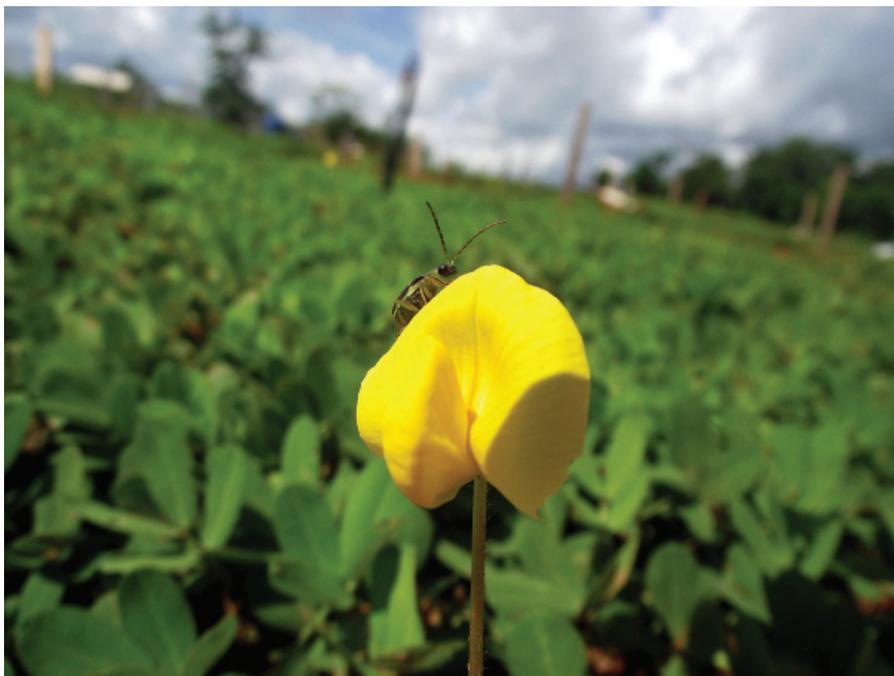


## **Protocolo para Identificação de Híbridos de Amendoim Forrageiro Utilizando Marcador Molecular Microssatélite**



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Acre  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

## **Documentos 146**

# **Protocolo para Identificação de Híbridos de Amendoim Forrageiro Utilizando Marcador Molecular Microssatélite**

*Tatiana de Campos  
Hellen Sandra Freires da Silva Azêvedo  
Jônatas Chagas de Oliveira  
Jaíre Alves Ferreira Filho  
Renata Beltrão Teixeira Yomura  
Luciélcio Manoel da Silva*

Embrapa Acre  
Rio Branco, AC  
2016

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

### **Embrapa Acre**

Rodovia BR 364, km 14, sentido Rio Branco/Porto Velho

Caixa Postal 321

CEP 69908-970 Rio Branco, AC

Fone: (68) 3212-3200

Fax: (68) 3212-3285

<http://www.embrapa.br/acre>

<https://www.embrapa.br/fale-conosco>

### **Comitê de Publicações da Unidade**

Presidente: José Marques Carneiro Júnior

Secretária-Executiva: *Claudia Carvalho Sena*

Membros: *Carlos Mauricio Soares de Andrade, Celso Luis Bergo, Evandro Orfanó Figueiredo, Patrícia Silva Flores, Rivaldalve Coelho Gonçalves, Rodrigo Souza Santos, Rogério Resende Martins Ferreira, Tadário Kamel de Oliveira, Tatiana de Campos*

Supervisão editorial: *Claudia Carvalho Sena / Suely Moreira de Melo*

Revisão de texto: *Claudia Carvalho Sena / Suely Moreira de Melo*

Normalização bibliográfica: *Renata do Carmo França Seabra*

Editoração eletrônica: *Eduardo Pereira*

Foto da capa: *Jônatas Chagas de Oliveira*

### **1ª edição**

1ª impressão (2016): 300 exemplares

### **Todos os direitos reservados.**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

### **Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) Embrapa Acre**

---

Protocolo para identificação de híbridos de amendoim forrageiro utilizando marcador molecular microssatélite / por Tatiana de Campos ... [et al]. – Rio Branco, AC: Embrapa Acre, 2016.

29 p.: il. color. – (Documentos / Embrapa Acre, ISSN 0104-9046; 146).

1. Amendoim forrageiro. 2. *Arachis pintoi*. 3. Melhoramento genético. 4. Marcador molecular. 5. Campos, Tatiana de. I. Embrapa Acre. II. Série.

---

631.5233

©Embrapa 2016

# **Autores**

## **Tatiana de Campos**

Bióloga, doutora em Genética e Biologia Molecular, pesquisadora da Embrapa Acre, Rio Branco, AC

## **Hellen Sandra Freires da Silva Azêvedo**

Bióloga, doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte, Rio Branco, AC

## **Jônatas Chagas de Oliveira**

Biólogo, doutorando do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte, Rio Branco, AC

## **Jaire Alves Ferreira Filho**

Biólogo, doutorando do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP

## **Renata Beltrão Teixeira Yomura**

Engenheira química, mestre em Engenharia de Processos, analista da Embrapa Acre, Rio Branco, AC

## **Lucielio Manoel da Silva**

Engenheiro-agrônomo, doutorando do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte, analista da Embrapa Acre, Rio Branco, AC



# Apresentação

A pecuária na Amazônia representa uma cadeia produtiva importante para pequenos, médios e grandes produtores, uma vez que mais de 80% das áreas desmatadas são ocupadas por pastagens e cerca da metade delas encontra-se degradada ou em vias de degradação.

