

Análise de relações genéticas entre espécies silvestres de *Arachis* por meio de marcadores microssatélites



ISSN 0102-0129

Dezembro, 2009

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 252

Análise de relações genéticas entre espécies silvestres de *Arachis* por meio de marcadores microssatélites

Ediene Galdino de Gouvea
Flávia Ludmila Ferreira Lustosa
José Francisco Montenegro Valls
David John Bertoli
Márcio de Carvalho Moretzsohn

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Brasília, DF
2009

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Endereço: Parque Estação Biológica – PqEB – Av. W5 Norte
Caixa Postal 02372 – Brasília, DF – Brasil – CEP: 70770-917

Fone: (61) 3448-4700 / Fax: (61) 3340-3624

Home page: <http://www.cenargen.embrapa.br/>

E-mail (sac): sac@cenargen.embrapa.br

Comitê Local de Publicações

Presidente: *Lúcio Brunale*

Secretária-Executiva: *Lígia Sardinha Fortes*

Membros: *José Roberto de Alencar Moreira*

Diva Maria de Alencar Dusi

Regina Maria Dechechi G. Carneiro

Samuel Rezende Paiva

Jonny Everson Scherwinski Pereira

Suplentes: *João Batista Tavares da Silva*

Margot Alves Nunes Dode

Normalização: *Lígia Sardinha Fortes*

Revisão de texto: *José Cesamildo Cruz Magalhães*

Editoração eletrônica e capa: *Rafaela Marcondes Oliveira*

1ª edição (online)

Todos os direitos reservados.

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

As opiniões nesta publicação são de exclusiva e de inteira responsabilidade dos autores, não exprimindo, necessariamente, o ponto de vista da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), vinculada ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

Análise de relações genéticas entre espécies silvestres de *Arachis* por meio de marcadores microssatélites. /Ediene Galdino de Gouvea ... [et al.]. – Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2009.

42p. – (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 252).

1. *Arachis*. 2. Amendoim. 3. Relações genéticas - análise. 4. Marcadores microssatélites. I. Gouvea, Ediene Galdino de. II. Lustoza, Flávia Ludmila Ferreira. III. Valls, José Francisco Montenegro. VI. Bertoli, David John. V. Moretzsohn, Márcio de Carvalho. VI. Série.

633.368 – CDD 20.

© Embrapa 2009

Sumário

Resumo.....	6
Abstract.....	8
Introdução.....	10
Material e Métodos.....	13
Resultados e Discussão.....	14
Conclusões.....	21
Referências.....	23
Anexos.....	29

Análise de relações genéticas entre espécies silvestres de *Arachis* por meio de marcadores microssatélites

*Ediene Galdino de Gouvea*¹

*Flávia Ludmila Ferreira Lustosa*¹

José Francisco Montenegro Valls^{2,4}

David John Bertoli^{3,4}

*Márcio de Carvalho Moretzsohn*²

Resumo

O gênero *Arachis* é dividido em nove seções taxonômicas, sendo a seção *Arachis* o maior grupo e o de maior interesse, por incluir o amendoim cultivado (*A. hypogaea*) e seus prováveis genitores. A análise da variabilidade genética existente nas espécies silvestres de *Arachis* é fundamental para um melhor entendimento sobre as relações genéticas entre acessos e espécies encontrados em coleções de germoplasma; para conservação e um melhor gerenciamento desses bancos; e para possibilitar seu uso em programas de melhoramento genético. Técnicas de genotipagem estão sendo cada vez mais otimizadas, informativas, automatizadas e com custo eficaz. Logo, o uso de marcadores microssatélites, juntamente com a detecção semiautomática dos fragmentos por fluorescência, tem-se mostrado eficaz, por cumprir muitos desses critérios. O principal objetivo deste trabalho foi avaliar a variabilidade genética de espécies da seção *Arachis*, utilizando-se marcadores microssatélites com detecção fluorescente. Foram amplificados 24 locos de 161 acessos, incluindo 27 das 29 espécies diploides descritas na seção *Arachis*. As

similaridades genéticas entre cada par de acessos foram calculadas com o emprego do coeficiente de *band-sharing*, e um dendrograma foi gerado pelo método UPGMA. As análises mostraram, em geral, o agrupamento de acessos com o mesmo tipo de genoma. Os acessos de uma mesma espécie tenderam a se agrupar. Os marcadores microssatélites utilizados, desenvolvidos para *A. hypogaea* ou *A. stenosperma*, mostraram uma alta transferibilidade entre as demais espécies da seção *Arachis*, o que possibilita seu uso em diversos estudos, incluindo mapeamento comparativo.

O valor médio de PIC foi igual a 0,764, que é considerado um valor alto, e a heteroziguidade observada foi baixa (0,135), sugerindo que a maioria das espécies aqui analisadas é autógama. Por apresentarem resistências a diferentes estresses bióticos e abióticos, espécies silvestres de *Arachis* constituem uma importante fonte de genes úteis para o amendoim. Dessa forma, o conhecimento da extensão e distribuição da diversidade genética de parentes silvestres do amendoim será de grande utilidade para seu uso eficiente em programas de melhoramento genético, assim como no gerenciamento e na manutenção de bancos de germoplasma, visando, principalmente, à obtenção de melhores resultados na agricultura.

¹ Biologia, graduada, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

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

³ Biologia, Ph.D, Universidade de Brasília.

⁴ Bolsista de Produtividade em Pesquisa/CNPq.

Analysis of genetic relationships between wild species of *Arachis* using microsatellite markers

Abstract

The genus Arachis is divided into nine sections. Arachis section is the largest and the most important group, because it includes the cultivated peanut (A. hypogaea) and its probable parents. Some questions about the diversity and relationships of Arachis species are still controversial. The analysis of the genetic variability found in Arachis wild species is essential for a better understanding of the genetic relationships among species and accessions; for conservation and better management of germplasm collections, and to enable their use in breeding programs. Molecular markers are the ideal tools for the analysis of genetic variability between individuals and populations. Genotyping techniques have been increasingly optimized, informative, automated and cost effective. Therefore, the use of microsatellite markers, along with semi-automatic detection of the fragments by fluorescence, has proved to be effective for meeting these criteria. The main objective of this work was to assess the genetic variability of species from Arachis section, using fluorescent-labeled microsatellite markers. Twenty-four loci were amplified in 161 accessions, including 27 of the 29 diploid species described in Arachis section. The genetic similarities between each pair of accessions were calculated using the coefficient of band-sharing, and a dendrogram was generated by UPGMA. The analysis showed, in general, the grouping of accessions with the same type of genome. The accessions of the same species tended to group together. The microsatellite markers used, developed

for *A. hypogaea* and *A. stenosperma*, showed high transferability between species of *Arachis* section, which allows their use in several studies, including comparative mapping. The average PIC value found was equals 0.764, considered a high value, and the observed heterozygosity was low (0.135), suggesting that most of the analyzed species are autogamous. By presenting resistances to different biotic and abiotic stresses, wild species of *Arachis* are an important source of useful genes for peanut. Thus, knowledge of the extent and distribution of genetic variation available in the wild relatives of peanut will be useful for their efficient use in breeding program, and management and conservation of germplasm banks, aimed mainly at better results in agriculture.

