

FOL 05432
2001
FL-05432

Estudo da variabilidade genética
da coleção brasileira de germoplasma
de amendoim (*Arachis hypogaea* L.),
por meio de marcadores microssatélites.

República Federativa do Brasil

Fernando Henrique Cardoso
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Marcus Vinicius Pratini de Moraes
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

Márcio Fortes de Almeida
Presidente

Alberto Duque Portugal
Vice-Presidente

Dietrich Gerhard Quast
José Honório Accarini
Sérgio Fausto
Urbano Campos Ribeiral
Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa

Alberto Duque Portugal
Diretor-Presidente

Dante Daniel Giacomelli Scolari
Bonifacio Hideyuki Nakasu
José Roberto Rodrigues Peres
Diretores-Executivos

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Luiz Antonio Barreto de Castro
Chefe-Geral

Arthur da Silva Mariante
Chefe-Adjunto de Administração

Clara Oliveira Goedert
Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

José Manuel Cabral Sousa Dias
Chefe-Adjunto de Comunicação, Negócios e Apoio

FOL 05432 19319

Embrapa

ISSN 1676 - 1340

Novembro, 2001

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

**Boletim de Pesquisa
e Desenvolvimento 13**

**Análise da variabilidade
genética da coleção brasileira de
germoplasma de amendoim
(*Arachis hypogaea* L.), por meio
de marcadores microssatélites**

Márcio de Carvalho Moretzsohn
José Francisco Montenegro Valls

Brasília, DF
2001

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão
Parque Estação Biológica, Av. W5 Norte (Final) - Brasília, DF
CEP 70770-900 - Caixa Postal 02372
PABX: (61) 448-4600
Fax: (61) 340-3624
http://www.cenargen.embrapa.br
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: José Manuel Cabral de Sousa Dias
Secretária-Executiva: Miraci de Arruda Camara Pontual
Membros: Antônio Costa Allem
Marcos Rodrigues de Faria
Marta Aguiar Sabo Mendes
Sueli Correa Marques de Mello
Vera Tavares Campos Carneiro
Suplentes: Edson Junqueira Leite
José Roberto de Alencar Moreira
Supervisor editorial: Miraci de Arruda Camara Pontual
Revisor de texto: Miraci de Arruda Camara Pontual
Normalização bibliográfica: Sérgio Souza Santos
Tratamento de ilustrações: Alysson Messias da Silva
Editoração eletrônica: Alysson Messias da Silva

1ª edição

1ª impressão (2001): tiragem 250 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).

MORETZSOHN, M. de C.; VALLS, J. F. M. **Análise da variabilidade genética da coleção brasileira de germoplasma de amendoim (*Arachis hypogaea* L.), por meios de marcadores microssotélites.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 27p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 13).

ISSN 1676 - 1340

1. *Arachis hypogaea*. 2. Caracterização molecular. 3. Variabilidade genética. 4. SSR. I. Título. II. Série. III. Valls, J. F. M.

CDD 583.74

© Embrapa 2001

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução	9
Material e Métodos	10
Resultados e Discussão	15
Conclusão	22
Referências Bibliográficas	23

Análise da variabilidade genética da coleção brasileira de germoplasma de amendoim (*Arachis hypogaea* L.), por meio de marcadores microssatélites

Márcio de Carvalho Moretzsohn¹

José Francisco Montenegro Valls²

Resumo

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) possui considerável variabilidade para diversas características morfológicas, fisiológicas e agrônomicas. No entanto, pouca variação tem sido detectada por marcadores moleculares, tais como RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA"), AFLP ("Amplified Fragment Length Polymorphism") e RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism"). A identificação de marcadores moleculares polimórficos seria, portanto, de grande utilidade para o melhoramento genético e para estudos de relações genéticas e filogenia do amendoim. Marcadores microssatélites ou SSR ("Simple Sequence Repeats") constituem a ferramenta ideal para estes estudos, por serem multialélicos, codominantes e baseados em PCR. Os objetivos deste trabalho foram (1) desenvolver e caracterizar marcadores microssatélites polimórficos para o amendoim e (2) analisar a variabilidade genética de acessos da coleção brasileira de germoplasma de amendoim. Foi construída uma biblioteca genômica, enriquecida para repetições TTG. Um total de 67 pares de primers foi desenhado (41,4% dos clones positivos seqüenciados); com base nas seqüências de DNA que flanqueiam o microssatélite (seqüência repetitiva). Destes, 53 primers (79,1%) amplificaram fragmentos com boa resolução, mas apenas três primers mostraram-se polimórficos para *A. hypogaea*. Estes primers, mais outros cinco já descritos na literatura, foram caracterizados quanto ao

¹ Eng. Agrôn., M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

² Eng. Agrôn., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Embrapa

Unidade Pernambuco

Vetor aquisição 2002

N.º N. Fiscalizadora

Fornecedor

N.º OCS

Origem Doacas

N.º KOL 05432

número de alelos por loco (de 2 a 18) e diversidade gênica (de 0,465 a 0,931), em uma amostra de 60 acessos de *A. hypogaea*. Os resultados mostraram que a coleção brasileira de germoplasma de amendoim possui considerável variabilidade genética. Além disso, grupos de similaridade foram estabelecidos e serão de grande utilidade para a definição de plantas parentais, a serem utilizadas em programas de melhoramento genético. Este estudo contém importantes informações para a conservação de germoplasma, para programas de melhoramento e para um melhor entendimento da evolução de *A. hypogaea*.