A utilização de pastagens consorciadas pode ser uma alternativa de recuperação, manutenção da produtividade por um período maior e redução do tempo dos animais no pasto. Essa tecnologia tem sido amplamente defendida e utilizada pelos pecuaristas.

A utilização do amendoim forrageiro em consórcio com gramíneas em pastagens tem mostrado resultados bastante significativos em relação ao aumento na rentabilidade e melhoria das condições do pasto. No entanto, ainda há baixa oferta de cultivares no mercado. No programa de melhoramento de amendoim forrageiro, a obtenção de novas cultivares pelo processo de hibridação depende da identificação das progênies recombinantes, que apresentam nova combinação genética, não herdada dos pais.

A Embrapa Acre vem trabalhando com métodos convencionais de melhoramento associados à biologia molecular na área de marcadores. A aplicação de marcadores moleculares para identificação dos híbridos é fundamental para a certificação da origem genética das plantas. Assim, o objetivo deste documento é apresentar um protocolo completo de fácil compreensão para genotipagem com marcadores microssatélites visando identificação de progênies oriundas de cruzamentos controlados, de forma a difundir o procedimento metodológico e contribuir com o melhoramento genético dessa espécie.

*Eufra Ferreira do Amaral*  
Chefe-Geral da Embrapa Acre



# Sumário

<b>Introdução .....</b>	<b>9</b>
<b>Biologia floral.....</b>	<b>10</b>
<b>Obtenção de híbridos artificialmente .....</b>	<b>11</b>
<b>Marcadores usados na identificação de híbridos .....</b>	<b>11</b>
<b>Protocolo para identificação de híbridos por microsatélites .....</b>	<b>13</b>
<b>Preparo das soluções usadas no processo.....</b>	<b>24</b>
<b>Referências .....</b>	<b>26</b>



# Protocolo para Identificação de Híbridos de Amendoim Forrageiro Utilizando Marcador Molecular Microssatélite

---

*Tatiana de Campos*  
*Hellen Sandra Freires da Silva Azêvedo*  
*Jônatas Chagas de Oliveira*  
*Jaire Alves Ferreira Filho*  
*Renata Beltrão Teixeira Yomura*  
*Lucielio Manoel da Silva*

## Introdução

O amendoim forrageiro (*Arachis pintoi* Krapov. & W.C. Gregory) é uma espécie diploide com 10 pares de cromossomos (LEWIS et al., 2005). Utilizado em consórcio com gramíneas forrageiras tem como vantagem o aumento do teor de nitrogênio e de matéria orgânica no solo e de proteína na pastagem (ASSIS; VALENTIM, 2009). Há apenas seis cultivares registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2016), o que exige o desenvolvimento de novos materiais adaptados às diferentes condições edafoclimáticas do País.

A espécie *Arachis pintoi* é perene, possui hábito de crescimento estolonífero e produz raízes nos nós. É exclusiva da flora brasileira, ocorrendo desde o Planalto Central, no Estado de Goiás, até o litoral da Bahia (KRAPOVICKAS; GREGORY, 1994).

O programa de melhoramento genético de amendoim forrageiro é recente e tem apresentado alguns entraves, tais como a dificuldade de realização da hibridação artificial e a limitação de identificação dos híbridos por marcadores morfológicos contrastantes. Nesse contexto, a utilização de ferramentas moleculares pode auxiliar o programa de melhoramento genético de amendoim forrageiro.

## Biologia floral

As flores papilionáceas são originárias de inflorescências axilares em forma de espigas, cálice bilabiado pubescente, com lábio inferior simples e um lábio superior amplo, com quatro dentes pequenos no ápice, resultantes da fusão de quatro sépalas (ARGEL; PIZARRO, 1992). A corola é formada por um estandarte, duas asas e quilha pontiaguda, curvada e aberta ventralmente na base, muito delgada e com variação de cor (ARGEL; PIZARRO, 1992; SIMPSON et al., 1994).

A biologia floral encontrada nas espécies de *Arachis* é considerada favorável à autofecundação, pois apresentam flores hermafroditas. Porém, estudo para determinar a taxa de polinização cruzada natural revelou *Arachis pintoi* como uma espécie de sistema reprodutivo misto (OLIVEIRA, 2015).

A presença de flores chamativas indica a evolução de caracteres florais que favorecem a visita de insetos (COSTA, 2012), o que pode propiciar a polinização cruzada. Os principais visitantes das flores de *A. pintoi* são himenópteros e coleópteros, como *Apis mellifera* e membros dos gêneros *Bombus*, *Megachiline*, *Nomia*, *Pithitis* e *Lasioglossum*, os quais necessitam abrir as pétalas das asas para ter acesso ao pólen (DRUMOND; CARDOSO, 2003; NIGAM et al., 1990).

Nas condições ambientais do Estado do Acre e em casa de vegetação, o florescimento tem início aos 23 dias após o plantio, com a abertura das flores ocorrendo pela parte da manhã, ocasião em que o estigma está receptivo e os grãos de pólen altamente viáveis (FLORES et al., 2015). A fertilização ocorre cerca de 16 horas após o grão de pólen

atingir o estigma e é confirmada pelo surgimento do ginóforo ou “peg”, aproximadamente 15 dias após a polinização (PERES; VALLS, 2002).

## **Obtenção de híbridos artificialmente**

Híbrido é o produto obtido a partir do cruzamento entre genitores geneticamente distintos. De modo geral, a obtenção de híbrido artificial segue as etapas: seleção dos genitores, emasculação do genitor feminino, polinização artificial com pólen do genitor masculino, avaliação da fertilização por meio da frutificação e confirmação da obtenção do híbrido.

