

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, INOVAÇÃO E TECNOLOGIA
PARA A AMAZÔNIA - CITA**

**Caracterização da diversidade genética de amendoim forrageiro
com marcadores microssatélites**

Hellen Sandra Freires da Silva Azêvedo

RIO BRANCO

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E
PÓS-GRADUAÇÃO
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA,
INOVAÇÃO E TECNOLOGIA PARA A
AMAZÔNIA



**Caracterização da diversidade genética de amendoim forrageiro
com marcadores microssatélites**

Hellen Sandra Freires da Silva Azêvedo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia da Universidade Federal do Acre, como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências**.

Área de Concentração: Ciência e Inovação Tecnológica

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tatiana de Campos

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Giselle Mariano Lessa de Assis

Rio Branco – Acre

Fevereiro 2014

© AZÊVEDO, H. S. F. DA S., 2014.

AZÊVEDO, Hellen Sandra Freires da Silva. **Caracterização da diversidade genética de amendoim forrageiro com marcadores microssatélites**. Rio Branco: UFAC, 2014. 72f.

Ficha catalogafica elaborada pela Biblioteca Central da UFAC.

F818c

Azêvedo, Hellen Sandra Freires da Silva, 1988 -
Caracterização da diversidade genética de amendoim forrageiro
com marcadores microssatélites / Hellen Sandra Freires da Silva
Azêvedo --- Rio Branco : UFAC, 2014.
72f : il. ; 30cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-
Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para Amazônia da
Universidade Federal do Acre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tatiana de campos.

Co-Orientadora: Prof^a Dr^a. Giselle Mariano Lessa de Assis.

Inclui bibliografia

1. *Arachis* - Amendoim. 2. Banco de Germoplasma. 3. Marcadores
Moleculares. Título.

CDD: 635.6596

CDU: 634.58

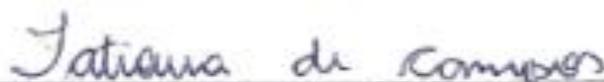
Marcelino G. M. Monteiro – CRB 11^a - 258

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, INOVAÇÃO E TECNOLOGIA PARA A
AMAZÔNIA

Hellen Sandra Freires da Silva Azêvedo

CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE AMENDOIM
FORRAGEIRO COM MARCADORES MICROSSATÉLITES

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 12/02/2014



Prof.^a Dr.^a Tatiana de Campos (Orientadora)
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária



Dr.^a Adna Cristina Barbosa de Sousa
Universidade Federal da Paraíba



Dr. José Francisco Montenegro Valls
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Dr. José Marques Carneiro Júnior
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Ao meu querido amado esposo
JOSÉ MARLO ARAÚJO DE AZEVEDO
pelo carinho, amor, incentivo e
compreensão em todos os momentos.
OFEREÇO

Aos meus queridos pais
JORGE SOUZA DA SILVA,
EDIANA RODRIGUES FREIRES, FRANCISCO EVILASIO DA COSTA
e ao meu amado irmão **PATRIC WILLIAM FREIRES DA SILVA**
que sempre me incentivavam a seguir em busca dos meus sonhos e
estiveram ao meu lado em todos os momentos da minha vida, muito
obrigada pela paciência, amor e carinho.
Amo muito vocês!

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela beleza e sabedoria da vida.

A cada membro da minha grande família que me apoiaram em todos os momentos para a concretização deste trabalho - pais, irmão, avós, tios, primos, sogros, sobrinhos e cunhados.

A meu esposo Marlo Azêvedo pela sua dedicação, competência e vontade em vencer.

À minha orientadora, Dra. Tatiana de Campos, pela sincera amizade, pelos ensinamentos profissionais, éticos e humanos, além da paciente orientação e confiança.

À minha coorientadora Doutora Giselle Mariano Lessa de Assis, pela amizade e disponibilidade em todos os momentos necessários.

À Universidade Federal do Acre - UFAC, especialmente ao Programa de Pós – graduação em Ciência Inovação e Tecnologia para a Amazônia (CITA), pela oportunidade de dar continuidade em minha formação profissional e acadêmica.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, por ter sido minha segunda casa nestes últimos dois anos.

A coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Professor Doutor José Marques Carneiro Júnior pelos valorosos ensinamentos durante a minha formação.

A todos os Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Inovação e Tecnologia para a Amazônia, pela sua contribuição neste percurso, seja nas aulas ou nas rápidas conversas de corredor.

Aos caríssimos amigos: Vanessa Silva, Jaire Alves, Márcia, Márcia Mendonça, Edirlei, Hermeson, Cléia(s), Erlailson, Paula Menezes, Sandy Honorato, Renata Beltrão, Janaína Medeiros, João Ricardo, Jônatas, Rafaela, Sabrina Margarido, Andréa, Josy Assunção, Sâmia, Sirley, Jair Aquino e Karina Martins pela amizade e incentivo durante o curso.

A todas as pessoas que participaram, direta ou indiretamente desta conquista.

MUITO OBRIGADA!

“Só uma sociedade bem informada a respeito da riqueza, do valor e da importância da biodiversidade é capaz de preservá-la”.

WASHINGTON NOVAES

“A variação, sob a forma de diferenças individuais, existe em todas as espécies ou populações”.

Charles Darwin

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a diversidade genética do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de amendoim forrageiro localizado na Embrapa Acre por meio de marcadores microssatélites. Foram analisados 145 acessos pertencentes às espécies (*Arachis pintoii*, *Arachis repens*, *Arachis glabrata* e *Arachis helodes*), híbridos intra e interespecíficos e genótipos de espécies não identificadas. Foram testados 17 microssatélites. Os produtos amplificados foram aplicados em gel de poliacrilamida desnaturante (5%), corados com nitrato de prata. Foram estimados: heterozigosidade observada (H_O) e esperada (H_E), número de alelos por loco, conteúdo de polimorfismo (PIC) e poder de discriminação (DP) dos acessos. Agrupamentos foram realizados pelo método UPGMA e *Neighbor-Joining*. Análises bayesianas e dispersão por coordenadas principais foram também utilizadas. Os acessos da secção *Caulorrhizae* foram utilizados para determinar a coleção nuclear. Dez locos foram polimórficos. Um total de 164 alelos foram observados entre os 145 acessos utilizados. Os valores médios de heterozigosidade observada para todos os acessos, *A. pintoii*, *A. repens* e *A. glabrata* foram de 0,35, 0,33, 0,43 e 0,34, respectivamente. As médias de heterozigosidade esperada com todos os genótipos, *A. pintoii*, *A. repens* e *A. glabrata* foram de 0,73, 0,71, 0,61 e 0,69, respectivamente. Devido à informatividade dos locos, foram observados altos valores de PIC e DP. Verificou-se a eficiência da transferibilidade de marcadores microssatélites para espécies do gênero *Arachis*. O loco Ah6-125, desenvolvido para *A. hypogaea*, apresentou 100% de transferibilidade para as espécies *A. repens* e *A. glabrata* e 98,81% para *A. pintoii*. Os resultados das análises de agrupamentos e dispersão foram consistentes e mostraram a dissimilaridade entre os acessos das secções *Caulorrhizae* e *Rhizomatosae* para a formação de grupos distintos. Entretanto, para *A. pintoii* e *A. repens* não houve um padrão de agrupamento por espécie. A coleção nuclear foi identificada por 41 acessos, sendo 33 de *A. pintoii* e 08 de *A. repens*. Conclui-se que: i) Os dez marcadores microssatélites polimórficos são eficientes para acessar a variabilidade genética presente nos 145 acessos de amendoim forrageiro do Banco Ativo de Germoplasma localizado na Embrapa Acre. ii) Os baixos valores de heterozigosidade observada mostram que os acessos das secções *Caulorrhizae* e *Rhizomatosae* apresentam perfil típico de autógamias. iii) Existe potencial de transferibilidade de marcadores microssatélites desenvolvidos

para *A. pintoi*, *A. glabrata* e *A. hypogaea* para as espécies do gênero *Arachis*. iv) As distâncias genéticas encontradas podem auxiliar na escolha dos acessos a serem realizados nos programas de melhoramento. v) As espécies *A. pintoi* e *A. repens* são muito próximas do ponto de vista genético, não havendo estruturação suficiente para separação das duas espécies. vi) Não foram observadas duplicatas no BAG de amendoim forrageiro.

Palavras-chave: *Arachis*. Banco de Germoplasma. Marcadores Moleculares

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the genetic diversity of forage peanut Active Germplasm Bank of Embrapa Acre by microsatellite markers. It was used 145 accessions comprising *Arachis pintoii*, *Arachis repens*, *Arachis glabrata*, *Arachis helodes*, intra and interspecific hybrids and five accessions without species identified. Seventeen microsatellites were analyzed. The amplification products were genotyping in a denaturing polyacrylamide gel (5%) stained with silver nitrate. The following parameters were estimated: observed (H_O) and expected (H_E) heterozygosity, number of alleles per locus, polymorphism information content (PIC) and discrimination power (DP) of each locus. Groups were performed by UPGMA and Neighbor-Joining method. Bayesian analysis and dispersion principal coordinates were also evaluated. The accessions of *Caulorrhizae* section were used to determine the core collection. Ten loci detected polymorphism and a total of 164 alleles were observed in the genotyping of the 145 accessions. The average values of observed heterozygosity for all accessions, *A. pintoii*, *A. repens* and *A. glabrata* were 0.35, 0.33, 0.43 and 0.34, respectively. The average expected heterozygosity with all genotypes, *A. pintoii*, *A. repens* and *A. glabrata* were 0.73, 0.71, 0.61 and 0.69, respectively. Due to the informativeness of the loci, high values of PIC and PD were observed. We verified the effectiveness of the transferability of microsatellite markers for *Arachis* species. The locus Ah6-125, developed for *A. hypogaea*, showed 100% transferability to *A. repens* and *A. glabrata* species and 98.81% for *A. pintoii*. The results of the analysis of clusters and dispersion were consistent and show the dissimilarity between *Caulorrhizae* and *Rhizomatosae* sections to form distinct groups. However, for *A. pintoii* and *A. repens* there wasn't a pattern of grouping species. The core collection was identified by 41 accessions, from 33 *A. pintoii* and 08 *A. repens*. We have concluded that: i) The ten microsatellite markers are efficient to access genetic variability present in 145 accessions of forage peanut from the Active Germplasm Bank of Embrapa Acre. ii) The low values of observed heterozygosity show that accessions of the sections *Caulorrhizae* and *Rhizomatosae* feature typical genetic profile of an autogamous plant. iii) There is potential for transferability of microsatellite markers developed for *A. pintoii*, *A. glabrata* and *A. hypogaea* amplifying in species from *Arachis* genus. iv) The genetic distances can provide an informative tool to choose crossings in breeding programs v) Species *A.*

pinto and *A. repens* are very close genetically, and then it hasn't enough genetic structuring to separate the two species. vi) No duplicates were observed in peanut forage BAG.

Key-words: *Arachis*. Germplasm Bank. Molecular Markers

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Acessos de <i>Arachis pintoi</i> e <i>Arachis repens</i>	19
Figura 2 -	Acesso de <i>Arachis glabrata</i>	23
Tabela 1 -	Acessos de amendoim forrageiro pertencentes ao banco ativo de germoplasma localizado na Embrapa Acre.....	32
Tabela 2 -	Sequência dos os iniciadores utilizados incluindo a temperatura de anelamento (T_a °C) e amplitude alélica (pb).....	33
Figura 3 -	Perfil do loco Ap176 em gel de poliacrilamida (5%) com 27 acessos de amendoim forrageiro.....	37
Tabela 3 -	Caracterização dos locos utilizados em número de alelos por loco (N); Heterozigosidade esperada (H_E); Heterozigosidade observada (H_O), poder discriminatório (DP) e o conteúdo de polimorfismo (PIC) para os 145 acessos e para as espécies <i>Arachis pintoi</i> , <i>Arachis repens</i> e <i>Arachis glabrata</i>	38
Figura 4 -	Dendrograma com os 145 acessos de amendoim forrageiro obtido pelo método UPGMA, utilizando-se a distância de Nei (1978) com 10 locos microssatélites. As barras laterais são referentes aos agrupamentos obtidos pelo programa STRUCTURE para $K = 2$	43
Figura 5 -	Gráfico de delta (K) com $K=2$, obtido a partir da análise no programa STRUCTURE com aplicação do modelo de Evanno et al. (2005) em 145 acessos de amendoim forrageiro pertencentes ao BAG da Embrapa Acre.....	44
Figura 6 -	Representação dos 145 acessos de amendoim forrageiro de acordo com a análise bayesiana do programa STRUCTURE. Cada indivíduo é representado por uma coluna. Os acessos avaliados foram divididos em 2 grupos ($K=2$): grupo 1 representado pela cor vermelha; grupo 2 representado pela cor verde.....	45
Figura 7 -	Representação gráfica dos 145 acessos de amendoim forrageiro com base na análise de coordenadas principais. As cores estão de acordo com a formação dos grupos gerados pelo programa STRUCTURE, considerando o $K=2$	48

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 8 -	Árvore <i>Neighbor-Joining</i> representando a relação genética entre 145 acessos de amendoim forrageiro. As cores estão de acordo com a formação dos grupos gerados pelo programa STRUCTURE, considerando o $K=2$	49
Figura 9 -	Dendrograma com os 106 acessos de amendoim forrageiro obtido pelo método UPGMA, utilizando-se a distância modificada de Rogers e 10 locos microssatélites. As barras laterais são referentes ao <i>pool</i> gênico determinado pelo programa STRUCTURE para $K=2$..	51
Figura 10 -	Valor de delta (K) com destaque para $(K)=2$ grupos, obtido a partir da análise no programa STRUCTURE com aplicação do modelo de Evanno et al. (2005) em 106 acessos de <i>Arachis pintoi</i> e <i>Arachis repens</i> do BAG da Embrapa Acre.....	52
Figura 11 -	Representação dos 106 acessos da secção <i>Caulorrhizae</i> de acordo com a análise bayesiana do programa STRUCTURE. Os acessos avaliados foram divididos em 2 grupos ($K=2$): grupo 1 representado pela cor vermelha; grupo 2 representado pela cor verde.....	53
Figura 12 -	Representação gráfica dos 106 acessos de <i>Arachis pintoi</i> e <i>Arachis repens</i> com base na Análise de Coordenadas Principais. As cores estão de acordo com a formação dos grupos gerados pelo programa STRUCTURE, considerando o $K=2$	54
Tabela 4 -	Identificação dos acessos de amendoim forrageiro para formação da coleção nuclear do BAG da Embrapa Acre.....	58
Figura 13 -	Número total de acessos e percentagem de alelos incluídos na coleção nuclear de amendoim forrageiro.....	58

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Gênero <i>Arachis</i>	18
2.1.1 Aspectos gerais e taxonômicos.....	18
2.1.2 Secção <i>Caulorrhizae</i>	19
2.1.3 Secção <i>Rhizomatosae</i>	23
2.2 Uso e conservação do germoplasma <i>ex situ</i> em programas de melhoramento	24
2.2.1 Banco de germoplasma do gênero <i>Arachis</i>	26
2.3 Marcadores Moleculares em análise de diversidade genética	27
2.3.1 Marcadores Microsatélites.....	27
2.3.2 Estudos moleculares no gênero <i>Arachis</i>	29
3 MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Material Vegetal.....	32
3.2 Extração de DNA.....	32
3.3 Locos microsatélites.....	32
3.4 Análises Estatísticas.....	35
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 Análise dos Microsatélites.....	38
4.2 Agrupamentos e diversidade genética do BAG de amendoim forrageiro.....	42
4.3 Diversidade genética da secção <i>Caulorrhizae</i>	51
5 CONCLUSÕES	60
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

1. INTRODUÇÃO

O crescimento da agropecuária no Brasil tem apresentado destaque em decorrência de um cenário econômico e de mercado favoráveis nos últimos anos (CLAUDINO et al., 2013). A pecuária brasileira baseia-se no uso de pastagens para a produção de carne e leite, trazendo grandes vantagens competitivas para o sistema nacional de produção. Porém, a perda da capacidade produtiva das pastagens e o impacto sobre o meio ambiente são facilmente detectáveis pelos anos de exploração (BARCELLOS et al., 2008).

Dentre alternativas para recuperar áreas degradadas e para garantir a sustentabilidade dos solos, destaca-se o cultivo de gramíneas consorciadas com leguminosas forrageiras. Esta prática é interessante em sistemas de produção animal a pasto, uma vez que agregam benefícios no processo. Segundo Assis e Valentim (2009a), a recuperação de pastagens degradadas diminui as pressões de desmatamento, reincorpora a terra ao processo produtivo, além de evitar a abertura de novas áreas de floresta.

A utilização de leguminosas forrageiras nos sistemas de produção permite a incorporação do nitrogênio atmosférico ao sistema solo–planta–animal, por meio da simbiose com bactérias do gênero *Rhizobium*. Dessa forma, há elevação do teor de matéria orgânica do solo e de proteína do volumoso oferecido aos animais, diversificação do ecossistema, aumento da produção de forragem, e maior cobertura do solo (MIRANDA et al., 2008).

Entre diversas leguminosas, espécies silvestres do gênero *Arachis* (*Arachis pintoii* Krapov. & W.C. Greg., *Arachis repens* Handro e *Arachis glabrata* Benth.), conhecidas como amendoim forrageiro, destacam-se pela utilização em pastagens consorciadas pela alta rentabilidade nos sistemas de produção e fornecem benefícios ambientais (CARVALHO; PIRES, 2008).

Considerando a importância destas leguminosas e o intuito de conservar a diversidade genética do gênero, a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia estabeleceu um banco de germoplasma com acessos provenientes de diversas regiões brasileiras. Atualmente, há cerca de 150 acessos de amendoim forrageiro da secção *Caulorrhizae*. A Embrapa Acre também tem um Banco Ativo de

Germoplasma (BAG) de amendoim forrageiro e está associado a um programa de melhoramento de *Arachis pintoi* (ASSIS; VALENTIM, 2009a).