Genetic variability of the Brazilian peanut (*Arachis hypogaea* L.) germplasm collection revealed by microsatellite markers

Abstract

Peanut (*Arachis hypogaea* L.) exhibits considerable amount of variability for several morphological, physiological, and agronomic traits. However, little variation has been detected at the DNA level, by using techniques such as RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) and RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). The identification of polymorphic molecular markers would be valuable for the genetic improvement and for studies of genetic relationships and evolution of this crop. Microsatellite or SSR (Simple Sequence Repeat) markers can provide an ideal tool for such studies due to their high information content, as they are multiallelic, codominant, and PCR-based markers. The objectives of this work were: (1) to develop and characterize polymorphic microsatellite markers in cultivated peanut, and (2) to quantify genetic variability among peanut accessions of the Brazilian germplasm collection. A library enriched for TTG repeats was constructed. A total of 67 primer pairs were designed (41.4% of the positive clones sequenced) on the basis of DNA sequences flanking the repeat motif. Of these, 53 primers (79.1%) generated clearly interpretable products, but only three primers were polymorphic for cultivated peanut. These primers plus five published SSR primers were characterized for number of alleles per locus (from 2 to 18) and gene diversity (from 0.465 to 0.931), using 60 accessions of *A. hypogaea*. Results showed that the Brazilian peanut germplasm collection has considerable levels of genetic diversity. Similarity groups for peanut accessions were established, which are useful for selecting

parental plants for crop improvement. The study provides important information for germplasm conservation, for peanut breeding programs, and for the understanding on the evolution of *A. hypogaea*.

Introdução

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é uma cultura importante internacionalmente, tanto para consumo direto, como para produção de óleo, sendo cultivada em mais de 80 países nas Américas, na Ásia e na África (Singh & Singh, 1992). O gênero *Arachis* é nativo da América do Sul e contém 69 espécies descritas, reunidas em nove seções, de acordo com a morfologia, distribuição geográfica e viabilidade de cruzamentos (Krapovickas & Gregory, 1994).

A grande maioria das espécies é diplóide, mas o amendoim cultivado é alotetraplóide (AABB). A origem de *A. hypogaea* é bastante controversa. Por ser um alotetraplóide, acredita-se que tenha surgido da hibridização entre duas espécies diplóides. Diversas espécies têm sido sugeridas como as possíveis doadoras dos genomas A e B (revisito por Kochert et al., 1996; Raina & Mukai, 1999). Atualmente, a hipótese mais aceita é de que o amendoim tenha uma origem única, resultante de um cruzamento entre *A. ipaënsis*, doadora do genoma B, e *A. duranensis* (Kochert et al., 1996) ou *A. villosa* (Raina & Mukai, 1999), doadoras do genoma A.

Arachis hypogaea possui considerável variabilidade para diversas características morfológicas, fisiológicas e agronômicas. No entanto, pouca variação tem sido detectada por marcadores moleculares, tais como RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA"), AFLP ("Amplified Fragment Length Polymorphism") e RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism") (Halward et al., 1991; Kochert et al., 1991, 1996; Paik-Ro et al., 1992; Hilu & Stalker, 1995; He & Prakash, 1997; Subramanian et al., 2000). Acredita-se que esta baixa variabilidade genética seja decorrente do isolamento reprodutivo do amendoim, em relação às espécies silvestres diplóides, devido à poliploidização (Halward et al., 1991; Young et al., 1996). No entanto, pouco se sabe sobre a variabilidade genética da coleção brasileira de germoplasma, especialmente ao nível de DNA. O conhecimento da variabilidade genética de acessos de amendoim é essencial para seu eficiente uso em programas de melhoramento, para estudos de filogenia e para a conservação de germoplasma. A análise de acessos com marcadores moleculares, junto à caracterização fenotípica, é a ferramenta ideal para a identificação de grupos de similaridade e para a seleção de genitores que irão constituir as novas populações de melhoramento. No contexto da conservação *ex situ*, marcadores moleculares têm-se mostrado de grande utilidade para o manejo de coleções de germoplasma

(Westman & Kresovich, 1997). A identificação de marcadores moleculares polimórficos seria, portanto, de grande utilidade para o melhoramento genético, para a conservação de germoplasma e para estudos de relações genéticas e filogenia do amendoim. Marcadores microssatélites ou SSR ("Simple Sequence Repeats") constituem a ferramenta ideal para estes estudos, por serem multialélicos, codominantes e baseados em PCR. Estudos comparativos, em plantas, mostraram que marcadores SSR são mais polimórficos do que outros tipos de marcadores moleculares (Powell et al., 1996; Milbourne et al., 1997; Bohn et al., 1999). Microssatélites têm sido utilizados em diversos estudos em plantas, incluindo a análise da variabilidade genética de coleções de germoplasma (revisto por Gupta & Varshney, 2000). Em *Arachis*, seis marcadores SSR foram recentemente desenvolvidos (Hopkins et al., 1999). Os objetivos do presente trabalho foram: (1) desenvolver e caracterizar marcadores microssatélites polimórficos para o amendoim e (2) analisar a variabilidade genética de acessos da coleção brasileira de germoplasma de amendoim.

Materiais e Métodos

Material experimental: Uma única planta de amendoim foi utilizada para o desenvolvimento de marcadores microssatélites (UF 91108). Para a triagem de primers polimórficos, foram testadas seis amostras de *A. hypogaea*. Estas plantas foram obtidas da coleção de germoplasma de amendoim da "Plant Genetic Conservation Unit" – USDA/ARS, Griffin, Georgia, Estados Unidos. Para a análise da variabilidade genética, foram utilizados 60 acessos de *A. hypogaea*, representando as duas subespécies (*hypogaea* e *fastigiata*) e as seis variedades descritas por Krapovickas & Gregory, 1994 (Tabela 1). Estas plantas foram obtidas da coleção de germoplasma mantida na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Extração de DNA: DNA genômico total, usado para a construção da biblioteca, foi extraído de acordo com o método descrito por Reichardt & Rogers (1997), com uma purificação adicional em gradiente de cloreto de cézio. Para as demais amostras, foi utilizado o protocolo de Ferreira & Grattapaglia (1998), com algumas modificações: proteinase K (20 mg/ml) foi adicionada ao tampão de extração e foi incluída uma precipitação de polissacarídeos com NaCl 2M.

Tabela 1 – Lista dos 60 acessos de *A. hypogaea* analisados com marcadores SSR.

