



CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE ACESSOS DA SECÇÃO *CAULORRHIZAE* COM MARCADORES MICROSSATÉLITES

Hellen Sandra Freires da Silva Azêvedo¹, Renata Beltrão Teixeira Yomura², Adna Cristina Barbosa de Sousa³, Giselle Mariano Lessa de Assis⁴, Tatiana de Campos⁴

¹Discente da Rede Bionorte do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Recursos genéticos. Bolsista CAPES. e-mail: hellenfreires@gmail.com; ²Analista da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Acre: e-mail: renata.beltrao@embrapa.br; ³Docente da Universidade Federal da Paraíba – UFPB: e-mail: adnacsousa@gmail.com; ⁴Pesquisadora da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Acre: e-mail: giselle.assis@embrapa.br; tatiana.campos@embrapa.br

1 **RESUMO:** As espécies *Arachis pintoi* e *Arachis repens*, conhecidas como amendoim
2 forrageiro, destacam-se pela utilização em pastagens consorciadas pela alta rentabilidade nos
3 sistemas de produção e por fornecerem benefícios ambientais. O objetivo do estudo foi avaliar
4 molecularmente a diversidade genética de 106 acessos da secção *Caulorrhizae* do Banco
5 Ativo de Germoplasma da Embrapa Acre por meio de marcadores microssatélites. Observou-
6 se na análise de alelos privados um total de 65 alelos. Treze alelos (20,3%) eram exclusivos
7 de *A. pintoi*, dois alelos (3,1%) de *A. repens* e 50 alelos (78,1%) foram compartilhados entre
8 as duas espécies. De acordo com o dendrograma obtido não foi possível verificar a formação
9 de grupos definidos. Na análise de estruturação, verificou-se a separação em dois *pools*
10 *gênicos* sem diferenciação entre as espécies. As espécies *A. pintoi* e *A. repens* apresentaram
11 alta similaridade, não havendo estruturação suficiente para separação das duas espécies.

12 **Palavras-chave:** *Arachis*, conservação, diversidade molecular, marcadores genéticos
13

14 **CARACTERIZATION OF GENETIC DIVERSITY OF *CAULORRHIZAE*** 15 **GENOTYPES WITH MICROSATELLITES MARKERS**

16
17 **ABSTRACT:** The *Arachis pintoi* and *Arachis repens* species known as forage peanut, stand
18 out for use in mixed pastures by high profitability in production systems and provide
19 environmental benefits. The goal of this study was to evaluate the molecular genetic diversity
20 of 106 accessions of *Caulorrhizae* section of the Active Germplasm Bank of Embrapa Acre
21 using microsatellite markers. It has been observed in the analysis of private alleles a total of
22 65 alleles. Thirteen alleles (20.3%) were unique to *A. pintoi*, two alleles (3.1%) of *A. repens*
23 and 50 alleles (78.1 %) were common between the two species. According to the obtained
24 dendrogram, it was not possible to verify defined groups. The structure analysis detected two
25 gene pools without differentiation between species. The species *A. pintoi* and *A. repens* were
26 genetically close, with not enough structure to differentiate the two species.

27 **KEYWORDS:** *Arachis*, conservation, genetic markers, molecular diversity



28

29

INTRODUÇÃO

30

31

32

33

34

35

36

37

38

O gênero *Arachis* está dividido em nove seções e pertence à família Leguminosae. O centro de origem situa-se na Serra do Amambá, no limite do Mato Grosso do Sul e Paraguai. Dentre as espécies endêmicas da flora brasileira, espécies da seção *Caulorrhizae* (*Arachis pintoii* e *Arachis repens*) vêm despertando interesse na agropecuária (CARVALHO; PIRES, 2008). Estudos de caracterização e avaliação de acessos *A. pintoii* e *A. repens* vêm sendo realizados, visando à conservação e utilização desses recursos genéticos. Os estudos mostram alta variabilidade e divergência genética entre os acessos para caracteres morfológicos e agronômicos, não tendo informações a nível molecular (AZEVEDO et al., 2011; MENEZES et al., 2012).