A expansão do uso do amendoim forrageiro depende de avanços no conhecimento sobre o seu potencial desempenho em diferentes ambientes e em sistemas de produção pecuários. Adicionalmente, as cultivares existentes da espécie *A. pintoi* disponíveis para o produtor no mercado nacional e internacional descendem de um mesmo acesso. Portanto, o conhecimento da diversidade genética dos acessos pode assessorar programas de melhoramento no desenvolvimento de novas cultivares.

Um banco de germoplasma tem como objetivo principal evitar a perda de alelos, que diminui a variabilidade genética disponível de uma espécie. Para evitar essas perdas são conservados acessos silvestres e domesticados, a fim de representar o patrimônio genético da espécie (BORÉM; MIRANDA, 2009).

A identificação da variabilidade genética dentro de banco de germoplasma é fundamental para um melhor entendimento sobre as relações genéticas entre os acessos. Para isso, a avaliação e a caracterização do germoplasma são atividades primordiais na manutenção e na utilização dos recursos genéticos. Essas informações facilitam o acesso dos pesquisadores a novos conjuntos gênicos, aumentando a eficiência na utilização dos genótipos.

O melhoramento genético de plantas tem gradualmente exigido procedimentos com menores custos, mais rápidos e eficientes para acessar a nível molecular os acessos de interesse. Estudos com marcadores moleculares têm mostrado nos últimos anos grandes descobertas sobre a variabilidade genética de várias culturas (BORÉM; CAIXETA, 2009).

Os marcadores moleculares são ferramentas utilizadas para detectar variações no genoma, possibilitando estimar diversos parâmetros genéticos. Apresentam vantagens sobre os marcadores morfológicos por detectarem o polimorfismo ao nível do genótipo e serem independentes dos efeitos ambientais e do estágio de desenvolvimento da planta (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Estudos com marcadores moleculares detectaram alta variabilidade entre os acessos da secção *Caulorrhizae* com marcadores RAPD (GIMENES et al., 2000; CARVALHO, et al., 2010) e marcadores microssatélites (PALMIERI et al., 2002, 2005, 2010; BRAVO et al., 2006; GIMENES et al., 2007) e entre espécies da secção

Rhizomatosae utilizando microssatélites (ANGELICI et al., 2008). Os locos microssatélites apresentaram elevados índices de polimorfismo e transferibilidade dentro do gênero *Arachis*, o que permite a sua utilização para estudos genéticos inter e intraespecíficos (PALMIERI et al., 2002, 2005; MORETZSOHN et al., 2005; GIMENES et al., 2007).

Os marcadores microssatélites, ou Repetições de Sequências Simples (SSRs - *Simple Sequence Repeats*), têm sido utilizados com sucesso na caracterização da diversidade de plantas (KALIA et al., 2011). São regiões de DNA que consistem em repetições em *tandem* de 1 a 6 nucleotídeos. Estas repetições estão distribuídas por todo o genoma eucarioto e podem ser analisadas através da técnica de PCR (*polymerase chain reaction*). Os marcadores microssatélites revelam polimorfismos individuais, devido à variação no número de repetições de um microssatélite (TAUTZ; RENZ, 1984; SCHLÖTTERER, 2000; VARSHNEY et al., 2002). São codominantes com alto número de alelos e elevada heterozigidade (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; VARSHNEY et al., 2002). Devido ao alto grau de polimorfismo, tornaram-se marcadores ideais para o estudo de diversidade genética de bancos de germoplasma, detectando duplicações, mistura de sementes e cruzamentos não controlados.

Acessar a diversidade genética é extremamente relevante no contexto do conhecimento do gênero *Arachis*, pois permitirá avaliar a variabilidade existente para assessorar programas de melhoramento. O presente estudo teve como objetivo avaliar a diversidade genética do Banco Ativo de Germoplasma de amendoim forrageiro localizado na Embrapa Acre por meio de marcadores microssatélites.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Gênero *Arachis*

2.1.1 Aspectos gerais e taxonômicos

O gênero *Arachis* pertence à família Leguminosae Adans. ou Fabaceae (Judd et al. 2009), subfamília Papilionoideae (Fabaceae *sensu stricto*), tribo Dalbergieae, subtribo Stylosanthinae (LEWIS et al. 2005).

O centro de origem situa-se na Serra do Amambaí, no limite do Mato Grosso do Sul e Paraguai, onde a espécie mais primitiva do gênero, *Arachis guaranitica* Chod. & Hassl. (GREGORY et al., 1980; HAMMONS, 1994) concentra sua ocorrência. O maior número de espécies concentra-se no Brasil, seguido da Bolívia, Paraguai, Argentina e Uruguai (VALLS; SIMPSON, 1995).

De acordo com estudos taxonômicos, o gênero *Arachis* está dividido em nove secções: *Arachis*, *Caulorrhizae*, *Erectoides*, *Extranervosae*, *Heteranthae*, *Procumbentes*, *Rhizomatosae*, *Trirectoides* e *Triseminatae* (KRAPOVICKAS; GREGORY, 1994; VALLS; SIMPSON, 2005). As espécies foram alocadas, nas respectivas secções de acordo com características morfológicas, citogenéticas, distribuição geográfica e padrão de fertilidade de híbridos interespecíficos.

O gênero *Arachis* é composto por espécies herbáceas, anuais ou perenes, rizomatosas ou estoloníferas, diplóides ($2n=2x=20$ ou $2x=18$) ou tetraplóides com $2n=4x=40$ (FERNÁNDEZ; KRAPOVICKAS, 1994; LAVIA, 1998; PEÑALOZA; VALLS, 1999). As secções *Rhizomatosae* e *Arachis* são as que apresentam algumas espécies tetraplóides.

A biologia floral encontrada na maioria das espécies silvestres é considerada favorável à autofecundação, porém a polinização cruzada pode ocorrer pela ação de insetos, principalmente abelhas (SIMPSON et al., 1995). Estudos mostram uma taxa de 10% de polinização cruzada em acessos da secção *Rhizomatosae* (SIMPSON et al., 1995)

O gênero *Arachis* apresenta uma característica exclusiva entre as leguminosas. Há associação de flores aéreas com frutos subterrâneos, e dessa forma, é considerada geocárpica (VALLS; SIMPSON, 1995). Tal característica é a

que mais produz efeito na distribuição geográfica e, conseqüentemente na evolução das espécies do gênero (KRAPOVICKAS; GREGORY, 1994).

O amendoim comum (*A. hypogaea* L.) destaca-se na secção *Arachis*, em função da sua importância econômica e expressão alimentícia. As espécies da secção *Caulorrhizae* (*A. repens* Handro, *A. pintoi* Krapov. & W.C. Greg. e da secção *Rhizomatosae* *A. glabrata* Benth.) apresentam características de interesse agrônomo para utilização forrageira (formação de pastagens), cobertura de pomares, paisagismo e controle da erosão do solo.

2.1.2 Secção *Caulorrhizae*

A secção *Caulorrhizae*, compreende duas espécies endêmicas da flora brasileira: *A. pintoi* e *A. repens* (Figuras 1A e 1B) (VALLS; SIMPSON, 1995).

Essas espécies vêm despertando interesse para uso forrageiro, com destaque para *A. pintoi*, por apresentar vários atributos relacionados à persistência sob pastejo e por ser fonte alimentar para animais no sistema lavoura-pecuária (SILVA et al., 2012). A espécie *A. repens* é usada como planta ornamental e para cobertura do solo.

Fotos: Jônatas Oliveira



Figura 1 - Acessos de *Arachis pintoi* (A) e *Arachis repens* (B).

As espécies pertencentes à secção *Caulorrhizae* são plantas perenes, com hábito de crescimento estolonífero, produzem raízes sem engrossamento, caules

com entrenós ocos, folhas quadrifoliadas, frutos subterrâneos biarticulados e pericarpo liso (KRAPOVICKAS; GREGORY, 1994).

O primeiro acesso de *A. pintoi* (GK 12787) foi coletado por Geraldo Pinto em 1954, junto à foz do rio Jequitinhonha no Estado da Bahia (VALLS, 1992). E o primeiro acesso de *A. repens* (GKP 10538) foi coletado por Otero em 1941, em Jequitaí, no Estado de Minas Gerais (VALLS et al., 1995).

Estudos de diversidade genética com caracteres morfológicos verificaram grande variação fenotípica entre os acessos de amendoim forrageiro. Monçato (1995) verificou que os caracteres com maior variação foram formato e dimensões dos folíolos, densidade e localização de pêlos e cerdas. Os acessos de *A. repens* apresentaram folíolos distais em média de 18,3 mm no comprimento por 8,9 mm de largura, e os folíolos basais com 16,7 mm de comprimento por 7,1 mm de largura, ausência de cerdas, com exceção no pecíolo ou raque. Em acessos de *A. pintoi*, as folhas são de maiores dimensões, os folíolos superiores apresentaram em média, 31,1 mm no comprimento e 19,1 mm na largura, os inferiores 28,8 mm no comprimento e 15,5 mm de largura. Cerdas foram presentes com frequência nas faces basais dos folíolos, entrenós, pecíolos e ráquis. Monçato (1995) concluiu que os genótipos de *A. pintoi* separam-se de *A. repens*, existindo tipos intermediários entre as duas espécies.

Menezes (2011) também identificou folíolos maiores nos acessos de *A. pintoi* e menores em acessos de *A. repens*. Resultados semelhantes foram encontrados por Azevedo et al. (2011) quando avaliaram acessos de *A. repens*, eles verificaram folíolos com menores dimensões.

Assis et al. (2009) encontraram variação para os caracteres densidade e comprimento de pêlos na superfície estigmática em acessos de amendoim forrageiro. Os autores verificaram estigmas com pêlos curtos e de baixa densidade; pêlos curtos e com densidade intermediária; pêlos de comprimento mediano e de densidade intermediária e pêlos de comprimento mediano e de densidade alta. A utilização do método de otimização de Tocher, permitiu a formação de quatro grupos. Três grupos foram formados com acessos de *A. pintoi* e *A. repens* e houve um grupo somente com acessos de *A. pintoi*.

Apesar da importância das características morfológicas nas análises de diversidade, elas apresentam limitações. Em plantas com base genética estreita

como a soja, elas podem não ser suficientes na separação de diferentes genótipos (MULATO, 2010). Sendo assim, a aplicabilidade de caracterização molecular nos acessos de coleções de germoplasma tem permitido maior discriminação dos genótipos.

Estudos com marcadores moleculares também indicam a similaridade entre *A. pinto* e *A. repens*. Uma análise de variação genética com marcador RAPD na secção *Caulorrhizae*, com 52 acessos de *A. pinto* e 12 de *A. repens*, resultou em um dendrograma com a maioria dos acessos de *A. repens* compondo um grupo distinto. Porém, foi detectada alta similaridade entre as duas espécies (GIMENES et al., 2000).

Outro estudo de diversidade genética com 33 acessos de *A. pinto* e 10 de *A. repens* usando marcadores microssatélites, verificou ausência de grupos com a separação dos indivíduos das duas espécies. Mesmo com a utilização de um marcador codominante específico, não foi possível distinguir o *pool* genético primário dessas espécies (PALMIERI et al., 2010).

A diferenciação entre as duas espécies (*A. pinto* e *A. repens*) foi identificada no sistema reprodutivo, pois há esterilidade nos cruzamentos interespecíficos (OLIVEIRA; VALLS, 2003). A morfologia do estigma e o modo de reprodução sugerem possíveis barreiras para a produção de sementes em alguns cruzamentos, reforçando a classificação em espécies distintas.

Existem doze cultivares de *A. pinto* disponíveis no mercado. Seis cultivares são do mesmo genótipo GK 12787 (BRA 013251) coletado em 1954, por Geraldo Pinto. Esse acesso foi lançado em outros países com denominações distintas. Durante os anos de 1987 a 1995 foram lançadas as cultivares Amarillo (Austrália), Maní Forrajero Perenne (Colômbia), Pico Bonito (Honduras), Maní Mejorador (Costa Rica), Maní Forrageiro (Panamá) e Amarillo MG-100 (Brasil). As outras seis cultivares existentes são Porvenir, Golden Glory, Alqueire-1, Belmonte, Itacambira e BRS Mandobi (ARGEL; VILLARREAL, 1998; PAGANELLA; VALLS, 2002; ARAÚJO et al., 2008; ASSIS; VALENTIM, 2009b).

As cultivares mais plantadas atualmente no Brasil são: Amarillo MG-100, Alqueire-1 e Belmonte. A cv. Amarillo MG-100 é bastante persistente sob pastejo e apresenta boa produção de forragem (MS), em torno de 5-8 ton/ha/ano. Devido ao seu potencial forrageiro, vem sendo foco de vários estudos e largamente utilizada

em ecossistemas de diversas regiões do Brasil (ASSIS et al., 2008; FERNANDES et al., 2009; GOBBI et al., 2009).

A cv. Alqueire-1 apresenta produção em torno de 8-10 ton/ha/ano de matéria seca de forragem com valor 23% de proteína bruta e 72% de digestibilidade (NASCIMENTO et al., 2003; GOMES, et al., 2007). A propagação é realizada através de sementes maduras e material vegetativo. Os custos operacionais de colheita oneram o preço da semente no mercado, que resultam comumente no emprego do material vegetativo para o estabelecimento de novas áreas (FISHER; CRUZ, 1995).

A cv. Belmonte foi a primeira cultivar lançada, exclusivamente, para propagação vegetativa (PAGANELLA; VALLS, 2002) através de mudas ou estolões, devido à baixa produção de sementes. Pastagens consorciadas por quatro anos com cv. Belmonte e *Brachiaria humidicola*, apresentaram nos rebanhos ganho de peso vivo de 565 gramas por cabeça ao dia (g/cab/dia), superior aos 444 g/cab/dia na pastagem da gramínea em monocultivo adubada com nitrogênio (VALENTIM et al., 2000).

A cv. BRS Mandobi foi obtida por meio de seleção massal, realizada na Embrapa Acre, a partir da rede de avaliação de acessos de amendoim forrageiro. Foi registrada em 2008 no Registro Nacional de Cultivares do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2011) e protegida em 2011. Uma de suas principais características é a elevada produção de sementes. Nas condições ambientais do Acre, a cultivar produz aproximadamente 3.000 mil kg/ha de sementes após um período de 18 a 21 meses (ASSIS; VALENTIM, 2009a). A cv. BRS Mandobi apresenta também boa produtividade de biomassa aérea, que varia de 9 t/ha a 15 t/ha de matéria seca, 10 meses após o plantio (BALZON et al., 2007; ASSIS et al., 2008). Essa cultivar apresenta elevado vigor vegetativo, bom estabelecimento no pasto, tolerância a solos bem drenados ou de baixa permeabilidade, boa taxa de crescimento foliar e boa disponibilidade de folhas (ASSIS, 2011).

A maioria das cultivares atualmente lançadas são provenientes de ecotipos encontrados na natureza e não do melhoramento propriamente dito. Há cerca de 150 acessos da secção *Caulorrhizae* disponíveis no banco de germoplasma localizado na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia em Brasília – DF. Estes

acessos podem ser usados para estudos de variabilidade genética, ensaio de desempenho agrônomo, caracterização morfológica e cruzamentos intra e interespecíficos em programas de melhoramento.

2.1.3 Secção *Rhizomatosae*

A secção *Rhizomatosae*, é constituída por quatro espécies: *Arachis burkartii* Handro, *A. glabrata* Benth, *A. nítida* Valls & CE Simpson e *A. pseudovillosa* (Chodat & Hassl.) Krapov. & W.C. Greg (FERNÁNDEZ; KRAPOVICKAS, 1994; PEÑALOZA; VALLS, 2005). Apenas a espécie *A. burkartii* é diplóide ($2n=2x=20$), e as demais espécies da secção são tetraplóides ($2n=4x=40$).

A. glabrata é uma das espécies da secção *Rhizomatosae* mais promissora como planta forrageira (Figura 2). Há acessos em bancos de germoplasma em vários países, como Brasil, Colômbia, Índia e EUA. Os estudos realizados com alguns acessos revelam alta diversidade e potencial uso nos programas de melhoramento (NÓBILE et al., 2004; ANGELICI et al., 2008).

Foto: Jônatas Oliveira



Figura 2 - Acesso de *Arachis glabrata*.

Conhecida como amendoim rizoma, é valorizada principalmente no mercado internacional. Segundo Prine et al. (1986) as cultivares da espécie *A. glabrata* foram coletadas próximo a Campo Grande (MS) Brasil. Nos Estados Unidos, as cultivares Florigraze e Arbrook vêm se destacando, pois contêm elevados níveis de proteínas e são resistentes a doenças e pragas (FRENCH et al., 1994). Na Austrália, esta

leguminosa é valorizada por apresentar alta qualidade de forragem e cobertura nos pastos (BOWMAN et al., 1998). Estudos de diversidade genética com acessos desta secção já foram realizados com marcadores isoenzimáticos, RAPD e microssatélites e foram detectados altos níveis de diversidade nos genótipos avaliados (MAASS; OCAMPO, 1995; NÓBILE et al., 2004; ANGELICI et al., 2008).

2.2 Uso e conservação do germoplasma *ex situ* em programas de melhoramento

A grande preocupação de nível mundial em conservar os recursos genéticos surgiu na primeira Conferência Internacional (1961), realizada pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO), cujo tema “Perda de genes causada pela destruição acelerada da vegetação primária e o abandono das variedades primitivas pelo agricultor, devido à pressão das cultivares providas pelo melhoramento genético” (GIACOMETTI; FERREIRA, 1988; BUENO et al., 2006). Desde então, uma série de conferências foram organizadas com o objetivo de traçar estratégias para o manejo e a conservação dos recursos genéticos do mundo.