Identificação	Código BRA	Subespécie/Variedade (Tipo)	Local de coleta
Branco	025950	<i>fastigiata/fastigiata</i>	Rio Grande do Sul
AsW 436	029564	<i>hypogaea/hypogaea</i> (Nambiquarae)	Guajará Mirim-RO
Bw 366	029688	<i>fastigiata/fastigiata</i>	Belém-PA
Bw 569	038270	<i>fastigiata/fastigiata</i>	Colorado do Oeste-RO
Cabral s/no.	031771	<i>hypogaea/hypogaea</i> (Guaicuru)	Xinguara-PA
Conceição s/no.	038261	<i>fastigiata/fastigiata</i>	Origem desconhecida
cv. BR-1	033383	<i>fastigiata/fastigiata</i>	Paraíba
cv. Georgia Red	029815	<i>fastigiata/fastigiata</i>	Georgia, Estados Unidos
cv. Tatu (2 plantas)	001538	<i>fastigiata/fastigiata</i>	Campinas-SP
Ff 281	016420	<i>hypogaea/hypogaea</i> (Guaicuru)	Wanderlândia-TO
FT 84004	023167	<i>fastigiata/fastigiata</i>	Tacuarembó, Uruguai
FT 84037	023272	<i>fastigiata/fastigiata</i>	Artigas, Uruguai
FT 85062	026239	<i>fastigiata/vulgaris</i>	Rivera, Uruguai
FT 85183	026794	<i>fastigiata/vulgaris</i>	Rivera, Uruguai
FT 85209	026999	<i>fastigiata/fastigiata</i>	Rivera, Uruguai
FT 85273	027251	<i>fastigiata/vulgaris</i>	Rivera, Uruguai
Mf 1538	037397	<i>hypogaea/hirsuta</i>	Pichincha, Equador
Mf 1560	037401	<i>fastigiata/peruviana</i>	Pastaza, Equador
Mf 1640	037427	<i>fastigiata/aequatoriana</i> (Zaruma)	Morona, Equador
Mf- 1678	037435	<i>fastigiata/aequatoriana</i> (Zaruma pálido)	Sucrubios, Equador
Paraguaio	025925	<i>fastigiata/fastigiata</i>	Rio Grande do Sul

Continua...

clonada em fago I ZAP II (Stratagene) e, então, transformada em *E. coli*, cepa XL1-Blue. As células transformadas foram multiplicadas em placas contendo o meio de crescimento LB-Amp (50 mg de ampicilina/ml) a 37° C. Clones individuais foram coletados das placas e inseridos em microtubos de 1,5 ml, contendo tampão SM (500 ml) e clorofórmio (20 ml). Os clones foram então amplificados por PCR usando-se primers complementares a seqüências do fago (T3 ou SK e T7 ou KS, Stratagene) e submetidos a eletroforese em géis de agarose (1,5%), para verificar-se a presença e os tamanhos dos insertos. Duas PCRs adicionais foram realizadas para cada clone positivo usando-se os primers T3 (ou SK) e T7 (ou KS) separadamente, mais os trinucleotídeos (PCR-ancorada). Com isso, foi possível, após eletroforese em géis de agarose (1,5%), determinar as posições dos SSRs, relativas aos sítios de ligação ao fago.

Seqüenciamento dos clones positivos e desenho de primers: Os clones positivos, cujos SSRs não estavam localizados próximos aos sítios de ligação do fragmento ao fago, foram amplificados por PCR e seqüenciados em seqüenciador automático ABI 377 (Perkin Elmer), usando-se kits de Dye-Terminator (Perkin Elmer/ABI). Primers complementares às regiões flangeadoras das seqüências SSR foram desenhados, utilizando o programa Primer 3 (Whitehead Institute of Biomedical Research). Para reduzir problemas de amplificação de bandas inespecíficas, alguns critérios restritivos foram utilizados: (1) temperatura de anelamento (T_m) entre 60°C e 70°C; (2) diferença de T_m entre pares de primers menor que 3°C; (3) conteúdo de GC entre 45% e 60% e (4) ausência de complementaridade entre primers. Os primers foram sintetizados pela Operon Tech. Inc.

Triagem de primers polimórficos e PCR dos locos SSR: Os 67 pares de primers foram inicialmente testados com seis amostras de *A. hypogaea*, para triagem dos primers polimórficos e com boa resolução de bandas. As PCRs foram realizadas em volumes de 13-ml, contendo tampão de PCR 1X (Tris-HCl 10mM pH8,3, KCl 50mM, MgCl₂ 1,5mM), 0,2 mM de cada dNTP, 1 unidade de *Taq* DNA polimerase, DMSO 50% (1,3 ml), 5 pmol de cada primer e 10 ng de DNA genômico. As amplificações foram realizadas em termociclador PTC-100 (MJ Research), com as seguintes condições: 96°C por 2 min (1 ciclo), 94°C por 1 min, 55-66°C por 1 min, 72°C por 1 min (30 ciclos); e 72°C por 7 min (1 ciclo). As temperaturas de anelamento foram otimizadas para cada primer. Os fragmentos amplificados na triagem e na otimização dos primers foram

visualizados em géis de agarose Metaphor (FMC Bioproducts), a 3,5% de concentração, corados com brometo de etídio. Para a determinação genotípica dos 60 acessos, foram utilizados géis de poliacrilamida a 4%, corados com nitrato de prata (Bassam et al., 1991). Os tamanhos dos fragmentos foram estimados por comparação com padrões obtidos com DNA ladder 10-bp (Gibco BRL).

Análise dos dados: Oito locos SSR foram caracterizados quanto ao número de alelos por loco e diversidade gênica (Gene diversity – Nei, 1973), usando-se 60 acessos de *A. hypogaea*. Estes primers incluem os três polimórficos desenvolvidos neste trabalho, mais 5 dos 6 desenvolvidos anteriormente para amendoim, por Hopkins et al. (1999). O programa GDA (Lewis & Zaykin, 2001) foi utilizado para estas análises. Para a determinação das relações genéticas entre os 60 acessos de amendoim cultivado, cada fragmento foi analisado quanto à presença (1) ou ausência (0) em cada um dos acessos. Esta matriz foi utilizada para calcular os coeficientes de similaridade de Jaccard (1908). Um dendrograma foi construído, em seguida, pelo método UPGMA (“unweighted pair-group method analysis”). Estas análises foram realizadas usando-se o programa NTSYS 2.0 (Rohlf, 1993).

