



43ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia  
24 a 27 de Julho de 2006  
João Pessoa - PB

## **ANÁLISE MOLECULAR DA VARIABILIDADE GENÉTICA COMO APOIO AO LANÇAMENTO DE CULTIVARES DE**

FÁBIO GELAPE FALEIRO (1), RONALDO PEREIRA ANDRADE (2), JUDSON FERREIRA VALENTIM (3), CLÁUDIO TAKAO KARIA (4), , CARLOS MAURÍCIO S. DE ANDRADE (5), ALLAN KARDEC BRAGA RAMOS (6), GRACIELE BELLON (7)

(1) Pesquisador da Embrapa Cerrados, BR 020, Km18, Caixa Postal 08223, Planaltina, DF, CEP 73301-970. e-mail: ffaleiro@cpac.embrapa.br;

(2,4,6) Pesquisadores da Embrapa Cerrados

(3,5) Pesquisadores da Embrapa Acre

(7) Estagiária da Embrapa Cerrados

### **RESUMO**

A distinção e a homogeneidade são características chaves para novas cultivares e marcadores moleculares são eficientes ferramentas para avaliar tais características. Neste trabalho, marcadores RAPD foram usados para caracterizar a variabilidade genética entre e dentro de acessos de 'Arachis pintoi'. Foram analisadas 11 plantas do acesso Ap 05 e Ap 31 (dez obtidas na Embrapa Cerrados-EC e uma na Embrapa Acre-EA, para cada acesso) e 11 do acesso Ap 65 (dez obtidas na EA e uma na EC), além do cv Belmonte e Amarillo. Foram gerados 109 marcadores RAPD, dos quais 69 (63,3%) foram polimórficos. Os marcadores foram convertidos em uma matriz de dados binários para estimar distâncias genéticas entre as plantas de cada acesso e realizar análises de agrupamento e dispersão gráfica. Embora pequena, ficou evidente a variabilidade genética dentro dos acessos Ap 05, Ap 31 e Ap 65. O acesso Ap 65 (Embrapa Acre) foi o que apresentou a menor variabilidade genética entre as plantas. Os acessos Ap 65 da Embrapa Acre e Cerrados ocuparam uma mesma região, embora o acesso da Embrapa Cerrados tenha ficado mais próximo do cv. Belmonte. Foi possível verificar que a variabilidade genética dentro dos acessos é menor que a variabilidade entre os acessos. Em conformidade com os resultados obtidos, a pequena variabilidade genética verificada dentro dos acessos pode não interferir no critério de homogeneidade, não sendo restrição para eventuais lançamentos de alguns desses acessos como novas cultivares.

### **PALAVRAS-CHAVE**

amendoim forrageiro, marcadores moleculares, homogeneidade genética

### **MOLECULAR GENETIC VARIABILITY STUDIES TO ASSIST THE RELEASE OF NEW**

### **ABSTRACT**

Distinctness and homogeneity are key characteristics for new cultivars and RAPD analysis is an efficient tool to characterize intra and inter genetic variability in accessions nominated for release. In this work, RAPD molecular markers were used to characterize inter and intra genetic variability in 'Arachis pintoi' accessions. The analysis was performed in 11 plants of the accessions Ap 05 and Ap 31 (ten from Embrapa Cerrados - EC and one from Embrapa Acre – EA, for each accession) and 11 of the Ap 65 (ten from EA and one from EC). Cultivars Belmonte and Amarillo were included as out group. Twelve

decamer primers generated 109 RAPD markers, of which 69 (63,3%) were polymorphic. These markers were transformed into a binary matrix data to estimate genetic distances among plants of the each accession and for cluster and graphical dispersion analysis. Low intra genetic variability occurred for the three accessions, and Ap 65 from Embrapa Acre showed the lowest intra variability among plants. Although accessions Ap 65 from Embrapa Acre and Cerrados were in the same graphical region, the Embrapa Cerrados was closer to cv. Belmonte. Among the accessions, the intra variability was lower than the inter variability. Accordingly, this low intra genetic variability will not affect the homogeneity criteria and do not restrict the eventual release of some of these accessions as new cultivars.