A polinização artificial em amendoim forrageiro é bastante difícil e, provavelmente, essa dificuldade está relacionada ao pequeno tamanho da flor e do estigma e à fragilidade da flor ao ser manipulada, o que tem resultado em baixas taxas de obtenção de híbridos.

## **Marcadores usados na identificação de híbridos**

A identificação de indivíduos híbridos pode ser realizada tanto por marcadores morfológicos e citogenéticos, como por marcadores moleculares. Os primeiros são caracterizados por um fenótipo de fácil classificação e com baixo custo para análise, porém, exigem que a espécie possua marcador monogênico, dominante e contrastante. No amendoim forrageiro apenas a cor da flor é relatada como marcador morfológico de fácil identificação, porém, a maioria dos genótipos usados no programa de melhoramento possui uma única cor de flor, o que dificulta o uso desse caráter para identificação dos híbridos. Essa dificuldade é facilmente superada com o uso de marcadores moleculares.

O uso de marcador molecular tem se mostrado indispensável, uma vez que o acompanhamento de ensaios de hibridação por meio de marcadores morfológicos é limitado. Uma das técnicas mais indicadas para estudar polimorfismo entre sequências de DNA é por meio dos microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*, TAUTZ; RENZ, 1984). Essa classe de marcadores amplifica regiões do genoma que contêm DNA repetitivo, por meio do uso de iniciadores específicos, que são frequentemente multialélicos, segregam de modo codominante e estão amplamente distribuídos no genoma eucariótico (TÓTH et al., 2000). Por ser um marcador com elevado grau de polimorfismo e reprodutibilidade, os microssatélites são ideais em um estudo de certificação de híbridos.

Existem marcadores microssatélites descritos para amendoim forrageiro (PALMIERI et al., 2010), mas a metodologia do processo, desde a extração do DNA até a leitura dos resultados no gel de poliacrilamida e a interpretação dos dados para certificação de hibridação, não está descrita em um único documento, dificultando a adoção imediata por outros pesquisadores, principalmente aqueles que não têm experiência na área.

Diante do exposto, o presente documento tem como objetivo descrever de forma prática e detalhada todas as etapas laboratoriais para análise genética de confirmação do material obtido nas hibridações artificiais de amendoim forrageiro utilizando marcadores microssatélites, visando dar apoio às atividades de melhoramento genético.

## Protocolo para identificação de híbridos por microssatélites

A identificação de híbridos de amendoim forrageiro com uso de marcadores microssatélites com revelação em prata é composta por quatro etapas sequenciais. A seguir serão descritas as etapas e as soluções usadas em cada uma delas.

**Etapas 1. Extração de DNA total** (HOISINGTON et al., 1994, com modificações)

1. Coletar folíolos jovens (aproximadamente 150 mg), lavar com água destilada e colocar em microtubo de 2 mL (Figura 1A) e manter em gelo até o momento da extração do DNA no laboratório.

2. Em laboratório, inserir duas microesferas de inox em cada microtubo e, em capela de exaustão, adicionar 698,6  $\mu\text{L}$  da solução de CTAB 2% e 1,4  $\mu\text{L}$   $\beta$ -mercaptoetanol (Figura 1B).

3. Em seguida, levar as amostras ao triturador (Figura 1C) por 40 segundos a 6.000 rpm.

Observação: no laboratório da Embrapa Acre utiliza-se o triturador *Tissue Lyser I* da Qiagen. Porém, outro equipamento similar poderá ser utilizado ou até mesmo a trituração manual em nitrogênio líquido.

4. Incubar as amostras em banho-maria por 40 minutos a 65 °C, agitando-as a cada 10 minutos (Figura 1D).

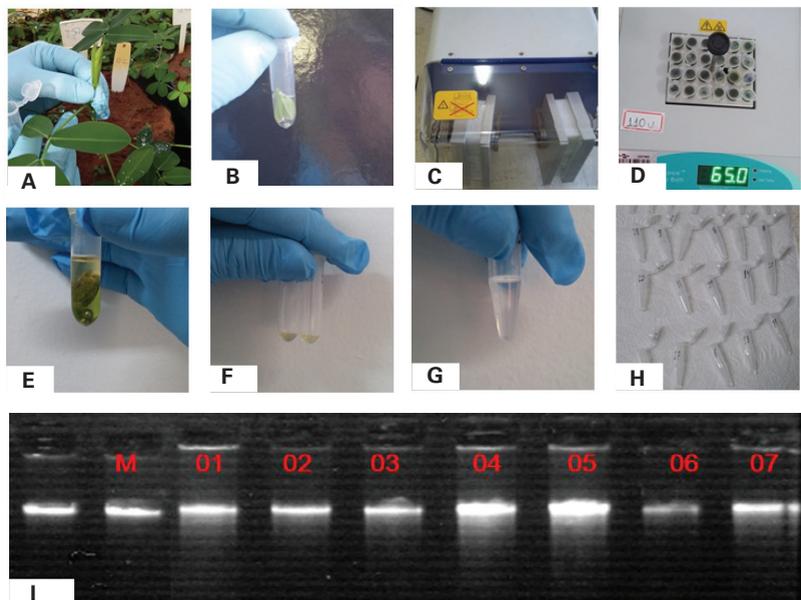
5. Retirar os microtubos do banho-maria, deixar resfriar, adicionar 600  $\mu\text{L}$  da solução de CIA e homogeneizar invertendo os tubos 10 vezes. Centrifugar a 13.000 rpm por 5 minutos.