39

40

41

42

43

44

Os marcadores moleculares são ferramentas utilizadas para acessar variações no genoma, possibilitando estimar diversos parâmetros genéticos. Devido ao alto grau de polimorfismo, tornaram-se marcadores robustos para o estudo de diversidade genética. A expansão do uso do amendoim forrageiro (*A. pintoii* e *A. repens*) depende de avanços no conhecimento da variabilidade genética e no seu potencial desempenho em diferentes ambientes, na recuperação de solos e nos sistemas de produção pecuários.

45

46

47

48

49

50

Portanto, o conhecimento da diversidade genética dos acessos de *A. pintoii* e *A. repens* pode aumentar a produtividade das pastagens, e assim diminuir as pressões de desmatamento, reincorporando a terra ao processo produtivo, além de evitar a abertura de novas áreas de floresta. O presente estudo teve como objetivo avaliar a diversidade genética dos acessos de *A. pintoii* e *A. repens* pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Acre por meio de marcadores microssatélites.

51

52

MATERIAL E MÉTODOS

53

54

55

56

57

58

O estudo foi realizado com 106 acessos (*A. pintoii* e *A. repens*) pertencentes ao BAG localizado na Embrapa Acre. Para a extração de DNA, foram coletadas folhas jovens em microtubos de 2 mL. O material foi armazenado em gelo até o momento da extração no Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular (LabMol) da Embrapa Acre. O DNA genômico total foi extraído usando o protocolo descrito por Hoisington et al. (1994) modificado. O DNA foi quantificado em agarose (1%).

59

60

61

62

Dezessete marcadores microssatélites descritos na literatura por Palmieri et al. (2002), (2005), (2010), Gimenes et al. (2007) foram testados e otimizados quanto à temperatura de anelamento. Desse conjunto, quatro locos foram desenvolvidos com base em sequências específicas para *A. hypogaea* (Ah), dez locos para *A. pintoii* (Ap) e três para *A. glabrata* (Ag).

63

64

65

66

67

68

As reações de amplificação dos fragmentos de DNA foram feitas contendo 7,5 ng de DNA genômico; tampão 1x; 0,25 mM de dNTP's cada; 0,25 mg/mL de BSA (Albumina Sérica Bovina); 2,0 mM MgCl₂; 0,8 μM de cada iniciador e 1 U de *Taq Polymerase* (Invitrogen). As amplificações foram realizadas em termociclador (Analytik jena). As etapas de amplificação consistiram em: 94 °C por 1 minuto, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, temperatura de anelamento definida para cada iniciador por 1 minuto a 72 °C, e uma

69 fase final de extensão de 72 °C por 5 minutos. Os produtos amplificados foram visualizados
70 em gel de agarose (3%).

71 A eletroforese para genotipagem dos locos foi realizada em gel de poliacrilamida
72 desnaturante (5%). A coloração do gel foi realizada utilizando-se nitrato de prata, segundo o
73 protocolo proposto por Creste et al. (2001). A interpretação dos fragmentos amplificados foi
74 realizada visualmente por meio de comparação com marcador de peso molecular padrão (Life
75 Technologies).

76 As distâncias genéticas foram geradas no programa TFGPA (Miller, 1997), utilizando o
77 coeficiente de Rogers Modificado. As estimativas de heterozigosidade esperada e observada,
78 riqueza alélica e índice de fixação foram estimados no programa GDA (LEWIS; ZAYKIN,
79 1999). Para análise da estruturação genética sem hierarquização, foi utilizado o programa
80 STRUCTURE (PRITCHARD et al., 2000).