Introdução

O gênero *Arachis* é nativo da América do Sul (KRAPOVICKAS; GREGORY, 1994). É uma leguminosa (Fabaceae) que se distingue de outras plantas por produzir flores acima do solo e frutos abaixo deste. Compreende 80 espécies descritas, sendo a maioria diploide ($2n = 2x = 20$ cromossomos); algumas com $2n = 2x = 18$ cromossomos e cinco espécies tetraploides ($2n = 4x = 40$ cromossomos), incluindo *Arachis hypogaea* (KRAPOVICKAS; GREGORY, 1994; LAVIA 1998; VALLS; SIMPSON, 2005). É dividido em nove seções taxonômicas, com base em dados morfológicos, distribuição geográfica e compatibilidade de cruzamento, sendo elas: *Arachis*, *Erectoides*, *Heteranthae*, *Caulorrhizae*, *Rhizomatosae*, *Extranervosae*, *Triseminatae*, *Procumbentes* e *Trirectoides* (KRAPOVICKAS; GREGORY, 1994).

A seção *Arachis* é o maior grupo do gênero, totalizando 31 espécies descritas até o momento (KRAPOVICKAS; GREGORY, 1994; VALLS; SIMPSON, 2005). Possui uma distribuição ampla, desde os Andes até áreas costeiras do Atlântico (CRESTE et al., 2005). Dados citogenéticos levaram à identificação de três tipos de genomas que diferenciam as espécies com relação aos cromossomos. As espécies caracterizadas com genoma A são aquelas que possuem um pequeno par de cromossomos, chamado A (HUSTED, 1936). A maioria das espécies diploides dessa seção possui esse genoma. As espécies diploides que não apresentam o par A são consideradas mais associadas ao genoma B de *A. hypogaea*, com exceção de *A. glandulifera*, que possui o genoma chamado D, caracterizado pela presença de seis pares de cromossomos subtlocêntricos (STALKER, 1991; FERNANDEZ; KRAPOVICKAS, 1994, ROBLEDO; SEIJO, 2008). *A. hypogaea* e *A. monticola* são espécies alotetraploides com genoma AB. Além disso, três espécies possuem $2n = 18$ cromossomos (*A. decora*, *A. praecox* e *A. palustris*) (LAVIA, 1998; PEÑALOZA; VALLS, 1997). Esses dados cromossômicos são de suma importância, pois valorizam os dados exomorfológicos (KRAPOVICKAS; GREGORY, 1994).

Existe muito interesse pelas espécies dessa seção, porque ela inclui o amendoim cultivado (*A. hypogaea* L.) e seus prováveis genitores (MILLA et al., 2005). O amendoim cultivado é uma cultura de grande importância econômica. É a quinta oleaginosa mais cultivada no mundo, em mais de 100 países, incluindo os continentes americano, africano e asiático. Os principais produtores mundiais são China, Índia, Nigéria e Estados Unidos (FAO, 2007). Possui também grande importância nutricional, pois o grão é rico em óleo, proteínas e vitaminas E e do complexo B (SANTOS et al., 2005). É utilizado como principal fonte proteica e calórica na alimentação de populações mais pobres da África e Ásia (NOGUEIRA; TÁVORA, 2005).

A origem de *A. hypogaea* tem sido objeto de debate. Por ser um alotetraploide, acredita-se que tenha origem na hibridização de duas espécies diploides, seguida de um evento de duplicação espontânea de cromossomos (HALWARD et al., 1991). A planta resultante deveria apresentar vigor híbrido, mas, por ser tetraploide, tornou-se isolada reprodutivamente de seus parentes silvestres. Esse fato levou a uma variabilidade genética reduzida, o que tem dificultado os avanços no melhoramento genético e molecular do amendoim. Por outro lado, espécies silvestres de *Arachis* possuem resistências a diferentes fatores bióticos e abióticos, que são de interesse para o melhoramento do amendoim (DWIVEDI et al., 2003; 2006), e acredita-se que apresentem maior variabilidade genética (HILU; STALKER, 1995; MORETZSOHN et al., 2004; MILLA et al., 2005). No entanto, até o momento, nenhum estudo foi feito com um grande número de marcadores moleculares e incluindo as várias espécies da seção *Arachis*. A análise da variabilidade genética existente nas espécies silvestres de *Arachis* é fundamental para um melhor entendimento sobre as relações genéticas entre os acessos e espécies encontrados em coleções de germoplasma. Esse conhecimento possibilitaria uma utilização mais eficiente dessas espécies em programas de melhoramento genético, na conservação e no gerenciamento dos bancos de germoplasma, visando, principalmente, à obtenção de melhores resultados na agricultura.

O uso de marcadores moleculares para análise de variabilidade genética entre indivíduos e em populações tem-se mostrado de grande utilidade. Sequências simples repetidas (SSR – “Simple Sequence Repeats”), microssatélites ou sítios de microssatélites marcados por sequências (STMS – “Sequence Tagged Microsatellite Sites”) consistem de pequenas sequências repetidas “in tandem” no genoma de eucariotos, as quais têm de um a seis nucleotídeos de comprimento. Esses marcadores são altamente polimórficos, codominantes, multialélicos, distribuídos ao acaso no genoma, abundantes e informativos, o que permite maior compreensão do organismo estudado (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; KRISHNA et al., 2004). Além disso, a taxa de transferibilidade de SSR de *A. hypogaea* para as espécies silvestres da seção *Arachis* tem sido relativamente alta (MORETZSOHN et al., 2004; GIMENES et al., 2007), o que permite seu uso para a análise das relações genéticas entre essas espécies.

Técnicas de genotipagem estão sendo cada vez mais otimizadas, altamente informativas, automatizadas e obtidas com um custo eficaz. Logo, o uso de marcadores microssatélites, juntamente com a detecção dos fragmentos por fluorescência e a análise semiautomatizada, tem-se mostrado potente para atender a muitos desses critérios (MITCHELL et al., 1997). Krishna e colaboradores (2004) ressaltam que o uso da técnica de microssatélites marcados com fluorescência possui vantagens significativas em relação ao uso de microssatélites com detecção radioativa ou por nitrato de prata, pois, além de aumentar a eficiência e a precisão dos resultados, reduz o risco de exposição a radioisótopos e íons de prata.

Portanto, os objetivos do presente trabalho foram: (1) analisar a diversidade genética de espécies da seção *Arachis*, duas espécies ainda não descritas e de uma espécie da seção *Procumbentes*, utilizando-se marcadores microssatélites com detecção fluorescente; e (2) analisar a transferibilidade desses marcadores, desenvolvidos para *A. hypogaea* ou *A. stenosperma*, para as várias espécies silvestres incluídas no presente estudo.

Material e Métodos

Material experimental: Foram utilizados 161 acessos, representando 27 das 29 espécies diploides descritas na seção *Arachis*, duas espécies ainda não descritas e dois acessos de *A. vallsii*, que é atualmente classificada na seção *Procumbentes* (Tabela 1). Essas plantas foram obtidas no Banco Ativo de Germoplasma de *Arachis* (BAG-*Arachis*), mantido na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília-DF.

Extração de DNA: DNA genômico total foi extraído de folíolos jovens, de acordo com o método descrito por Ferreira e Grattapaglia (1998), com pequenas modificações. A concentração de DNA de cada tubo foi estimada por eletroforese em gel de agarose a 1% de concentração, comparando-se as intensidades de fluorescência de cada amostra corada com brometo de etídio com diferentes padrões de DNA Lambda.

PCR dos locos SSR: Foram montados seis sistemas multiplex de acordo com a fluorescência, o tamanho dos alelos amplificados e a temperatura (Tabela 2), sendo que dois multiplex foram compostos por seis marcadores (hexaplex), outros dois compostos por quatro marcadores (tetraplex) e os dois últimos por três marcadores. Os *primers* foram marcados com fluorescências 6-FAM (azul), HEX (verde) e NED (amarela). As PCRs foram realizadas com o Kit Qiagen Multiplex PCR (Qiagen), em volumes de 5 μ L, contendo 2,5 μ L de Master Mix (*Taq* DNA Polimerase, tampão de PCR e dNTPs); 0,5 μ L de Solução Q; 0,4 - 0,7 μ L de água destilada ultrapura (dependendo do número de *primers*); 0,1 μ L de cada *primer* (a 10 μ M); e 1 μ L de DNA genômico (a 2,5 ng/ μ L). As amplificações foram realizadas em termocicladores ABI 9700 (Applied Biosystems), nas seguintes condições: 95°C por 15 minutos (1 ciclo); 94°C por 30 seg; 52-60°C por 1:30 min; 72°C por 1:30 min (35 ciclos); e uma extensão final a 72°C por 10 minutos (1 ciclo).