Resultados e Discussão

Desenvolvimento de microssatélites e triagem de primers: Digestões do DNA genômico com cinco enzimas de restrição diferentes (AluI, MseI, RsaI, Sau3AI e Tsp509I) mostraram que Tsp509I produziu um perfil mais adequado para a construção de biblioteca, com fragmentos entre 200 e 800 pares de bases. Quatro bibliotecas, enriquecidas para TTG, TGG, ATG e ATC, foram construídas. Após o enriquecimento, repetições TTG mostraram-se mais abundantes no genoma de amendoim (TTG > TGG > ATG > ATC) e foram utilizadas para o desenvolvimento dos marcadores microssatélites.

De um total de 750 clones submetidos à PCR-ancorada, 162 (21,6%) apresentaram SSRs com tamanho e posição adequados. Estes 162 clones positivos foram seqüenciados, resultando em 91 seqüências não-redundantes. Um exemplo de seqüenciamento é apresentado na Fig.1. A partir destas, 67 pares de primers foram desenhados (41,4% dos clones positivos), com base nas seqüências que flanqueiam os SSRs.

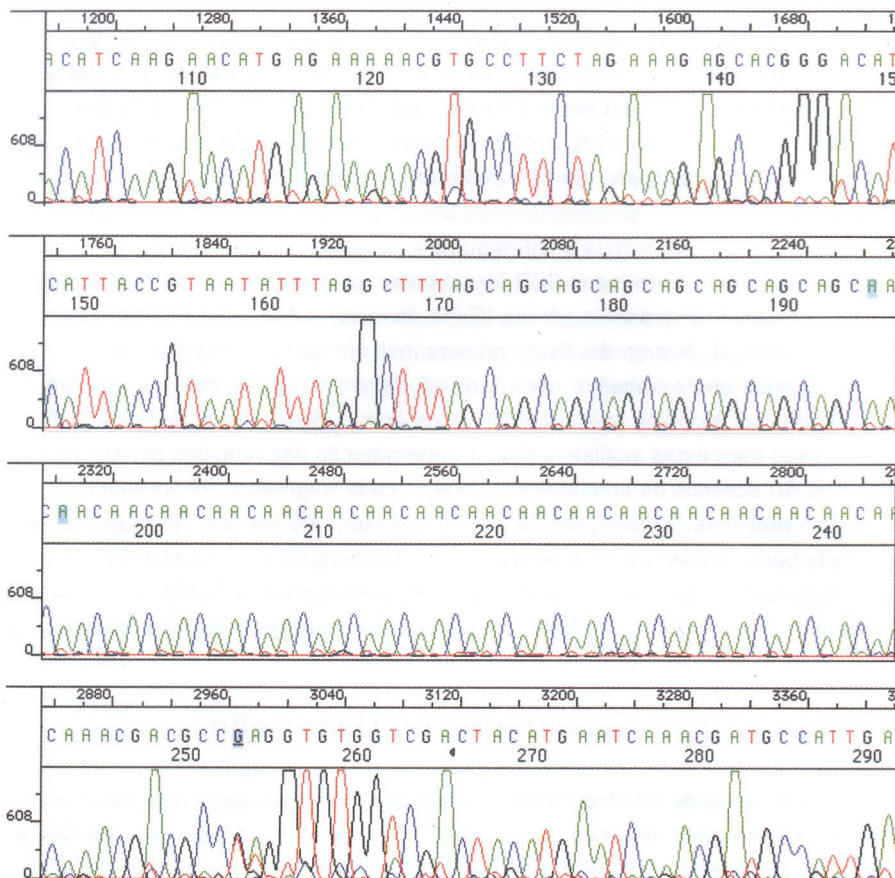


Fig. 1. Resultado do seqüenciamento, usando o kit "Dye Terminator", em um seqüenciador ABI Prism 377 (Perkin Elmer). Este clone apresentou uma repetição (AGC)₈ ao lado da repetição (AAC)₁₇.

O desenho de primers para as demais seqüências não foi possível devido à ocorrência de baixo número de repetições (menor que 5), baixo conteúdo de GC nas seqüências que flanqueiam os SSRs ou da proximidade dos SSRs ao final do inserto clonado. Apenas três clones apresentaram um grande número de repetições TTG (de 18 a 31), mas os primers desenhados com base nestas seqüências mostraram-se monomórficos entre os acessos de *A. hypogaea* testados. Estes resultados contradizem os estudos de Weber (1990) e Thomas & Scott (1993), que sugerem que locos com longas repetições tendem a ser mais polimórficos.

O uso da PCR-ancorada, antes do seqüenciamento, mostrou-se de grande utilidade. Um rendimento bastante alto de seqüências úteis foi obtido, com poucos clones falso-positivos. O alto número de primers desenhados, em relação ao número de clones seqüenciados (41,4%), confirmou a eficiência do método utilizado.

Os 67 primers foram testados com seis amostras de amendoim, para identificação dos primers polimórficos. Destes, 53 (79,1%) amplificaram fragmentos com boas resoluções, mas apenas três primers mostraram-se polimórficos. Estes resultados corroboram diversos outros estudos que têm detectado baixa variabilidade genética em acessos de amendoim cultivado com diferentes marcadores moleculares, tais como RFLP (Halward et al., 1991; Kochert et al., 1991, 1996; Paik-Ro et al., 1992), RAPD (Hilu & Stalker, 1995; He & Prakash, 1997; Subramanian et al., 2000) e AFLP (He & Prakash, 1997). Esta baixa variabilidade genética tem sido atribuída a três principais fatores: (1) prevenção de cruzamentos com as espécies silvestres em consequência da poliploidização (Young et al., 1996); (2) poliploidização recente, a partir de um ou poucos indivíduos de cada espécie parental, junto à autofecundação (Halward et al., 1991) e (3) uso de poucas linhagens-elite e pouco germoplasma exótico nos programas de melhoramento, resultando em uma estreita base genética (Knauff & Gorbet, 1989; Isleib & Wynne, 1992).