6. Retirar cuidadosamente os microtubos da centrífuga, sem movimentar a interface da solução (Figura 1E), e, em capela de exaustão, pipetar a solução sobrenadante (Figura 1F) para dois novos microtubos de 2 mL (pipetar 180  $\mu$ L para cada microtubo).
7. Adicionar 1 mL da solução de CTAB 1% em cada microtubo e homogeneizar. Centrifugar a 13.000 rpm por 2 minutos.
8. Descartar o sobrenadante (o precipitado encontrar-se-á aderido ao fundo do microtubo).
9. Adicionar 300  $\mu$ L da solução de NaCl 1,2 mol L<sup>-1</sup>. Essa solução fará com que o precipitado se desprenda do fundo do microtubo.
10. Juntar as amostras dos dois microtubos em um único microtubo (Figura 1G). Centrifugar a 13.000 rpm por 5 minutos.
11. Transferir o sobrenadante para um novo microtubo de 1,5 mL (o DNA estará no sobrenadante).
12. Adicionar 900  $\mu$ L de etanol absoluto gelado e agitar levemente. Centrifugar a 13.000 rpm por 2 minutos.
13. Descartar o sobrenadante. Adicionar 500  $\mu$ L de etanol absoluto 70% e agitar levemente. Centrifugar a 13.000 rpm por 2 minutos.
14. Descartar o sobrenadante e deixar o microtubo sobre a bancada durante a noite para secagem do precipitado de DNA (Figura 1H).
15. No dia seguinte, ressuspender o DNA com 50  $\mu$ L da solução de TE.
16. Armazenar as amostras em geladeira, para posterior quantificação.

## Eletroforese do DNA total após extração

Quantificar as amostras de DNA em gel de agarose 1% (Figura 11) e diluí-las a  $5 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ , concentração necessária para realização da PCR.

1. Preparar gel de agarose 1% com solução tampão de TBE 0,5X. O tamanho do gel depende do número de amostras que serão quantificadas.
2. Em microplaca de PCR, aplicar  $4,0 \mu\text{L}$  de água ultrapura e  $2,0 \mu\text{L}$  de DNA e intercalante de DNA. A quantidade de intercalante de DNA é utilizada de acordo com o padrão do fabricante.
3. Aplicar o marcador fago lambda em diferentes quantidades (ex. 100 ng, 200 ng, 300 ng e 400 ng) a fim de gerar um gradiente para comparação com as amostras recém-extraídas.
4. Colocar o gel na cuba e fazer a corrida de eletroforese a 80 volts por 50 minutos.
5. Após a eletroforese, utilizar um fotodocumentador para visualização das bandas no gel.



Fotos: Clemeson Silva de Souza

**Figura 1.** Etapas da extração de DNA genômico em amendoim forrageiro: folíolos adequados para extração de DNA (A), folíolo em microtubo com solução de CTAB 2% (B), macerador (C), amostras incubadas após a maceração (D), separação das fases após centrifugação (E), alíquota do sobrenadante da amostra (F), DNA precipitado no fundo do tubo (G), amostras expostas para secagem (H), quantificação do DNA total diluído em gel de agarose 1% (M – marcador fago lambda DNA com 10 ng) (I).

## Etapa 2. Reação em cadeia da polimerase – PCR

Na Tabela 1 estão descritos os marcadores usados para amendoim forrageiro.

O mix para realização de PCR deve conter: tampão 1X; 2,0 mM de  $MgCl_2$ ; 0,25 mg  $mL^{-1}$  BSA (albumina sérica bovina); 0,25 mM dNTP; 0,8  $\mu M$  de iniciadores; 1 U de Taq polimerase e 7,5 ng  $\mu L^{-1}$  DNA. Ciclo da PCR: desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos a 94 °C por 1 minuto para desnaturação, temperatura de anelamento (específica para cada iniciador), extensão a 72 °C por 1 minuto e uma fase final de extensão a 72 °C por 5 minutos.

A PCR pode ser realizada com os mesmos ciclos para todos os locos, diferenciando apenas a temperatura de anelamento, conforme demonstrado na Tabela 1.

Eletroforese de fragmentos de PCR amplificados em gel de agarose 3%

A avaliação do produto da PCR é feita em gel de agarose 3% com solução de TBE 0,5X. O tamanho dos fragmentos visualizados em agarose deve corresponder ao previsto na literatura, quando comparado ao padrão de peso molecular (Figura 2).

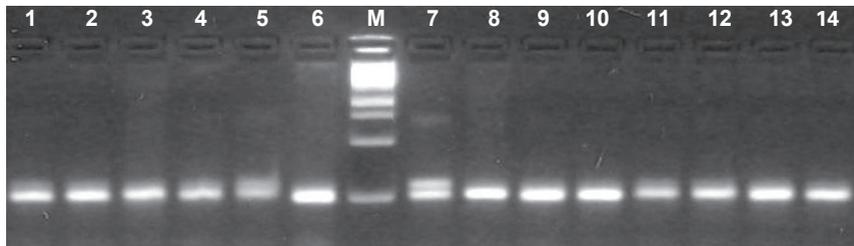
Preparo das amostras para aplicação no gel de agarose 3%

1. Em uma microplaca de PCR aplicar 4,0  $\mu$ L do produto de PCR de cada amostra e intercalante de DNA, conforme instruções do fabricante.
2. Preparar o marcador de tamanho (que contemple o intervalo esperado dos produtos de PCR) conforme instruções do fabricante.
3. Colocar o gel na cuba, aplicar as amostras e o marcador. Fazer a corrida de eletroforese em 100 volts por 1 hora.
4. Após a corrida, digitalizar a imagem do gel em fotodocumentador.
5. Adicionar tampão de formamida ao produto de PCR e armazenar em freezer. O volume do tampão deve ser de forma que a diluição do produto de PCR fique na proporção 1:1.