Uma das primeiras estratégias internacionais foi a criação do *International Board for Plant Genetic Resources* (IBPGR), hoje, *Bioversity International* durante a Conferência Técnica Internacional em Biologia realizada pela FAO, em 1974. Tendo como objetivo a elaboração de metas eficazes para a conservação dos recursos genéticos vegetais, principalmente os utilizados na alimentação e agricultura. A preocupação em conservar esses recursos reflete na sua utilização em longo prazo.

Os recursos genéticos vegetais podem ser entendidos como fonte natural de diversidade biológica e variabilidade genética de plantas, conceituados como materiais genéticos portadores de genes que possuem valor atual ou potencial para a alimentação, agricultura e floresta (SALOMÃO, 2010). O elemento dos recursos genéticos que maneja a variabilidade genética intraespecífica das espécies, com fins de utilização para a pesquisa em melhoramento genético e em biotecnologia, denomina-se “germoplasma” (GOEDERT, 2007). No que se refere à conservação e o uso sustentável desses recursos duas estratégias são possíveis: a conservação *ex situ* e *in situ*.

A conservação *ex situ* é caracterizada pela conservação fora do *habitat* natural das espécies; ao passo que a conservação *in situ* refere-se à conservação no ecossistema e *habitat* natural da espécie. Como exemplo de conservação *ex situ*, podemos citar os bancos de germoplasma, definidos como coleções vivas de todo o patrimônio genético de uma espécie, incluindo acessos silvestres, nativos, cultivares obsoletas ou desenvolvidas pelo melhoramento genético, conservadas para uso imediato ou futuro (BORÉM; MIRANDA, 2009). Dessa maneira, preservação *ex situ* constitui a forma mais importante de conservação das espécies em locais diferentes daqueles aos quais estão adaptadas.

Contudo, para acessar a diversidade genética dentro dos bancos de germoplasma é necessário coletar, avaliar, caracterizar, conservar e documentar para assim assessorar os programas de melhoramento com o germoplasma necessário para o desenvolvimento de novas variedades (GIMENES et al., 2000).

A avaliação e a caracterização do germoplasma são atividades primordiais na manutenção e na utilização dos recursos genéticos de qualquer espécie. Essas atividades, além de proporcionarem melhor conhecimento do germoplasma disponível, geram informações que auxiliam a manutenção e o manejo da coleção, facilitando o acesso dos pesquisadores a novos conjuntos gênicos e aumentando a utilização dos materiais com maior eficiência.

Em meados da década de 70, devido à grande preocupação mundial sobre o aceleramento de perda dos recursos genéticos, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) criou o Centro Nacional de Recursos Genéticos, localizado em Brasília, atualmente, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Os acervos mantidos na unidade representam a diversidade biológica de diferentes grupos de plantas, animais e microrganismos. Esses materiais são provenientes de coleta ou intercâmbio. A rede de bancos e a coleção de base de germoplasma contam com mais de 200 mil acessos conservados em câmara fria, campo, *in vitro* e em casas de vegetação.

A conservação *ex situ* dos recursos genéticos nos bancos de germoplasma é uma atividade que vai além do simples armazenamento. Envolve também estudos minuciosos dos acessos disponíveis no banco, desde o local de coleta, identificação taxonômica, caracterização morfológica e molecular, avaliação agrônômica, monitoramento, à disponibilização do germoplasma e de todas as informações sobre

o acesso analisado. Contudo, conservar espécies de plantas fora do seu *habitat* natural mostra-se uma atividade dinâmica e de alto custo.

2.2.1 Banco de germoplasma do gênero *Arachis*

A conservação da diversidade do gênero *Arachis* em bancos de germoplasma pode ser encontrada em diferentes países: na Índia (ICRISAT), Estados Unidos (USDA-ARS) Texas A & M, Argentina (INTA e IBONE), Bolívia (PROINPA), Brasil (EMBRAPA), Argentina e Colômbia (CIAT).

No Brasil, o banco de germoplasma apresenta mais de 1.280 acessos de espécies do gênero *Arachis* e abrange 74 das 81 espécies descritas do gênero. Das 57 espécies brasileiras de *Arachis*, 56 estão representadas. As outras 23 espécies do gênero estão representadas ao menos por uma amostra.

Devido à intensa demanda por germoplasma e ao interesse no potencial forrageiro de *A. pintoii*, foi criado em 2006 o Banco Ativo de Germoplasma de amendoim forrageiro na Embrapa Acre, Rio Branco (AC). Os acessos deste banco são oriundos, principalmente, do Banco Ativo de Germoplasma de *Arachis*, localizado na Embrapa Recursos Genético e Biotecnologia (ASSIS et al., 2012).

Atualmente, são mantidos 139 acessos pertencentes às espécies *A. pintoii*, *A. repens*, *A. glabrata* e *A. helodes*, além de híbridos intra e interespecíficos. Estudos realizados neste germoplasma mostram alta variabilidade e divergência genética entre os acessos para caracteres morfológicos e agrônômicos (ASSIS et al., 2012).

Deste modo, essas espécies constituem importantes recursos genéticos com potencial e valor econômico. Portanto, a conservação, a utilização e o acesso à variabilidade genética são imprescindíveis para auxiliar o programa de melhoramento do amendoim forrageiro.

2.3 Marcadores moleculares em análise de diversidade genética

A expansão significativa do uso de marcadores moleculares atribui-se à rapidez e a eficiência dos resultados, pois detectam o polimorfismo diretamente ao nível do DNA, sem influência ambiental. Essa característica possibilita aprimorar estudos entre o genótipo e o fenótipo do indivíduo, aumentando a eficiência dos programas de melhoramento.

Atualmente, os marcadores disponíveis são: (a) marcadores de hibridação - *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP, BOTSTEIN et al., 1980); (b) e marcadores à base de PCR - *Random Amplified Polymorphic* (RAPD, WILLIAMS et al., 1990), *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP, VOS et al., 1995), *Simple Sequence Repeats* (SSR, HAMADA et al., 1982; TAUTZ; RENZ, 1984), e *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs, WANG et al., 1998).

A utilização desses marcadores moleculares no melhoramento de plantas é bastante amplo, destacando-se:

- a) Identificação e discriminação de genótipos;
- b) Caracterização da variabilidade genética;
- c) Identificação de origem parental e teste de paternidade;
- d) Identificação e proteção de cultivares;
- e) Certificação de pureza genética;
- f) Caracterização de germoplasma;
- g) Estudos de diversidade e distância genética e;
- h) Identificação e seleção para locos de caracteres quantitativos (QTL's).

2.3.1 Marcadores Microsatélites

Marcadores microsatélites, ou repetições de sequências simples (SSR - *Simple Sequence Repeats*), são regiões de DNA que consistem de repetições em *tandem* de pequenas unidades de 1 a 6 nucleotídeos. Estas repetições estão distribuídas por todo o genoma eucarioto e podem ser analisadas por ampliações utilizando a técnica de PCR. As sequências que flanqueiam um loco microsatélite são conservadas dentro de uma espécie e, muitas vezes, entre espécies do mesmo gênero. Estas sequências flanqueadoras são utilizadas para o desenho de *primers* visando amplificar locos microsatélites.

Os marcadores microssatélites revelam polimorfismos individuais, devido à variação no número de repetições de um microssatélite (TAUTZ; RENZ, 1984; SCHLÖTTERER, 2000; VARSHNEY et al., 2002). Os microssatélites são marcadores codominantes com alto número de alelos e grande heterozigosidade (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; VARSHNEY et al., 2002). Devido ao alto grau de polimorfismo, tornaram-se os marcadores ideais para mapeamento genético, estudos populacionais ou mesmo para seleção assistida em programas de melhoramento genético (CAIXETA et al., 2009).

Em espécies vegetais a presença das repetições (AC)_n e (AG)_n foram descritas pela primeira vez por Condit e Hubbell (1991). A procura por microssatélites em bancos de dados sobre sequências de DNA de espécies de plantas indicaram que a repetição (AC)_n é geralmente menos frequente do que em mamíferos, sendo o motivo (AT)_n o mais encontrado. Segundo Caixeta et al. (2009), a frequência dos microssatélites varia entre espécies tanto em termos de número absoluto de locos quanto na preferência de repetição.

As diferentes repetições de microssatélites encontradas são divididas em: a) repetições perfeitas, quando não apresentam nenhuma interrupção; b) repetições imperfeitas, quando são interrompidas por bases não repetidas; c) repetições simples, quando o microssatélite é formado por apenas uma repetição. As repetições simples e compostas podem ser perfeitas ou imperfeitas; d) repetições compostas, quando duas ou mais repetições de microssatélite estão dispostas adjacentes (TAUTZ; RENZ, 1984; WEBER; MAY 1989).

Apesar da ampla aplicabilidade dos marcadores microssatélites em plantas, seu desenvolvimento permanece como um gargalo para a maioria das espécies, especialmente para aquela com menor valor econômico. A grande limitação deste marcador é a necessidade de serem isolados e desenvolvidos para cada espécie, não sendo possível utilizar a estratégia de desenho de “*primers* universais” (CAIXETA et al., 2009). No entanto, essa desvantagem é compensada pela facilidade, eficiência e ampla potencialidade de pesquisas desenvolvidas após a sua obtenção.

Existem disponíveis aproximadamente 3.000 marcadores microssatélites desenvolvidos para espécies do gênero *Arachis* (HE et al., 2003, 2005; MORETZSOHN et al., 2004, 2005, 2009; BRAVO et al., 2006; BUDIMAN et al.,

2006; MARTINS et al., 2006; GIMENES et al., 2007; PROITE et al., 2007; CUC et al., 2008; GUO et al., 2008; LIANG et al., 2009). No entanto, a maioria dos marcadores desenvolvidos foram para o amendoim comum (*A. hypogaea*), devido à sua utilização e importância econômica. A partir de estudos recentes, 25 locos foram desenvolvidos para *A. pinto* (PALMIERI et al., 2002; 2005; 2010). Estes locos apresentaram elevados índices de polimorfismo e transferibilidade para acessos das espécies *A. repens*, *A. glabrata* e *A. hypogaea*, o que permite sua utilização para estudos genéticos inter e intraespecíficos.

2.3.2 Estudos moleculares no gênero *Arachis*

A variabilidade intraespecífica de genótipos das espécies da seção *Caulorrhizae* e seção *Rhizomatosae* do gênero *Arachis* vem sendo bastante pesquisada, através de estudos com marcadores moleculares do tipo microssatélite e RAPD.

Marcadores RAPD já foram utilizados em acessos da seção *Caulorrhizae* com o objetivo de discriminar as duas espécies da seção. Segundo os autores, a percentagem de fragmentos de amplificação compartilhados entre *A. pinto* e *A. repens* foi muito maior (74% do número total de fragmentos detectados) do que entre as três formas de cultura do *Apium graveolens* que compartilham 68% dos fragmentos de amplificação (YANG; QUIROS, 1993), e entre as quatro espécies do gênero *Hordeum*, que compartilha quatro fragmentos (BUSTOS et al., 1998). A separação de *A. pinto* e *A. repens* em espécies distintas com base em estudos moleculares é ainda discutível (GIMENES et al., 2000).

Nóbile et al. (2004) ao analisarem acessos da seção *Rhizomatosae*, por meio de marcadores RAPD, verificaram que os acessos da espécie diplóide (*A. burkartii*) e tetraplóides (*A. glabrata*, *A. nítida* e *A. pseudovillosa*) foram agrupadas separadamente, sugerindo que os acessos tetraplóides não se originaram a partir da espécie diplóide da mesma seção.

Carvalho et al. (2010) verificaram em um estudo de diversidade genética com 34 acessos de *A. pinto* pertencentes ao germoplasma nos Estados Unidos, utilizando marcadores RAPD, grande variabilidade genética dentro do germoplasma.

Angelici et al. (2008) utilizaram quinze locos microssatélites, sendo de três

diferentes espécies (*A. hypogaea*, *A. pinto* e *A. glabrata*) no estudo de diversidade genética em acessos da secção *Rhizomatosae*. Verificaram que além da reprodutibilidade dos marcadores microssatélites, outra vantagem que eles apresentam é a possibilidade de transferência entre as espécies pertencentes às diferentes secções (*Arachis*, *Caulorrhizae* e *Rhizomatosae*). Segundo os autores, os marcadores microssatélites utilizados permitiram distinguir as espécies da secção *Rhizomatosae* e a existência de alta variabilidade genética entre os acessos estudados.

Estudos de diversidade genética em genótipos do gênero *Arachis* utilizando a transferibilidade de locos entre as espécies permitiram acessar a diversidade molecular do germoplasma existente. Bravo et al. (2006) utilizaram 14 locos das espécies *A. hypogaea*, *A. pinto* e *A. glabrata* para análise genética dentro da secção *Arachis*, verificaram alta variabilidade genética entre os acessos e todos os locos amplificaram as espécies estudadas. Resultado semelhante foi encontrado por Hoshino et al. (2006) no estudo de transferibilidade de locos de *A. hypogaea*, *A. pinto* e *A. glabrata* em 34 acessos das nove secções do gênero. O sucesso na transferibilidade pode ser decorrente da proximidade entre as espécies do gênero *Arachis*.

Gimenes et al. (2007) também detectaram alta transferibilidade de marcadores microssatélites desenvolvidos para *A. hypogaea* e utilizados em *A. pinto*. Palmieri et al. (2010) verificaram que pares de *primers* desenhados a partir de *A. pinto* mostraram total transferibilidade para a espécie *A. repens*. Leite (2008) também verificou a transferibilidade de marcadores microssatélites desenvolvidos para as espécies *A. hypogaea* e *A. glabrata* no estudo com genótipos selecionados de uma população do híbrido intraespecífico (BRA 041122) da espécie *A. pinto*. Os resultados dessas pesquisas confirmam grande variação genética presente nos genótipos de ambas as secções. Isso mostra a necessidade de desenvolver novos trabalhos para conhecer melhor esses e novos acessos do germoplasma de amendoim forrageiro.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

O estudo foi realizado com todos os 145 acessos de amendoim forrageiro pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma localizado na Embrapa Acre (Tabela 1). Os acessos deste banco são conservados em vasos, em estufa agrícola, e no campo, em parcelas de 4 m². O BAG tem atualmente 84 acessos de *A. pintoi* (incluindo as cultivares Amarillo - MG100, Alqueire-1, Belmonte e BRS Mandobi), 23 acessos de *A. repens*, 16 acessos de *A. glabrata* (incluindo as cultivares Florigraze e Arbrook), 1 acesso da espécie *A. helodes*, 17 híbridos interespecíficos e intraespecíficos e 4 acessos ainda sem identificação da espécie.

3.2 Extração de DNA

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%).

3.3 Locos microssatélites

Dezessete marcadores microssatélites descritos na literatura por Palmieri et al. (2002), (2005), (2010), Hoshino et al. (2006), Gimenes et al. (2007) foram testados e otimizados quanto à temperatura de anelamento (Tabela 2). Desse conjunto, quatro locos foram desenvolvidos com base em sequências específicas para *A. hypogaea* (Ah), dez locos para *A. pintoi* (Ap) e três para *A. glabrata* (Ag).

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).

Tabela 1 - Acessos de amendoim forrageiro pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma localizado na Embrapa Acre

*Código dos acessos	BRA	Código dos acessos	BRA	Código dos acessos	BRA	Código dos acessos	BRA	Código dos acessos	BRA
Ap1	014931	Ap61	030384	Ap114	041475	Ar73	040088	ApxAp30	037346
Ap2	037036	Ap62	031526	Ap115	041467	Ar75	037443	ApxAp37	Desconhecido
Ap4	039985	Ap63	040550	Ap116	041424	Ar76	014788	ApxAp56	035025
Ap5	039799	Ap64	013251	Ap118	Desconhecido	Ar78	014770	ApxAp57	039080
Ap13	040894	Ap65	013251	Ap122	038900	Ar79	032361	ApxAp58	039128
Ap14	030333	Ap66	031984	Ap123	030490	Ar81	040185	ApxAp83	Desconhecido
Ap16	039187	Ap68	040193	Ap124	Desconhecido	Ar85	034363	ApxAp86	Desconhecido
Ap17	014991	Ap69	015121	Ap125	036561	Ar90	032492	ApxAr6	035068
Ap18	015083	Ap70	016683	Ap127	032441	Ar105	036862	ApxAr59	035076
Ap19	015253	Ar71	032280	Ap128	015598	Ar106	039179	ApxAr60	038857
Ap21	035114	Ap72	034193	Ap129	Desconhecido	Ar111	042251	AppxAp77	038911
Ap25	032344	Ap74	016357	Ap131	Desconhecido	Ag34	Desconhecido	AppxAp112	038903
Ap26	032409	Ap80	022683	Ap132	042188	Ag36	Desconhecido	Ah96	041131
Ap27	032450	Ap82	031135	Ap134	031577	Ag97	Desconhecido	Ax12	Desconhecido
Ap28	034142	Ap84	036544	Ap138	Desconhecido	Ag98	017531	Ax20	Desconhecido
Ap29	035122	Ap87	034355	Ap140	020401	Ag107	032514	Ax40	Desconhecido
Ap33	031909	Ap88	032433	Ap141	034100	Ag108	037745	Ax117	Desconhecido
Ap35	040223	Ap89	030392	Ap142	030465	Ag119	040126		
Ap38	033481	Ap91	031895	Ap143	Desconhecido	Ag120	Desconhecido		
Ap39	012122	Ap92	030872	Ap144	033375	Ag121	Desconhecido		
Ap41	014982	Ap93	030899	Ap145	030635	Ag126	012084		
Ap42	030325	Ap94	030945	Ar3	033260	Ag130	036331		
Ap43	039195	Ap95	030929	Ar15	029220	Ag133	037826		
Ap44	030601	Ap99	Desconhecido	Ar22	032352	Ag135	034576		
Ap45	030635	Ap100	042242	Ar23	034436	Ag136	020575		
Ap46	031097	Ap101	015121	Ar24	032379	Ag137	035840		
Ap47	031275	Ap102	015580	Ar31	032387	Ag139	037192		
Ap48	031461	Ap103	031143	Ar32	032280	ApxAp7	035017		
Ap49	031828	Ap104	Desconhecido	Ar53	012106	ApxAp 8	035041		
Ap50	034100	Ap109	042170	Ar54	029190	ApxAp 9	035009		
Ap51	039772	Ap110	034347	Ar55	029203	ApxAp10	Desconhecido		
Ap52	040045	Ap113	041483	Ar67	012114	ApxAp11	035033		

*Os códigos Ap (*Arachis pintoï*); Ar (*Arachis repens*); Ag (*Arachis glabrata*); Ah (*Arachis helodes*); ApxAp (*Arachis pintoï* x *Arachis pintoï*); ApxAr (*Arachis pintoï* x *Arachis repens*); AppxAp (*Arachis appressipila* x *Arachis pintoï*); Ax (sem identificação) correspondem às espécies estudadas.