Caracterização dos marcadores microssatélites: Um dos três primers polimórficos (A1-193) provavelmente amplificou um único loco, uma vez que apenas um fragmento foi produzido. O primer A1-558 amplificou quatro fragmentos em todas as amostras. Estes resultados são consistentes com a amplificação de locos duplicados. Para o primer A1-041, dois alelos foram observados nas 60 amostras. Neste caso, duas hipóteses podem ser levantadas: todos os

indivíduos são heterozigotos ou o primer A1-041 amplifica locos duplicados. Uma vez que *A. hypogaea* é um alotetraplóide e preferencialmente autógamo, com apenas cerca de 2,5% de fecundação cruzada (Norden, 1973), a última hipótese deve ser a correta. Portanto, incluindo os primers desenvolvidos por Hopkins et al. (1999) e utilizados no presente estudo, 5 dos 9 primers amplificaram locos duplicados na maioria dos acessos de amendoim analisados. Esta proporção é maior do que as encontradas para outras espécies poliplóides, tais como: trigo (Bryan et al., 1997), maçã (Guilford et al., 1997), mandioca (Chavarriga-Aguirre et al., 1998), e batata-doce (Buteler et al., 1999). Embora os conhecimentos sobre a evolução de locos SSR em plantas sejam limitados, estes resultados sugerem uma alta taxa de duplicação de locos SSR em amendoim, como esperado para uma espécie alotetraplóide.

A diversidade alélica foi estimada para os três primers polimórficos desenvolvidos neste estudo e para cinco primers previamente desenvolvidos para *A. hypogaea* (Tabela 2). Um dos primers já publicados (Ah6-125) mostrou-se monomórfico para os 60 acessos e não foi incluído nas análises. Cada um dos 8 primers polimórficos amplificou de 2 a 18 alelos, com uma média de 8,3 alelos por loco. Exemplos de amplificação, obtidos com os primers Ah4-20 e Lec-1 são mostrados na Fig.2. Os valores de diversidade gênica (h) variaram de 0,465 a 0,931, com uma média de 0,683. O cálculo destes índices é válido também para poliplóides (Nei, 1987), mas estes valores estão provavelmente superestimados, uma vez que alguns destes primers amplificaram locos múltiplos. Apesar disto, são similares aos obtidos para outras espécies poliplóides, tais como, batata (Provan et al., 1996), mandioca (Chavarriga-Aguirre et al., 1998) e trigo (Prasad et al., 2000) e consideravelmente maiores que os detectados para amendoim com marcadores RFLP (Paik-Ro et al., 1992). Estes resultados demonstram a grande utilidade dos marcadores microssatélites em estudos de diversidade genética.

Tabela 2 – Pares de primers, repetições (microssatélites), variações dos tamanhos dos fragmentos (em pares de bases), número total de alelos (A) e diversidade gênica (h) para os 8 marcadores SSR polimórficos para o amendoim.

Identificação	Repetições	Tamanhos dos fragmentos (pb)	A*	h
Ah-041	(AAC) ₂₁ (CAA) ₁₀	280-292	3	0,463
Ah-193	(AAC) ₁₆ (GA) ₂₄	444-462	8	0,717
Ah-558	(AAC) ₉	226-241	4	0,516
Ah4-04	(GA) ₁₉	84-108	7 (6)	0,705
Ah4-20	(GA) ₁₉	201-215	4 (3)	0,640
Ah4-24	(ATA) ₁₇	406-418	5 (5)	0,755
Ah4-26	(CT) ₂₅ imperfeito	156-213	15 (8)	0,743
Lec-1	(AT) ₁₈	212-258	18 (14)	0,921

(*) Entre parênteses, encontram-se os números de fragmentos detectados por Hopkins et al., 1999.

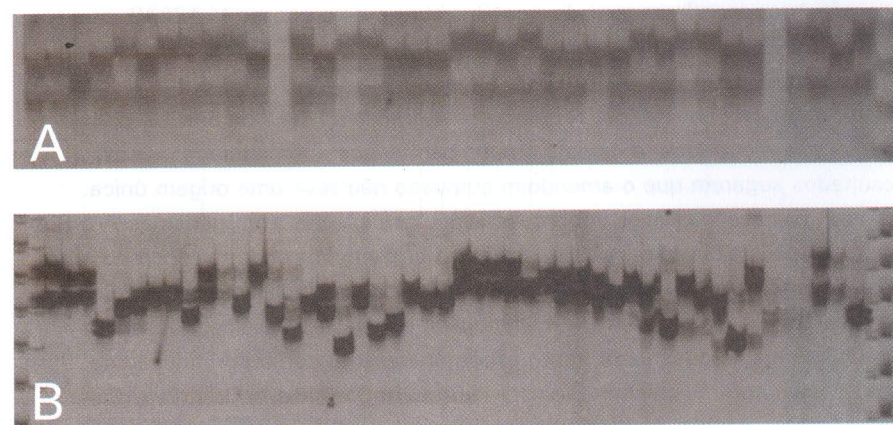


Fig. 2. Polimorfismos obtidos em acessos de *Arachis hypogaea*, com os primers Ah4-20 (A) e Lec-1 (B), em géis de poliacrilamida, corados com nitrato de prata. Linha 39 (foto A) e linhas 1 e 51 (foto B) - marcador de 10 pb (Gibco BRL).

Variabilidade genética de acessos de *A. hypogaea*: As relações genéticas entre os 60 acessos foram estimadas por presença ou ausência de fragmentos, amplificados pelos oito primers. Um índice de similaridade de Jaccard médio igual a 0,579 foi obtido para os 60 acessos. O menor valor (0,250) foi observado entre o acesso Sv 3109 (*fastigiata/fastigiata*) e os dois acessos de *fastigiata/peruviana* (Mf 1560 e Sv 429). Apenas quatro pares de acessos não puderam ser diferenciados por estes primers e apresentaram similaridade igual a 1 (Pd3147/Pd3324, V13009/ScJs139, V13009/12111 e ScJs139/12111).