**Tabela 1.** Sequência dos iniciadores utilizados na identificação dos híbridos de amendoim forrageiro, temperatura de anelamento (Ta °C) e amplitude alélica (pb).

Loco	Sequência do iniciador (5'-3')	Ta (°C)	Amplitude alélica (pb)	Loco	Sequência do iniciador (5'-3')	Ta (°C)	Amplitude alélica (pb)
****Ah6-125	F: TCGTGTCCCGATTGTCC R: CAAACCCAAACACACGTCAC	48,2	170-194	****Ap164	F: TGTGGAATTGCAGAGAAC R: GATTCAGGCTGCAGATGGAC	50,0	213
****Ah7	F: CAGAGTCGTGATTTGTGCACTG R: ACAGAGTCGGCGTCAAGTTA	52,1	97-122	*Ap166	F: CGGCAGTCAACGAAGCTAT R: TCGCCAAAAGGTTAGATTGC	55,0	200
****Ah21	F: CTTGGAGTGGAGGGATGAAA R: CTCACCTCACTCGCACCTAAACC	57,3	100-135	*Ap175	F: CCAATAGGCTAATTCAGAAAGG R: GCCTTATTTTGGCGACTGAGG	55,4	174-230
****Ah282	F: GCCAAACACACACACATTTC R: GGCTCCAATCCCAAACACTA	55,4	173-202	*Ap176	F: CCAACACAGGGCTTACCAAG R: TCACCGATCCCACTTTTCC	50,0	194-246
***Ap10	F: GAGGGAGTGGGGGTTTAG R: ATCCCCACCCCTTCTTT	52,0	144	**Ap187	F: TTCGTCACTCGTCGTCTTC R: GTGGTGATGATGACGCAGAA	55,0	179
****Ap18	F: TGCAGCCCACTGTATATTCG R: TACACAGCGTAAACAACCTATTTAGTG	52,0	200	***Ag39	F: TGTAGTCAGCTGCTCCAAAA R: ATGAAAAGTTCACTTTGAGCAAA	52,1	150-190
****Ap32	F: ATAGGGAGAAGCGAGGAGA R: GATCATGCTCATCATCAACACC	48,0	150-170	***Ag140	F: TGACCGTTGGGGTTTTG R: CAAACCCAAACACACGTCAC	57,3	164-191
****Ap45	F: TGTGCACATCAGACTCAACA R: TTTAGCCTAGCGCGAATTCAC	50,0	185	***Ag171	F: TGACCGTTGGGGTTTTG R: CAAACCCAAACACACGTCAC	48,2	164-196
*Ap152	F: AGAGGATGCAGCGAGTAGA R: CTGGCCAAATTCCTATGATCG	58,5	259-322				

\*PALMIERI et al. (2002); \*\*PALMIERI et al. (2005); \*\*\*HOSHINO et al. (2006); \*\*\*\*GIMENES et al. (2007); e \*\*\*\*\*PALMIERI et al. (2010). Sequências específicas para *Arachis hypogaea* (Ah), *Arachis pintoi* (Ap) e *Arachis glabrata* (Ag).



**Figura 2.** Produto de PCR em gel de agarose (3%), sendo 1 a 14: amostras de possíveis híbridos de amendoim forrageiro e M: marcador 1 Kb Plus DNA ladder.

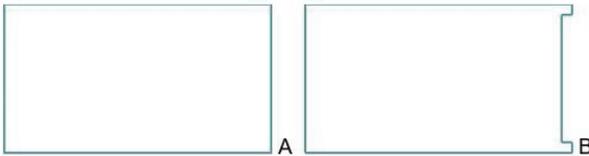
### **Etapa 3. Eletroforese de fragmentos de PCR amplificados em gel de poliacrilamida 5%**

Preparo das placas de vidro para verter o gel

O gel desnaturante de poliacrilamida é feito entre duas placas de vidro (Figura 3), separadas por espaçadores de 0,4 mm. As placas são tratadas cuidadosamente com reagentes, de forma que, ao final do processo, ao separá-las, o gel fique aderido apenas a uma delas:

1. Lavar as placas de vidro com detergente Extran neutro e com uma esponja macia, até remoção total de resíduos, e enxaguá-las com água destilada.
2. Secar as placas com papel toalha.
3. Em capela de exaustão, dispor as placas sobre a bancada, apoiadas sobre suporte de isopor, com a parte em que estará em contato com o gel para cima, e aplicar 1 mL de etanol absoluto para limpeza das placas.
4. Aplicar 1,0 mL de *Repel* na placa (Figura 3A), espalhar com papel toalha por toda placa, de forma homogênea, até evaporação total do produto do papel, e esperar cerca de 10 minutos.

5. Em um microtubo de 2 mL preparar a solução de *Bind*: 995  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto, 5  $\mu\text{L}$  de ácido acético e 3  $\mu\text{L}$  *Bind*. Verter essa solução sobre a placa (Figura 3B) e espalhar igualmente com papel toalha por toda superfície. Aguardar cerca de 10 minutos para secagem completa.

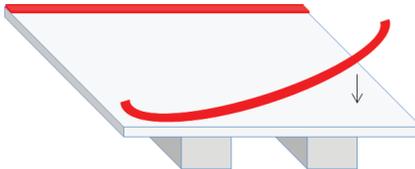


**Figura 3.** Placas de vidro com *Repel* (A) e com *Bind* (B).

Procedimento para aplicar o gel nas placas

Após o tratamento das placas

1. Em capela de exaustão, dispor a placa tratada com *Repel* sobre a bancada, apoiada sobre suporte de isopor, com a parte em que estará em contato com o gel para cima.
2. Molhar dois espaçadores de 4 mm com água deionizada e dispô-los nas duas extremidades laterais da placa (Figura 4).



