

VARIABILIDADE GENÉTICA DE ACESSOS DE "ARACHIS PINTOI" AVALIADOS EM DIFERENTES CENTROS DE PESQUISA DA EMBRAPA COM BASE EM MARCADORES RAPD

FÁBIO GELAPE FALEIRO ¹, RONALDO PEREIRA ANDRADE ², CLÁUDIO TAKAO KARIA ³, JUDSON FERREIRA VALENTIM ⁴, CARLOS MAURÍCIO S. DE ANDRADE ⁵, ALLAN KARDEC BRAGA RAMOS ⁶, GRACIELE BELLON ⁷, ANDRÉA DEL PILAR DE SOUZA PENALOZA ⁸, JOSÉ FRANCISCO MONTENEGRO VALLS ⁹

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

² Pesquisador da Embrapa Cerrados. e-mail: ronaldo@cpac.embrapa.br

³ Pesquisador da Embrapa Cerrados. e-mail: karia@cpac.embrapa.br

⁴ Pesquisador da Embrapa Acre. e-mail: judson@cpafac.embrapa.br

⁵ Pesquisador da Embrapa Acre. e-mail: mauricio@cpafac.embrapa.br

⁶ Pesquisador da Embrapa Cerrados. e-mail: allan@cpac.embrapa.br

⁷ Estagiária da Embrapa Cerrados. e-mail: bellon@cpac.embrapa.br

⁸ Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. e-mail: andrea@cenargen.embrapa.br

⁹ Pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. e-mail: valls@cenargen.embrapa.br

RESUMO A variabilidade genética de 5 acessos de *Arachis pintoii* (cv. Amarillo, cv. Belmonte, Ap 05, Ap 31 e Ap 65) existentes na Embrapa Cerrados, Acre e Recursos Genéticos e Biotecnologia foi avaliada utilizando marcadores moleculares RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA"). Para cada acesso, marcadores RAPD foram gerados utilizando DNA genômico obtido a partir de tecido foliar de plantas provenientes de cada um dos três Centros da Embrapa. Foram utilizados 15 "primers" decâmeros os quais geraram 143 marcadores RAPD, dos quais 78 (54,5%) foram polimórficos. Os marcadores gerados foram convertidos em uma matriz de dados binários para estimar distâncias genéticas entre os acessos e realizar análises de agrupamento e dispersão gráfica. As diferenças genéticas entre as plantas do cv. Amarillo provenientes das três unidades da Embrapa foram mínimas. O mesmo foi verificado para as plantas do cv. Belmonte e do acesso Ap 31. Entretanto, foram verificadas diferenças genéticas entre as plantas do acesso Ap 05 e do Ap 65 provenientes das diferentes unidades da Embrapa. O Ap 65 da Embrapa Cerrados ficou muito próximo geneticamente do cv. Belmonte. Tal proximidade não foi verificada com o Ap 65 da Embrapa Acre. Ficou evidenciada a variabilidade genética dentro dos acessos Ap 05 e Ap 65 de "*A. pintoii*" o que corrobora com dados morfo-agronômicos avaliados a campo e trabalhos anteriores utilizando marcadores moleculares.

PALAVRAS-CHAVE amendoim forrageiro, diversidade molecular, germoplasma, leguminosa forrageira

GENETIC VARIABILITY OF "ARACHIS PINTOI" ACCESSIONS EVALUTED IN THREE DIFFERENT EMBRAPA RESEARCH CENTERS USING RAPD MARKERS