Tabela 2 – Sequência dos iniciadores utilizados incluindo a temperatura de anelamento (Ta °C) e amplitude alélica (pb)

Loco	Sequência do Iniciador (5' - 3')	Ta (°C)	Amplitude Alélica (pb)	Loco	Sequência do Iniciador (5' - 3')	Ta (°C)	Amplitude Alélica (pb)
****Ah6-125	F: TCGTGTCCCGATTGTCC R: CAAACCCAAACACACGTCAC	48,2	170-194	*****Ap164	F: TGGTGAATTGCAGAGAAC R: GATTCAGGCTGCAGATGGAC	50,0	213
****Ah7	F: CAGAGTCGTGATTTGTGCACTG R: ACAGAGTCGGCCGTCAAGTTA	52,1	97-122	*Ap166	F: CGGCAGTCAACGAAGCTAT R: TCGCCAAAGGTTAGATTGC	55,0	200
****Ah21	F: CTTGGAGTGGAGGGATGAAA R: CTCACTCACTCGCACCTAACC	57,3	100-135	*Ap175	F: CCAATAGGCTAATTCAGAAGG R: GCCTTATTTTGC GACTGAGG	55,4	174-230
****Ah282	F: GCCAAACACACCACATTTCA R: GGCTCCAATCCCAAACACTA	55,4	173-202	*Ap176	F: CCAACACAGGGCTTACCAAG R: TCACCGATCCCCTTTTCC	50,0	194-246
***Ap10	F: GAGGGAGTGAGGGGTTTAG R: ATCCCCACCCCTTCTTT	52,0	144	**Ap187	F: TTCGTCATCGTCGTCGTTTC R: GTGGTGATGATGACGCAGAA	55,0	179
*****Ap18	F: TGCAGCCCCTGTATATTCG R: TACACAGCGTAACAACCTTATTTAGTG	52,0	200	***Ag39	F: TGTAGTCAGCTGCTCCAAAA R: ATGAAAGTTCACTTGAGCAAA	52,1	150-190
*****Ap32	F: ATAGGGAGAAGGCAGGGAGA R: GATCATGCTCATCATCAACACC	48,0	150-170	***Ag140	F: TGACCGTTGGGGTTTTG R: CAAACCCAAACACACGTCAC	57,3	164-191
*****Ap45	F: TGTGCACACTCAGACTCAACA R: TTTAGCCTAGAGCCGAATTCAC	50,0	185	***Ag171	F: TGACCGTTGGGGTTTTG R: CAAACCCAAACACACGTCAC	48,2	164-196
*Ap152	F: AGAGGATGCAGCGAGTAGA R: CTGGCCAATTCCTATGATCG	58,5	259-322				

*PALMIERI et al. (2002); **PALMIERI et al. (2005); ***HOSHINO et al. (2006); ****GIMENES et al. (2007); e *****PALMIERI et al. (2010) Sequências específicas para *Arachis hypogaea* (Ah), *Arachis pintoi* (Ap) e *Arachis glabrata* (Ag)

As amplificações foram realizadas em termociclador (Analitikjena). 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 (Tabela 2) por 1 minuto a 72 °C, e uma fase final de extensão de 72 °C por 5 minutos. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose (3%).

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

3.4 Análises estatísticas

A análise dos dados foi realizada considerando-se os 145 acessos do banco de germoplasma e por espécie (*A. pintoii*, *A. repens* e *A. glabrata*). Foram estimados os seguintes parâmetros de diversidade genética: Heterozigosidade Observada (H_O), Heterozigosidade Esperada (H_E), Número de Alelos (N) por Loco e o Conteúdo de Polimorfismo (PIC) pelo programa *Tools for Population Genetic Analyses* - TFPGA versão 1.3 (MILLER, 1997). O número médio de alelos por loco foi obtido pela divisão do número total de alelos pelo número total de locos.

Valores do conteúdo de polimorfismo (PIC) foram calculados estimando a informatividade do marcador de acordo com a equação de Botstein et al. (1980):

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n f_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2f_i^2 f_j^2$$

onde f_i é a frequência do i -ésimo alelo, f_j é a frequência do j -ésimo alelo e a soma se estende ao longo de n alelos. Para comparar a eficiência dos marcadores na identificação de variedades, poder de discriminação (DP) foi estimado para cada loco baseando-se na fórmula,

$$D_k = 1 - \sum_{j=1}^l P_j \frac{Np_j - 1}{N - 1}$$

onde N é o número de indivíduos e p_j é a frequência do j -ésimo padrão (TESSIER et al., 1999).

A análise com os 145 acessos inclui genótipos poliplóides de *A. glabrata*. Assim, a genotipagem foi feita com base na presença (1) e ausência (0) de bandas, gerando uma matriz binária. As distâncias genéticas foram calculadas utilizando-se a distância de Nei (1978) obtida pelo programa TFPGA versão 1.3 (MILLER, 1997) e usada na construção de dendrograma no programa NTSYS versão 2.1 (ROHLF, 1993), pelo critério de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with na Arithmetic Mean*). A consistência dos agrupamentos foi testada pelo procedimento de reamostragem utilizando 10.000 *bootstraps*, com auxílio do *software* BOOD (COELHO, 2002).

A consistência do dendrograma foi avaliada pela correlação cofenética entre as distâncias representadas pelo dendrograma e as distâncias genéticas originais entre os pares de acesso. A significância dessa correlação foi testada pelo teste de Z de Mantel, utilizando-se 10.000 permutações aleatórias.

Para verificar a organização genética desta coleção foi empregado o método bayesiano do *software* STRUCTURE versão 2.3 (PRITCHARD et al., 2000). Essa análise considera a separação do número total de indivíduos analisados em agrupamentos (*clusters*), atribuindo-lhes um valor K que representa o número de *pools* gênicos diferentes, assumindo equilíbrio de Hardy-Weinberg e ausência de desequilíbrio de ligação entre os locos analisados dentro de cada população. Dessa forma, são definidos os agrupamentos de indivíduos que compartilham o mesmo *pool* gênico, sem a necessidade da informação prévia sobre sua origem.

O programa foi executado com número de total dos acessos estabelecidos, com K variando de 1 a 12. Foram executadas cinco simulações independentes para cada K, usando o modelo “admixture”, frequências alélicas independentes, 10.000 *burn-in* e 10.000 de MCMC (*Markov Chain Monte Carlo*). A determinação do número K mais provável foi realizada utilizando valores de ΔK segundo Evanno et al. (2005), pelo aplicativo Structure Harvester v. 0.6.5 (EARL, 2012). A atribuição dos acessos dentro dos grupos foi realizada de acordo com a probabilidade de cada indivíduo pertencer a cada um dos grupos.

A relação entre os acessos foi verificada pela Análise de Coordenadas Principais (PC_oA), utilizando a mesma matriz de distância genética de Nei (1978) obtida pelo programa TFPGA, no *software* Darwin versão 5.0.158 (PERRIER; JACQUEMOUND - COLLET, 2006). A análise de *cluster* foi realizada usando o método de *Neighbor-Joining* (NJ).

A fim de verificar a variação dentro da secção *Caulorrhizae* e auxiliar o programa de melhoramento de amendoim forrageiro da Embrapa Acre, os dados de *A. pinto* e *A. repens* foram analisados separadamente como dados codominantes para todas as análises citadas. As distâncias genéticas foram calculadas utilizando a distância modificada de Rogers (1978) (GOODMAN; STUBER, 1983). O *software* CoreFinder 1.0 (POLICRITI; SGARRO, 2011) foi utilizado para determinar a coleção nuclear.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise dos Microssatélites

Dentre os 17 microssatélites testados, 10 locos (58,8%) detectaram polimorfismo e produziram bandas definidas (Figura 3 e Tabela 3). Os demais locos foram monomórficos ou inespecíficos (41,2%), com o mesmo perfil apresentado em estudos anteriores (HOSHINO et al., 2006; ANGELICI et al., 2008; PALMIERI et al., 2010).

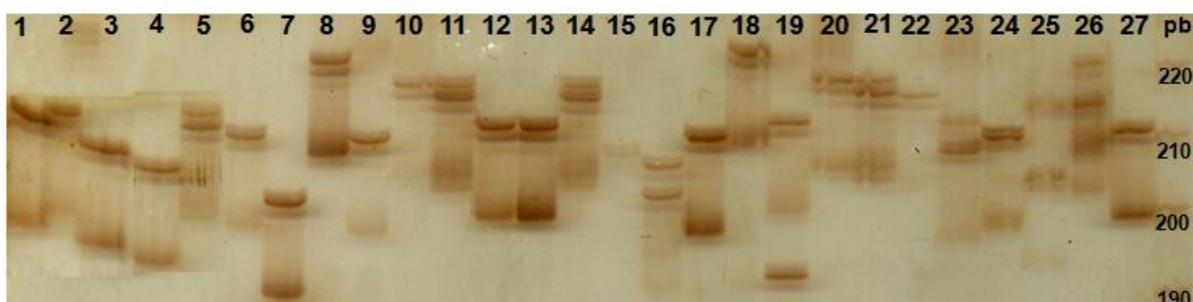


Figura 3 – Perfil do loco Ap176 em gel de poliácridamida (5%) com 27 acessos de amendoim forrageiro.

Na análise com todos os acessos do BAG, observou-se um total de 164 alelos, com fragmentos que variaram de 97 pb (Ah7) a 322 pb (Ap152), conforme Tabela 2. O número de alelos variou de 11 (Ag140) a 25 (Ap175 e Ag39), com uma média de 16,4 alelos por loco (Tabela 3). Na análise por espécie, foram observados 129 alelos nos acessos de *A. pintoi*, 81 em *A. repens* e 77 em *A. glabrata*. O menor número de alelos encontrado para *A. glabrata* pode ser decorrente da genotipagem de apenas 16 acessos da espécie.

Palmieri et al. (2010) utilizaram 20 locos microssatélites e encontraram 196 alelos em 33 acessos de *A. pintoi* e 10 de *A. repens*, com média de 9,8 alelos por loco. Angelici et al. (2008) encontraram um total de 249 alelos, utilizando 15 locos e 77 acessos da secção *Rhizomatosae*. O maior número de alelos encontrados por esses autores pode estar relacionado ao maior número de locos utilizados.

Tabela 3 - Caracterização dos locos utilizados em número de alelos por loco (N); Heterozigosidade esperada (H_E); Heterozigosidade observada (H_O), poder discriminatório (DP) e o conteúdo de polimorfismo (PIC) para os 145 acessos e para as espécies *Arachis pintoi*, *Arachis repens* e *Arachis glabrata*

Loco	Total de acessos (145)*					<i>Arachis pintoi</i> (84)*					<i>Arachis repens</i> (22)*					<i>Arachis glabrata</i> (16)*				
	N	H_E	H_O	PIC	DP	N	H_E	H_O	PIC	DP	N	H_E	H_O	PIC	DP	N	H_E	H_O	PIC	DP
Ah6-125	13	0,37	0,26	0,37	0,55	12	0,33	0,27	0,33	0,51	3	0,23	0,25	0,22	0,41	4	0,74	0,31	0,71	0,91
Ah7	16	0,79	0,30	0,79	0,88	14	0,75	0,26	0,74	0,80	7	0,74	0,42	0,72	0,86	10	0,87	0,25	0,84	0,93
Ah 21	14	0,85	0,27	0,84	0,93	12	0,84	0,30	0,84	0,92	8	0,73	0,17	0,71	0,81	8	0,73	0,19	0,71	0,99
Ah282	12	0,78	0,82	0,78	0,87	11	0,76	0,80	0,76	0,84	6	0,76	1,00	0,74	0,76	10	0,82	0,56	0,79	0,97
Ap 152	16	0,90	0,43	0,89	0,97	11	0,89	0,41	0,89	0,96	8	0,84	0,58	0,82	0,95	9	0,80	0,56	0,78	0,85
Ap 175	25	0,86	0,42	0,85	0,95	23	0,89	0,46	0,88	0,97	12	0,56	0,33	0,54	0,67	6	0,51	0,25	0,5	0,99
Ap 176	18	0,90	0,35	0,90	0,95	16	0,88	0,30	0,88	0,94	12	0,91	0,75	0,89	0,96	3	0,33	0,19	0,32	0,34
Ag39	25	0,92	0,35	0,92	0,99	22	0,92	0,27	0,92	0,98	17	0,94	0,63	0,92	0,96	11	0,74	0,44	0,72	0,99
Ag140	11	0,51	0,12	0,51	0,58	3	0,45	0,07	0,44	0,52	4	0,23	0,08	0,23	0,31	9	0,84	0,5	0,82	0,99
Ag171	14	0,47	0,13	0,47	0,57	5	0,39	0,12	0,39	0,49	4	0,16	0,08	0,16	0,24	7	0,52	0,19	0,5	0,99
Total	164					129					81					77				
Média	16,4	0,73	0,35	0,73	0,82	12,9	0,71	0,33	0,71	0,79	8,1	0,61	0,43	0,60	0,69	7,7	0,69	0,34	0,67	0,90

*número de acessos utilizados para cada análise.

Verificou-se variação no nível de polimorfismo entre os locos polimórficos. Os valores de PIC variaram de 0,37 (Ah6-125) a 0,92 (Ag39), com um valor médio de 0,73 considerando os dez locos e os 145 acessos do BAG (Tabela 3). Os valores médios de PIC para os acessos de *A. pintoii*, *A. repens* e *A. glabrata* foram 0,71, 0,60 e 0,67, respectivamente. Do total de dez locos utilizados, oito locos apresentaram valores de PIC superiores a 0,5. Segundo a classificação definida por Botstein et al. (1980), marcadores com valores de PIC superiores a 0,5 são considerados altamente informativos.

As sequências microssatélites estão presentes tanto em regiões codificantes como não codificantes e podem ser encontradas no genoma nuclear ou de organelas (TÓTH et al., 2000; LI et al., 2002; MORGANTE et al., 2002). O loco Ap176 foi altamente informativo e apresentou 92% de identidade e 90% de similaridade com uma sequência (GW937987.1) de mRNA isolada de uma biblioteca de cDNA de raiz de *A. duranensis*. Anteriormente, Palmieri et al. (2010) verificaram que o loco Ap176 apresentou similaridade para a enzima lipoxigenase (41% de identidade, 47% de similaridade). Assim, o loco está intimamente relacionado com a expressão de genes e pode ser classificado como um marcador funcional informativo.

Dentre os locos polimórficos, o loco Ag39 destacou-se por apresentar o maior valor de PIC quando analisado em todos os acessos, em *A. pintoii* e *A. repens*. A sequência que deu origem ao marcador foi desenvolvida a partir de *A. glabrata* e apresenta 100% de similaridade e 94% de identidade com uma sequência de *A. hypogaea* (DQ099178.1), depositada no GenBank no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Na análise de *Blast*, observou-se que as regiões flangeadoras da repetição microssatélite são conservadas e há variação no motivo repetido.

A conservação de sítios microssatélites entre espécies ou mesmo entre gêneros torna possível a utilização de marcadores entre espécies relacionadas. Essa característica de transferibilidade é condicionada por homologia de sequências de DNA entre espécies relacionadas. No presente estudo, verificou-se que independentemente da espécie (*A. hypogaea*, *A. glabrata* ou *A. pintoii*) a partir da qual o loco foi desenvolvido, todos os locos utilizados foram amplificados nas diferentes espécies estudadas.

O loco que apresentou a menor transferibilidade foi desenvolvido para *A. hypogaea* (Ah21) e apresentou 81,81% de amplificação nos acessos de *A. repens*. Os locos Ah282, Ah6-125, Ah7 e Ag39 apresentaram 100% de transferibilidade para os acessos de *A. repens*. Para a espécie *A. glabrata*, a menor taxa de amplificação (93,75%) foi verificada nos locos Ah21 e Ap175, e ainda, 100% de transferibilidade para os locos Ah282, Ah7, Ap152, Ah6-125 e Ap176. Nos acessos de *A. pintoii*, a menor taxa de amplificação heteróloga (82,14%) entre os genótipos foi verificada no loco Ag39, e a maior (98,81%) foi verificada nos locos Ah6-125 e Ah7. Esses resultados comprovam a eficiência da transferibilidade de marcadores microssatélites em espécies do mesmo gênero.

Leite (2008) verificou que o loco Ah7 desenvolvido para *A. hypogaea* e os locos Ag39, Ag140 e Ag171 desenvolvidos para *A. glabrata* apresentaram transferibilidade para a espécie *A. pintoii*. O estudo realizado por Koppolu et al. (2010), com 101 marcadores microssatélites, desenvolvidos a partir de sequências de *A. hypogaea*, detectaram uma taxa de transferibilidade para a secção *Arachis* de 81% e cinco marcadores mostraram 100% de taxa de amplificação.