**Figura 4.** Disposição dos espaçadores sobre a placa de *Repel*.

3. Dispor a placa tratada com solução de *Bind* sobre a placa tratada com *Repel*, mantendo a superfície tratada em contato com o gel para baixo.

4. Prender as laterais das placas com grampos (Figura 5).
5. Misturar em um recipiente 70 mL da solução de poliacrilamida 5% e 397  $\mu$ L de solução de APS 10% e verter rapidamente entre as placas, evitando a formação de bolhas no gel.
6. Quando o espaço entre as placas estiver completo com gel, inserir o pente “dente de tubarão” entre as placas para formar o poço com a parte reta do pente (Figura 5).
7. Colocar o restante da solução no becker para acompanhar a polimerização do gel.



**Figura 5.** Esquema das placas montadas com os grampos e com o pente “dente de tubarão” entre elas.

#### Preparo das amostras para aplicar no gel de poliacrilamida 5%

1. Desnaturar o produto de PCR em termociclador por 5 minutos a 95 °C.
2. Retirar a microplaca do termociclador e colocá-la em gelo até a aplicação das amostras no gel. O objetivo dessa etapa é manter a desnaturação das fitas de DNA.

#### Eletroforese vertical

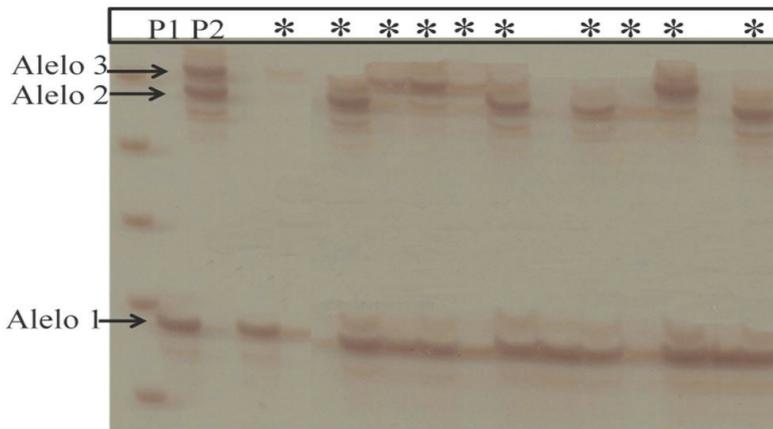
1. Programar a fonte da cuba vertical para 80 watts.

2. Montar as placas na cuba de eletroforese com o tampão TBE 1X. Retirar o pente e limpar eventuais pedaços de gel e cristais de ureia que se depositam sobre as bordas das placas de vidro e/ou sobre a superfície do gel. Inserir o pente com os dentes para baixo até uma profundidade de aproximadamente 1 mm. Fazer uma pré-corrída por cerca de 40 minutos, para aquecimento das placas a 55 °C.
3. Após esse período, interromper a corrida e, com a ajuda de uma pipeta, retirar o excesso de ureia que se deposita nos poços do pente. Aplicar 1,5  $\mu$ L do produto da PCR com tampão de formamida em cada poço do gel de poliacrilamida 5%. A aplicação não deve demorar mais que 20 minutos.
4. Aplicar no primeiro e no último poço do gel o marcador molecular 10 pb *ladder*.
5. O tempo de eletroforese é de cerca de 60 minutos para produtos de PCR de até 150 pb e de 120 minutos para fragmentos com cerca de 300 pb.
6. Após o término da eletroforese, retirar as placas da cuba e dispô-las sobre a bancada.
7. Com auxílio de uma espátula de acrílico, levantar a placa de *Bind* cuidadosamente, até que se solte completamente da placa de *Repel*, sem danificar o gel. A película de gel deverá ficar completamente aderida à placa de *Bind*, que seguirá para revelação.

#### **Etapa 4. Revelação do gel de poliacrilamida em nitrato de prata** (conforme Creste et al., 2001)

1. Mergulhar a placa de *Bind* com o gel aderido em bandeja plástica contendo a solução de fixação e agitar lentamente durante 10 minutos.

2. Retirar a placa da solução de fixação e colocá-la em bandeja plástica com água destilada durante 1 minuto.
3. Colocar a placa em bandeja plástica com a solução de oxidação durante 3 minutos.
4. Retirar a placa da solução de oxidação e colocá-la na bandeja plástica com água destilada durante 1 minuto.
5. Colocar a placa em bandeja plástica com a solução de impregnação, durante 20 minutos, sob agitação constante. Essa etapa deve ser realizada na ausência da luz.
6. Retirar a placa da solução de impregnação e colocá-la em bandeja plástica com água destilada durante 30 segundos. Repetir essa etapa.
7. Colocar a placa em bandeja plástica com a solução de revelação e agitá-la lenta e uniformemente até o aparecimento das bandas no gel (Figura 6).
8. Colocar a placa em bandeja plástica com a solução de parada durante 5 minutos.
9. Retirar a placa da solução de parada e colocá-la em bandeja plástica com água destilada durante 1 minuto.
10. Deixar a placa secar à temperatura ambiente e fazer a leitura dos alelos.
11. Os alelos entre os genitores devem ser polimórficos. A identificação do híbrido ocorre quando os alelos dos genitores estão presentes no perfil genotípico da progênie.
12. Recomenda-se utilizar ao menos três locos distintos para confirmação dos resultados.