## KEYWORDS

Forage peanut, molecular marker, homogeneity genetic

## INTRODUÇÃO

Dentre as leguminosas tropicais, o amendoim forrageiro, *Arachis pintoi*, devido ao seu potencial na diversificação de pastagem, na incorporação de nitrogênio biológico no sistema e na melhoria do desempenho animal com o fornecimento de uma dieta de melhor qualidade, tem sido estudado na Embrapa desde o início da década de 70 (Karia et al., 2004).

Nos últimos anos, diferentes acessos de *A. pintoi* têm sido avaliados na Embrapa com base em características morfológicas, agrônômicas, citogenéticas, bioquímicas e moleculares. Estudos envolvendo marcadores moleculares têm mostrado que alguns acessos são muito próximos geneticamente do cv. Belmont (Faleiro et al., 2003) e que existem evidências da variabilidade genética dentro de acessos avaliados em diferentes unidades da Embrapa (Faleiro et al., 2005). Neste trabalho, objetivou-se avaliar a variabilidade genética entre e dentro de três promissores acessos de amendoim forrageiro para investigar a homogeneidade genética desses acessos, a qual é essencial para um eventual lançamento de alguns desses acessos como cultivares.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 11 plantas do acesso Ap 05 (dez obtidas na Embrapa Cerrados-EC e uma na Embrapa Acre-EA), 11 do acesso Ap 31 (dez obtidas na EC e uma na EA), 11 do acesso Ap 65 (dez obtidas na EA e uma na EC), além dos cultivares Belmonte e Amarillo, utilizados como "out group". As análises foram feitas no Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Embrapa Cerrados. Cada planta de cada acesso foi cultivada na Embrapa Cerrados, por propagação vegetativa, para produção de folhas visando a extração de DNA genômico. Amostras de DNA de cada material genético foram amplificadas para obtenção de marcadores RAPD.

As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 13  $\mu$ L, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, 100  $\mu$ M de cada um dos desoxiribonucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,4  $\mu$ M de um "primer" (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA), uma unidade da enzima Taq polimerase e, aproximadamente, 15 ng de DNA. Para obtenção dos marcadores RAPD foram utilizados 12 primers decâmeros: OPD (2, 7, 8), OPE 18, OPF 12, OPG (9, 10, 12), OPH (2, 4, 17, 19). As amplificações foram efetuadas em termociclador programado para 40 ciclos, cada um constituído pela seguinte seqüência: 15 Segundos a 94 °C, 30 segundos a 35 °C e 90 segundos a 72 °C. Após os 40 ciclos, foi feita uma etapa de extensão final de seis minutos a 72 °C e, finalmente, a temperatura foi reduzida para 4 °C. Após a amplificação, foram adicionados, a cada amostra, 3  $\mu$ L de uma mistura de azul de bromofenol (0,25%) e glicerol (60%) em água. Essas amostras foram aplicadas em gel de agarose (1,2%), corado com brometo de etídio, submerso em tampão TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1 mM). A separação eletroforética foi de, aproximadamente, quatro horas, a 90 volts. Ao término da corrida, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta.

Os marcadores RAPD gerados foram convertidos em uma matriz de dados binários, a partir da qual foram estimadas as distâncias genéticas entre as plantas, com base no complemento do coeficiente de

similaridade de Nei & Li, utilizando-se o Programa Genes (Cruz, 1997). A matriz de distâncias genéticas foi utilizada para realizar a análise de agrupamento, utilizando o método do UPGMA, e dispersão gráfica baseada em escalas multidimensionais usando o método das coordenadas principais, com auxílio do Programa SAS e do Programa Statistica (Statsoft Inc., 1999).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 12 primers decâmeros geraram um total de 109 marcadores RAPD, perfazendo uma média de 9,1 marcadores por primer. Dos 109 marcadores, 69 (63,3%) foram polimórficos. A média de marcadores por primer e a porcentagem de marcadores polimórficos foram semelhantes às obtidas por Faleiro et al. (2003, 2005).

As distâncias genéticas entre as plantas dentro de cada acesso mostraram que, embora pequena, existe uma variabilidade genética dentro dos acessos Ap05, Ap31 e Ap65. Os marcadores moleculares permitiram separar as plantas de cada um dos acessos Ap05, Ap31 e Ap65, além dos cultivares Belmonte e Amarillo (Figura 1). Estes resultados evidenciam que a variabilidade genética entre os acessos é maior que a variabilidade dentro de acesso.