Os valores de DP para todos os acessos do BAG variaram de 0,55 a 0,99, com uma média de 0,82 (Tabela 3). Para os acessos das espécies *A. pintoii*, *A. repens* e *A. glabrata*, os valores de DP variaram de 0,49 a 0,98, 0,24 a 0,95 e 0,34 a 0,99, respectivamente, com os valores médios de 0,79, 0,69 e 0,90, respectivamente. Verificou-se que os valores encontrados para DP para a maioria dos locos foram altos, demonstrando assim, o grau de informatividade destes locos e seu potencial para a análise de diversidade genética.

As heterozigosidades esperadas foram altas para a maioria dos locos, e variaram de 0,37 a 0,92, considerando todos os acessos. As médias de heterozigosidade esperada com todos os genótipos, *A. pintoii*, *A. repens* e *A. glabrata* foram de 0,73, 0,71, 0,61 e 0,69, respectivamente, e foram moderadamente altas. Os valores médios de heterozigosidade observada (H_o) para todos os acessos, *A. pintoii*, *A. repens* e *A. glabrata* foram de 0,35, 0,33, 0,43 e 0,34, respectivamente. Os baixos valores de heterozigosidade observada eram esperados, pois o gênero *Arachis* é citado como autógamo, com pequenas populações limitando a troca de material genético entre as espécies (KRAPOVICKAS; GREGORY, 1994). Baixos valores de heterozigosidade observada

foram também detectados em outros trabalhos com espécies do gênero *Arachis* (BRAVO et al., 2006; HOSHINO et al., 2006).

Somente o loco Ah282 apresentou o valor de heterozigosidade observada maior que a esperada para os 145 acessos, e para os acessos de *A. pintoii* e *A. repens*. Tal fato pode ser resultado da ocorrência de cruzamentos entre diferentes acessos no *habitat* natural antes da coleta e a heterozigosidade foi posteriormente mantida devido à propagação vegetativa na conservação dos acessos em campo. Valores de heterozigosidade observada maiores que a esperada também foram verificados em estudos de diversidade genética na secção *Caulorrhizae* (PALMIERI et al., 2005, 2010).

4.2 Agrupamentos e diversidade genética do BAG de amendoim forrageiro

Com base na distância genética de Nei (1978) os acessos foram agrupados pelo método UPGMA (Figura 4). A menor distância (0,0062) foi observada entre os acessos Ar105 e Ar106 e a maior (0,2918) entre os acessos Ag126 e ApxAr6. Os baixos valores de distâncias genéticas mostram alta similaridade entre os acessos do BAG, porém sem acessos em duplicata.

Os baixos valores de distância genética em acessos de amendoim foram relatados em outros estudos. Palmieri et al. (2010) verificaram distâncias genéticas variando de 0,064 a 0,566. Shoba et al. (2010) identificaram em um estudo com amendoim comum (*A. hypogaea*) com marcadores microssatélites distâncias genéticas de 0,0 a 0,46.

No agrupamento pelo método UPGMA realizou-se um corte de forma subjetiva considerando uma distância genética de 0,135 conforme a Figura 4. Analisando os diferentes grupos formados verificou-se que não houve um padrão de agrupamento por espécie. Entretanto, foi possível observar um grupo maior com a secção *Caulorrhizae*. O primeiro grupo foi formado por 126 acessos, sendo 84 acessos de *A. pintoii*, 21 de *A. repens*, 12 híbridos intraespecíficos de *A. pintoii* (ApxAp), dois híbridos interespecíficos de *A. pintoii* com *A. repens* (ApxAr), dois híbridos interespecíficos de *A. pintoii* com *A. appressipila* (AppxAp), um acesso da espécie *A. helodes* e quatro acessos com espécies não identificadas.

O segundo grupo foi formado por apenas um acesso de *A. repens* (Ar32). O terceiro grupo foi formado por dois acessos (Ag130 e Ag139) de *A. glabrata*. O quarto grupo foi formado por apenas um híbrido interespecífico de *A. pintoii* x *A. repens* (ApxAr6). O quinto grupo foi formado por seis acessos, sendo cinco da espécie *A. glabrata* e um acesso de espécie não identificada (Ax117).

O sexto e sétimo grupos foram formados por apenas um acesso cada, sendo o Ag36 e Ag97, respectivamente. O oitavo grupo foi formado por dois acessos Ag119 e Ag120. O nono grupo foi formado somente pelo acesso Ag34. O décimo grupo foi formado por dois acessos, sendo eles o Ag136 e Ag133. O décimo primeiro e décimo segundo grupos foram formados por apenas um acesso cada, sendo Ag107 e Ag126, respectivamente.

Segundo Menezes (2012), a ocorrência de grupos com apenas um genótipo evidencia a ampla diversidade, já que os genótipos em grupos unitários são mais dissimilares em relação ao conjunto.

Não houve um padrão de agrupamento nas espécies *A. pintoii* e *A. repens*. No entanto, mesmo ocorrendo a formação de grupo com ambas as espécies observa-se que existem subgrupos. É possível observar a formação de subgrupos com apenas acessos de *A. pintoii* ou de acessos de *A. repens*. Já os acessos de *A. glabrata* apresentaram diversidade suficiente para formar grupos isolados, não havendo a formação de grupos com a presença das espécies *A. pintoii*, *A. repens* e *A. glabrata*. Verificou-se também que alguns acessos de *A. glabrata* eram tão dissimilares que formaram grupos isolados.

A partir da análise do dendrograma é possível obter uma visão geral da diversidade genética dos 145 acessos do banco ativo de germoplasma de amendoim forrageiro localizado na Embrapa Acre. Os marcadores microssatélites utilizados foram eficientes na discriminação dos acessos em estudo.

A dissimilaridade entre os acessos das secções *Caulorrhizae* e *Rhizomatosae* para a formação de grupos distintos corrobora estudos anteriores. O estudo realizado por Krapovickas e Gregory (1994) sobre a divisão taxonômica do gênero *Arachis* em secções, verificaram que os acessos pertencentes a cada secção foram determinados com base nas relações filogenéticas, similaridade morfológica, compatibilidade de cruzamentos interespecíficos, número e morfologia cromossômica.

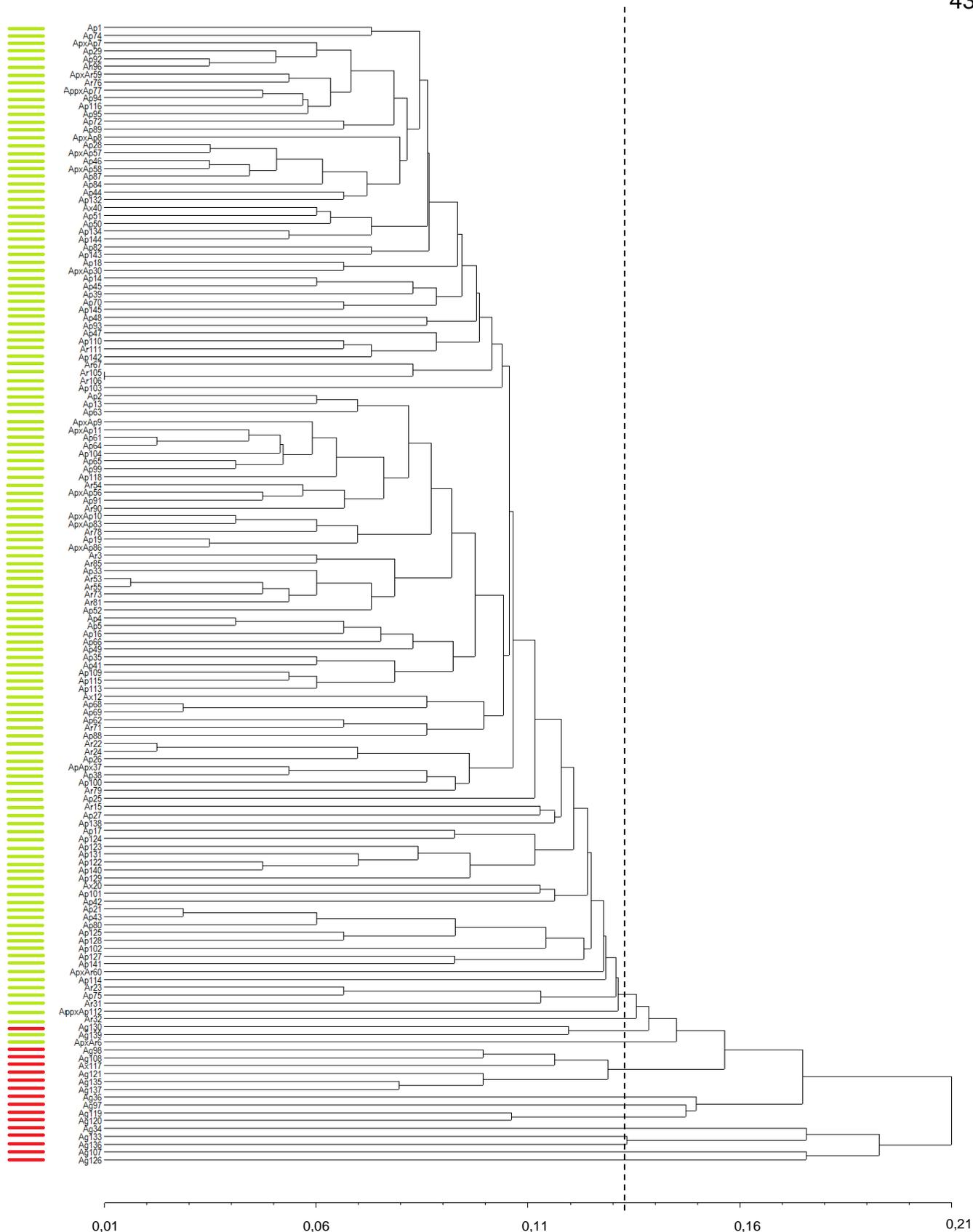


Figura 4 – Dendrograma com os 145 acessos de amendoim forrageiro obtido pelo método UPGMA, utilizando-se a distância de Nei (1978) com 10 locos microssatélites. As barras laterais são referentes aos agrupamentos obtidos pelo programa STRUCTURE para K = 2.

Do ponto de vista citogenético, a principal diferença observada está relacionada ao número de cromossomos. A secção *Caulorrhizae* apresenta o número de cromossomo de $2n=20$ (diplóides) e a secção *Rhizomatosae* de $2n=40$ (tetraplóides) para a espécie *A. glabrata* (FERNÁNDEZ; KRAPOVICKAS, 1994, LAVIA, 1998, PEÑALOZA; VALLS, 1999; PENÁLOZA, 2005).

Gimenes et al. (2002) utilizaram alguns acessos de várias secções do gênero *Arachis* e marcadores AFLP. Os acessos de *A. pintoi* e *A. repens* (*Caulorrhizae*) ficaram no mesmo grupo e o acesso da espécie *A. glabrata* da secção *Rhizomatosae* ficou em grupo separado, evidenciando a dissimilaridade entre estas secções.

O coeficiente de correlação cofenética (r_{cof}) entre a matriz de distância original e a matriz cofenética foi de (0,85), evidenciando que o dendrograma forneceu alta representação das relações genéticas expressadas pelas distâncias genéticas obtidas para o conjunto original dos dados.

Na análise bayesiana implementada pelo programa STRUCTURE verificou-se que o maior valor de delta K foi para $K=2$ (Figura 5), evidenciando a diferenciação genética dos 145 acessos de amendoim forrageiro em dois grupos distintos (Figura 6).

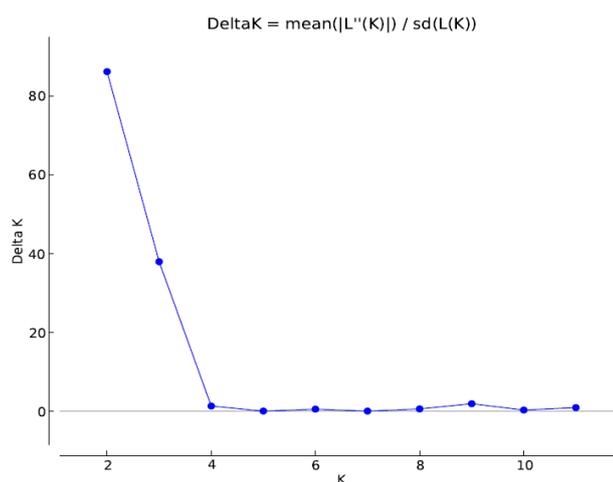


Figura 5 – Gráfico de delta (K) com $K=2$, obtido a partir da análise no programa STRUCTURE com aplicação do modelo de Evanno et al. (2005) em 145 acessos de amendoim forrageiro pertencentes ao BAG da Embrapa Acre.



Figura 6 – Representação dos 145 acessos de amendoim forrageiro de acordo com a análise bayesiana do programa STRUCTURE. Cada indivíduo é representado por uma coluna. Os acessos avaliados foram divididos em 2 grupos (K=2): grupo 1 representado pela cor vermelha; grupo 2 representado pela cor verde.

Comparando os dados da análise bayesiana determinada pelo STRUCTURE com o agrupamento UPGMA, é possível notar que houve grande correspondência entre os grupos formados. Os dois agrupamentos encontrados correspondem também às secções *Rhizomatosae* (representado pela cor vermelha) e *Caulorrhizae* (representado pela cor verde).

O acesso de espécie não identificada (Ax117) foi alocado no *pool* gênico representado em vermelho junto com os acessos da espécie *A. glabrata*. No dendrograma (Figura 4), este acesso também agrupou com acessos de *A. glabrata*. A partir de uma breve caracterização morfológica no BAG, observou-se que este acesso apresenta características morfológicas semelhantes à espécie *A. glabrata* (formato dos folíolos e crescimento por rizoma), o que pode ser um indicativo para posteriormente classificar sua espécie. Vale salientar que deve-se fazer estudo detalhado visando a classificação correta deste acesso a nível de espécie.

O *pool* gênico representado pela cor verde (Figura 6) agrupou 84 acessos de *A. pintoii*, 22 *A. repens*, 12 híbridos intraespecíficos e quatro híbridos interespecíficos, um acesso de *A. helodes*, um acesso de *A. glabrata* e quatro acessos com espécies não identificadas. Este *pool* foi correspondente ao grupo 1 do dendrograma, com exceção do acesso Ag139. Este acesso é intermediário e compartilha a mistura dos dois *pools* (Figura 6). No grupo representado pela cor vermelha existem todos os acessos da espécie *A. glabrata*.

A análise de Coordenadas Principais - PCoA mostrou a associação entre os acessos de forma multidimensional e evidenciou a formação de nove grupos (Figura 7). As duas primeiras coordenadas principais representaram 19,55% da variação encontrada.

Pela dispersão gráfica da análise de Coordenadas Principais e *Neighbor-Joining* - NJ (Figura 8) verificou-se que os acessos de *A. glabrata* identificados pela cor vermelha apresentaram-se muito divergentes em relação aos demais acessos. Esses resultados corroboram os grupos formados pelo dendrograma obtido pelo método UPGMA, onde os acessos de *A. glabrata* formaram grupos isolados e evidenciaram a dissimilaridade em relação aos demais acessos das outras espécies. O maior grupo formado nas análises de NJ e PCoA correspondeu ao grupo 1 formado no dendrograma.

Com base nos diferentes métodos estatísticos utilizados, verificou-se que o acesso (Ar32) e o híbrido interespecífico de *A. pintoii* e *A. repens* (ApxAr6) apresentaram alta dissimilaridade em relação aos demais acessos da secção *Caulorrhizae*. No dendrograma esses acessos formaram grupos isolados. E na análise NJ verificou-se que os acessos (Ar32) e (ApxAr6) apresentaram maior distância genética em relação aos demais acessos da secção.

