



ANÁLISE GENÉTICA DE GENÓTIPOS INTERESPECÍFICOS DE AMENDOIM DIVERGENTES PARA PRODUÇÃO DE ÓLEO

¹ Camila Marques Queiroz; ² Vandre Guevara Lyra Batista; ² Antônio Lopes de Arroxelas Galvão Filho; ³ Morganna Pollyne Nóbrega Pinheiro; ³ Carliane Rebeca Coelho Silva; ² Roseane Cavalcanti dos Santos; ² Liziane Maria de Lima

¹ CCBS-UEPB (cmilacg@hotmail.com); ² Embrapa Algodão; ³ UFRPE

RESUMO – Marcadores ISSR foram utilizados para discriminar acessos interespecíficos de amendoim, divergentes para produção de óleo. Os acessos foram cultivados em casa de vegetação e aos 20 dias após o plantio foram coletadas folhas para extração de DNA e posterior ensaios de PCR-ISSR. Dez primers foram utilizados gerando bandas mono e polimórficas. Dentre eles, os mais responsivos em termos de discriminação dos acessos foram 818 e 842, que geraram, respectivamente, 14 e 12 regiões e taxa de polimorfismo de 64 e 83%, respectivamente. Os primers 847 e 858 geraram poucas bandas e mais de 60% foram monomórficas, de pouco valor para estudos de discriminação de acessos por meio de marcadores do tipo ISSR. No dendrograma gerado pelo programa NTSYS-PC 2.10 observou-se a formação de 3 grupos, estando os genótipos rasteiros, que contém maior teor de óleo, mais separados dos eretos, que situaram-se em aglomerados distintos. Para geração de maior variabilidade para este caráter, sugere-se hibridizações entre genótipos do tipo rasteiro com algum acesso do grupo 2, que possuem teor de óleo abaixo de 48%.

Palavras-chave – *Arachis hypogaea*, ISSR, polimorfismo.

INTRODUÇÃO

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) pertence ao gênero *Arachis* e é a espécie de maior valor comercial no mundo. As variedades comerciais são divididas em duas subespécies, *hypogaea* e *fastigiata*, que são distinguidas entre si quanto hábito de crescimento, tamanho da semente, presença de flor na haste principal, precocidade entre outros descritores (VALLS, 2005). A subespécie *hypogaea* concentra as variedades do grupo *Runner* ou Virgínia, enquanto que a *fastigiata* é constituída pelas variedades eretas do grupo Valência.

Nos trabalhos de melhoramento genético a discriminação dos genótipos de amendoim geralmente é baseada nos descritores morfológicos. No entanto, alguns deles são pouco sensíveis





para serem utilizados, com critério, nos processos de seleção. Ademais, alguns descritores são muito influenciados pelas condições ambientais, incorrendo algumas vezes em identificações errôneas.

As análises de diversidade genética ou mesmo de diferenciação de germoplasma tem sido realizadas, já ha algumas décadas, por meio de uso de ferramentas moleculares, em especial marcadores dos tipos ISSR (Inter Simple Sequence Repeat), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), e VNTR (Variable Number of Tandem Repeats), que permitem distinguir acessos com precisão e confiabilidade (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Os marcadores ISSR têm sido amplamente utilizados pelos melhoristas de plantas porque, além de contribuir nas análises de variabilidade genética entre acessos, também são usados para determinar o grau de associação entre a distância genética entre parentes e desempenho dos híbridos para construção de mapas genéticos de ligação, entre outros.

Nesse trabalho foi procedida análise genética entre acessos interespecíficos de amendoim, das subespécies *hypogaeae* e *fastigiata* e *divergentes quanto aos teores de óleo nas sementes*, utilizando-se marcadores do tipo ISSR.

METODOLOGIA

Dez acessos interespecíficos de amendoim, das subespécies *hypogaeae* e *fastigiata*, foram cultivados em bandejas, em casa de vegetação, e aos 20 dias após o cultivo, folhas frescas foram coletadas para extração de DNA seguindo metodologia descrita em Santos et al. (2008). Uma síntese dos principais descritores destes acessos encontra-se na Tabela 1. Após extração, todas as amostras foram alíquotadas em 20 ng/μl para os ensaios de PCR.