Eletroforese: Para a genotipagem, foram adicionados a 1 μ L do produto de PCR diluído 1:6 em água MilliQ, 8,5 μ L de Hi-Di formamida e 0,5 μ L do padrão com comprimentos de fragmentos conhecidos, marcado com

fluorescência ROX. Essas amostras foram submetidas à eletroforese em sequenciador automático de DNA ABI 3700 (Applied Biosystems), localizado no Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Análise dos dados: Os dados obtidos após a eletroforese foram analisados pelos programas GeneScan e Genotyper 3.7 e submetidos ao programa AlleloBin (PRASANTH et al., 2007) para classificar os comprimentos dos alelos observados de acordo com as unidades de repetição, utilizando-se o algoritmo de quadrados mínimos de Idury e Cardon (1997). A partir da planilha com os genótipos (comprimento dos alelos em pares de bases) padronizados de cada acesso, foram estimadas as similaridades genéticas entre cada par de acessos, utilizando-se o coeficiente *band-sharing* de Lynch (1990). A matriz de similaridades resultante foi submetida à análise de agrupamento com o emprego do método UPGMA (“unweighted pair-group method analysis”). A fim de verificar a consistência dos agrupamentos obtidos a partir dos dados de distâncias genéticas, a correlação cofenética (r) foi estimada (MANTEL, 1967). Para isso, a matriz de distâncias genéticas foi comparada com a matriz cofenética gerada pelo programa MXCOMP. Essas análises foram realizadas com a utilização do programa NTSYS, versão 2.21 (ROHLF, 2009). Para cada um dos 24 marcadores analisados nas 161 amostras, foram estimados os números de alelos e de genótipos por loco, a heterozigosidade esperada e observada e o polimorfismo, utilizando-se o Conteúdo Informativo de Polimorfismo (PIC) por meio do programa *PowerMarker* 3.25 (LIU; MUSE, 2005).

Resultados e Discussão

As distâncias genéticas entre os 161 acessos foram calculadas pelo método de *band-sharing* (LYNCH, 1990), utilizando-se 24 marcadores microssatélites fluorescentes. Tem sido demonstrado que, em *Arachis*, a variação entre alelos é causada não somente por incrementos

das unidades de repetição, mas também por inserções/deleções (“indels”) que ocorrem nas regiões próximas aos microssatélites (BARKLEY et al., 2007). Portanto, um método de cálculo de distâncias/similaridades genéticas que considere que todos os alelos são igualmente relacionados, como o *band-sharing*, deve ser mais apropriado para análise de relações genéticas no amendoim. Uma matriz de similaridades genéticas entre cada par de acessos foi obtida. A partir dessa matriz, um dendrograma foi construído, baseado no método UPGMA (Figura 1). As similaridades genéticas entre os 161 acessos variaram de 0 a 0,93. Portanto, todos os acessos puderam ser diferenciados com a utilização dos 24 locos. *Arachis hypogaea* e *A. monticola*, que são tetraploides, não foram incluídas, porque os alelos dos genomas A e B não podem ser analisados separadamente. A inclusão dessas espécies levaria ao agrupamento com as espécies geneticamente mais próximas aos genomas A ou B, em vez dos dois componentes separadamente.

Foram observados quatro grupos principais, os quais reúnem as espécies de acordo com os genomas descritos para a seção *Arachis*, com algumas exceções. O Grupo BD foi constituído por espécies de genomas B e D. Esse grupo mostrou-se geneticamente próximo ao grupo formado pelas espécies com $2n = 18$ cromossomos (Grupo $2n = 18$). As 13 espécies incluídas, das 14 conhecidas com genoma A, formaram um grande grupo (Grupo A), com nove subgrupos, reunindo, de maneira geral, acessos das mesmas espécies. O Grupo B foi constituído por espécies com genoma B, separadas em quatro subgrupos. O subgrupo superior apresentou quatro dos cinco acessos de *A. valida* incluídos, os únicos acessos de *A. ipaënsis*, *A. williamsii* e *A. sp_Sj3625*, além de um acesso de *A. magna* e um de *A. gregoryi*. Outro subgrupo foi composto de acessos de *A. magna* e do acesso de *A. sp_Sj3292*, associado a um subgrupo constituído basicamente por acessos de *A. gregoryi*. Os dois acessos de *A. vallsii*, que foi descrita na seção *Procumbentes*, tiveram uma posição basal nesse grupo IV.

Todas as espécies com mais de um acesso disponível apresentaram alta

variabilidade genética intraespecífica. Apesar disso, acessos de uma espécie tenderam a se agrupar. Por exemplo, grupos bem definidos de *A. stenosperma*, *A. kempff-mercadoi* e *A. gregoryi* são evidentes no dendrograma (Fig. 1). A principal exceção foi *A. kuhlmannii*, com 28 acessos (incluindo quatro *A. aff. kuhlmannii* e um *A. cf. kuhlmannii*) dispersos por todo o grupo contendo as espécies de genoma A (Grupo A).

As espécies *A. batizocoi*, *A. cruziana*, *A. krapovickasii* e *A. benensis*, em geral associadas ao genoma B, mostraram-se geneticamente distantes das demais espécies de genoma B, que formaram o Grupo B. Dados não publicados sugerem que as espécies atualmente consideradas associadas ao genoma B apresentam diferenças em seus cromossomos, o que pode levar à reclassificação de algumas dessas espécies (Guillermo Seijo, comunicação pessoal).

As espécies com 18 cromossomos (*A. decora*, *A. palustris* e *A. praecox*) formaram um grupo bastante consistente (Grupo $2n = 18$). Os genomas dessas espécies também não são bem definidos. Lavia (1998) e Peñaloza e Valls (1997) não encontraram o par "A" em análises citogenéticas. Os dados de Milla et al. (2005) mostraram um grupo próximo das espécies de genoma B e D. Já os resultados de Creste et al. (2005) mostraram que o grupo com $2n = 18$ era mais próximo de *A. stenosperma*, espécie de genoma A. Os resultados obtidos aqui corroboram os resultados de Milla et al., (2005) e sugerem uma maior similaridade genética desse grupo com algumas espécies de genoma B e *A. glandulifera*, que possui genoma D.

O grupo A, formado pelas espécies de genoma A, apresentou oito subgrupos, reunindo, de maneira geral, acessos de uma mesma espécie. O subgrupo A1 apresentou um acesso de *A. cardenasii* e um de *A. cf. helodes*, os três acessos de *A. diogoi*, o único acesso conhecido de *A. linearifolia* e cinco dos 28 acessos de *A. kuhlmannii* incluídos. *Arachis linearifolia* possui também uma grande similaridade morfológica com *A. diogoi* (VALLS; SIMPSON, 2005).

Os seis acessos de *A. helodes* formaram um pequeno grupo (subgrupo A2). Os outros cinco, classificados como *Arachis* aff. *helodes* ou *Arachis* cf. *helodes*, ficaram dispersos pelo grupo A. Esses resultados levantam dúvidas sobre sua classificação como *A. helodes*. No subgrupo A2, ficaram também os cinco acessos de *A. kempff-mercadoi*.