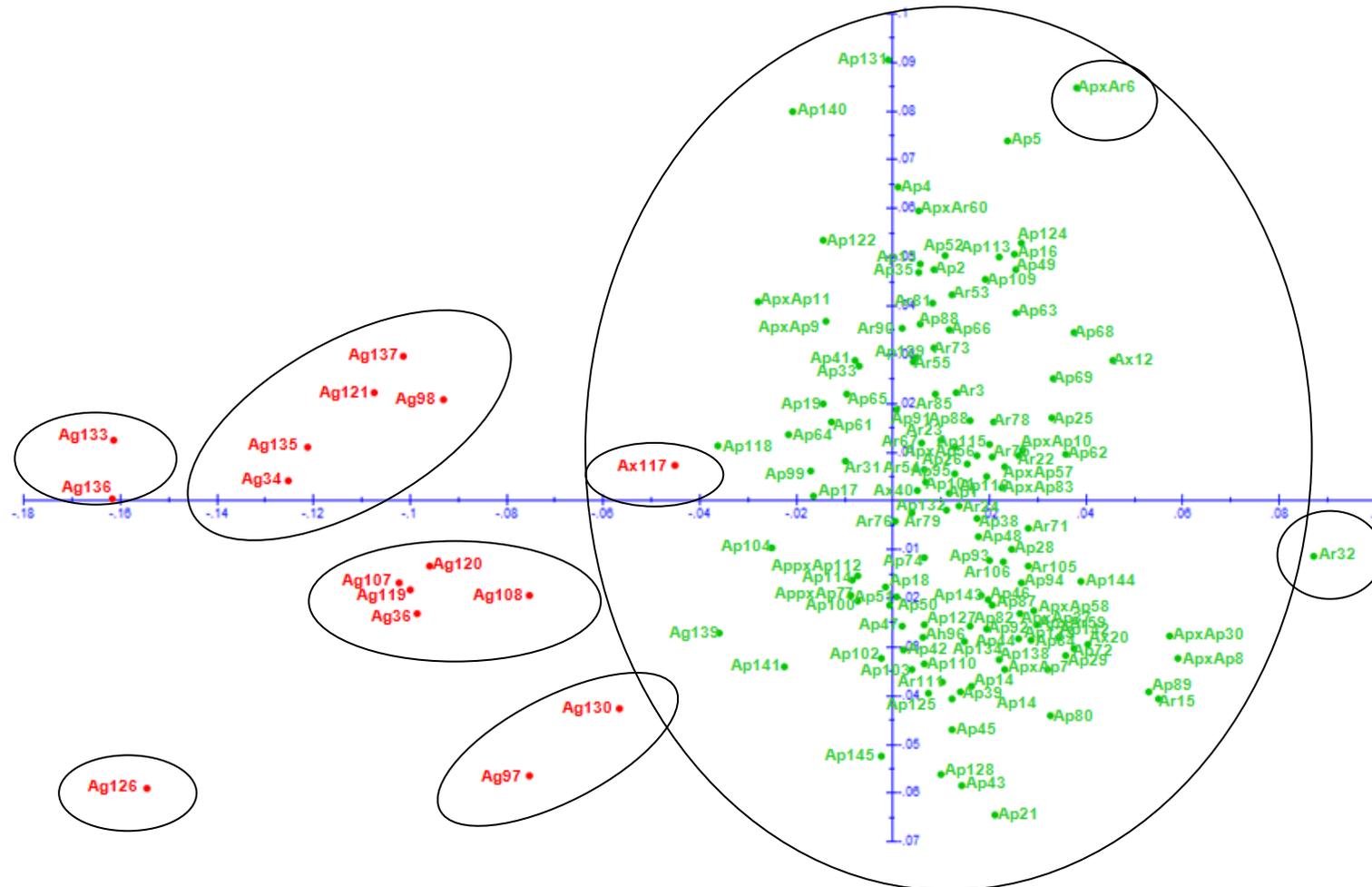


Figura 7 – Representação gráfica dos 145 acessos de amendoim forrageiro com base na análise de coordenadas principais. As cores estão de acordo com a formação dos grupos gerados pelo programa STRUCTURE, considerando o K=2.

Allcochete et al. (2008) compararam a análise bayesiana gerada pelo STRUCTURE com o dendrograma baseado no método *Neighbour-Joining*. Os autores concluíram que ambas as análises foram adequadas para avaliar a diversidade genética existente e demonstraram alta correspondência entre elas. Silva (2011) ao estudar a diversidade genética em 500 acessos de feijoeiro, também observou correspondência entre os agrupamentos do programa STRUCTURE com o método de agrupamento de UPGMA.

4. 3 Diversidade genética da secção *Caulorrhizae*

Observou-se na análise de alelos privados um total de 65 alelos distribuídos para as duas espécies. Treze alelos (20,3%) eram exclusivos de *A. pintoii*, dois alelos (3,1%) foram encontrados apenas em acessos de *A. repens* e 50 alelos (78,1%) foram compartilhados entre as duas espécies. Valores muito próximos foram encontrados por Gimenes et al. (2000) com marcadores RAPD ao verificar 74% do número total de fragmentos foram compartilhados entre *A. pintoii* e *A. repens*. Verifica-se que as espécies *A. pintoii* e *A. repens* apresentam relações genéticas muito próximas.

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

Os dados genotípicos dos 106 acessos de amendoim forrageiro da secção *Caulorrhizae* foram utilizados para estimar as distâncias genéticas, através da Distância Modificada de Rogers. A menor distância (0,16) foi observada entre os acessos Ap109 (*A. pintoii*) e o Ar106 (*A. repens*). Por sua vez, a maior distância genética (0,96) foi observada entre os acessos Ap128 (*A. pintoii*) e Ar105 (*A. repens*). De acordo com o dendrograma obtido (Figura 9) foi possível verificar a variabilidade entre os acessos de *A. pintoii* e *A. repens*, porém sem a estrutura de diferenciação genética que possibilite a formação de grupos definidos.

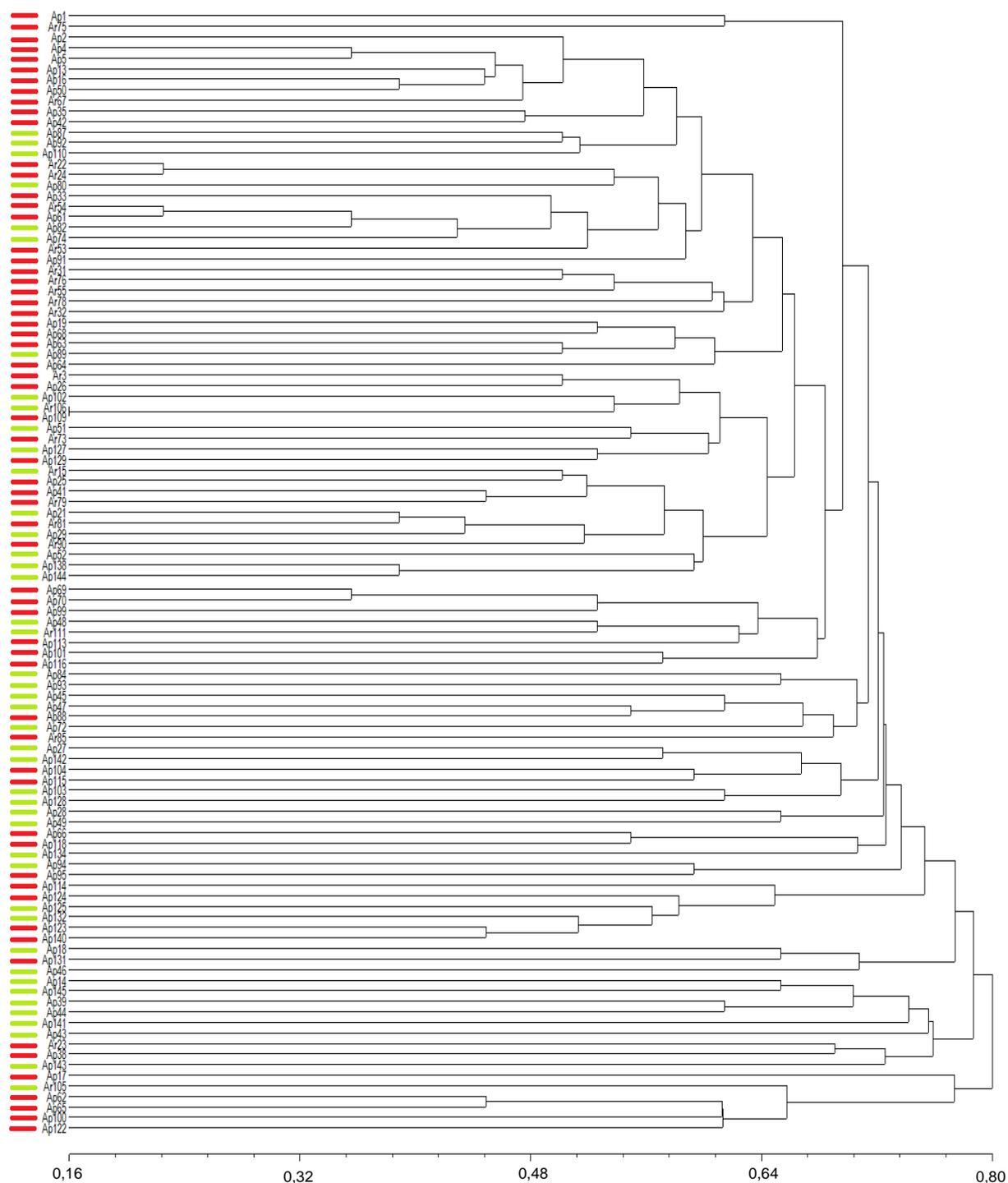


Figura 9 - Dendrograma com os 106 acessos de amendoim forrageiro obtido pelo método UPGMA, utilizando-se a distância modificada de Rogers e 10 locos microssatélites. As barras laterais são referentes ao *pool* gênico determinado pelo programa STRUCTURE para K=2.

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

Na análise bayesiana pelo programa STRUCTURE, verificou-se que o valor de K mais provável foi K=2 (Figura 10). Verificou-se a separação dos acessos de *A. pinto* e *A. repens* em dois grupos com pouca mistura genômica entre os acessos (Figura 11).

A relação entre os acessos de *A. pinto* e *A. repens* também foi verificada pela análise de coordenadas principais (PCoA). A dispersão gráfica dos 106 acessos no espaço multidimensional pode ser observada na Figura 12.

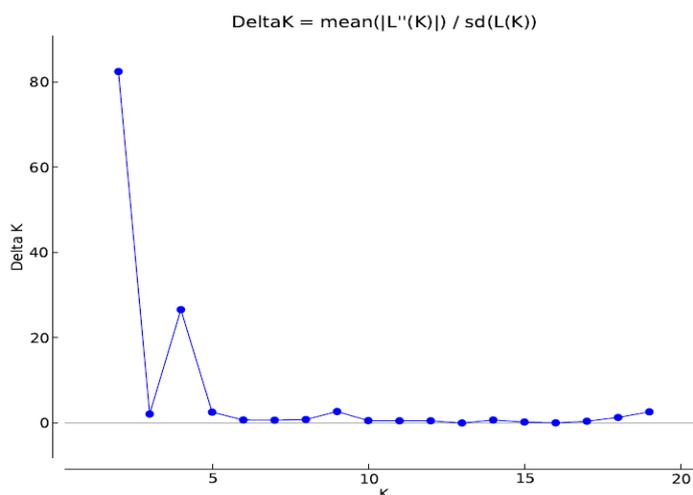


Figura 10 - Valor de delta (K) com destaque para (K)=2 grupos, obtido a partir da análise no programa STRUCTURE com aplicação do modelo de Evanno et al. (2005) em 106 acessos de *Arachis pinto* e *Arachis repens* do BAG da Embrapa Acre.

O grupo I (vermelho) agrupou 62 acessos, sendo 44 de *A. pinto* e 18 de *A. repens*. Neste grupo verificou-se que 20,97% dos acessos apresentaram mistura genômica, entre eles onze acessos da espécie *A. pinto* e dois da espécie *A. repens* (Ar76 e Ar31). O grupo II (verde) incluiu 44 acessos, sendo 40 de *A. pinto* e quatro de *A. repens*. Verificou-se neste grupo que 13,64% apresentaram mistura genômica,

entre eles quatro foram da espécie *A. pintoi* (Ap48, Ap18, Ap74 e Ap132) e dois da espécie *A. repens* (Ar106 e Ar105).

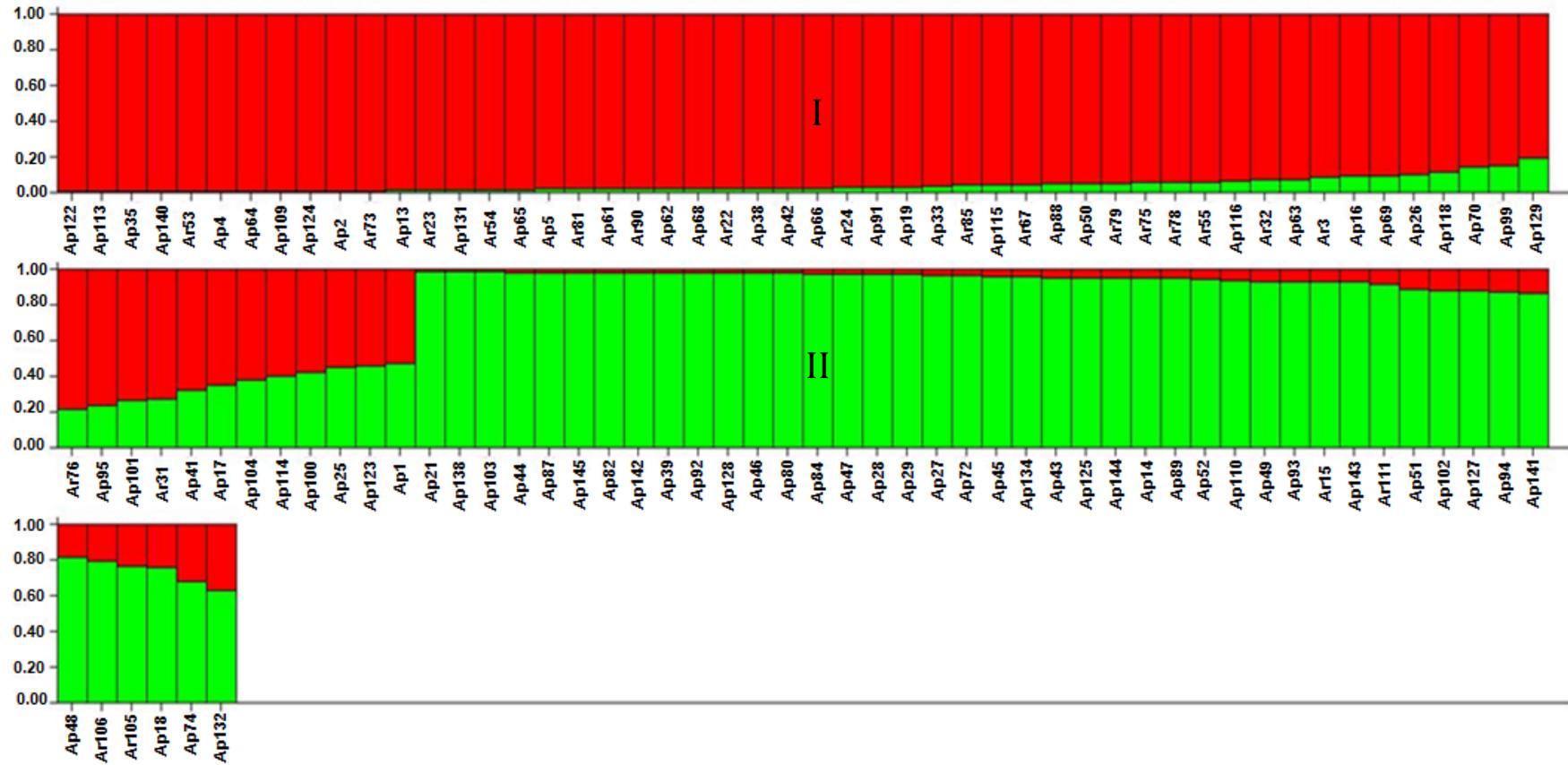


Figura 11 - Representação dos 106 acessos da secção *Caulorrhizae* de acordo com a análise bayesiana do programa STRUCTURE. Os acessos avaliados foram divididos em 2 grupos (K=2): grupo 1 representado pela cor vermelha; grupo 2 representado pela cor verde.

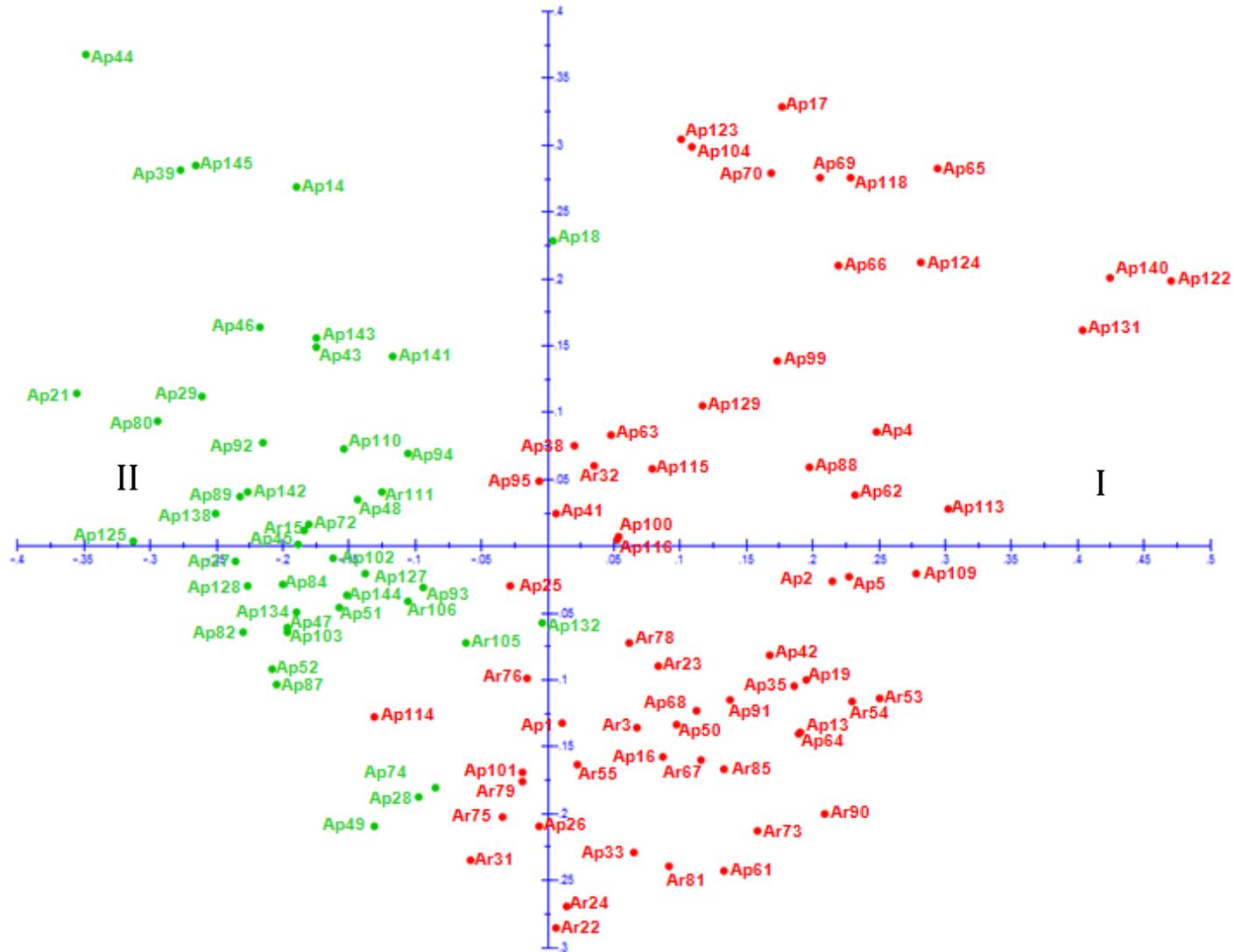


Figura 12 - Representação gráfica dos 106 acessos de *Arachis pintoi* e *Arachis repens* com base na Análise de Coordenadas Principais. As cores estão de acordo com a formação dos grupos gerados pelo programa STRUCTURE, considerando o K=2.