Um dendrograma, baseado nos índices de similaridade de Jaccard, foi construído para os 60 acessos de amendoim (Fig.3). Dois grupos principais tornaram-se evidentes. O grupo superior (Grupo I) foi constituído por todos os acessos da subespécie *fastigiata* variedade *fastigiata*, todos os *fastigiata/vulgaris* e *fastigiata/aequatoriana* incluídos nesta análise, o único *hypogaea/hirsuta* (Mf 1538), o único *hypogaea/hypogaea* do tipo Malhado (V 12577), além de um acesso não identificado quanto à subespécie e variedade (Wi 632). Todos os acessos deste grupo foram heterozigotos para os alelos 292 e 280, do loco A1-041 (genoma do tipo AABB). O grupo inferior (Grupo II) foi formado por todos os acessos *hypogaea/hypogaea* do tipo Guaicuru e pelo acesso V 12549, que foi identificado, neste estudo, como *hypogaea* "tipo Xingu". Estes 16 acessos foram homozigotos A1-041-292/292 (genoma AAA'A'). Um outro dendrograma foi construído, retirando-se o primer A1-041 da análise (dados não mostrados) e os dois grupos permaneceram inalterados. Estes resultados sugerem que o amendoim cultivado não teve uma origem única. Após a hibridização envolvendo duas espécies diplóides com genomas A e B e posterior poliploidização (AABB), um outro cruzamento pode ter ocorrido entre esta nova espécie e uma espécie com genoma A'. A duplicação de triplóides obtidos por cruzamentos entre *A. hypogaea* e espécies diplóides da seção *Arachis* têm sido observada, tanto espontaneamente como por indução de hexaplóides com colchicina (Smartt, 1964; Krapovickas & Gregory, 1994; Singsit et al., 1995). Análises das relações genéticas entre o amendoim cultivado e espécies silvestres de *Arachis* estão sendo realizadas atualmente, no Laboratório de Genética Vegetal, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, e poderão identificar as espécies envolvidas na origem de *A. hypogaea*.

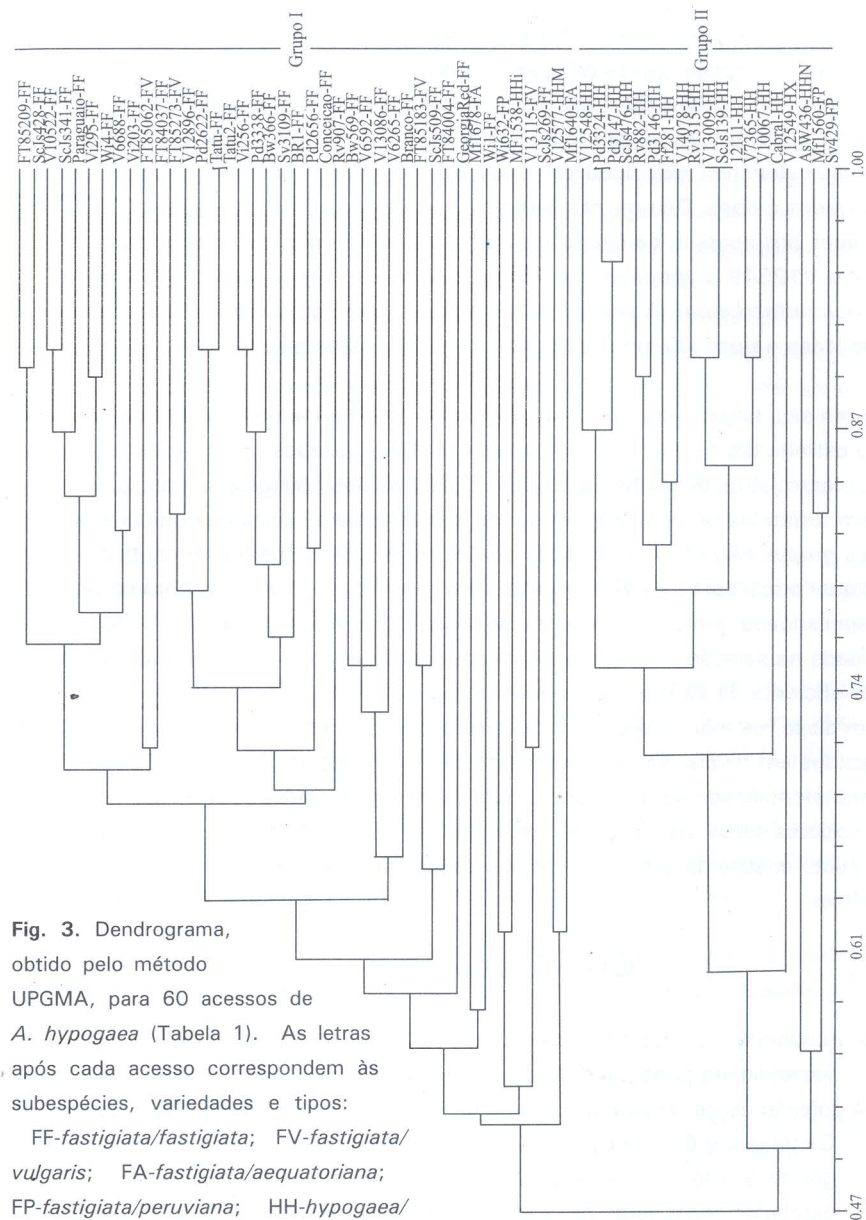


Fig. 3. Dendrograma, obtido pelo método UPGMA, para 60 acessos de *A. hypogaea* (Tabela 1). As letras após cada acesso correspondem às subespécies, variedades e tipos: FF-fastigiata/fastigiata; FV-fastigiata/vulgaris; FA-fastigiata/aequatoriana; FP-fastigiata/peruviana; HH-hypogaea/hypogaea; HHi-hypogaea/hirsuta; HHN-hypogaea/hypogaea tipo Nambiquarae; HHM-hypogaea/hypogaea tipo Malhado; HX- hypogaea tipo Xingu e Ni-acesso não identificado, quanto à subespécie e variedade.