Os 28 acessos de *Arachis kuhlmannii* (incluindo quatro *A.* aff. *kuhlmannii* e um *A.* cf. *kuhlmannii*) ficaram dispersos por todo o grupo A, com pelo menos quatro subgrupos. Esses grupos menores não possuem relação com os locais de coleta ou qualquer outra característica conhecida. A separação de acessos de *A. kuhlmannii* em diferentes grupos também foi observada com marcadores AFLP (MILLA et al., 2005). Essa espécie ocorre ao longo do Pantanal Matogrossense, nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, o principal centro de variabilidade morfológica, citogenética e genética do gênero *Arachis* (GREGORY et al., 1980; FERNÁNDEZ; KRAPOVICKAS, 1994). Pouco se sabe sobre o sistema reprodutivo de *A. kuhlmannii*, e a polinização cruzada com espécies simpátricas no campo poderia explicar essa grande variação genética. Krapovickas e Gregory (1994) relataram algumas diferenças morfológicas entre acessos de *A. kuhlmannii*, e um estudo taxonômico mais detalhado é necessário para o material atualmente classificado como *A. kuhlmannii*.

No pequeno subgrupo A3, cinco acessos de três diferentes espécies agruparam-se sem uma razão aparente. O subgrupo A4 foi composto basicamente de *A. stenosperma*, com 27 dos 29 acessos incluídos, e *A. kuhlmannii*, com 13 acessos. *Arachis stenosperma* é a única espécie da seção *Arachis* que ocorre na Costa Atlântica, sendo encontrada do Rio de Janeiro ao Paraná (KRAPOVICKAS; GREGORY, 1994). É também encontrada no Mato Grosso, noroeste de Goiás e sudoeste do Tocantins, no Planalto Central. As duas áreas são separadas por mais de 1000 km, mas esse material é morfológicamente muito similar. Além disso, como mostrado pela primeira vez com um grande número de acessos, é também geneticamente bastante próximo. O acesso

mais distante no subgrupo A4 (V15286) foi classificado como *A. cf. stenosperma*, devido a diferenças morfológicas em relação ao holótipo.

Os dois acessos identificados como *A. aff. simpsonii* formaram um pequeno grupo, com três acessos de *A. kuhlmannii* (subgrupo A5). Esses cinco acessos foram coletados em Porto Esperidião, no estado de Mato Grosso. O único acesso de *A. simpsonii* incluído na análise (V13716), também coletado em Porto Esperidião, foi localizado no subgrupo A8. Esses resultados sugerem que os acessos identificados como *A. aff. simpsonii* (V13710 e V13728) e *A. simpsonii* (V13716) podem ser de espécies diferentes. *Arachis simpsonii* é morfológicamente similar a *A. villosa* e, por algumas características morfológicas, a *A. diogeni* (KRAPOVICKAS; GREGORY, 1994). No entanto, nossas análises mostraram que são geneticamente distantes, corroborando estudos anteriores também baseados em marcadores microssatélites (MORETZSOHN et al., 2004; GIMENES et al., 2007).

Acessos de *A. duranensis* formaram um subgrupo (com exceção de V14167), junto a um acesso de *A. villosa* e dois de *A. kuhlmannii* (subgrupo A6). Os outros dois acessos de *A. villosa*, os três de *A. correntina* e três dos quatro acessos incluídos de *A. microsperma* formaram um subgrupo bem diferenciado (A7). *Arachis correntina* é morfológicamente muito similar a *A. villosa* (KRAPOVICKAS; GREGORY, 1994).

O subgrupo externo (A8) do grupo A apresentou os seis acessos de *A. hoehnei*. Essa espécie foi inicialmente descrita sem o pequeno par de cromossomos "A" (FERNÁNDEZ; KRAPOVICKAS, 1994), mas análises recentes sugerem que essa espécie possui um cariótipo que corresponde ao genoma A (Guillermo Seijo, comunicação pessoal). *Arachis hoehnei* foi associada a espécies com $2n = 18$, com base em marcadores AFLP (TALLURY et al., 2005), ou ficou localizada externamente ao grupo com as espécies de genomas A e B, com base em marcadores AFLP e RFLP (MILLA et al., 2005; BUROW et al., 2009). No entanto, *A. hoehnei* agrupou junto às espécies de genoma

A baseado em microssatélites (BRAVO et al., 2006; GIMENES et al., 2007) e RAPD (CUNHA et al., 2008), em concordância com dados do presente estudo. Cruzamentos entre *A. hoehnei* e várias espécies da seção *Arachis* encontram-se em andamento e poderão auxiliar a classificação dessa espécie.

O último grupo (Grupo B) foi formado basicamente por espécies associadas ao genoma B. O único acesso conhecido de *A. schinonii*, que possui genoma A (PEÑALOZA; VALLS, 2005), foi localizado nesse grupo sem razão aparente. Esse grupo contêve a maioria dos acessos incluídos de *A. magna*, *A. gregoryi* e *A. valida*, além de duas espécies ainda não descritas, *A. sp1_Sj3292* e *A. sp2_Sj3625*. Nenhum estudo citológico ou de viabilidade de cruzamentos foi publicado para essas espécies até o momento, e nada se sabe sobre suas relações genéticas com espécies da seção *Arachis*. Os resultados deste trabalho sugerem que ambas as espécies são fortemente associadas a espécies com genoma B.

Os dois acessos de *A. vallsii* incluídos formaram um pequeno grupo, associado ao Grupo B (Fig. 1). Ao nosso conhecimento, nenhum estudo de relações genéticas incluindo *A. vallsii* foi publicado. Essa espécie foi classificada na seção *Procumbentes* por Krapovickas e Gregory (1994), mesmo sendo morfologicamente diferente das outras espécies dessa seção. Muito recentemente, foi sugerida a reclassificação de *A. vallsii* na seção *Arachis*, levando em consideração características morfológicas e cromossômicas (LAVIA et al., 2009). Dados não publicados de nosso grupo de pesquisa mostraram que *A. vallsii* produz híbridos quando cruzada com diferentes espécies da seção *Arachis*, incluindo *A. hypogaea*, o que corrobora a proposta de sua inclusão na seção *Arachis*.

Com a finalidade de testar a consistência do agrupamento resultante, o coeficiente de correlação cofenético (ou coeficiente de correlação de Mantel) – r – foi calculado, gerando um valor de 0,814. Logo, a matriz cofenética e a matriz de similaridades genéticas mostraram uma

correlação significativa de 81,4%. O valor obtido por esse coeficiente indica que o dendrograma gerado corresponde à matriz de distâncias, ou seja, foi um valor bom, considerando os índices mostrados pelo programa (0,80 a 0,90 é considerado bom). Apesar disso, é necessária a utilização de um maior número de marcadores para que as distâncias entre os grupos ou até mesmo entre as espécies fiquem mais definidas, atingindo assim um nível ótimo de confiabilidade.

Os marcadores utilizados foram desenvolvidos para a espécie cultivada (*A. hypogaea*) ou para *A. stenosperma* e testados em acessos pertencentes a 30 espécies (incluindo as duas novas espécies e *A. vallsii*). Com isso, calculou-se a transferibilidade desses marcadores. Para evitar a amplificação de locos inespecíficos, a mesma temperatura foi utilizada para todas as espécies. A partir dos marcadores que geraram dados robustos, obteve-se uma taxa média de transferência de aproximadamente 89%. A transferibilidade dos marcadores para as diversas espécies incluídas na análise foi alta, o que é muito bom, levando-se em consideração que não será necessário o desenvolvimento de marcadores para cada espécie separadamente, já que o desenvolvimento de novos marcadores leva tempo e tem um custo alto.

