



CERTIFICAÇÃO MOLECULAR DE HIBRIDAÇÃO INTRAESPECÍFICA EM AMEDOIM FORRAGEIRO POR MEIO DE MARCADORES SSRs.

JAIRE ALVES FERREIRA; MÁRCIA OLIVEIRA DA CUNHA; GISELLE MARIANO LESSA DE ASSIS; TATIANA DE CAMPOS;
EMBRAPA ACRE, RIO BRANCO, AC, BRASIL;
jaire_hp@yahoo.com.br

Resumo: *Arachis pintoi* é uma leguminosa de grande interesse agropecuário devido à alta produção de forragem, capacidade de fixar nitrogênio e boa tolerância ao sombreamento. Através da técnica de hibridação, a variabilidade genética da espécie pode ser utilizada em programas de melhoramento para geração de novos cultivares. A natureza codominante e multialélica dos marcadores microssatélites faz com que estes sejam ideais para o estudo de identificação molecular de cruzamentos. O objetivo desse trabalho foi selecionar um conjunto polimórfico de locos microssatélites para certificar hibridação em cruzamentos de *A. pintoi*. A partir de um conjunto de vinte e um marcadores foi possível selecionar seis locos com adequado padrão de leitura. Estes marcadores foram utilizados na genotipagem de 59 progênies de um cruzamento de amendoim forrageiro a partir de dois acessos selecionados do Banco de Germoplasma da Embrapa Acre. Foi possível identificar sete híbridos. A porcentagem de sucesso da hibridação foi de 11,8%. Os indivíduos híbridos identificados serão utilizados no programa de melhoramento da espécie para o desenvolvimento de cultivares.

Palavras-chave: *Arachis pintoi*, híbridos, microssatélite, genotipagem molecular

Introdução

O *Arachis pintoi* é uma espécie nativa do Cerrado do Brasil. É uma leguminosa perene, que se propaga através de semente, estolão ou coroa com parte da raiz. A espécie é adaptada a solos ácidos e de baixa fertilidade, e possui características como alta produção de forragem de boa qualidade, alta capacidade de fixar nitrogênio e boa tolerância ao sombreamento (ANDRADE & VALETIM, 1999). De acordo com a literatura, as espécies do gênero *Arachis* são autógamas, com fluxo gênico limitado a pequenas populações (OLIVEIRA & VALLS, 2003). O melhoramento genético do amendoim forrageiro se baseia na técnica de hibridação artificial para acessar a variabilidade genética. No entanto, a certificação dos cruzamentos por meio de características morfológicas se torna praticamente impossível devido à limitação dos marcadores fenotípicos. A certificação dos cruzamentos por meio de marcadores microssatélites é extremamente promissora, já que esse tipo de marcador molecular é extremamente polimórfico e caracteriza-se por ser amplamente distribuído no genoma eucariótico



(WEBER & MAY, 1989). O objetivo desse trabalho foi selecionar um conjunto polimórfico de locos microssatélites para certificar a hibridação entre cruzamentos de *A. pinto* realizados no programa de melhoramento da Embrapa Acre.

Material e Métodos

Vinte e um marcadores microssatélites descritos na literatura (PALMIERI *et al.*, 2002; MORETZSOHN *et al.*, 2005) foram testados e otimizados quanto à temperatura de anelamento. Foram utilizados nove genótipos (Ap1, Ap8, Ap53, Ap56, Ap61, Ap64, Ap75, Ap77 e Ar67) avaliados e selecionados a partir do Banco de Germoplasma do Amendoim Forrageiro localizado na Embrapa Acre para a caracterização dos locos. Os locos selecionados foram utilizados para a identificação de hibridação entre dois acessos (Ap77 e Ap8) em uma progênie com 59 indivíduos. A extração do DNA seguiu os procedimentos descritos por Hoisington *et al.* (1994). As reações de amplificação seguiram as seguintes condições: 1 min a 94°C 30 ciclos de [1 min. 94°C, 1 min. a *Ta* específica, 1 min a 72°C], seguidos de 5 min a 72°C. Os produtos de amplificação foram visualizados em agarose (3%) e aplicados em gel de poliacrilamida desnaturante (6%) p/v, usando *ladder* de 10 pb (Invitrogen) como marcador de peso molecular. Em seguida, foi realizada a coloração de nitrato de prata. As estimativas de Conteúdo de Informação de Polimorfismo (PIC), heterozigosidade esperada (H_E) e observada (H_O) foram analisados no *software* TFPGA.

Resultados e Discussão

Dos 21 locos, seis foram selecionados com base no melhor perfil de amplificação e informatividade. A temperatura de anelamento dos locos variou de 45°C a 59°C. Os demais locos obtiveram uma amplificação inespecífica. Desse conjunto, quatro locos foram desenvolvidos com base em seqüências específicas para *A. pinto*, e os outros dois locos são de *A. glabrata* e *A. hypogaea* (Tabela 1). A amplificação de locos por transferibilidade evidencia que a região franqueadora da seqüência microssatélite é conservada entre essas espécies. Os valores de heterozigosidade esperada variaram de 0,767 a 0,883, e os de heterozigosidade observada variaram de 0,719 a 0,828. Os valores de PIC variaram de 0,599 a 0,855. Através dos seis locos SSRs selecionados foi possível identificar híbridos na progênie genotipada. Das 59 progênies analisadas, a hibridação foi positiva para sete

indivíduos, sendo as demais provenientes de autofecundação do acesso utilizado como mãe do cruzamento. Através da variação alélica entre diferentes locos utilizados, foi possível concluir que dos sete indivíduos híbridos, quatro são de geração F₁ e três de geração F₂ (Figura 1). A porcentagem de sucesso da hibridação foi de 11,8%. A baixa taxa de sucesso pode ser explicada pela biologia reprodutiva da planta, predominantemente autógama, dificultando a ocorrência de cruzamentos artificiais.