ABSTRACT The genetic variability of "*Arachis pintoii*" accessions (cv. Amarillo, cv. Belmonte, Ap 05, Ap 31 e Ap 65) from Embrapa Cerrados, Acre e Recursos Genéticos e Biotecnologia was evaluated using RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA") molecular markers. For each accession, RAPD markers were obtained using genomic DNA of plants from each Embrapa Research Center. Fifteen decamer primers were used. These primers generated 143 RAPD markers, of which 78 (54.8%) were polymorphic. These markers were transformed into a binary matrix data to estimate genetic distances between the accessions and for cluster and graphical dispersion analysis. The genetic differences among cv. Amarillo plants from each Center were minimum. The same result was verified for the cv. Belmonte and Ap 31 plants. However, genetic differences were verified among Ap 05 and Ap65 plants from each Embrapa Research Center. The Ap 65 from Embrapa Cerrados is very similar to cv. Belmonte. This similarity was not verified with the Ap 65 from Embrapa Acre. These results showed the intra-accession genetic variability in Ap 05 and Ap 65 and confirm previous field morphological and agronomic evaluations and molecular characterization.

KEYWORDS Forage peanut, molecular diversity, germplasm, Forage Leguminosae

INTRODUÇÃO

A utilização de leguminosas forrageiras tem sido preconizada como forma de diversificação de pastagem, de incorporar nitrogênio biológico no sistema e minimizar a perda da capacidade produtiva dos pastos, além de melhorar o desempenho animal com o fornecimento de uma dieta de melhor qualidade. Dentre as leguminosas tropicais, o amendoim forrageiro, devido ao seu comprovado potencial, tem sido estudado na Embrapa desde o início da década de 70 (Karia et al., 2004). Os estudos realizados na Embrapa envolvem a coleta, conservação, caracterização e avaliação de germoplasma, bem como a definição de práticas culturais relacionadas à adubação, taxa de semeadura, controle de pragas e doenças, produção de sementes e manejo das pastagens. Nos últimos anos, diferentes acessos de "A. pintoj" têm sido avaliados em diferentes unidades da Embrapa com base em características morfológicas, agrônômicas, citogenéticas, bioquímicas e moleculares. Diferenças fenotípicas do mesmo acesso avaliado nos diferentes locais têm sido verificadas. Neste trabalho, objetivou-se avaliar a variabilidade genética de cinco acessos de "Arachis pintoj" (cv. Amarillo, cv. Belmonte, Ap 05, Ap 31 e Ap 65) provenientes da Embrapa Cerrados, Embrapa Acre e Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia utilizando marcadores moleculares RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA") e investigar a origem das variações fenotípicas verificadas dentro dos acessos.

MATERIAL E MÉTODOS

Cinco acessos de amendoim forrageiro (cv. Amarillo, cv. Belmonte, Ap 05, Ap 31 e Ap 65) foram analisados no presente trabalho. Para cada acesso, plantas utilizadas em experimentação na Embrapa Cerrados, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e Embrapa Acre (Tabela 1) foram analisadas com base em marcadores RAPD. As análises foram feitas no Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Embrapa Cerrados. Cada planta de cada acesso de cada unidade da Embrapa foi cultivada na Embrapa Cerrados, por propagação vegetativa, para produção de folhas visando a extração de DNA genômico. A extração foi feita utilizando o método do CTAB, com modificações (Faleiro et al., 2003a). 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 μ L, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 3 mM, 100 μ M de cada um dos desoxiribonucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,4 μ 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 15 "primers" decâmeros: OPD (7, 8, 10), OPE (2, 18), OPF (1, 2, 5), OPG (9, 10, 12), OPH (2, 4, 16, 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 μ 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 diferentes 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 e dispersão gráfica baseada em escalas multidimensionais usando o método das cordeadas principais, com auxílio do Programa SAS e do Programa Statistica (Statsoft Inc., 1999).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 15 "primers" decâmeros geraram um total de 143 marcadores RAPD, perfazendo uma média de 9,5 marcadores por primer. Dos 143 marcadores, 78 (54,8%) foram polimórficos. A média de marcadores por primer e a porcentagem de marcadores polimórficos foi semelhante ao obtido por Faleiro et al. (2003b) que analisaram a similaridade genética de uma coleção de trabalho de "A. pintoj" composta por 10 acessos. As distâncias genéticas entre as plantas dentro de cada acesso mostraram que as três plantas do cv. Amarillo são extremamente próximas, as três plantas do cv. Belmonte são praticamente idênticas e uma pequena diferença genética foi verificada entre as plantas do Ap 31 (Tabela 1). Maiores diferenças genéticas foram verificadas entre as plantas do cv. Ap 05 e do Ap 65 (Tabela 1). Tais diferenças evidenciam uma variabilidade genética intra acesso. A análise de dispersão gráfica (Figura 1) ilustra a proximidade entre as plantas do cv. Amarillo, cv. Belmonte e Ap 31 e as diferenças genéticas entre as plantas do Ap 05 e do Ap 65. Pode-se observar que as plantas do Ap 05, embora diferentes, ocupam a mesma região gráfica, o mesmo acontecendo com as plantas do Ap 65. Tal observação é um indicativo que as diferenças genéticas entre as plantas do Ap 05 e do Ap 65 não são devidas a trocas de etiquetas ou erros na condução dos experimentos, mas sim devidas, provavelmente, à variabilidade genética intra-acesso. Outra observação verificada no gráfico é que o Ap 65 da Embrapa Cerrados ficou muito próximo do cv. Belmonte. Tal proximidade genética já havia sido observada por