O nível de polimorfismo de cada marcador foi avaliado pelo cálculo do número de alelos e genótipos por loco, heterozigosidade esperada e observada, e pelos valores de PIC (Tabela 3). A média do número de alelos encontrados foi de 18,87, variando de três alelos, encontrados para o marcador RM14B11, a 29, encontrados para o loco IPAHM123. Foi encontrada uma baixa taxa de heterozigosidade observada (0,135) nos acessos estudados, comparada aos valores da heterozigosidade esperada (0,783). Essa baixa proporção de heterozigotos encontrada indica que as espécies estudadas são, em sua maioria, autógamas. Para os 24 marcadores utilizados, a média de PIC obtida foi de 76,4%, e os *primers* que obtiveram maior conteúdo polimórfico foram Ah3 (0,944) e IPAHM108A (0,934), e os de menor polimorfismo foram RM14B11 (0,333) e RN36A01 (0,354). Os valores do PIC refletem a

diversidade e frequência alélica entre os acessos (BLAIR et al., 2006), e a média encontrada foi considerada alta, podendo ser explicada pela utilização de marcadores muito informativos ou pelo uso de diversas espécies silvestres que possuem, em conjunto, uma grande variabilidade genética. Em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), o valor médio de PIC encontrado (0,594) foi considerado alto (BLAIR et al., 2006). No trabalho de Akkaya e Buyukunal-Bal (2004), a média obtida de PIC também foi elevada (0,68). Valores consideravelmente menores foram encontrados com marcadores RFLP, em um estudo que incluiu seis espécies da seção *Arachis* (PAIK-RO et al., 1992). Esses resultados demonstram a grande utilidade dos marcadores microssatélites em estudos de diversidade genética.

No geral, os resultados obtidos foram de suma importância. Eles poderão ser utilizados para melhor conservação e gerenciamento de bancos de germoplasma, identificando duplicações ou acessos que necessitem de mais estudos para confirmação da espécie a que pertencem, e também para inclusão de novos acessos e/ou espécies de interesse. A taxonomia de *Arachis*, embora bastante fundamentada, é dinâmica, e podem aparecer novas *taxa*. Por exemplo: foi incluído, inicialmente, em *A. hoehnei* o acesso que hoje é *A. schinonii*. Com a intenção de se obter melhores resultados na agricultura, este estudo também ajudará a formação de novas populações, visando principalmente à busca de genes de interesse para o melhoramento genético de *A. hypogaea*, considerando que esta possui baixa variabilidade genética se comparada às espécies silvestres.

Conclusões

A utilização de marcadores microssatélites com detecção fluorescente mostrou-se um método eficiente e rápido para a análise da diversidade genética em *Arachis*. Em geral, os microssatélites corroboraram dados citogenéticos e morfológicos. Logo, a partir deste estudo, será possível selecionar plantas para serem utilizadas como progenitoras

em programas de melhoramento e para a construção de mapas genéticos e uso de seleção assistida por marcadores em programas de melhoramento genético, objetivando tornar a espécie cultivada mais resistente a diversos fatores.

Os acessos analisados do BAG-*Arachis* mostraram uma grande variabilidade genética. A divisão dos grupos de acordo com o tipo de genoma era esperada, resultados também encontrados em outros trabalhos. Porém, alguns acessos que ficaram em agrupamentos não esperados mostraram-se atípicos para a espécie descrita, necessitando de mais estudos para uma melhor definição. Isso indica que é necessário o uso de um número maior de marcadores moleculares para se obter uma melhor e mais confiável definição dos grupos.

Referências

AKKAYA, M. S.; BUYUKUNAL-BAL, E. B. Assessment of genetic variation of bread wheat varieties using microsatellite marker. **Euphytica**, v. 135, p. 179-185, 2004.

BARKLEY, N. A.; DEAN, R. E.; PITTMAN, R. N.; WANG, M. L.; HOLBROOK, C. C.; PEDERSON, G. A. Genetic diversity of cultivated and wild-type peanuts evaluated with M13-tailed SSR markers and sequencing. **Genetics Research**, v. 89, p. 93-106, 2007.

BLAIR, M. W.; GIRALDO, M. C.; BUENDÍA, H. F.; TOVAR, E.; DUQUE, M. C.; BEEBE, S. E. Microsatellite marker diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 113, p. 100-109, 2006.

BRAVO, J. P.; HOSHINO, A. A.; ANGELICI, C. M. L. C. D.; LOPES, C. R.; GIMENES, M. A. Transferability and use of microsatellite markers for the genetic analysis of the germplasm of some *Arachis* section species of the genus *Arachis*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 516-524, 2006.

BUROW, M. D.; SIMPSON, C. E.; FARIES, M. W.; STARR, J. L.; PATERSON, A. H. Molecular biogeographic study of recently described

B- and A-genome *Arachis* species, also providing new insights into the origins of cultivated peanut. **Genome**, v. 52, p. 107-119, 2009.

CRESTE, S.; TSAI, S. M.; VALLS, J. F. M.; GIMENES, M. A.; LOPES, C. R. Genetic characterization of Brazilian annual *Arachis* species from section *Arachis* and *Heterantheae* using RAPD markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 52, p. 1079-1086, 2005.

CUNHA, F. B.; NOBILE, P. M.; HOSHINO, A. A.; MORETZSOHN, M. C.; LOPES, C. R.; GIMENES, M. A. Genetic relationships among *Arachis hypogaea* L. (AABB) and diploid *Arachis* species with AA and BB genomes. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 55, p. 15-20, 2008.

DWIVEDI, S. L.; CROUCH, J. H.; NIGAM, S. N.; FERGUSON, M. E.; PATERSON, A. H. Molecular breeding of groundnut for enhanced productivity and food security in the semi-arid tropics: opportunities and challenges. **Advances in Agronomy**, v. 80, p.153-221, 2003.

DWIVEDI, S. L.; BERTIOLI, D. J.; CROUCH, J. H.; VALLS, J. F. M.; UPADHYAYA, H. D.; FÁVERO, A. P.; MORETZSOHN, M. C.; PATERSON, A. H. Peanut Genetics and Genomics: Toward Marker-assisted Genetic Enhancement in Peanut (*Arachis hypogaea* L.). In KOLE, C. (Ed.). **Oilseeds**. Series: Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants. , Berlim: Springer, 2006. 302p.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations (2007). Disponível em: < <http://faostat.fao.org/> >. Acesso em: 06 out 2009.

FERNANDEZ, A.; KRAPOVICKAS, A. Cromossomas y evolución en *Arachis* (Leguminosae). **Bonplandia**, v. 8, p. 187-220, 1994.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1998. 220 p.

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**, v. 7, n. 9, 2007.

GREGORY, W. C.; KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, M. P. Structure, variation, evolution, and classification in *Arachis*. In: SUMMERFIELD, R. J.; BUNTING, A. H. (Ed.). **Advances in Legume Science**. London: Kew Royal Botanical Gardens, 1980. p. 469-481.

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

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.

HUSTED, L. Cytological studies on the peanut, *Arachis*. II. Chromosome number, morphology and behavior, and their application to the problem of the origin of the cultivated forms. **Cytologia**, v. 7, p. 396-422, 1936.

IDURY, R. M.; CARDON, L. R. A simple method for automated allele binning in microsatellite markers. **Genetics Research**, v. 7, p. 1104-1109, 1997.

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

KRISHNA, G. K.; ZHANG, J.; BUROW, M.; PITTMAN, R. N.; DELIKOSTADINOV, S. G.; LU, Y.; PUPPALA, N. Genetic diversity analysis in Valencia peanut (*Arachis hypogaea* L.) using microsatellite markers. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 9, p. 685-697, 2004.

LAVIA, G. I. Karyotypes of *Arachis palustris* and *A. praecox* (section *Arachis*), two species with basic chromosome number $x = 9$. **Cytologia**, v. 63, p. 177-181, 1998.