81

82 RESULTADOS E DISCUSSÃO

83 Dentre os 17 locos testados, 10 (58,8%) foram polimórficos. Foram observados 129
84 alelos nos acessos de *A. pinto*i e 81 em *A. repens*. As heterozigosidades esperadas foram
85 moderadamente altas, com médias de 0,73, 0,71 para *A. pinto*i e *A. repens*, respectivamente.
86 Os valores médios de heterozigosidade observada para *A. pinto*i, *A. repens* foram de 0,33 e
87 0,43, respectivamente.

88 Observou-se na análise de alelos privados um total de 65 alelos. Treze alelos (20,3%)
89 eram exclusivos de *A. pinto*i, dois alelos (3,1%) de *A. repens* e 50 alelos (78,1%) foram
90 compartilhados entre as duas espécies. Valores muito próximos foram encontrados por
91 Gimenes et al. (2000) com marcadores RAPD, ao verificar 74% do número total de
92 fragmentos compartilhados entre *A. pinto*i e *A. repens*.

93 Palmieri et al. (2010) obtiveram 99 (49%) alelos exclusivos em *A. pinto*i, 21 (10,7%)
94 alelos exclusivos em *A. repens* e 79 (40,3%) compartilhados entre as duas espécies. Porém,
95 neste trabalho, foram analisados outros locos microssatélites desenvolvidos a partir de
96 sequências específicas de *A. pinto*i.

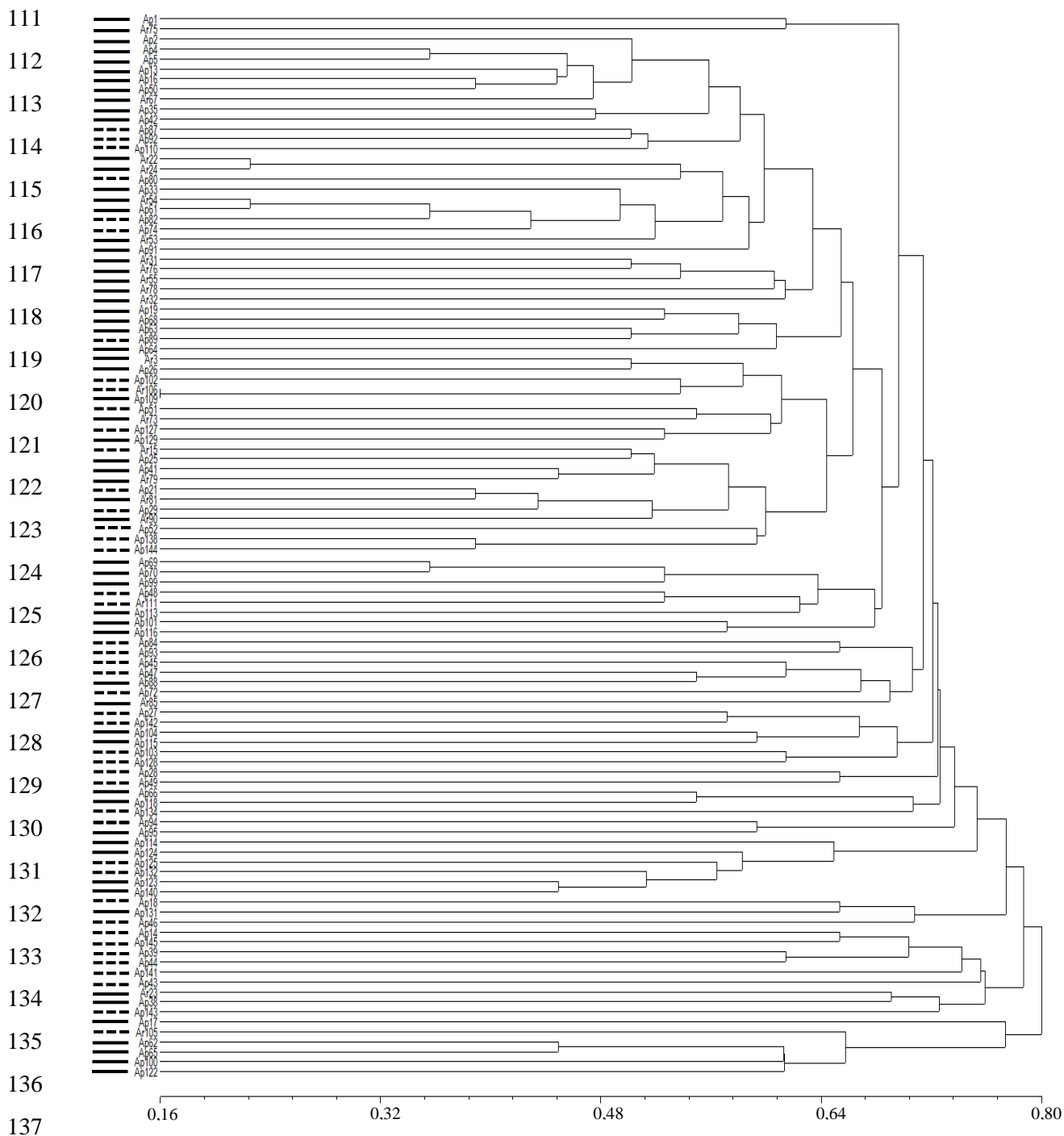
97 De acordo com o dendrograma obtido (Figura 1), foi possível verificar a variabilidade
98 entre os acessos de *A. pinto*i e *A. repens*, porém sem a estrutura de diferenciação genética que
99 possibilite a formação de grupos definidos. A menor distância (0,16) foi observada entre os
100 acessos Ap109 (*A. pinto*i) e o Ar106 (*A. repens*). Por sua vez, a maior distância genética
101 (0,96) foi observada entre os acessos Ap128 (*A. pinto*i) e Ar105 (*A. repens*).