No Grupo II, um grupo menor foi constituído, incluindo o único acesso *hypogaea/hypogaea* tipo Nambiquarae (AsW 436) e os dois acessos *fastigiata/peruviana* (Mf 1560 e Sv 429). Estes três acessos foram heterozigotos A1-041-292/280. As razões para o agrupamento destes acessos no Grupo II não são evidentes, mas poderiam estar ligadas à baixa representatividade destas variedades e tipos. De uma maneira geral, estes acessos mostraram-se mais similares aos acessos do Grupo I, mas apresentaram a maior similaridade com o acesso V12549 (*hypogaea* tipo Xingu) e a menor com o acesso Sv 3109 (*fastigiata/fastigiata*). A análise de um maior número de acessos destas variedades e tipos diferenciados deverá elucidar estes resultados.

Embora seja largamente difundida a idéia de que o amendoim cultivado possui uma estreita base genética, os marcadores SSR utilizados no presente estudo detectaram altos níveis de variabilidade. Dentro dos dois grupos principais, foram formados grupos de similaridade, geneticamente distantes uns dos outros. Estes grupos não são relacionados aos locais de coleta, cor de sementes ou a qualquer outra característica aparente. No entanto, o estabelecimento de grupos de similaridade, junto à caracterização morfológica e agrônômica, será de grande utilidade na seleção e cruzamento de plantas superiores, possibilitando um uso mais eficiente da variabilidade genética disponível para o melhoramento. Além disso, os marcadores SSR caracterizados neste trabalho poderão ser utilizados em diversos outros estudos com o amendoim. Finalmente, após testes de transferibilidade de marcadores para espécies silvestres de *Arachis*, tais marcadores serão úteis para diversos tipos de estudo, tais como mapeamento genético, análise de estruturas de populações e estudos de filogenia entre espécies.

Conclusão

- 1- Marcadores microssatélites mostraram-se bastante eficientes na análise da variabilidade genética de acessos de amendoim.
- 2- A coleção de germoplasma de amendoim mantida na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia apresenta consideráveis níveis de variabilidade genética. Além disso, grupos de similaridade entre acessos foram estabelecidos e serão de grande utilidade na seleção de plantas a serem usadas como parentais em programas de melhoramento genético.

- 3 - As análises de agrupamento indicaram que *A. hypogaea*, provavelmente, não teve uma origem única. Um cruzamento entre espécies com genomas A e B, seguido de um evento de poliploidização, provavelmente, teria originado o grupo do qual fazem parte as variedades *fastigiata/fastigiata*, *fastigiata/vulgaris*, *fastigiata/aequatoriana* e *hypogaea/hirsuta*, enquanto a variedade *hypogaea/hypogaea* poderia ter-se originado, posteriormente, a partir de um cruzamento entre esta nova planta AABB e uma espécie de genoma A' (ou não-B).
- 4 - O método utilizado, no presente trabalho, para desenvolvimento de marcadores microssatélites mostrou-se altamente eficiente, produzindo um grande número de primers desenhados, em relação ao número de clones seqüenciados

Referências Bibliográficas

- BASSAM, B. J.; CAETANO-ANOLLES, G.; GRESSHOFF, P. M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrilamide gels. **Analytical Biochemistry**, v.196, p.80-83, 1991.
- BOHN, M.; UTZ, H. F.; MELCHINGER, A. E. Genetic similarities among winter wheat cultivars determined on the basis of RFLPs, AFLPs, and SSRs and their use for predicting progeny variance. **Crop Science**, v.39, p.228-237, 1999.
- BRYAN, G. J.; COLLINS, A. J.; STEPHENSON, P.; ORRY, A.; SMITH, J. B.; GALE, M. D. Isolation and characterization of microsatellites from hexaploid bread wheat. **Theoretical Applied Genetic**, v.94, p.557-563, 1997.
- BUTELER, M. I.; JARRET, R. L.; LABONTE, D. R. Sequence characterization of microsatellites in diploid and polyploid *Ipomoea*. **Theoretical Applied Genetic**, v.99, p.123-132, 1999.
- CHAVARRIAGA-AGUIRRE, P.; MAYA, M. M.; BONIERBALE, M. W.; KRESOVICH, S.; FREGENE, M. A.; TOHME, J.; KOCHERT, G. Microsatellites in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz): discovery, inheritance and variability. **Theoretical Applied Genetic**, v.97, p.493-501, 1998.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: Embrapa-CENARGEN, 1998. 220p.

GUILFORD, P.; PRAKASH, S.; ZHU, J. M.; RIKKERINK, E.; GARDINER, S.; BASSET, H.; FOSTER, R. Microsatellites in *Malus x domestica* (apple): abundance, polymorphism and cultivar identification. **Theoretical Applied Genetic**, v.94, p.249-254, 1997.

GUPTA, P. K.; VARSHNEY, R. K. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. **Euphytica**, v.113, p.163-185, 2000.

HALWARD, T. M.; STALKER, H. T.; LARUE, E. A.; KOCHERT, G. Genetic variation detectable with molecular markers among unadapted germ-plasm resources of cultivated peanut and related wild species. **Genome**, v.34, p.1013-1020, 1991.

HE, G.; PRAKASH, C. S. Identification of polymorphic DNA markers in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Euphytica**, v.97, p.143-149, 1997.

HILU, K. W.; STALKER, H. T. Genetic relationships between peanut and wild species of *Arachis* sect. *Arachis* (*Fabaceae*): evidence from RAPDs. **Plant Systematics and Evolution**, v.198, p.167-178, 1995.