LAVIA, G. I.; ORTIZ, A. M.; FERNÁNDEZ, A. Karyotypic studies in wild germplasm of *Arachis* (Leguminosae). **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 56, p. 755-764, 2009.

LIU, K.; MUSE, S. V. Power Marker: an integrated analysis environment for genetic marker analyses. **Bioinformatics**, v. 21, p. 2128-2129, 2005.

LYNCH, M. The Similarity Index and DNA Fingerprinting. **Molecular Biology and Evolution**, v. 7, p. 478-484, 1990.

MANTEL, N. A. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research**, v. 27, p. 209-220, 1967.

MILLA, S. R.; ISLEIB, T. G.; STALKER, H. T. Taxonomic relationships among *Arachis* sect. *Arachis* species as revealed by AFLP markers. **Genome**, v. 48, p. 1-11, 2005.

MITCHELL, S. E.; KRESOVICH, S.; JESTER, C. A.; HERNANDEZ, C. J.; SZEWC-MCFADDEN, A. K. Application of multiplex PCR and fluorescence-based, semi-automated allele sizing technology for genotyping plant genetic resources. **Crop Science**, v. 37, p. 617-624, 1997.

MORETZSOHN, M. C.; HOPKINS, M. S.; MITCHELL, S. E.; KRESOVICH, S.; VALLS, J. F. M.; FERREIRA, M. E. Genetic diversity of peanut (*Arachis hypogaea* L.) and its wild relatives based on the analysis of hypervariable regions of the genome. **BMC Plant Biology**, v. 4, n. 11, 2004.

NOGUEIRA, R. J. M. C.; TÁVORA, F. J. A. F. Ecofisiologia do amendoim

(*Arachis hypogaea* L.). In: SANTOS, R. C. (Ed.). **O agronegócio do amendoim no Brasil**. Paraíba: Embrapa Algodão, 2005. p. 71-122.

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

PEÑALOZA, A. P. S.; VALLS, J. F. M. Contagem do número cromossômico em acessos de *Arachis decora* (Leguminosae). In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS, 1., 1997, Campinas, SP. **Programa e resumos**. Campinas: IAC; Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1997. p. 39.

PEÑALOZA, A.; VALLS, J. F. M. Chromosome number and satellite chromosome morphology of eleven species of *Arachis* (Leguminosae). **Bonplandia**, v. 14, p. 65-72, 2005.

PRASANTH, V. P.; CHANDRA, S.; JAYASHREE, B.; HOISINGTON, D. **AlleloBin** – A program for allele binning of microsatellite markers based on the algorithm of Idury and Cardon (1997). India: ICRISAT, 2007.

ROBLEDO, G.; SEIJO, G. Characterization of the *Arachis* (Leguminosae) D genome using fluorescence in situ hybridization (FISH) chromosome markers and total genome DNA hybridization. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 3, p. 717-724, 2008.

ROHLF, F. J. **NTSYSpc**: numerical taxonomy system - version 2.21c. New York: Exeter Software: Setauket, 2009.

SANTOS, R. C.; GODOY, I. J.; FÁVERO, A. P. Melhoramento do amendoim. In: SANTOS, R.C. (Ed.). **O agronegócio do amendoim no Brasil**. Paraíba: Embrapa Algodão, 2005. p. 123-192.

STALKER, H. T. A new species in section *Arachis* of peanut with a D genome. **American Journal of Botany.**, v. 78, p. 630-637, 1991.

TALLURY, S. P.; HILU, K. W.; MILLA, S. R.; FRIEND, S. A.; ALSAGHIR, M.; STALKER, H. T.; QUANDT, D. Genomic affinities in *Arachis* section *Arachis* (Fabaceae): molecular and cytogenetic evidence. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 111. p. 1229-1237, 2005.

VALLS, J. F. M.; SIMPSON, C. E. New species of *Arachis* L. (Leguminosae) from Brazil, Paraguay and Bolivia. **Bonplandia**, v. 14. p. 35-64, 2005.

Anexos

Tabela 1. Lista de acessos e espécies de *Arachis* utilizados nas análises com marcadores microsatélites. O genoma de cada espécie também foi apresentado. (*) Espécies com genoma não definido. (**) Espécies ainda não descritas. (***) Espécie pertencente à seção *Procumbentes*.

Espécie	Acesso	Genoma
<i>A. batizocoi</i> Krapov. & W.C. Greg.	K30079	B
<i>A. batizocoi</i>	K9484	B
<i>A. benensis</i> Krapov., W.C. Greg. & C.E. Simpson	K35005	B
<i>A. cardenasii</i> Krapov. & W.C. Greg.	GKP10017	A
<i>A. cardenasii</i>	K36020	A
<i>A. correntina</i> (Burkart) Krapov. & W.C. Greg.	GKP9530	A
<i>A. correntina</i>	GKP9548	A
<i>A. cruziana</i> Krapov., W.C. Greg. & C.E. Simpson	Wi1302-2	B
<i>A. cruziana</i>	Wi1302-3	B
<i>A. decora</i> Krapov., W.C. Greg. & Valls	Sv4533	2n = 18
<i>A. decora</i>	Sv4881	2n = 18
<i>A. decora</i>	Sv8188	2n = 18

Espécie	Acesso	Genoma
<i>A. decora</i>	V9955	2n = 18
<i>A. decora</i>	V13290	2n = 18
<i>A. decora</i>	V13307	2n = 18
<i>A. decora</i>	V13430	2n = 18
<i>A. decora</i>	V13478	2n = 18
<i>A. decora</i>	V13884	2n = 18
<i>A. decora</i>	W648	2n = 18
<i>A. decora</i>	W674	2n = 18
<i>A. diogoi</i> Hoehne	Vp5000	A
<i>A. aff. diogoi</i>	V15269	A
<i>A. aff. diogoi</i>	V15270	A
<i>A. duranensis</i> Krapov. & W.C. Greg.	K7988	A
<i>A. duranensis</i>	Sj2737	A
<i>A. duranensis</i>	Sj2845	A
<i>A. duranensis</i>	Sj2864	A
<i>A. duranensis</i>	V14167	A
<i>A. glandulifera</i> Stalker	V13738	D
<i>A. glandulifera</i>	V14730	D
<i>A. gregoryi</i> C.E. Simpson, Krapov. & Valls	V6389	B
<i>A. gregoryi</i>	V14735	B
<i>A. gregoryi</i>	V14739	B

Espécie	Acesso	Genoma
<i>A. gregoryi</i>	V14740	B
<i>A. gregoryi</i>	V14743	B
<i>A. gregoryi</i>	V14753	B
<i>A. gregoryi</i>	V14760	B
<i>A. gregoryi</i>	V14765	B
<i>A. gregoryi</i>	V14767	B
<i>A. gregoryi</i>	V14960	B
<i>A. gregoryi</i>	V14962	B
<i>A. helodes</i> Mart. ex Krapov. & Rigoni	V6325	A
<i>A. helodes</i> (flor amarela)	V6326y	A
<i>A. helodes</i>	V10470	A
<i>A. helodes</i>	V12083	A
<i>A. helodes</i>	V14678	A
<i>A. helodes</i>	V15271	A
<i>A. aff. helodes</i>	Co6862	A
<i>A. cf. helodes</i>	V13701	A
<i>A. cf. helodes</i>	V14685	A
<i>A. cf. helodes</i>	V15289	A
<i>A. cf. helodes</i>	V15291	A
<i>A. hoehnei</i> Krapov. & W.C. Greg.	K30006	*
<i>A. hoehnei</i>	V9094	*