102 Resultados similares foram encontrados por Perseguini et al. (2011) ao estimarem a
103 diversidade presente em 60 genótipos de feijoeiro comum (Carioca) com 70 marcadores
104 microssatélites. Os autores obtiveram valores de distância genética entre 0,37 e 0,63 e
105 verificaram baixa estruturação genética sem grupos bem definidos.

106 Na análise bayesiana pelo programa STRUCTURE, verificou-se que o valor de K mais
107 provável foi K=2. Verificou-se ainda a separação dos acessos de *A. pinto*i e *A. repens* em dois
108 *pool* gênicos (Figura 1).

109

110



138 **Figura 1.** Dendrograma com os 106 acessos de *Arachis pintoi* e *Arachis repens* obtido pelo
 139 método UPGMA, utilizando-se a distância modificada de Rogers e 10 locos microssatélites.
 140 As barras laterais (linhas contínuas: *pool gênico I*; linhas pontilhadas: *pool gênico II*) são



141 referentes ao *pool gênico* determinado pelo programa STRUCTURE para K=2. Embrapa
142 Acre, 2013.

143 O *pool gênico* I (linhas contínuas) agrupou 62 acessos, sendo 44 de *A. pintoi* e 18 de *A.*
144 *repens*. Neste grupo verificou-se que 20,97% dos acessos apresentaram mistura genômica,
145 entre eles onze acessos da espécie *A. pintoi* e dois da espécie *A. repens* (Ar76 e Ar31). O *pool*
146 *gênico* II (linhas pontilhadas) incluiu 44 acessos, sendo 40 de *A. pintoi* e quatro de *A. repens*.
147 Verificou-se neste grupo que 13,64% apresentaram mistura genômica, entre eles quatro foram
148 da espécie *A. pintoi* (Ap48, Ap18, Ap74 e Ap132) e dois da espécie *A. repens* (Ar106 e
149 Ar105).

150 Estudo de filogenia molecular nas espécies das secções do gênero *Arachis* confirmou
151 natureza monofilética dos acessos das espécies *A. pintoi* e *A. repens* da secção *Caulorrhizae*
152 (FRIEND et al., 2010). Portanto, os acessos devem apresentar genomas muito semelhantes,
153 pois possuem um mesmo ancestral comum e origem a partir do mesmo *pool* genético.
154 Adicionalmente, ainda não foi comprovada a existência de híbridos interespecíficos férteis
155 entre as duas espécies (OLIVEIRA; VALLS, 2003).