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que não houve um padrão de agrupamento com base nas espécies *A. pintoi* e *A. repens*. No entanto, mesmo ocorrendo a formação de grupos com ambas as espécies é possível observar que a maioria dos acessos da espécie *A. repens* ficaram reunidos em um mesmo *pool* gênico (grupo I). Os demais acessos de *A. repens* foram agrupados no outro *pool* gênico e somente dois acessos apresentaram padrões intermediários (Ar106 e Ar105).

Estudo de filogenia molecular nas espécies das secções do gênero *Arachis* confirmou natureza monofilética dos acessos das espécies *A. pintoi* e *A. repens* da secção *Caulorrhizae* (FRIEND et al., 2010). Portanto, os acessos devem apresentar genomas muito semelhantes, pois possuem um mesmo ancestral comum e origem a partir do mesmo *pool* genético. Adicionalmente, ainda não foi comprovada a existência de híbridos interespecíficos férteis entre as duas espécies (OLIVEIRA; VALLS, 2002; 2003).

Um estudo citogenético realizado recentemente com o híbrido interespecífico de *A. pintoi* x *A. repens* (10538) e seus progenitores verificou que os acessos de *A. pintoi*, *A. repens* e o híbrido apresentaram alto percentual para viabilidade do grão de pólen, sendo de 97,43%, 99,4% e 97,53%, respectivamente (PUCCIARIELLO et al., 2013). O emparelhamento e a segregação dos cromossomos na meiose foram normais. Portanto, a ausência de produção de semente não é devido a irregularidades meióticas. Uma possível causa para a ausência de produção de semente pode estar associada à presença de pêlos longos e densos na superfície estigmática (LU et al., 1990; PEÑALOZA, 1995; ASSIS, et al., 2009).

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

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

Menezes et al. (2012) no estudo de caracterização agrônômica e bromatológica na secção *Caulorrhizae* verificaram a formação de seis grupos pelo método de Tocher, baseado na distância de Mahalanobis. Os autores verificaram

também que não houve um padrão de agrupamento com base nas espécies. Dos seis grupos formados, quatro foram constituídos por genótipos de *A. pintoii* e *A. repens*.

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

Na análise de PCoA, houve uma divisão dos acessos nos dois primeiros eixos e apresentou 17,29% da variação total. A dispersão dos acessos em relação às duas coordenadas principais também sugere a formação de dois grupos. Foi possível verificar que a maioria dos acessos de *A. repens* apresenta significativa similaridade entre si com exceção dos acessos Ar15, Ar38 e Ar32, próximos aos acessos de *A. pintoii* no gráfico (Figura 12).

Azevedo et al. (2011) trabalharam com 19 acessos de *A. repens* verificaram a formação de seis grupos obtidos pelo método de Tocher baseado na distância de Mahalanobis e oito grupos obtido através da análise de variáveis canônicas. Em ambas as análises o acesso Ar15 formou grupo unitário. Isto mostra que este acesso se diferencia morfológicamente dos outros acessos de *A. repens*. Gimenes et al. (2000) verificaram que o acesso Ar15 agrupou com os acessos de *A. pintoii*.

Observou-se no gráfico de dispersão, ampla diferença genética entre acessos de *A. pintoii*, além disso, a posição dos acessos evidencia claramente a separação dos acessos de *A. pintoii* em dois grupos, corroborando com os dados do STRUCTURE (Figura 12). A dissimilaridade presente nos acessos de *A. pintoii* possibilita a obtenção de cruzamentos intraespecíficos por meio de cruzamentos, aumentando a heterose.

Portanto, com base nas análises realizadas verificou-se variabilidade genética na secção *Caulorrhizae*, no entanto, devido à alta similaridade genética entre os acessos é recomendado a introdução de novos materiais no Banco Ativo de Germoplasma de amendoim forrageiro, visando ampliar a diversidade. Em programas de melhoramento visando aumentar a diversidade genética do BAG recomenda-se ao melhorista trabalhar com acessos que apresentam maiores distâncias genéticas.

Visando determinar a coleção nuclear do banco ativo de germoplasma de amendoim forrageiro da Embrapa Acre, utilizou-se o *software* Corefinder através da estratégia M, mantendo 100% dos alelos observados. O objetivo de uma coleção nuclear é reunir a maior variabilidade genética de uma espécie no menor número de amostras. É um subconjunto da coleção ativa e tem por finalidade representar pelo menos 70 – 80% (alelos comuns e raros) da variabilidade da coleção base com 10 – 15% dos acessos (BROWN; SPILLANE, 1999). Para Araújo (2008) na prática a coleção nuclear pode apresentar proporções variando de 5% a 20% das subamostras e 70% a 90% da diversidade.

Neste estudo para a formação da coleção nuclear foram identificados 192 alelos nos 10 locos microssatélites representados por 41 acessos (Tabela 4), destes 13 acessos foram agrupados no *pool* gênico (I) representado pela cor vermelha, 22 acessos foram alocados no *pool* gênico (II) representado pela cor verde e seis compartilham ambos os *pools* gênicos (Figura 11). Verifica-se que a coleção nuclear é representada por 33 acessos da espécie *A. pintoi* 08 acessos da espécie *A. repens*. Na figura 13 observa-se o número total de alelos em função do número de acessos liberado pelo *software*.

A coleção nuclear estabelecida a partir deste estudo é representada por um grande número de acessos, apresentando aproximadamente 39% do total de acessos do BAG, garantindo que a máxima variabilidade genética observada (88%) na coleção seja preservada.

Tabela 4 – Identificação dos acessos de amendoim forrageiro para formação da coleção nuclear do BAG da Embrapa Acre

Código dos acessos	BRA	Espécie	Código dos acessos	BRA	Espécie
Ap39	012122	<i>Arachis pintoi</i>	Ap93	030899	<i>Arachis pintoi</i>
Ap28	034142	<i>Arachis pintoi</i>	Ap114	041475	<i>Arachis pintoi</i>
Ap48	031461	<i>Arachis pintoi</i>	Ap144	033375	<i>Arachis pintoi</i>
Ap75	037443	<i>Arachis pintoi</i>	Ap45	030635	<i>Arachis pintoi</i>
Ap27	032450	<i>Arachis pintoi</i>	Ap43	039195	<i>Arachis pintoi</i>
Ar32	032280	<i>Arachis repens</i>	Ar76	014788	<i>Arachis repens</i>
Ap68	040193	<i>Arachis pintoi</i>	Ar85	034363	<i>Arachis repens</i>
Ap99	Desconhecido	<i>Arachis pintoi</i>	Ap4	039985	<i>Arachis pintoi</i>
Ap49	031828	<i>Arachis pintoi</i>	Ap129	Desconhecido	<i>Arachis pintoi</i>
Ap42	030325	<i>Arachis pintoi</i>	Ar111	042251	<i>Arachis repens</i>
Ap134	031577	<i>Arachis pintoi</i>	Ap18	015083	<i>Arachis pintoi</i>
Ap128	015598	<i>Arachis pintoi</i>	Ap125	036561	<i>Arachis pintoi</i>
Ap46	031097	<i>Arachis pintoi</i>	Ap72	034193	<i>Arachis pintoi</i>
Ap103	031143	<i>Arachis pintoi</i>	Ap118	031577	<i>Arachis pintoi</i>
Ap52	040045	<i>Arachis pintoi</i>	Ap140	020401	<i>Arachis pintoi</i>
Ar31	032387	<i>Arachis repens</i>	Ar53	012106	<i>Arachis repens</i>
Ap145	030635	<i>Arachis pintoi</i>	Ap17	014991	<i>Arachis pintoi</i>
Ap94	030945	<i>Arachis pintoi</i>	Ar91	031895	<i>Arachis repens</i>
Ap143	Desconhecido	<i>Arachis pintoi</i>	Ap102	015580	<i>Arachis pintoi</i>
Ap95	030929	<i>Arachis pintoi</i>	Ar22	032352	<i>Arachis repens</i>
Ap84	036544	<i>Arachis pintoi</i>	-	-	-

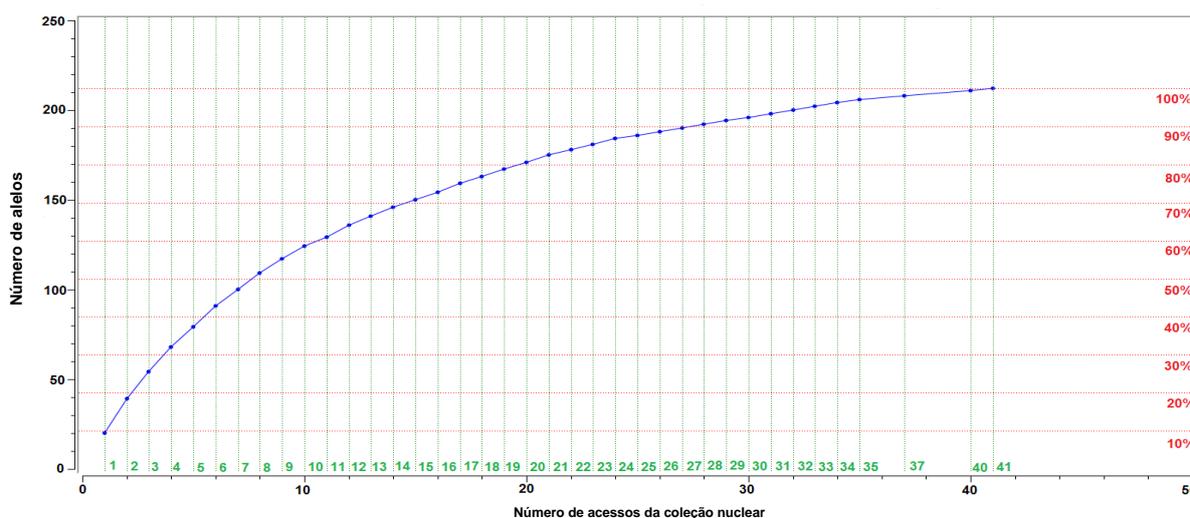


Figura 13 – Número total de acessos e porcentagem de alelos incluídos na coleção nuclear de amendoim forrageiro.

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que:

- Os dez marcadores microssatélites são eficientes para acessar a variabilidade genética presente nos 145 acessos de amendoim forrageiro do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Acre;
- Os baixos valores de heterozigosidade observada mostram que os acessos das secções *Caulorrhizae* e *Rhizomatosae* apresentam perfil típico de autógamias;
- Existe potencial de transferibilidade de marcadores microssatélites desenvolvidos para *A. pintoi*, *A. glabrata* e *A. hypogaea* para as espécies do gênero *Arachis*;
- As distâncias genéticas encontradas podem auxiliar na escolha dos acessos a serem realizados nos programas de melhoramento;
- As espécies *A. pintoi* e *A. repens* são muito próximas do ponto de vista genético, não havendo estruturação suficiente para separação das duas espécies;
- Não foram observadas duplicatas no BAG de amendoim forrageiro;
- A coleção nuclear de amendoim forrageiro está representada por aproximadamente 39% do total de acessos do BAG.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLCOCHETE, A. A. N.; RANGEL, P. H. N.; FERREIRA, M. E. Genetic structure of rice samples from a germplasm bank. **Scientific Research and Essay**, v. 3, n. 12, p. 577-598, December, 2008.

ANGELICI, C. M. L. C. D.; HOSHINO, A. A.; NÓBILE, P. M.; PALMIERI, D. A.; VALLS, J. F. M.; GIMENES, M. A.; LOPES, C. R. Genetic diversity in section *Rhizomatosae* of the genus *Arachis* (Fabaceae) based on microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, Brazilian, v. 31, n. 1, p. 79-88, may. 2008.

ARAÚJO, M. C. **Uma coleção nuclear de pupunha na Amazônia**. 2008. 94f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2008.

ARAÚJO, S. A. C.; DEMINICIS, B. B.; CAMPOS, P. R. S. S. Melhoramento genético de plantas forrageiras tropicais no Brasil. **Arquivos de Zootecnia**, v. 57, p. 62, fev. 2008.

ARGEL, P. J.; VILLARREAL, M. Nuevo maní forrajero perenne (*Arachis pinto* Krapov y Gregory) Cultivar Porvenir (CIAT 18744): leguminosa herbácea para alimentación animal, el mejoramiento y conservación del suelo y el embellecimiento del paisaje. Ministerio de Agricultura y Ganadería de Costa Rica (MAG)/Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 1998. 32p. (Boletín Técnico).

ASSIS, G. M. L.; VALENTIM, J. F.; CARNEIRO JÚNIOR, J. M.; AZEVEDO, J. M. A. de.; FERREIRA, A. S. Seleção de genótipos de amendoim forrageiro para cobertura do solo e produção de biomassa aérea no período de estabelecimento utilizando-se metodologia de modelos mistos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, n. 11, p. 1905-1911. 2008.

ASSIS, G. M. L.; VALENTIM, J. F. Programa de melhoramento genético do amendoim forrageiro: avaliação agrônômica de acessos no Acre. **Amazônia: Ciência e Desenvolvimento**, Belém, v. 4, n. 8, p. 207-215, jan./jun. 2009a.

ASSIS, G. M. L.; VALENTIM, J. F. Forage peanut breeding program in Brazil. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE MELHORAMENTO DE FORRAGEIRAS, 2, 2009, Campo Grande: SIMF, 2009b.

ASSIS, G. M. L.; VALENTIM, J. F.; CARNEIRO JUNIOR, J. M.; SILVA, H. S. F.; SANTOS, L. F. A.; AZEVEDO, J. M. A.; REIS, S. S. de O. Caracterização da pilosidade da superfície estigmática de genótipos de amendoim forrageiro. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 46, 2009, Maringá: SBZ, 2009.

ASSIS, G. M. L.; Principais características de *Arachis pinto* cv. BRS Mandobi. In: **Produção de sementes de *Arachis pinto* cv. BRS Mandobi no Acre**. Rio Branco, AC: Embrapa Acre, 2011. (Sistemas de produção, 4). Disponível em:

<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Amendoim/ProducaoSementesArachisAcre/index.htm> > Acesso em: 12 nov. 2013.

ASSIS, G. M. L.; CAMPOS, T.; BIANCHINI, P. C.; MATOS, L. R. A. Banco de germoplasma de amendoim forrageiro: conservação e utilização. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS, 2. 2012, Belém – Pará: CBRG, 2012.

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

BALZON, T. A.; VALENTIM, J. F.; ASSIS, G. M. L.; FERREIRA, A. S.; CUSTÓDIO, D. P. Efeito da época de plantio no estabelecimento do amendoim forrageiro BRA 040550 nas condições ambientais do Acre. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 44, 2007, Jaboticabal. O avanço científico e tecnológico na produção animal: **Anais...** Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Zootecnia; UNESP, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2007. 1 CD ROM.

BARCELLOS, A. O.; RAMOS, A. K. B.; VILELA, L.; MARTHA JUNIOR, G. B. Sustentabilidade da produção animal baseada em pastagens consorciadas e no emprego de leguminosas exclusivas, na forma de banco de proteína, nos trópicos brasileiros. **Revista Brasileira Zootecnia**, Viçosa, v. 3, suplemento especial, p. 51-67. 2008.

BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. Viçosa: UFV, 2009. v. 2, 585 p.

BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de Plantas**. 5. ed. Viçosa: UFV, 2009. 529 p.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal Human Genetics**, v. 32, n. 3, p.314-331, may.1980.

BOWMAN, A. M.; WILSON, G. P. M.; GOGEL, B. J. Evaluation of perennial peanuts (*Arachis* spp.) as forage on the New South Wales north coast. **Tropical Grasslands**, v. 32, p. 252-258. 1998.

BRASIL. 2011. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Registro Nacional de Cultivares**. Brasília. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/php/proton/cultivarweb/cultivares_registradas.php>. Acesso em: 20 nov. 2013.

BRAVO, J. P.; HOSHINO, A. A., ANGELICI, C. M. L. C. D. 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.

BROW, A. H. D.; SPILLANE, C. Implementing core collections principles procedures, progress, problems and promise. In: JOHNSON, R. C.; HODGKIN, T. **Core collections for today and tomorrow**. Rome: IPGRI, 1999. p. 1-9.

BUDIMAN, M. A.; JONES, J. I. T.; CITEK, R.W.; WAREK, U.; BEDELL, J.A.; KNAPP, S. J. 2006. Methylation-filtered and shotgun genomic sequences for diploid and tetraploid peanut taxa. GenBank Available at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>> Acesso em: 20. jan. 2013.

BUENO, L. C. S. Melhoria de plantas: princípios e procedimentos. 2 ed. Lavras: UFLA, 2006. 319 p.

BUSTOS, A. D.; CASANOVA, C.; SOLER, C.; JOUVE, N. RAPD variation in wild populations of four species of the genus *Hordeum* (*Poaceae*). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 96:101–111. 1998.

CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B.; BRITO, G. G.; SAKIYAMA, N. S.; Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores Moleculares**. 2 ed. Viçosa: UFV, 2009. 532 p.

