas no termociclador Mastercycler Gradiente, em um volume final de 15 L, contendo 0,2 M de

TABELA 1. Síntese de alguns descritores agrônômicos dos genótipos de amendoim utilizados para o estudo de similaridade genética baseando-se em marcadores do tipo RAPD.

Genótipo	HC	TB	TOS	TV	TS	FS	CS	St/vg	Ciclo (dias)
L 100	Ereto	Spanish	M	M	M	AR	bege	2	1
L 137	Ereto	Spanish	M	M	M	AR	bege	2	1
L 55	Ereto	Spanish	M	M	G	AR	bege	2	1
L 78	Ereto	Spanish	M	P	P	AR	bege	2	1
L 9	Ereto	Spanish	M	M	M	AR	bege	2	1
55 437	Ereto	Spanish	M	P	P	AR	bege	2	1
IAC Caiapó	Rasteiro	Virginia	A	G	G	AL	bege	2	2

HC- hábito de crescimento; TB- tipo botânico; TOS - teor de óleo na semente: B- baixo (< 45%), M- médio (entre 45 e 47%), A- alto (> 48%); TV- tamanho da vagem e TS- tamanho da semente (P= pequena, M= média, G= grande); FS- forma da semente: AR- arredondada; AL- alongada; CS- cor da semente; St/vg- número de semente/vagem; Ciclo- 1 (< 90 dias), 2 (> 130 dias).

cada oligonucleotídeo, 0,25 mM de cada dNTP, 0,10 g de DNA de cada genótipo, 1 U de Taq DNA polimerase, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM de KCl e 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>. As condições de PCR utilizadas foram: 35 ciclos de desnaturação (94 C/15 seg), anelamento (35 C/30 seg) e extensão (72 C/1 min) e um ciclo final de extensão a 72 C/7 min. Doze oligonucleotídeos decâmeros e randômicos da Operon foram utilizados. Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose (1,2%), corados em Sybr Gold (Invitrogen) e fotodocumentados.

#### Análise dos dados

Os produtos da amplificação foram codificados em uma matriz de dados binários para determinação da similaridade genética entre cada par de acesso, utilizando-se o coeficiente de Jaccard. Para obtenção da matriz de similaridade genética e construção do dendrograma empregou-se o programa NTSYSpc 2.10 (NEI, 1979); para o agrupamento das linhagens foi empregada a técnica de aglomeração hierárquica da média aritmética entre pares não ponderados (UPGMA).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos 12 oligonucleotídeos utilizados, 104 regiões genômicas foram obtidas (Tabela 2), tendo os AH 06, AH 13, AH 16 e G 09 gerado maior número de marcas, todos acima de 10. Os oligonucleotídeos AH 10 e AH 16 contêm um códon de iniciação em sua seqüência, ATG e GTG, respectivamente, que podem favorecer o anelamento no início de genes. Isso pode ser útil em linhas de pesquisa, nas quais se pretenda prospectar genes a partir de regiões promotoras já que na reação de PCR, o primer RAPD pode anelar nas fitas do DNA tanto no sentido forward quanto no reverse. O códon de iniciação GTG é raro, porém pode ser uma alternativa, especialmente quando se prospecta genes de microorganismos. Considerando os padrões obtidos com esses oligonucleotídeos e a expressividade das bandas, o isolamento de tais fragmentos pode ser útil para trabalhos de prospecção a partir das isolinhas e da cv. resistente à seca, 55 437.

O dendrograma obtido a partir da matriz de similaridade entre os acessos estudados apresentou dois grupos distintos (Figura 1),

TABELA 2. Relação dos oligonucleotídeos utilizados e padrões obtidos via RAPD a partir de genótipos de amendoim tolerantes e sensíveis ao estresse hídrico.

Oligonucleotídeos	Seqüência	Padrões gerados (polimórficos – monomórficos)
AZ 14	CACGGGTTCC	7
AH 18	GGGCTAGTCA	5
AH 05	TTGCAGGCAG	5
V 06	ACGCCCAGGT	8
AH 09	AGAACCGAGG	9
AH 06	GTAAGCCCT	14
AH 16	CAAGGTGGGT	11
AH 10	GGGATGACCA	8
AH 13	TGAGTCCGA	12
N 15	CAGCGACTGT	6
G 16	AGCGTCTCC	7
G 09	CTGACGTCAC	12
Total		104

sendo o primeiro, constituído por dois subgrupos, dos quais, o primeiro foi composto pelas linhagens L 100, L 137 e L 55 e o segundo, pelas L 78, 55 437 e L9. O segundo grupo conteve apenas a cv. IAC Caiapó, que apareceu mais afastada dos demais.

Os resultados verificados no dendrograma relacionados ao primeiro grupo conferem com o esperado, considerando o alto grau de similaridade genética existente entre estas linhagens que, em condições de campo, têm demonstrado, também, grande similaridade fenotípica. No trabalho de Cabral (1999), foram avaliadas 16 linhagens oriundas da mesma população através de marcadores isoenzimáticos e observou-se que estas linhagens, junto com as 55 437 e L 78 apresentaram alta similaridade genética, a despeito dos vários ciclos seletivos, aos quais a população foi submetida durante o processo de melhoramento.