156 Um estudo citogenético realizado recentemente com o híbrido interespecífico de *A.*
157 *pintoi* x *A. repens* (10538) e seus progenitores verificou que os acessos de *A. pintoi*, *A. repens*
158 e o híbrido apresentaram alto percentual para viabilidade do grão de pólen, sendo de 97,43%,
159 99,4% e 97,53%, respectivamente (PUCCIARIELLO et al., 2013). O emparelhamento e a
160 segregação dos cromossomos na meiose foram normais. Portanto, a ausência de produção de
161 semente não é devido a irregularidades meióticas. Uma possível causa para a ausência de
162 produção de semente pode estar associada à presença de pelos longos e densos na superfície
163 estigmática (ASSIS, et al., 2009).

164 A similaridade entre acessos de ambas as espécies foi verificada em estudos de
165 caracterização morfológica, agrônômica, bromatológica e molecular (ASSIS et al., 2009;
166 PALMIERI et al., 2010; MENEZES et al. 2012).

167 Assis et al. (2009) realizaram a caracterização da pilosidade da superfície estigmática e
168 verificaram a formação de quatro grupos, obtidos pelo método de Tocher baseado na distância
169 de Mahalanobis. Destes grupos, três agruparam acessos das duas espécies.

170 Menezes et al. (2012), no estudo de caracterização agrônômica e bromatológica na
171 secção *Caulorrhizae*, verificaram a formação de seis grupos pelo método de Tocher, baseado
172 na distância de Mahalanobis. Os autores verificaram também que não houve um padrão de
173 agrupamento com base nas espécies. Dos seis grupos formados, quatro foram constituídos por
174 genótipos de *A. pintoi* e *A. repens*.

175 Corroborando com este estudo, Menezes et al. (2012) também verificaram um grupo
176 contendo os acessos Ar53, Ar55, Ap63, Ap41, Ap42 e Ap4. Além disso, o acesso Ar15
177 aproximou-se do grupo de acessos de *A. pintoi*, o que reitera a proximidade deste acesso de *A.*
178 *repens* com *A. pintoi*.

179

180 CONCLUSÕES

181 Os locos microssatélites foram eficientes para o estudo de caracterização do
182 germoplasma. Não foram encontrados acessos duplicados. O agrupamento indicou que as



183 espécies *A. pintoi* e *A. repens* são muito próximas, não havendo estruturação genética
184 suficiente para separação entre as duas espécies.

185

186 AGRADECIMENTOS

187 À Unipasto e a FUNTAC pelo apoio financeiro e a Coordenação de Aperfeiçoamento
188 de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa.

189

190 REFERÊNCIAS

191 ASSIS, G. M. L.; VALENTIM, J. F.; CARNEIRO JUNIOR, J. M.; SILVA, H. S. F.;
192 SANTOS, L. F. A.; AZEVEDO, J. M. A.; REIS, S. S. de O. Caracterização da pilosidade da
193 superfície estigmática de genótipos de amendoim forrageiro. *In: REUNIÃO ANUAL DA*
194 *SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA*, 46, 2009, Maringá. **Anais...** Maringá: SBZ,
195 1 CD-ROM.

196

197

198 AZEVEDO, J. M. A.; SILVA, H. S. F.; ASSIS, G. M. L.; SANTOS, L. F. A.; WOLTER, P.
199 F. Genetic divergence among accessions of *Arachis repens* based on vegetative
200 morphological traits. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Brazilian, v. 40, n. 10, p. 2067-2073,
201 october. 2011.

202

203

204 CARVALHO, G. G. P.; PIRES, A. J. V. Leguminosas tropicais em associação com pastagens.
205 **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 57, p. 103-113, 2008.