Andrade et al. (2002) com base na produção de matéria seca e por Faleiro et al. (2003b) com base em marcadores moleculares. O Ap 65 da Embrapa Acre, por sua vez, não ficou próximo do cv. Belmonte. 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. Os resultados do presente trabalho mostram que tais diferenças não são devidas essencialmente aos efeitos ambientais, mas sim às diferenças genéticas entre esses materiais.

CONCLUSÕES

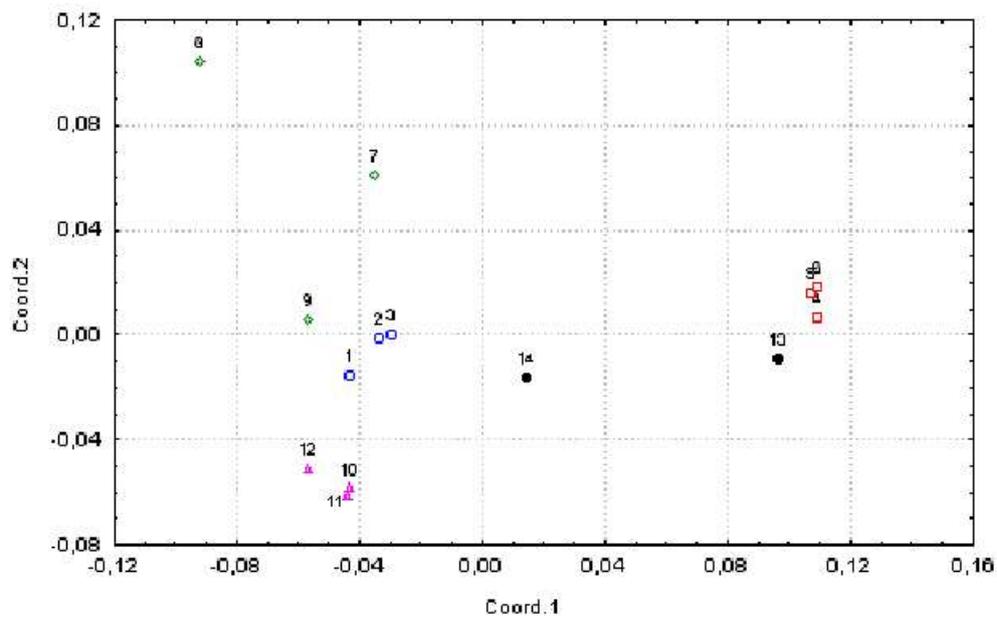
Ficou evidenciada a variabilidade genética dentro dos acessos Ap 05 e Ap 65. A distância genética entre o Ap 65 da Embrapa Acre em relação ao Ap 65 da Embrapa Cerrados e ao cv. Belmonte mostra a importância desse material para a ampliação da base genética do amendoim forrageiro, considerando os dados iniciais promissores relacionados principalmente à alta produção de sementes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- CRUZ, C.D. . Programa Genes: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: Editora UFV, 1997. 442p.
- FALEIRO, F.G.; FALEIRO, A.S.G.; CORDEIRO, M.C.R. et al. . Metodologia para operacionalizar a extração de DNA de espécies nativas do cerrado. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2003a. (Comunicado Técnico No.92) 6p.
- 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.
- 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)
- STATSOFT, INC. . STATISTICA for Windows [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc., 2300 East 14th Street, Tulsa. 1999.