Espécie	Acesso	Genoma
<i>A. hoehnei</i>	V9140	*
<i>A. hoehnei</i>	V9146	*
<i>A. hoehnei</i>	V13985	*
<i>A. hoehnei</i>	V14547	*
<i>A. ipaënsis</i> Krapov. & W.C. Greg.	K30076	*
<i>A. kempff-mercadoi</i> Krapov., W.C. Greg. & C.E. Simpson	V13250	B
<i>A. kempff-mercadoi</i>	V14673	A
<i>A. kempff-mercadoi</i>	V14885	A
<i>A. kempff-mercadoi</i>	V14886_5	A
<i>A. kempff-mercadoi</i>	V14885_6	A
<i>A. kempff-mercadoi</i>	V15135	A
<i>A. krapovickasii</i> C.E.Simpson, D.E.Williams, Valls & I.G.Vargas	Wi1291	A
<i>A. kuhlmannii</i> Krapov. & W.C. Greg.	V6352	B
<i>A. kuhlmannii</i>	V6404	A
<i>A. kuhlmannii</i>	V6413	A
<i>A. kuhlmannii</i>	V7639	A
<i>A. kuhlmannii</i>	V8887	A
<i>A. kuhlmannii</i>	V8916a	A
<i>A. kuhlmannii</i>	V8979	A
<i>A. kuhlmannii</i>	V9214	A
<i>A. kuhlmannii</i>	V9230	A

Espécie	Acesso	Genoma
<i>A. kuhlmannii</i>	V9235	A
<i>A. kuhlmannii</i>	V9243	A
<i>A. kuhlmannii</i>	V9375	A
<i>A. kuhlmannii</i>	V9394	A
<i>A. kuhlmannii</i>	V9470	A
<i>A. kuhlmannii</i>	V9479	A
<i>A. kuhlmannii</i>	V9912	A
<i>A. kuhlmannii</i>	V10506	A
<i>A. kuhlmannii</i>	V13530	A
<i>A. kuhlmannii</i>	V13721	A
<i>A. kuhlmannii</i>	V14691	A
<i>A. kuhlmannii</i>	V14705	A
<i>A. kuhlmannii</i>	V15296	A
<i>A. kuhlmannii</i>	V15299	A
<i>A. aff. kuhlmannii</i>	V6380	A
<i>A. aff. kuhlmannii</i>	V15304	A
<i>A. aff. kuhlmannii</i>	V15310	A
<i>A. aff. kuhlmannii</i>	V15312	A
<i>A. cf. kuhlmannii</i>	V15287	A
<i>A. cf. kuhlmannii</i>	V15295	A
<i>A. linearifolia</i> Valls, Krapov. & C.E. Simpson	V9401	A

Espécie	Acesso	Genoma
<i>A. magna</i> Krapov., W.C. Greg. & C.E. Simpson	V6396	B
<i>A. magna</i>	V13751	B
<i>A. magna</i>	V13761	B
<i>A. magna</i>	V13765	B
<i>A. magna</i>	V14707	B
<i>A. magna</i>	V14724	B
<i>A. magna</i>	V14727	B
<i>A. magna</i>	V14744	B
<i>A. magna</i>	V14750	B
<i>A. magna</i>	K30097	B
<i>A. microsperma</i> Krapov., W.C. Greg. & Valls	Sv3817	A
<i>A. microsperma</i>	V14031	A
<i>A. microsperma</i>	V14041	A
<i>A. microsperma</i>	V14042	A
<i>A. palustris</i> Krapov., W.C. Greg. & Valls	V13023	2n = 18
<i>A. palustris</i>	V14156	2n = 18
<i>A. palustris</i>	V14994	2n = 18
<i>A. praecox</i> Krapov., W.C. Greg. & Valls	V14682	2n = 18
<i>A. praecox</i>	V14777	2n = 18
<i>A. schininii</i> Krapov., Valls & C.E. Simpson	V9923	A

Espécie	Acesso	Genoma
<i>A. simpsonii</i> Krapov. & W.C. Greg.	V13716	A
<i>A. aff. simpsonii</i>	V13710	A
<i>A. aff. simpsonii</i>	V13728	**
<i>A. sp1</i>	Sj3292	**
<i>A. sp2</i>	Sj3625	A
<i>A. stenosperma</i> Krapov. & W.C. Greg.	H408	A
<i>A. stenosperma</i>	Lm3	A
<i>A. stenosperma</i>	Sv2411	A
<i>A. stenosperma</i>	Sv3042	A
<i>A. stenosperma</i>	Sv3712	A
<i>A. stenosperma</i>	V7377	A
<i>A. stenosperma</i>	V7379	A
<i>A. stenosperma</i>	V7762	A
<i>A. stenosperma</i>	V9010	A
<i>A. stenosperma</i>	V9017	A
<i>A. stenosperma</i>	V10229	A
<i>A. stenosperma</i>	V10309	A
<i>A. stenosperma</i>	V12488	A
<i>A. stenosperma</i>	V12575	A
<i>A. stenosperma</i>	V13258	A
<i>A. stenosperma</i>	V13693	A

Espécie	Acesso	Genoma
<i>A. stenosperma</i>	V13796	A
<i>A. stenosperma</i>	V13828	A
<i>A. stenosperma</i>	V13844	A
<i>A. stenosperma</i>	V14090	A
<i>A. stenosperma</i>	V14092	A
<i>A. stenosperma</i>	V14453	A
<i>A. stenosperma</i>	V14454	A
<i>A. stenosperma</i>	V14773	A
<i>A. stenosperma</i>	V15063	A
<i>A. stenosperma</i>	V15076	A
<i>A. stenosperma</i>	V15282	A
<i>A. stenosperma</i>	W422	A
<i>A. cf. stenosperma</i>	V15286	A
<i>A. valida</i> Krapov. & W.C. Greg.	V9153	B
<i>A. valida</i>	V9157	B
<i>A. valida</i>	V13514	B
<i>A. valida</i>	V13516	B
<i>A. valida</i>	V15096	B
<i>A. vallsii</i> Krapov. & W.C. Greg.	V7635	***
<i>A. vallsii</i>	V13515	***
<i>A. villosa</i> Benth.	V12812	A

Espécie	Acesso	Genoma
<i>A. villosa</i>	V14309	A
<i>A. villosa</i>	V14316	A
<i>A. williamsii</i> Krapov. & W.C. Greg.	Wi1118	B

Tabela 2. Sistemas multiplex de *primers* marcados com fluorescências. (*) Azul (6-FAM), Verde (HEX) e Amarelo (NED). (**) Marcadores não incluídos na análise por apresentarem genotipagem confusa.

Multiplex	Primers	Fluorescência *	Tamanho (pB)	Temp. (°C)
1	PM36	Amarelo	182-238	50
	RN12E01	Amarelo	117-155	52
	IPAHM123	Verde	104-198	52
	RN34H10	Azul	177-257	52
	RI2A06	Azul	141-169	52
	Ah-275	Azul	64-88	50
2	Ah3	Amarelo	190-268	50
	PM137	Amarelo	126-178	52
	IPAHM108A	Azul	194-256	52
	IPAHM406	Azul	94-180	52
	RM6F03	Verde	172-204	52
	Seq14G03	Verde	220-258	52
3	Ap40	Azul	157-221	52
	RN36A01	Azul	85-105	52
	RN10F09	Verde	193-245	52
	RM14B11	Verde	310-316	52
4	RN27A10	Amarelo	108-132	54
	Seq4B09	Verde	278-300	54
	Seq16C07	Azul	208-290	54
	Seq4F10	Azul	136-210	54

5	TC3B05	Azul	267-353	60
	RN5H02	Verde	180-220	60
	PSeq3D09	Verde	265-305	60
6	TC4E10	Azul	267-353	58
	Seq15C10**	Amarelo	180-220	60
	Seq14H06**	Amarelo	265-305	60