Tabela 1: Locos microssatélites selecionados no estudo. Ag (*Arachis glabrata*), Ap (*Arachis pintoi*), Ah (*Arachis hypogaea*) Ta (Temperatura de anelamento), H_E (Heterozigosidade esperada), H_O (Heterozigosidade observada) e PIC.

Loco	Motivo	Ta (°C)	H _E	H _O	PIC
Ag140	(GA) ₂₈	45	0,719	0,875	0,681
Ap175	(AG) ₂₂	45	0,633	0,750	0,599
Ap176	(AG) ₁₈	48	0,915	0,864	0,855
Ap152	(AG) ₂₄	45	0,883	0,828	0,809
Ap40	(TC) ₁₇	45	0,836	0,833	0,834
Ah11	(TTA) ₁₅	59,4	0,867	0,833	0,840

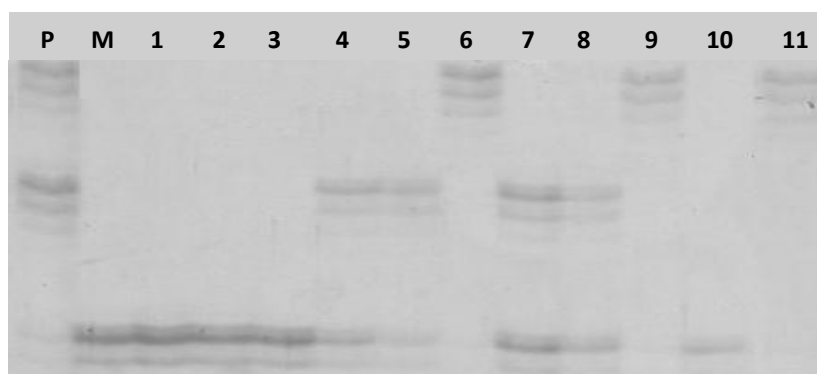


Figura 1. Genotipagem de um cruzamento de amendoim forrageiro com o loco microssatélite Ap152. P: genitor masculino; M: genitor feminino; Filhos 1, 2, 3 e 10: provenientes de autofecundação da mãe; Filhos 4, 5, 7 e 8: híbridos de geração F₁; Filhos 6, 9 e 11 híbridos de geração F₂.

Conclusão

Os locos microssatélites selecionados nesse trabalho serão utilizados em rotina para a identificação molecular de ensaios de hibridação de amendoim forrageiro, certificando os cruzamentos. A baixa taxa de hibridação encontrada no cruzamento estudado está de acordo com a biologia reprodutiva da planta, com baixa taxa de reprodução cruzada. Os sete híbridos identificados



representam novos materiais genéticos com potencial para ser explorado no programa de melhoramento do amendoim forrageiro realizado pela Embrapa Acre.

Agradecimentos

À UNIPASTO pelo financiamento parcial dos trabalhos realizados e ao CNPq pela bolsa concedida.

Referências Bibliográficas

- ANDRADE, C. M. S. & VALETIM, J. F. Adaptação, produtividade e persistência de *Arachis pintoi* submetido a diferentes níveis de sombreamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 28, n.3, p. 439-455, 1999.
- HOISINGTON, D.; KHAIRALLAH, M.; GONZÁLEZ-DE-LEÓN, D (1994). Laboratory protocols: CIMMYT applied molecular genetics laboratory, 2nd edn. CIMMYT, Mexico, DF.
- MORETZSOHN, M. C.; LEOI, L., PROITE, K., GUIMARÃES, P. M., LEAL-BERTIOLI, S. C. M., GIMENES, M. A., MARTINS, W. S., VALLS, J. F. M., GRATTAPAGLIA, D., BERTIOLI, D. J. A microsatellite based, gene-rich linkage map for the AA genome of *Arachis (Fabaceae)*. **Theor Appl Genet**, v. 111, p. 1060-1071, 2005.
- OLIVEIRA, M. A. P. & VALLS, J. F. M. Morphological characterization and reproductive aspects in genetic variability studies of forage peanut. **Scientia Agricola**, v. 60, p. 299-304, 2003.
- PALMIERI D. A.; HOSHINO A. A.; BRAVO J. P.; LOPES C. R.; GIMENES M. A. Isolation and characterization of microsatellite loci from the forage species *Arachis pintoi* (Genus *Arachis*). **Mol Ecol Notes**, v. 2, p. 551-553, 2002.
- WEBER, J. L. & MAY, P. E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the Polymerase Chain Reaction. **American Journal of Human Genetics**, v. 44, n. 3, p. 388-396, 1989.