A IAC Caiapó apresentou apenas 25% de similaridade genética em relação aos demais genótipos, sendo o de maior divergência entre

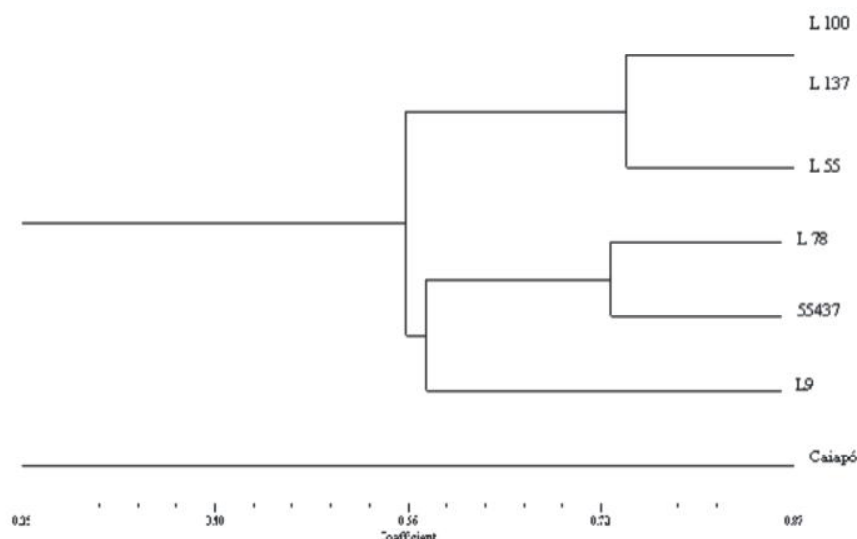


FIG. 1. Dendrograma gerado pelo programa NTSys 2.10 pelo método de clusterização UPGMA baseado nos padrões de bandas geradas via RAPD a partir de genótipos de amendoim tolerantes e sensíveis ao estresse hídrico.

os estudados e, portanto, de grande valor nos trabalhos de hibridação que visem à elevação do nível de variabilidade genética. Apesar de ser de hábito rasteiro e ciclo longo, a IAC Caiapó, traz no seu genoma genes das subespécies *fastigiata* e *hypogaea*, uma vez que foi obtida pelo cruzamento entre um acesso do tipo Virginia e outro do tipo Spanish (GODOY et al., 1999). Isto denota que, embora a referida cultivar tenha se estabelecido geneticamente com o padrão botânico do tipo Virginia, genes remanescentes do progenitor Spanish associados a outros do mesmo grupo botânico, podem auxiliar na obtenção de segregantes menos tardios e de alta produtividade, que são as principais características do tipo botânico Spanish.

### CONCLUSÕES

1. As linhagens L 100, L 137 e L 55 são de alta similaridade genética, podendo ser avançadas como um bulk, de modo a acelerar o processo de seu melhoramento para resistência a seca.

2. A cv. IAC Caiapó é a mais divergente, podendo ser útil em trabalhos de hibridação para ampliar a base genética de populações de amendoim do tipo Spanish.

### REFERÊNCIAS

- CABRAL, E.L. Estudo da similaridade fenotípica e genética em germoplasma de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) resistente à seca. 1999. 56f. Trabalho de Conclusão do Curso (Graduação Bacharelado em Ciências Biológicas)- Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE.
- FREITAS, M.S.; MARTINS, S.S.; NOMI, K.A.; CAMPOS, F.A. Evolução do mercado brasileiro de amendoim. In: SANTOS, R.C. (Ed. Tec.) O agronegócio do amendoim no Brasil. Campina Grande: Embrapa Algodão 2005. p.15-44.
- GAGLIARDI, R.F. et al. Rescue of a non-viable accession and RAPD analysis of recovered plants of *Arachis retusa*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.39, n.2, p.197-199, 2004.
- GODOY, I.J.; MORAES, S.A.; ZANOTTO, M.D.; SANTOS, R.C. Melhoramento do amendoim. In: BORÉM, A. (Ed.) Melhoramento de espécies cultivadas. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1999. 817p.
- NEI, M. LI, W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonuclease. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.76, p.5269-5273. 1979.
- NOGUEIRA, R. J.M.C.; SANTOS, R.C.; BEZERRA NETO, E.; SANTOS, V.F. Comportamento fisiológico de duas cultivares de amendoim submetidas a diferentes regimes hídricos. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.33, n.12, p.1963-1969, 1998.
- ROMANO, E. Extração de DNA de tecidos vegetais. IN: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. Manual de transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, 1998. 309p.
- SANTOS, R.C. Melhoramento genético do amendoim para resistência à seca via hibridação com espécies cultivada e selvagens de *Arachis*. In: NOGUEIRA, R.J.M.C.; ARAUJO, E.L.; WILLADINO, L.G.; CAVALCANTE, U.M.T. Estresses ambientais. Recife: UFRPE, 2005. 500p.