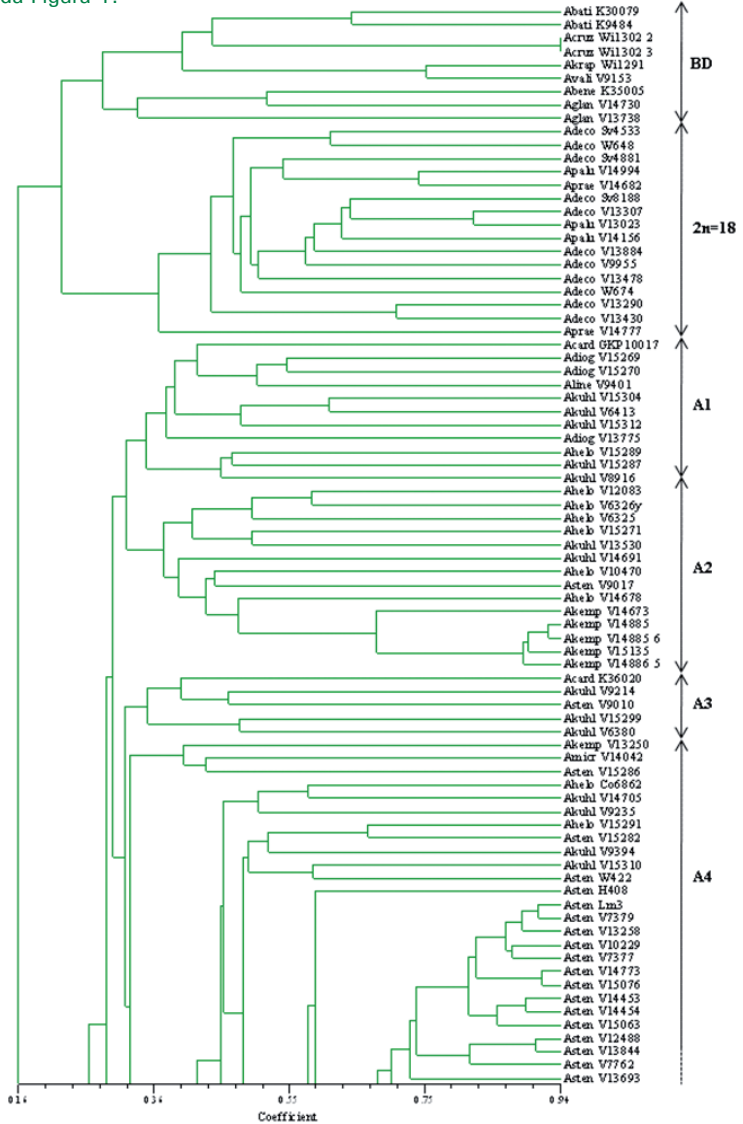
Tabela 3. Número de genótipos (Ng) e alelos (Na), heterozigosidade esperada (*He*) e observada (*Ho*) e conteúdo informativo de polimorfismo (PIC), encontrados para cada um dos 24 locos microssatélites analisados em 161 acessos de *Arachis* spp.

Loco	Ng	Na	<i>He</i>	<i>Ho</i>	PIC
Ah-275	16	11	0,619	0,343	0,560
Ah3	16	28	0,946	0,182	0,944
IPAHM108A	39	25	0,883	0,207	0,875
IPAHM123	30	26	0,938	0,110	0,934
IPAHM406	40	32	0,871	0,212	0,863
PM137	14	31	0,861	0,139	0,852
PM36	43	13	0,706	0,049	0,680
PSeq3D9	21	27	0,914	0,184	0,908
RI2A06	17	14	0,837	0,097	0,824
RM14B11	4	3	0,400	0,086	0,333

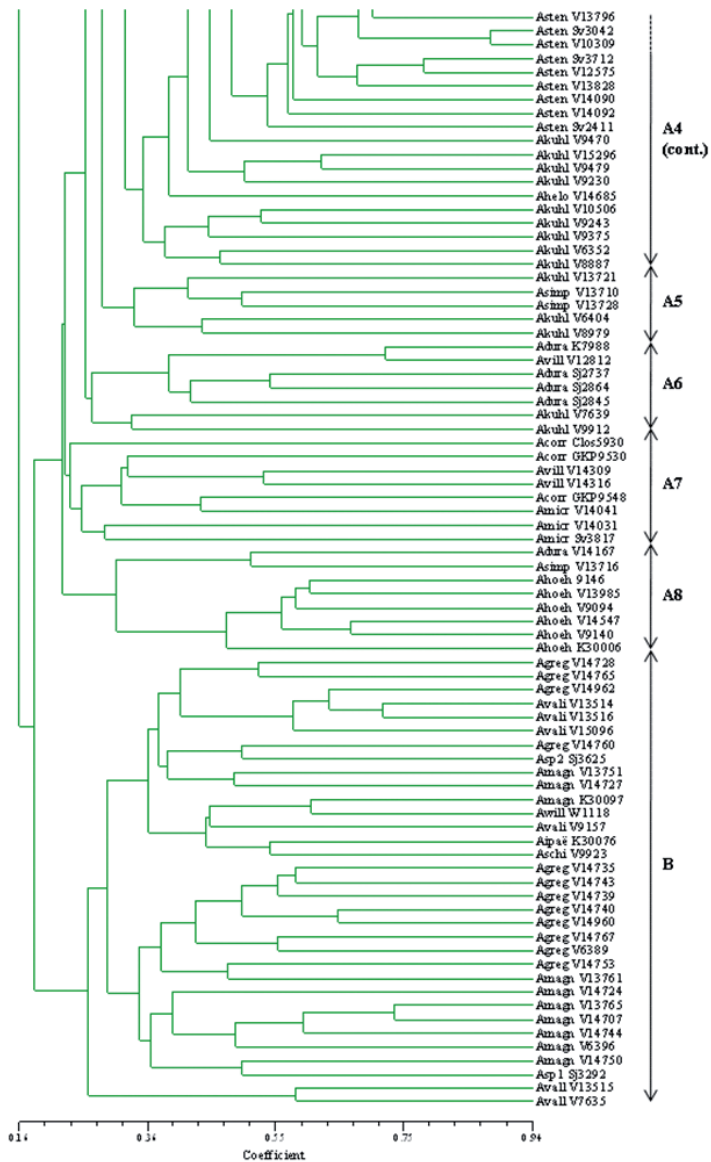
Loco	Ng	Na	He	Ho	PIC
RM6F03	12	10	0,680	0,032	0,654
RN10F9	37	21	0,872	0,309	0,860
RN12E01	21	15	0,814	0,110	0,790
RN27A10	11	7	0,663	0,085	0,605
RN34H10	39	29	0,902	0,240	0,894
RN36A01	10	6	0,372	0,070	0,354
RN5H02	15	15	0,845	0,013	0,829
Seq14G03	30	20	0,891	0,129	0,882
Seq16C07	27	22	0,780	0,066	0,768
Seq4B09	12	10	0,641	0,145	0,610
Seq4F10	45	28	0,920	0,187	0,915
TC3B05	26	24	0,922	0,050	0,917
TC4E10	32	25	0,878	0,128	0,870
Média	26,54	18,87	0,783	0,135	0,763

Figura 1. Dendrograma obtido pelo método UPGMA, baseado em similaridades genéticas entre cada par de acessos, calculadas pelo coeficiente de *band-sharing* (Lynch, 1990), entre 161 acessos de 27 espécies da seção *Arachis*, uma espécie da seção *Procumbentes* e duas espécies ainda não descritas.

Primeira parte da Figura 1.



Segunda parte da Figura 1.





*Recursos Genéticos
e Biotecnologia*

**Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