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

CARVALHO, M. A.; QUESENBERRY, K.; GALLO, M. Comparative assessment of variation in the USA *Arachis pintoi* (Krap. and Greg.) germplasm collection using RAPD profiling and tissue culture regeneration ability. **Plant Systematics and Evolution**, n. 288, p. 245–251, august, 2010.

CLAUDINO, L.; GEDOUIN, M.; POCCARD-CHAPUIS, R.; DARNET, L. F.; WAQUIL, P.; TOURRAND, J. F. Transformação nos território de produção bovina pelo desenvolvimento do setor agropecuário: estudo comparativo entre Brasil e Uruguai. **Interfaces em Desenvolvimento, Agricultura e Sociedade**, v. 7, n. 1, p. 8-42, 2013.

COELHO, A. S. G. **BooD: avaliação dos erros associados a estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap com número variado de marcadores (software)**. Goiânia: UFG, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Genética Vegetal, 2002.

CONDIT, R.; HUBBELL, S. P. Abundance and DNA sequence of two-base regions in tropical tree genomes. **Genome**, v. 34, p. 66-71, 1991.

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

CUC, L. M.; MACE, E. S.; CROUCH, J. H.; QUANG, V. D.; LONG, T. D.; VARSHNEY, R. K Isolation and characterization of novel microsatellite markers and their application for diversity assessment in cultivated groundnut (*Arachis hypogaea* L.). **BMC Plant Biology**, p. 8:-55. 2008.

EARL, D. A.; VONHOLDT, B. M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v. 4, p. 359–361. 2012.

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

FERNANDES, F. D.; RAMOS, A. K. B.; GUIMARÃES JÚNIOR, R.; CARVALHO, M. A.; KARIA, C. T.; ASSIS, G. M. L. de. Produtividade de massa seca de genótipos de *Arachis spp.* no Distrito Federal. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 46., 2009, Maringá. **Anais...** Maringá: SBZ, 2009.

FERNÁNDEZ, A.; KRAPOVICKAS, A. Cromosomas y evolución em *Arachis* (Leguminosae). **Bonplandia**, Corrientes, v. 8, p.187-220. 1994.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª ed. Brasília: Embrapa – Cenargen, 1998, 220 p.

FISHER, M. J.; CRUZ, P. Algunos aspectos de la ecofisiología de *Arachis pintoii*. In: KERRIDGE, P. C. (Ed.). **Biología y agronomía de especies forrajeras de Arachis**. Cali: CIAT, 1995. 227 p. (Publicacion CIAT, 245).

FRENCH, E. C.; PRINE, G. M.; OCUMPAUGH, W. R.; RICE, R. W. Regional experience with forage in the USA. In: **Kerridge PC and Hardy B, Biology and Agronomy of Forage Arachis**: CIAT, Cali, p. 169-186, 1994.

FRIEND, S. A. D.; QUANDT, S. P.; TALLURY, H. T.; STALKER, K. W. H. Species, genomes, and section relationships in the genus *Arachis* (Fabaceae): a molecular phylogeny. **Plant Systematics and Evolution**, v. 290, p. 185–199, october. 2010.

GIACOMETTI, D. C.; FERREIRA, F. R. Organização e uso de banco de germoplasma de fruteiras. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 9, 1987, Campinas. **Anais...** Campinas: SBF, 1988. p. 11-17.

GIMENES, M. A.; LOPES, C. R.; GALGARO, M. L.; VALLS, J. F. M.; KOCHERT, G. Genetic variation and phylogenetic relationships based on RAPD analysis in section *Caulorrhizae*, genus *Arachis* (Leguminosae). **Euphytica**, Wageningen, v. 116, p. 187–195, march. 2000.

GIMENES, M. A.; LOPES, C. R.; VALLS, J. F. M. Genetic relationships among *Arachis* species based on AFLP. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, n. 3, p. 349-353. 2002.

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, 2007.

GOBBI, K. F.; GARCIA, R.; GARCEZ NETO, A. F. Características morfológicas, estruturais e produtividade do capim-braquiária e do amendoim forrageiro submetidos ao sombreamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 9, p.1645-1654, 2009.

GOEDERT, C. O. Histórico e avanços em recursos genéticos no Brasil. In: NASS, L. L. **Recursos genéticos vegetais**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. 858 p.

GOMES, J. F.; REIS, J. C. L.; STUMPF JÚNIOR; W. **Produção e qualidade de forrageiras perenes de verão em solo hidromórfico no litoral sul do Rio Grande do Sul**. Pelotas, RS: Embrapa Clima Temperado, 2007. p. 1-3 (Comunicado Técnico, 164).

GREGORY, W. C.; KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, M. P. **Structure, variation, evolution and classification in *Arachis***. In: Summerfield, R. J.; Bunting, A. H. *Advances in legume Science*, Kew: Royal Botanic Gardens, 1980. v. 2, p. 469-481.

GOODMAN, M. M.; STUBER, C. W. Races of maize VI. Isozyme variation among races of maize in Bolívia. **Maydica**, v. 28, p. 169-187. 1983.

GUO, B. Z.; CHEN, X.; DANG, P.; SCULLY, B. T.; LIANG, X.; HOLBROOK, C. C.; YU, J.; CULBREATH, A. K. Peanut gene expression profiling in developing seeds at different reproduction stages during *Aspergillus parasiticus* infection. **BMC Developmental Biology**, p. 8-12. 2008.

HAMADA, H. H.; PETRINO, P. M.; KAKUNAGA, A. D. K. T. A novel repeated element with Z-DNA forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Estados Unidos da America, v. 79, p. 6465-6469.1982.

HAMMONS, R. O. **The origin and history of the Groundnut**. In: SMARTT, J. *The Groundnut Crop: a scientific basis for improvement*. London: Chapman & Hall, 1994. v. 2, p. 24-42.

HE, G. M.; NEWMAN, M. G. G.; PITTMAN, R. N.; PRAKASH, C. S. Microsatellites as DNA markers in cultivated peanut (*A. hypogaea* L.). **BMC Plant Biology**, p. 3-3. 2003.

HE, G. M. R.; GAO, H.; GUO, B.; GAO, G.; NEWMAN, M.; PITTMAN, R. N.; PRAKASH, C. S. Simple sequence repeat markers for botanical varieties of cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Euphytica**, v. 142, p. 131–136. 2005.

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

HOSHINO, A. A.; BRAVO, J. P.; ANGELICI, C. M. L. C. D.; BARBOSA, A. V. G.; LOPES, C. R.; GIMENES, M. A. Heterologous microsatellite primer pairs informative for the whole genus *Arachis*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 4, p. 665-675, march. 2006.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J. 2009. **Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético**. 3 ed. 612 p.

KALIA, R. K.; RAI, M. K.; KALIA, S.; SINGH, R.; DHAWAN, A. K. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica**, Wageningen v. 177, p. 309–334, november. 2011.

KOPPOLU, R.; UPADHYAYA, H. D.; DWIVEDI, S. L.; HOISINGTON, D. A.; VARSHNEY, K. R. Genetic relationships among seven sections of genus *Arachis* studied by using SSR markers. **BMC Plant Biology**, p. 10-15. 2010.

KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, W. C. Taxonomia del género *Arachis* (Leguminosae). **Bonplandia**, Corrientes, Argentina, p. 1-186. 1994.

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.

LEWIS, G. P.; MACKINDER, B.; LOCK, M. 2005. **Legumes of the World**. Kew: Royal Botanic Gardens. 578 p.

LEITE, V. S. **Determinação do grau de heterozigose de progênies do acesso BRA 041122 da espécie *Arachis Pintoi* Krapov. & Gregory por meio de marcador molecular SSR**. Botucatu, 2008. 88f. Dissertação (Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

LI, Y. C.; KOROL, A. B.; FAHIMA, T.; BEILES, A.; NEVO, E. Microsatellites: Genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: A review. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 2453-2465. 2002.

LIANG X.; CHEN, X.; HONG, Y.; LIU, H.; ZHOU, G.; LI, S.; GUO, B. Utility of EST-derived SSR in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) and *Arachis* wild species. **BMC Plant Biology**, p. 9-35. 2009.

LU, J.; MAYER, A.; PICKERSGILL, B. Stigma morphology and pollination in *Arachis* L. (Leguminosae). **Annals of Botany**, v.66, p.73-82, 1990.

MAASS, B. L.; OCAMPO, C. H. Isozyme polymorphism provides fingerprints for germoplasm of *Arachis glabrata* Benth. **Genetic Resources and Crop Evolution**, n. 42, p. 77-82. 1995.

MARTINS, W. S. D.; PROITE, K. P.; MORETZSOHN, M.; BERTIOLI, D. J. New softwares for automated microsatellite marker development. **Nucleic Acids Research**, p. 34-31. 2006.

MENEZES, A. P. M. **Caracterização morfológica, divergência genética e correlação entre caracteres em genótipos de amendoim forrageiro**. Rio Branco, 2011. 137f. Dissertação (Mestrado em agronomia) – Universidade Federal do Acre, Rio Branco, 2011.

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

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

MIRANDA, E. M. de; **Fungos micorrízicos arbusculares em amendoim forrageiro (*Arachis pinto* Krap. e Greg.)**. 2008. 95 f. Tese (Doutorado em Agronomia Ciências do Solo) - Instituto de Agronomia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

MONÇATO, L. **Caracterização morfológica de germoplasma de espécies de *Arachis*, seção *Caulorrhizae*, pela análise multivariada**. 1995. 122 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 1995.

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**, p. 4-11. 2004.

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). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 111, p. 1060-1071. 2005.

MORETZSOHN, M. C.; BARBOSA, A. V. G.; ALVES-FREITAS, D.M.T.; TEIXEIRA, C. LEAL-BERTIOLI, S. C. M.; GUIMARÃES, P. M.; PEREIRA, R. W.; LOPES, C. R. CAVALLARI, M. M.; VALLS, J. F. M.; BERTIOLI, D.J.; GIMENES, M. A. A linkage map for the B-genome of *Arachis* (Fabaceae) and its synteny to the A-genome. **BMC Plant Biology**, p. 9-40. 2009.

MORGANTE, M.; HANAFEY, M.; POWELL, W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. **Nature Genetics**, v. 30, p.194-200. 2002.

MULATO, B. M.; MÖLLER, M.; ZUCCHI, M. I.; QUECINI, VERA.; PINHEIRO, J. B. Genetic diversity in soybean germplasm identified by SSR and EST-SSR markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, p. 276-283. 2010.

NASCIMENTO, I. S.; MONKS, P. L.; LÜDER, W. E. *Arachis pintoii* behavior under different fertilizer levels and cutting intervals. In: WORLD CONFERENCE ON ANIMAL PRODUCTION, 4., AND THE REUNIÃO ANUAL DA ASSOCIAÇÃO LATINOAMERICANA DE PRODUÇÃO ANIMAL, 18., 2003, Porto Alegre, **Anais...** Porto Alegre: 2003. CD-ROM.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v. 89, p. 583-590. 1978.

NÓBILE P. M.; GIMENES M. A.; VALLS, J. F. M.; LOPES, C. R. Genetic variation within and among species of genus *Arachis*, section *Rhizomatosae*. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 51, p. 299-307. 2004.

OLIVEIRA, M. A. P.; VALLS, J. F. M. Produção de híbridos de amendoim forrageiro por meio de hibridação artificial. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n.6, p. 885-888, jun. 2002.

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

PAGANELLA, M. B.; VALLS, J. F. M. Caracterização morfológica de cultivares e acessos selecionados de *Arachis pintoii* Krapov. & Gregory. **Pasturas Tropicales**, Cali, Colômbia, v. 24, n. 2, p. 23-30, 2002.

PALMIERI, D. A.; HOSHINO, A. A.; BRAVO, J. P.; LOPES, C. R.; GIMEMES, M. A. Isolation and characterization of microsatellite loci from the forage species *Arachis pintoii* (Genus *Arachis*). **Molecular Ecology Notes**, v. 2, p. 551-553, july. 2002.

PALMIERI, D. A.; BECHARA, M. D.; CURI, R. A.; GIMEMES, M. A.; LOPES, C. R. Novel polymorphic microsatellite markers in section *Caulorrhizae* (*Arachis*, Fabaceae), **Molecular Ecology Notes**, v. 5, p. 77-79, october. 2005.

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

PEÑALOZA, A. P. S.; VALLS, J. F. M. Número cromossômico de novas espécies de *Arachis* (leguminosae). In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA A AMÉRICA LATINA E CARIBE, 2. 1999, Brasília. **Anais...** Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. CD ROM.

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

PEÑAZOLA, A. P. S. **Caracterização dos componentes biológicos da produção de sementes de *Arachis pintoii* (Leguminosae)**. Dissertação de Mestrado,

Departamento de Engenharia Agrônômica, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 1995, 82 p.

PERRIER, X.; JACQUEMOUND-COLLET, J. P. 2006. **DARwin software. Available from.** <<http://www.darwin.cirad.fr/darwin>>. Acesso em: 12 maio. 2013.

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

POLICRITI, A.; SGARRO, A. **CoreFinder v.1.0**. 2011. Disponível em: <[http:// www. Appliedgenomics.org/services/software](http://www.Appliedgenomics.org/services/software)>. Acesso em: 14 mar. 2012.

PRINE, G. M.; DUNAVIN, L. S.; GLENNON, R. J.; ROUSH, R. D. **Arbrook rhizoma peanut, a perennial forage legume**. Circular S-332, Agriculture Experimental Station, Gainesville.1986.

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

PROITE, K.; LEAL-BERTIOLI, S. C. M.; BERTIOLI, D. J.; MORETZSOHN, M. C.; SILVA, F. R.; MARTINS N. F.; GUIMARÃES, P. M. ESTs from a wild *Arachis* species for gene discovery and marker development. **BMC Plant Biology**, p. 7-7. 2007.

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

RHOLF, F. J. **NTSYS-PC Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.1**, Exeter Publ., Setauket, NY, 1993.

SALOMÃO, A. N. **Manual de curadores de germoplasma – vegetal: Glossário**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010, 14p (Documentos, 326).

SCHLÖTTERER, C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. **Chromosoma**, v. 109, p. 365-371, june. 2000.

SHOBA, D.; MANIVANNAN, N.; VINDHIYAVARMAN, P. Genetic diversity analysis of groundnut genotypes using SSR markers. **Electronic Journal of Plant Breeding**, v. 1, p. 1420-1425, December. 2010.

SILVA, R. N. O. **Diversidade genética em feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) por marcadores morfoagronômicos e moleculares**. Teresina, 2011. 176f. Dissertação (Genética e Melhoramento) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011.

SILVA, M. A.; BERBER, R. C. A.; FILHO, A. B.; JUNCAL, E. A. P.; MUNHOZ, A. L.; SILVEIRA F. H. R.; CAVALHEIRO, T.; FURINI, P. M. Morfometria de amendoim forrageiro em diferentes estágios de desenvolvimento. **Comunicata Scientiae**, Piauí, v. 3, n. 2, p. 130-133, outubro. 2012.

SIMPSON, C. E.; VALLS, J. F. M.; MILES, J. W. Biología reproductiva y potencial para La recombinación genética en *Arachis*. In: KERRIDGE, P. C. (Ed.). **Biología y agronomía de especies forrajeras de *Arachis***. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 1995. p. 227.

TAUTZ, D.; RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 12, n. 10, p. 4127-4138, may. 1984.

TESSIER, C.; DAVID, J.; THIS, P.; BOURSQUOT, J. M.; CHARRIER, A. Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 98, p. 171-177. 1999.

TÓTH, G.; GÁSPARI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. **Genome Research**, v. 10, p. 967-981. 2000.

VALENTIM, J. F.; CARNEIRO, J. C.; VAZ, F. A. et al. **Produção de mudas de *Arachis pinto***. Rio Branco: Embrapa Acre, 2000. 4 p. (Instruções técnicas, 33).

VALLS, J. F. M. Origem do germoplasma de *Arachis pinto* disponível no Brasil. In: REUNIÓN SAVANAS, 1, 1992, Brasília. **Red internacional de evaluación de pastos tropicales - RIEPT**. Cali: CIAT, Brasília: EMBRAPA – CPAC, 1992. p. 81-96.

VALLS, J. F. M.; MAASS, B. L.; LOPES, C. R. Recursos genéticos de *Arachis* silvestre y diversidad genética. In: KERRIDGE, P. C. (Ed.). **Biología y agronomía de especies forrajeras de *Arachis***. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 1995. p. 227.

VALLS, J. F. M.; SIMPSON, C. E. Taxonomía, distribución natutal y atributos de *Arachis*. In: KERRIDGE, P. C. **Biología y agronomía de especies forrajeras de *Arachis***. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 1995. p. 227.

VALLS, J. F. M.; SIMPSON. C. E. New species of *Arachis* (leguminosae) from Brazil, Paraguay and Bolivia. **Bonplandia**, Corrientes, Argentina, v. 14, n. 2, p. 35-63. 2005.

VARSHNEY, R. K.; THIEL, T.; STEIN, N.; LANGRIDGE, P. E.; GRANER, A. In silico analysis on frequency and distribution of microsatellites in ESTs of some cereal species. **Cellular Molecular Biology Letters**, v. 7, n. 2, p. 537-546. 2002.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; van de LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, London, v. 23, n. 21, p. 4.407-4.414.1995.

WANG, D. G.; FAN, J. B.; SIAO, C. J.; BERNO, A. Y. P.; SAPOLSKY, R. G. G.; PERKINS, N.; WINCHESTER, E.; SPENCER, J. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. **Science**, v. 280, p. 1077–1082. 1998.

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 Genetic**, v. 44, p. 388-396. 1989.

WILLIAMS, J. K. F.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. G.; RAFALKI, J. A.; TINGEY S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6531-6535. 1990.

YANG, X.; QUIROS, C. Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 86, p. 205–212. 1993.