As reações de PCR-ISSR foram conduzidas em um volume final de 25 μL contendo: 0,3 μl de Taq DNA polimerase, 2,5 μl de tampão da enzima (10 X), 1,4 μl de MgCl₂ (2,5 mM), 0,5 μl de dNTP (10 mM), 1 μl de cada *primer* ISSR (10 μM) e 1 μl de cada DNA genômico (20 ng/μl). As reações consistiram de uma desnaturação inicial a 94 °C/4 min, seguido por 25 ciclos de desnaturação a 94 °C/1 min, anelamento a 45 °C/1 min e extensão a 72 °C/1 min, seguida de extensão final por 7 min a 72 °C. Os produtos da amplificação foram corados com Syber Green (LGC) e separados por eletroforese em gel de agarose a 0.8%, visualizados sob luz ultravioleta e fotografados.

Os produtos da amplificação foram codificados em uma matriz de dados binários para determinação da similaridade genética entre cada par de acessos, utilizando-se o coeficiente de





Jaccard. A partir da matriz de similaridade genética foi feita a análise de agrupamento, via dendrograma com o auxílio do programa NTSYS-PC 2.10 (ROHLF, 2000), utilizando como critério de agrupamento o método baseado na distância média (UPGMA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos dez primers utilizados, apenas 818 e 842 foram mais responsivos para discriminação dos genótipos, gerando taxa de polimorfismo de 64 e 83%, respectivamente (Tabela 2). Os primers de menor contribuição para discriminação dos genótipos foram 847 e 858 que geraram apenas 15 e 22 de bandas polimórficas. Um detalhe do padrão de bandas obtido com os primers 818 e 842 encontra-se na Figura 1.

O dendrograma, gerado pelo programa NTSYS-PC 2.10, a partir dos coeficientes de similaridade, permitiu a formação de três grupos entre os genótipos avaliados (Figura 2). Os grupos 1 e 3 foram representados, respectivamente, pelos genótipos rasteiros tardios LGoPE-06 e LViPE-06, que possuem sementes extra-longas e alto teor de óleo. Diferem entre si pela dormência nas sementes, presente no LGoPE-06 e pela maior habilidade de tolerar condições de estresse hídrico, encontrada em LViPe-06.

O segundo grupo apresentou 4 subgrupos, sendo dois deles representados pela IAC Caiapó e a Florunner, ambas rasteiras, que contém em seu genoma genes oriundos de um dos progenitores da subespécie vulgaris, de porte ereto. Estas cultivares são ricas em teor de óleo e possuem grãos grandes, atendendo ao mercado de confeitaria e oleoquímico.

Nos outros subgrupos, encontram-se as isolinhas CNPA 271 AM, CNPA 270 AM e CNPA 283 AM, geradas a partir de cruzamento com as cultivares Florunner e a argentina Manfredi. Estas linhagens foram geradas no final da década de 90 e têm sido avaliadas em ensaios de rede regional, visando melhorá-las no aspecto oleico e precocidade (GOMES et al., 2007). As cultivares BR 1, BRS Havana e as linhagens avançadas CNPA 280 AM, L 7 Bege e Branco Rasteiro aglomeraram-se no segundo subgrupo. Todas são de porte ereto, grãos de tamanho médio a longo e teor de óleo entre 43 e 47%. A exceção é a linhagem Branco rasteiro que situou-se neste grupo por ser progênie da BR 1, tendo herdando dela características de alta expressividade, como precocidade, tolerância ao estresse hídrico e padrão de vagens e sementes, com excesso da cor.





Em trabalhos de melhoramento que visem geração de variabilidade para elevação do teor de óleo nas sementes, sugere-se realizar hibridizações entre genótipos de tipo rasteiro com algum acesso ereto do grupo 2, que possuem teor de óleo abaixo de 48%, porém são tolerantes às condições de manejo com baixa disponibilidade hídrica.

CONCLUSÃO

- Os primers 818 e 842 são os mais responsivos para discriminação dos genótipos intraespecíficos de amendoim;

- Dos três grupos gerados no dendrograma, o segundo aglomerou a maioria dos genótipos de porte ereto, com teor de óleo abaixo de 48%. Para geração de variabilidade deste caráter, o cruzamento entre genótipos de tipo rasteiro com algum ereto do grupo 2, oferece maior possibilidade de sucesso.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220p. (Embrapa-Cenargen. Documentos, 20).

GOMES, L.R.; SANTOS, R.C.; ANUNCIÇÃO FILHO, C.J.; MELO FILHO, P.A. Adaptabilidade e estabilidade fenotípica de genótipos de amendoim de porte ereto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 7, p. 985-989, jul. 2007.

ROHLF, F. J. **NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1**. New York: Exeter Software, 2000.

SANTOS, M.M.S.; SANTOS, R. C. Validação de um protocolo rápido para extração de dna vegetal. In: VIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFRPE, 2008, Recife. Anais da VIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFRPE, 2008.