**Figura 6.** Identificação dos híbridos no gel de poliacrilamida 5%, sendo P1: genitor feminino, P2: genitor masculino, \*genótipos híbridos.

## Preparo das soluções usadas no processo

Antes de preparar a solução de CTAB 2%, preparar as soluções que a compõem e que precisam ser autoclavadas (15 minutos a 121 °C):

Solução de cloreto de sódio 5 mol L<sup>-1</sup> – pesar 292,2 g, diluir em água ultrapura e aferir o volume para 1.000 mL.

Solução de EDTA dissódico dihidratado 0,5 mol L<sup>-1</sup> (pH 8,0) – pesar 186 g de EDTA, adicionar lentilhas de hidróxido de sódio até a dissolução total, completar o volume para 1.000 mL e ajustar o pH para 8,0 com a adição de hidróxido de sódio.

Tris HCl 1 mol L<sup>-1</sup> (pH 8,0) – pesar 121,12 g de tris, dissolver em aproximadamente 980 mL de água ultrapura e ajustar o pH para 8,0 com o uso de solução de ácido clorídrico 1 mol L<sup>-1</sup>.

CTAB 2% – pesar 20 g de brometo de cetiltrimetilamônio e 10 g de polivinilpirrolidona-40 e dissolver em 400 mL de água ultrapura autoclavada aquecida. Adicionar 280 mL da solução de cloreto de

sódio  $5 \text{ mol L}^{-1}$ , 40 mL da solução de EDTA  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , 100 mL da solução de tris HCl  $1 \text{ mol L}^{-1}$  e completar o volume para 1.000 mL. Recomenda-se preparar a solução de CTAB 2% no dia em que for usá-la, assim o volume a ser preparado pode ser menor.

CTAB 1% – pesar 10 g de brometo de cetiltrimetilamônio, adicionar 40 mL de solução de EDTA  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  e 22,5 mL da solução de tris HCL  $1,0 \text{ M}$  com pH 8,0. Aferir a solução para 250 mL com água ultrapura.

Solução de CIA (clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) – misturar 960 mL de clorofórmio com 40 mL de álcool isoamílico.

Solução de cloreto de sódio  $1,2 \text{ mol L}^{-1}$  – pipetar 240 mL da solução de cloreto de sódio  $5 \text{ mol L}^{-1}$  e aferir o volume para 1.000 mL com água ultrapura autoclavada.

Solução de etanol absoluto 70% – pipetar 700 mL de etanol absoluto e aferir o volume para 1.000 mL com água ultrapura autoclavada.

Solução de TE (tris-EDTA) – misturar  $500 \mu\text{L}$  da solução de tris-HCl  $1 \text{ mol L}^{-1}$  com  $100 \mu\text{L}$  da solução de EDTA  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  e aferir o volume para 50 mL com água ultrapura autoclavada.

Tampão de formamida – em um tubo de 15 mL estéril, adicionar 9,8 mL de formamida,  $125 \mu\text{L}$  de EDTA  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , azul de bromofenol e azul de xileno cianol até a cor desejada (azul-escuro).

Solução de acrilamida 5% – pesar 420 g de ureia, adicionar 100 mL de TBE 10X e cerca de 300 mL de água destilada e deixar sob agitação; após a dissolução da ureia, adicionar 125 mL da solução de poli(acrilamida) (40%), aferir o volume para 1.000 mL com água ultrapura autoclavada. Filtrar a solução em papel de filtro com poro de  $0,2 \text{ mM}$ , com auxílio de uma bomba a vácuo; adicionar  $667 \mu\text{L}$  TEMED e passar a solução para um frasco com tampa. Essa solução deve ser mantida em refrigerador.

Solução de APS (persulfato de amônio – 10%) – dissolver 1 g de persulfato de amônio em 10 mL de água ultrapura. Fracionar em microtubos alíquotas de 770  $\mu$ L e mantê-las congeladas em freezer -20 °C.

Solução de TBE 10X – dissolver 121,14 g de tris e 55,60 g de ácido bórico, adicionar 40 mL da solução de EDTA 0,5 mol L<sup>-1</sup> e aferir a solução para 1.000 mL com água ultrapura autoclavada.

Solução de fixação – misturar 200 mL de etanol absoluto com 20 mL de ácido acético glacial e aferir o volume para 2.000 mL com água destilada.

Solução de oxidação – pipetar 30 mL de ácido nítrico em 200 mL de água destilada e aferir o volume para 2.000 mL com água destilada.

Solução de impregnação – pesar 4 g de nitrato de prata e dissolver em água destilada e aferir o volume para 2.000 mL com água destilada. Manter essa solução protegida da luz.

Solução de revelação – dissolver 30 g de carbonato de sódio em água destilada e aferir a solução para 1.000 mL com água destilada.

Solução de parada – pipetar 100 mL de ácido acético glacial e aferir o volume para 2.000 mL com água destilada.

## Referências

ARGEL, P. J.; PIZARRO, E. A. **Germoplasm case study: *Arachis pintoi***. In: PASTURES for the tropical lowlands: CIAT's contribution. Cali: CIAT, 1992. p. 57-76.

ASSIS, G. M. L. de; VALENTIM, J. F. Programa de melhoramento genético do amendoim forrageiro: avaliação agronômica de acessos no Acre. **Amazônia: Ciência e Desenvolvimento**, Belém, v. 4, n. 8, p. 207-215, jan./jun. 2009.