Com base na análise do gráfico de dispersão (Figura 2), pode-se verificar também que o Ap65 (Embrapa Acre) foi o que apresentou a menor variabilidade genética dentro, evidenciando uma maior homogeneidade das plantas deste acesso. Chama a atenção a diferença genética da planta do Ap 65 da Embrapa Cerrados em relação às plantas do mesmo acesso da Embrapa Acre. A planta do Ap 65 da Embrapa Cerrados ficou bem próxima do cv. Belmont, o que não aconteceu com as plantas do Ap 65 da Embrapa Acre. A proximidade genética do Ap 65 da Embrapa Cerrados e o cv. Belmont já havia sido observada por Andrade et al. (2002) com base na produção de matéria seca e por Faleiro et al. (2003, 2005) com base em marcadores moleculares. Como relatado por Faleiro et al. (2005), diferenças entre o Ap 65 da Embrapa Cerrados e o Ap 65 da Embrapa Acre relacionadas à morfologia das folhas e, principalmente, relacionadas à produção de sementes estão sendo observadas em condições experimentais. O fato das plantas do Ap 65 da Embrapa Acre e da planta do Ap 65 da Embrapa Cerrados ocuparem uma mesma região gráfica indica que a diferença genética não é devida a troca de etiqueta ou erros na condução dos experimentos, mas sim, devida à variabilidade genética dentro do acesso. Tal hipótese já havia sido levantada por Faleiro et al. (2005).

A análise da dispersão gráfica das plantas dos acessos Ap 05, Ap 31 e Ap 65 mostra que, dentro do acesso, as plantas originadas da mesma unidade da Embrapa ficaram mais fortemente agrupadas. Este resultado indica que pode estar havendo algum tipo de seleção natural dentro do acesso em cada unidade. Tal seleção pode estar ocorrendo com a sucessão dos plantios ao longo dos anos por meio de propagação vegetativa, levando a uma maior homogeneidade genética das plantas do acesso. Tal seleção diferenciada em cada ambiente, pode explicar as diferenças genéticas observadas entre plantas do mesmo acesso na Embrapa Cerrados e na Embrapa Acre.

## CONCLUSÕES

Os resultados mostraram que, embora pequena, existe uma variabilidade genética dentro dos acessos Ap 05, Ap 31 e Ap 65, a qual pode não interferir na homogeneidade, não sendo restrição para um eventual lançamento desses acessos como cultivares. O Ap 65 da Embrapa Acre foi o acesso que apresentou a menor variabilidade genética dentro, evidenciando uma maior homogeneidade genética das plantas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDRADE, R.P.; KARIA, C.T.; SOUZA, M.A. . Tolerância ao sombreamento de acessos de *Arachis pintoi*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 39, 2002, Recife. Anais... Sociedade Brasileira de Zootecnia. CD-ROM. Forragicultura.
2. CRUZ, C.D. . Programa Genes: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: Editora

UFV, 1997. 442p.

3. FALEIRO, F.G.; ANDRADE, R.P.; KARIA, C.T. et al.. Similaridade genética de acessos de “Arachis pintoi” com diferentes níveis de produtividade de matéria seca com base em marcadores RAPD. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 40, 2003, Santa Maria. Anais...Sociedade Brasileira de Zootecnia. CD-ROM. 2003. 5p.

4. FALEIRO, F.G.; ANDRADE, R.P.; KARIA, C.T. et al. Variabilidade de acessos de Arachis pintoi avaliados em diferentes centros de pesquisa da Embrapa com base em marcadores RAPD. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42, 2005, Goiânia. Anais...Sociedade Brasileira de Zootecnia. CD-ROM. 2005. 5p.

5. KARIA, C.T.; ANDRADE, R.P.; RAMOS, A.K.B. et al.. Pesquisa e desenvolvimento de cultivares de amendoim forrageiro para a região do Cerrado. In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE ESPECIALISTAS EM “ARACHIS”, 4, 2004, Brasília. Anais... Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 2004. (no prelo)

6. STATISTICA for Windows [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc., 2300 East 14th Street, Tulsa. 1999.