

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 de Andrade¹, Cláudio Takao Karia¹, Judson Ferreira Valentim², Carlos Maurício S. de Andrade², Allan Kardec Braga Ramos¹, Graciele Bellon¹, Andréa Del Pilar de Souza Penalzoa³, José Francisco Montenegro Valls³

¹Embrapa Cerrados, CP 08223, 73310-970 Planaltina-DF; ²Embrapa Acre; ³Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. *e-mail: ffaleiro@cpac.embrapa.br

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, considerando, entre outros aspectos, a sua multifuncionalidade (Karia et al., 2004) (Figura 1).

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 *Arachis pintoi* têm sido avaliados em diferentes unidades da Embrapa com base em características morfológicas, agrônomicas, citogenéticas, bioquímicas e moleculares. Diferenças fenotípicas do mesmo acesso avaliados nos diferentes locais têm sido verificadas.

OBJETIVO

Avaliar a variabilidade genética de cinco acessos de *A. pintoi* em avaliação na 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.



Figura 1. Aspectos fenotípicos do amendoim forrageiro evidenciando a sua multifuncionalidade.

RESULTADOS

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 (Tabela 1). 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. pintoi* composta por 10 acessos.

As distâncias genéticas entre as plantas dentro de cada acesso mostraram que as três plantas do cv. Amarelo 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 2). Maiores diferenças genéticas foram verificadas entre as plantas do cv. Ap 05 e do Ap 65 (Tabela 2). Tais diferenças evidenciam uma variabilidade genética intra acesso.

A análise de dispersão gráfica (Figura 2) ilustra a proximidade entre as plantas do cv. Amarelo, 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.

MATERIAL E MÉTODOS

Cinco acessos de amendoim forrageiro (cv. Amarelo, 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 µL, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 3 mM, 100 µM de cada um dos desoxiribonucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,4 µM 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 µl 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 coordenadas principais, com auxílio do Programa SAS e do Programa Statistica (Statsoft Inc., 1999)

Tabela 1. Primers utilizados para obtenção dos marcadores RAPD e respectivo número de bandas polimórficas e monomórficas.

Primer	Seqüência 5'→3'	Nº de bandas polimórficas	Nº de bandas monomórficas
OPD-07	TTGGCAGCGG	4	6
OPD-08	GTGTGCCCCA	6	7
OPD-10	GGTCTACACC	1	4
OPE-02	GGTGGCGGAA	6	6
OPE-18	GGACTGCAGA	1	8
OPF-01	ACGGATCCTG	6	3
OPF-02	GAGGATCCCT	8	4
OPF-05	CCGAATCCCC	4	6
OPG-09	CTGACGTCAC	7	2
OPG-10	AGGGCCGTCT	5	3
OPG-12	CAGCTCACGA	6	1
OPH-02	TCGGACGTGA	5	4
OPH-04	GGAAGTCGCC	9	2
OPH-16	TCTCAGTGG	8	4
OPH-19	CTGACCAGCC	2	5
TOTAL		78	65

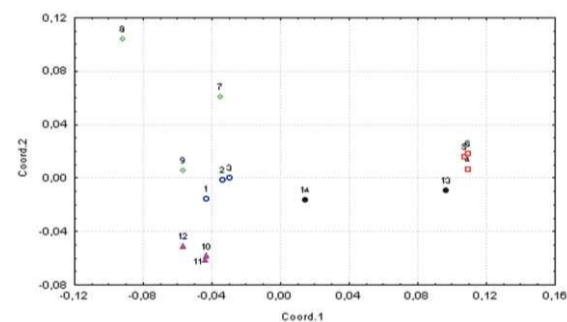


Figura 2. Dispersão gráfica e análise de agrupamento de 14 materiais genéticos de *Arachis pintoi* com base na matriz de distâncias genéticas. Os acessos correspondentes aos números (1-14) são referidos na Tabela 1. Os materiais genéticos com o mesmo símbolo pertencem ao mesmo acesso.

Tabela 2. Matriz de distâncias genéticas entre 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

LITERATURA CITADA

- 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 SBZ, 40, 2003, Santa Maria. Anais... Sociedade Brasileira de Zootecnia, CD-ROM, 2003b. 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. (Ino prelo).
- STATSOFT, INC. STATISTICA for Windows [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc., 2300 East 14th Street, Tulsa, 1999.