VALLS, J.F.M. Recursos genéticos do gênero *Arachis*. In: SANTOS, R. C. (Ed.). **O Agronegócio do Amendoim no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão; Brasília: Embrapa Informações Tecnológica, 2005. p. 45-69.





Tabela 1. Descritores morfológicos e agrônômicos dos acessos utilizados neste trabalho.

| Acesso | HB | CS | SP | SV | ciclo | TES | TS | O (%) |
|-------------------|----|----|----|-----|---------|-----|----|-------|
| 1 LGoPE-06 | R | B | F | 1-2 | 130-135 | Não | EG | 50 |
| 2-CNPA 271 AM | E | V | H | 1-2 | 90-100 | Sim | M | 45 |
| 3- Braço rasteiro | R | Br | F | 3-4 | 100-115 | Sim | G | 50 |
| 4- BRS Havana | E | B | H | 3-4 | 85-90 | Sim | M | 43 |
| 5- BR 1 | E | V | H | 3-4 | 87-90 | Sim | M | 45 |
| 6- CNPA 283 AM | E | B | H | 1-2 | 90-100 | Sim | M | 47 |
| 7- LViPE-06 | R | B | F | 1-2 | 120-125 | Sim | EG | 50 |
| 8-CNPA 270 AM | E | V | F | 1-2 | 90-100 | Sim | M | 45 |
| 9-CNPA 280 AM | E | B | F | 1-2 | 90-100 | Sim | M | 47 |
| 10- IAC Caiapó | R | B | H | 1-2 | 130-135 | Não | G | 50 |
| 11- Florunner | R | B | H | 1-2 | 120-130 | Não | G | 50 |
| 12- L 7 Bege | E | B | F | 1-2 | 90-95 | Sim | M | 45 |

Legenda: HB- habito de crescimento, E- ereto, R- rasteiro; CS: cor da semente: V-vermelha, B- bege, Br- branca; SB: subespécie, H- hypogaea, F: fastigiata; SV: semente/vagem; TES: tolerância ao estresse hídrico; TV- tamanho da semente: M- média, G- grande, EG- extra grande

Tabela 2. Primers, seqüências, número de bandas (NB), bandas monomórficas (NBM) e taxa de polimorfismo (TP) nos genótipos interespecíficos de amendoim.

| Primers | Seqüências | NB | NBM | TP (%) |
|---------|-------------------------|----|-----|--------|
| 812 | GAG AGA GAG AGA GAG AA | 10 | 3 | 70 |
| 816 | CAC ACA CAC ACA CAC AT | 9 | 5 | 45 |
| 817 | CAC ACA CAC ACA CAC AA | 9 | 3 | 67 |
| 818 | CAC ACA CAC ACA CAC AG | 14 | 5 | 64 |
| 809 | (AG)8G | 10 | 4 | 60 |
| 836 | AGA GAG AGA GAG AGA GYA | 7 | 2 | 72 |
| 842 | GAG AGA GAG AGA GAG AYG | 12 | 2 | 83 |
| 847 | CAC ACA CAC ACA CAC ARC | 4 | 3 | 15 |
| 815 | CTCTCTCTCTCTCTG | 9 | 3 | 67 |
| 858 | TGT GTG TGT GTG TGT GRT | 9 | 7 | 22 |