HOPKINS, M. S.; CASA, A. M.; WANG, T.; MITCHELL, S. E.; DEAN, R.; KOCHERT, G. D.; KRESOVICH, S. Discovery and characterization of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in peanut. **Crop Science**, v.39, p.1243-1247, 1999.

ISLEIB, T. G.; WYNNE, J. C. Use of plant introductions in peanut improvement. In: SHANDS, H. L.; WIESNER, L. E., (Ed.). **Use of plant introductions in cultivar development, part 2**. Madison: CCSA, 1992. Chapter 4, p. 75-116. (CCSA. Special Publication, 18).

JACCARD, P. Nouvelles recherches sur la distribution florale. **Bulletin de la Société Vaudoise Sciences Naturelles**, v.44, p.223-270, 1908.

KNAUFT, D. A.; GORBET, D. W. Genetic diversity among peanut cultivars. **Crop Science**, v.29, p.1417-1422, 1989.

KOCHERT, G.; HALWARD, T.; BRANCH, W. D.; SIMPSON, C. E. RFLP variability in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and wild species. **Theoretical Applied Genetic**, v.81, p.565-570, 1991.

KOCHERT, G.; STALKER, H. T.; GIMENES, M.; GALGARO, L.; LOPES, C. R.; MOORE, K. RFLP and cytogenetic evidence on the origin and evolution of allotetraploid domesticated peanut, *Arachis hypogaea* (Leguminosae). **American Journal of Botany**, v.83, p.1282-1291, 1996.

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

LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. **Genetic Data Analysis**: computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d16c). Disponible: <<http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>> 2001.

MILBOURNE, D.; MEYER, R.; BRADSHAW, J. E.; BAIRD, E.; BONAR, N.; PROVAN, J.; POWEL, W.; WAUGH, R. Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. **Molecular Breeding**, v.3, p.127-136, 1997.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v.70, p.3321-3323, 1973.

NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Columbia University Press, 1987. 512p.

NORDEN, A.V. Breeding of the cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). In: **Peanuts-cultures and uses**. Stillwater: America Peanut Res., 1973. p.175-208.

PAIK-RO, O. G.; SMITH, R. L.; KNAUFT, D. A. Restriction fragment length polymorphism evaluation of six peanut species within the *Arachis* section. **Theoretical Applied Genetic**, v.84, p.201-208, 1992.

POWELL, W.; MORGANTE, M.; ANDRE, C.; HANAFEY, M.; VOGEL, J.; TINGEY, S.; RAFALSKI, A. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. **Molecular Breeding**, v.2, p.225-238, 1996.

PRASAD, M.; VARSHNEY, R. K.; ROY, J. K.; BALYAN, H. S.; GUPTA, P. K. The use of microsatellites for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat. **Theoretical Applied Genetetic**, v.100, p.584-592, 2000.

PROVAN, J.; POWELL, W.; WAUGH, R. Microsatellite analysis of relationships within cultivated potato (*Solanum tuberosum*). **Theoretical Applied Genetetic**, v.92, p.1078-1084, 1996.

RAFALSKI, J. A.; VOGEL, J. M.; MORGANTE, M.; POWELL, W. ANDRE, C.; TINGEY, S. V. Generating and using DNA markers in plants. In: BIRREN, B.; LAI, E., (Ed.). **Analysis of non-mammalian genomes: a practical guide**. New York: Academic Press, 1996.

RAINA, S. N.; MUKAI, Y. Genomic in situ hybridization in *Arachis* (*Fabaceae*) identifies the diploid wild progenitors of cultivated (*A. hypogaea*) and related wild (*A. monticola*) peanut species. **Plant Systematics and Evolution**, v.214, p.251-262, 1999.

REICHARDT, M.; ROGERS, S. Preparation of genomic DNA from plant tissue. In: AUSUBEL, F. M., (Ed.). **Current Protocols in Molecular Biology**. New York: John Wiley & Sons, 1997.

ROHLF, F. J. **NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate System**. Version 2.0. New York: Applied Biostatistics Inc., 1993. não paginado.

SINGH, U.; SINGH, B. Tropical grain legumes as important human foods. **Economic Botany**, v.46, p.310-321, 1992.

SINGSIT, C.; OZIAS-AKINS, P.; HOLBROOK, C. C.; CULBREATH, A. K. Progenies of an interspecific hybrid between *Arachis hypogaea* and *A. stenosperma* - pest resistance and molecular homogeneity. **Euphytica**, v.83, p.9-14, 1995.

SMARTT, J. **Cross-compatibility relationships between the cultivated peanut *Arachis hypogaea* L. and other species of the genus *Arachis***. 1964. Ph.D (Thesis) - North Carolina State University, Raleigh.

SUBRAMANIAN, V.; GURTU, S.; NAGESWARA RAO, R. C.; NIGAM, S. N. Identification of DNA polymorphism in cultivated groundnut using random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. **Genome**, v.43, p.656-660, 2000.

THOMAS, M. R.; SCOTT, N. S. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analyzed as sequence-tagged sites (STSs). **Theoretical Applied Genetetic**, v.86, p.985-990, 1993.

WEBER, J. L. Informativeness of human (dC-dA)_n (dG-dT)_n polymorphisms. **Genomics**, v.7, p.524-530, 1990.

WESTMAN, A. L.; KRESOVICH, S. Use of molecular marker techniques for description of plant genetic variation. In: CALLOW, J. A.; FORD-LLOYD, B. V.; NEWBURY, H. J., (Ed.). **Plant genetic resources: conservation and use**. Wallingford: CAB Int, 1997. p.9-48.

YOUNG, N. D.; WEEDEN, N. F.; KOCHERT, G. Genome mapping in legumes (Family Fabaceae). In: PATERSON, A. H., (Ed.). **Genome Mapping in Plants**. Austin: R.G. Landes, 1996.

Embrapa

**Recursos Genéticos e
Biotecnologia**

Análise da variabilidade ...

2001

FL-05432



CENARGEN- 19319-1

**MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
PECUÁRIA E ABASTECIMENTO**

**GOVERNO
FEDERAL**
Trabalhando em todo o Brasil