ASSIS, G. M. L. de. Principais características de *Arachis pintoi* cv. BRS Mandobi. In: ANDRADE, C. M. S. de; ASSIS, G. M. L. de; VALENTIM, J. F. (Ed.). **Produção de sementes de *Arachis pintoi* cv. BRS Mandobi no Acre**. Rio Branco, AC: Embrapa Acre, 2011. (Sistemas de produção, 4). Disponível em: <[https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p\\_p\\_id=conteudoportlet\\_WAR\\_sistemasdeproducao1f6\\_1ga1ceportlet&p\\_p\\_lifecycle=0&p\\_p\\_state=normal&p\\_p\\_mode=view&p\\_p\\_col\\_id=column-2&p\\_p\\_col\\_count=1&p\\_r\\_p\\_-76293187\\_sistemaProducaoId=3830&p\\_r\\_p\\_-996514994\\_topicId=3820](https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistemasdeproducao1f6_1ga1ceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-2&p_p_col_count=1&p_r_p_-76293187_sistemaProducaoId=3830&p_r_p_-996514994_topicId=3820)>. Acesso em: 12 nov. 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Registro Nacional de Cultivares - RNC**. 2016. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/registros-autorizacoes/registro/registro-nacional-cultivares>>. Acesso em: 20 set. 2016.

COSTA, L. C. **Biologia floral de espécies do gênero *Arachis* L. (Fabaceae-Papilionoideae), com ênfase em aspectos da morfologia floral e na anatomia de ovários**. 2012. 235 f. Tese (Doutorado em Botânica) - Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

CRESTE, S.; TUMANN, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphism in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Berlim, v. 19, n. 1, p. 299-306, Dec. 2001.

DRUMOND, P. M.; CARDOSO, G. A. **As abelhas e a produção de sementes do amendoim forrageiro**. Rio Branco, AC: Embrapa Acre, 2003. 8 p. (Embrapa Acre. Comunicado Técnico, 177).

FLORES, P. S.; SANTOS, V. B.; SILVA, L. M.; CAPISTRANO, M. C. **Manual para teste de viabilidade e armazenamento de pólen e receptividade de estigma do amendoim forrageiro**. Rio Branco, AC: Embrapa Acre, 2015. (Embrapa Acre. Documentos, 143).

GIMENES, M. A.; HOSHINO, A. A.; BARBOSA, A. V. G.; PALMIERI, D. A.; LOPES, C. R. Characterization and transferability of microsatellite markers of the cultivated peanut (*Arachis hypogaea*). **BMC Plant Biology**, United Kingdom, v. 7, Feb. 2007.

HOISINGTON, D.; KHAIRALLAH, M.; GONZÁLEZ-DE-LEÓN, D. **Laboratory protocols**: CIMMYT applied molecular genetics laboratory. 2. ed. México, DF: CIMMYT, 1994.

HOSHINO, A. A.; BRAVO, J. P.; ANGELICI, C. M. L. C. D.; BARBOSA, A. V. G.; LOPES, C. R.; GIMENES, M. A. Heterologous microsatellite primer pairs informative for the whole genus *Arachis*. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, n. 4, p. 665-675, Mar. 2006.

KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, W. C. Taxonomía del género *Arachis* (Leguminosae). **Bonplandia**, Corrientes, v. 8, n. 1-4, p.1-186, 1994.

LEWIS, G. P.; MACKINDER, B.; LOCK, M. **Legumes of the world**. Kew: Royal Botanic Gardens, 2005. 578 p.

NIGAM, S. N.; RAO, M. J. V.; GIBBONS, R. W. **Artificial hybridization in groundnut**. Patancheru, India: ICRISAT, 1990. 27 p.

OLIVEIRA, J. C. **Taxa de cruzamento e diversidade genética em *Arachis pintoi* com marcadores microsatélites**. 2015. 52 f. Dissertação (Mestrado em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia) - Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, 2015.

PALMIERI, D. A.; HOSHINO, A. A.; BRAVO, J. P.; LOPES, C. R.; GIMEMES, M. A. Isolation and characterization of microsatellite loci from the forage species *Arachis pintoi* (Genus *Arachis*). **Molecular Ecology Notes**, New Jersey, v. 2, n. 4, p. 551-553, Dec. 2002.

PALMIERI, D. A.; BECHARA, M. D.; CURI, R. A.; GIMEMES, M. A.; LOPES, C. R. Novel polymorphic microsatellite markers in section *Caulorrhizae* (*Arachis*, Fabaceae), **Molecular Ecology Notes**, New Jersey, v. 5, n. 1, p. 77-79, Mar. 2005.

PALMIERI, D. A.; BECHARA, M. D.; CURI, R. A.; MONTEIRO, J. P.; VALENTE, S. E. S.; GIMENES, M. A.; LOPES, C. R. Genetic diversity analysis in the section *Caulorrhizae* (genus *Arachis*) using microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 33, n. 1, p. 109-118, 2010.

PERES, M. A.; VALLS, J. F. M. Produção de híbridos de amendoim forrageiro por meio de hibridação artificial. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 37, n. 6, p.885-888, jun. 2002.

SIMPSON, C. E.; VALLS, J. F. M.; MILES, J. W. Reproductive biology and potential for recombination in *Arachis*. In: P. C. KERRIDGE, P. C.; HARDY, B. (Ed). **Biology and agronomy of forage *Arachis***. Cali: CIAT, 1994. Chapter 14, p. 43-52.

TAUTZ, D.; RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic Acids Research**, United Kingdom, v. 12, n. 10, p. 4127-4138, May 1984.

TÓTH, G.; GÁSPARI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. **Genome Research**, New York, v. 10, n. 7, p. 967-981, July 2000.

**Embrapa**

---

**Acre**

Ministério da  
**Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento**