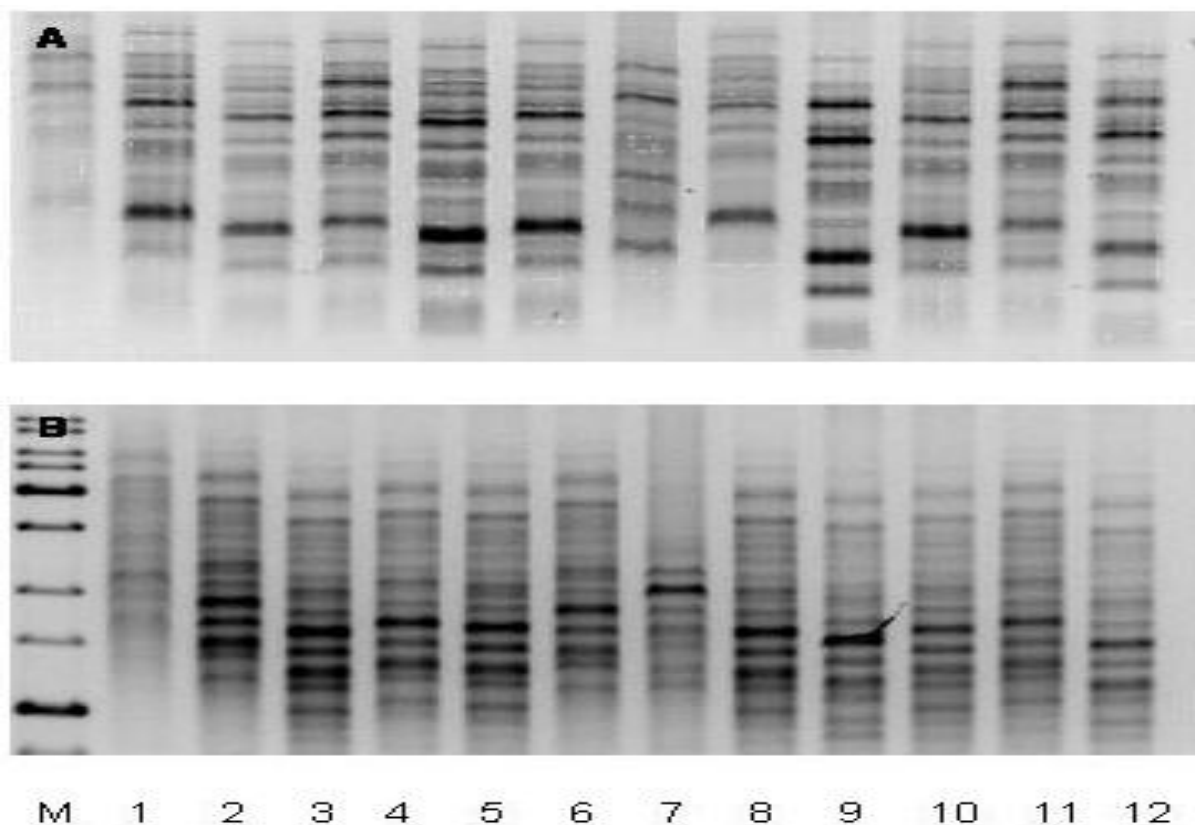


Figura 1. Padrão de bandas obtido com os primers ISSR 812 (A) e 842 (B) em gel agarose, corado com Syber Green (LGC). M- Marcador Ladder 1 Kb. 1- LGoPE-06, 2- CNPA 271 AM, 3- Braço rasteiro, 4- BRS Havana, 5- BR 1, 6- CNPA 283 AM, 7- LViPE-06, 8-CNPA 270 AM, 9-CNPA 280 AM, 10- IAC Caiapó, 11- Florunner, 12- L 7 Bege

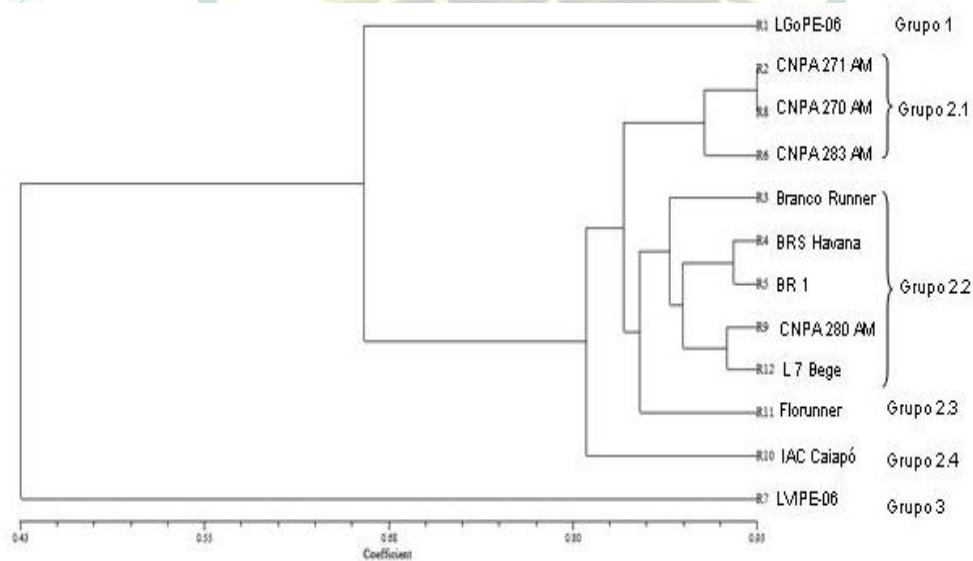


Figura 2. Dendrograma gerado pelo programa NTSYS-PC 2.10 pelo método de clusterização UPGMA baseado nos padrões de bandas geradas via ISSR a partir de genótipos interespecíficos de amendoim.