206

207

208 CRESTE, S.; TUMANN, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat
209 polymorphism in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant**
210 **Molecular Biology**, Netherlands, v.19, p. 299-306. 2001.

211

212

213 EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals
214 using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 14, p.
215 2611- 2620, 2005.

216

217

218 FRIEND, S. A. D. et al. Species, genomes, and section relationships in the genus *Arachis*
219 (Fabaceae): a molecular phylogeny. **Plant Systematics and Evolution**, Austria, v. 290, p.
220 185–199, 2010.

221

222

223 GIMENES, M. A. et al. Characterization and transferability of microsatellite markers of the
224 cultivated peanut (*Arachis hypogaea*). **BMC Plant Biology**, United Kingdom, v. 7, 2007.



225

226

227 GIMENES, M. A. et al. Genetic variation and phylogenetic relationships based on RAPD
228 analysis in section *Caulorrhizae*, genus *Arachis* (Leguminosae). **Euphytica**, Wageningen, v.
229 116, p. 187–195, 2000.

230

231

232 HOISINGTON, D.; KHAIRALLAH, M.; GONZÁLEZ-DE-LEÓN, D. **Laboratory**
233 **protocols: CIMMYT applied molecular genetics laboratory**, 2 ed. CIMMYT, México, DF.
234 1994.

235

236

237 LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. **GDA - Genetic data analysis**: Version 1.1 for Windows95/NT.
238 Albuquerque: University of New Mexico. Free program distributed by the authors form
239 <<http://www.lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/>> 1999.

240

241

242 MENEZES, A. P. M.; ASSIS, G. M. L.; MATAVELI, M.; SILVA, H. S. F.; AZEVEDO, J.
243 M. A.; MENDONÇA, M. S. Genetic divergence between genotypes of forage peanut in
244 relation to agronomic and chemical traits. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Brazilian, v. 41,
245 n. 7, p. 1608-1617, 2012.

246

247

248 MILLER, M. P. **Tools for population genetic analyses (TFPGA): A Windows program**
249 **for the analysis of allozyme and molecular population genetic data, version 1.3**. Northern
250 Arizona University, Arizona, 1997.

251

252

253 OLIVEIRA, M. A. P.; VALLS, J. F. M. Morphological characterization and reproductive
254 aspects in genetic variability studies of forage peanut. **Scientia Agricola**, São Paulo, v. 60, p.
255 299-304, 2003.

256

257

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

262

263

264 PALMIERI, D. A. et al. Isolation and characterization of microsatellite loci from the forage
265 species *Arachis pintoi* (Genus *Arachis*). **Molecular Ecology Notes**, United Kingdom, v. 2, p.
266 551-553, 2002.



267

268

269 PALMIERI, D. A. et al. Novel polymorphic microsatellite markers in section *Caulorrhizae*
270 (*Arachis*, Fabaceae), **Molecular Ecology Notes**, United Kingdom, v. 5, p. 77-79, 2005.

271

272

273 PERSEGUINI, J. M. K. C.; CHIORATTO, A. F.; ZUCCHI, M. I.; Colombo, C. A.;
274 Carbonell, S. A. M.; Mondego, J. M. C.; Gazaffi, R.; Garcia, A. A. F.; Campos, T.; Souza, A.
275 P.; Rubiano, L. B. Genetic diversity in cultivated carioca common beans based on molecular
276 marker analysis. **Genetics and Molecular Biology**, Brazilian, v. 34, n. 1, p. 88-102, 2011.

277

278

279 PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure
280 using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, p. 945-959, 2000.

281

282

283 PUCCIARIELLO, O.; ORTIZ, A. M.; FERNÁNDEZ, A.; LAVIA, G. I. Análisis
284 cromosómico del híbrido *Arachis pinto* x *A. repens* (Leguminosae) mediante citogenética
285 clásica y molecular. **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**, Argentina, v. 48, n. 1,
286 p.111-119, 2013.