TABELA 1. Matriz de distâncias genéticas entre os 14 materiais genéticos de "Arachis pintoi", calculadas com base no complemento do coeficiente de similaridade de Nei e Li, utilizando 143 marcadores RAPD.

Materiais	Origem	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
1	Amarillo	EC	0,000	0,000	0,034	0,164	0,181	0,174	0,111	0,179	0,126	0,096	0,125	0,115	0,161	0,133
2	Amarillo	ERB	0,000	0,000	0,006	0,146	0,148	0,148	0,074	0,130	0,106	0,076	0,103	0,104	0,143	0,099
3	Amarillo	EA	0,034	0,006	0,000	0,159	0,158	0,156	0,097	0,157	0,123	0,089	0,128	0,125	0,151	0,105
4	Belmonte	EC	0,164	0,146	0,159	0,000	0,000	0,010	0,163	0,237	0,176	0,159	0,171	0,175	0,026	0,114
5	Belmonte	ERB	0,181	0,148	0,158	0,000	0,000	0,000	0,146	0,213	0,176	0,172	0,179	0,185	0,029	0,091
6	Belmonte	EA	0,174	0,148	0,156	0,010	0,000	0,000	0,157	0,221	0,175	0,174	0,176	0,190	0,037	0,108
7	Ap05	EC	0,111	0,074	0,097	0,163	0,146	0,157	0,000	0,126	0,128	0,078	0,130	0,135	0,173	0,106
8	Ap05	ERB	0,179	0,130	0,157	0,237	0,213	0,221	0,126	0,000	0,126	0,179	0,171	0,155	0,211	0,157
9	Ap05	EA	0,126	0,106	0,123	0,176	0,176	0,175	0,128	0,126	0,000	0,119	0,082	0,071	0,158	0,095
10	Ap31	EC	0,096	0,076	0,089	0,159	0,172	0,174	0,078	0,179	0,119	0,000	0,068	0,068	0,155	0,091
11	Ap31	ERB	0,125	0,103	0,128	0,171	0,179	0,176	0,130	0,171	0,082	0,068	0,000	0,019	0,159	0,067
12	Ap31	EA	0,115	0,104	0,125	0,175	0,185	0,190	0,135	0,155	0,071	0,068	0,019	0,000	0,152	0,077
13	Ap65	EC	0,161	0,143	0,151	0,026	0,029	0,037	0,173	0,211	0,158	0,155	0,159	0,152	0,000	0,089
14	Ap65	EA	0,133	0,099	0,105	0,114	0,091	0,108	0,106	0,157	0,095	0,091	0,067	0,077	0,089	0,000



EC-Embrapa Cerrados; ERB-Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia; EA-Embrapa Acre

FIGURA 1. Dispersão gráfica e análise de agrupamento de 14 materiais genéticos de "Arachis pintoi" com base na matriz de distâncias genéticas. Os acessos correspondentes aos números (1-14) são referidos na Tabela 1. Os materiais genéticos com o mesmo símbolo pertencem ao mesmo acesso.