

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

**Taxa de cruzamento e diversidade genética em *Arachis pinto* com  
marcadores microssatélites**

**Jônatas Chagas de Oliveira**

**RIO BRANCO  
2015**



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



**Taxa de cruzamento e diversidade genética em *Arachis pintoi* com  
marcadores microssatélites**

Jônatas Chagas de Oliveira

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<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Tatiana de Campos.

©OLIVEIRA, J. C, 2015.

OLIVEIRA, Jônatas Chagas de. **Taxa de cruzamento e diversidade genética em *Arachis pinto* com marcadores microssatélites**. Rio Branco, 2015. 52f. Dissertação (Mestrado em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia) - Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia. Universidade Federal do Acre, 2015.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UFAC

O48t Oliveira, Jônatas Chagas de, 1987-

Taxa de cruzamento e diversidade genética em *Arachis pinto* com marcadores microssatélites / Jônatas Chagas de Oliveira. Rio Branco: UFAC/, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, 2015.

55f.: il. ; 30 cm.

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.

Inclui bibliografia

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Tatiana de Campos

1. Amendoim forrageiro (*Arachis pinto*) - Taxa de Cruzamento - Marcadores microssatélites. I. Título.

CDD: 633.3680981

CDU: 633.368(81)

Agostinho Sousa – CRB 11<sup>a</sup> – 547.

Rio Branco - Acre  
2015

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

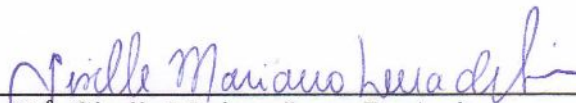
Jônatas Chagas de Oliveira

TAXA DE CRUZAMENTO E DIVERSIDADE GENÉTICA EM *Arachis*  
*pintoi* COM MARCADORES MICROSSATÉLITES

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 30/06/2015



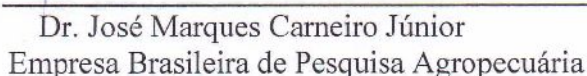
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tatiana de Campos (Orientadora)  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária



Dr.<sup>a</sup> Giselle Mariano Lessa De Assis  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária



Dr. Judson Ferreira Valentim  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária



Dr. José Marques Carneiro Júnior  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

À minha esposa Josiany dos Santos Dias pelo  
carinho, amor, incentivo, compreensão e  
paciência.  
Ofereço

Aos meus  
pais Valdir Brilhante de Oliveira, Gizeuda M<sup>a</sup>  
Chagas de Oliveira e ao meu irmão Ádam  
Chagas de Oliveira, pelo apoio,  
companheirismo e incentivo em todos os  
momentos de minha vida.  
Dedico

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar o dom da vida e me permitir chegar até esse momento.

A cada membro de minha família que me incentivou, apoiou e motivou em todos os momentos que precisei.

À minha esposa Josiany por ser essa mulher batalhadora, dedicada, competente, me apoiando e acompanhando durante a concretização desse trabalho.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tatiana de Campos, pela amizade, conselhos profissionais e pela paciente orientação.

À Universidade Federal do Acre e, em especial, ao Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia (CITA), pela oportunidade de especialização profissional.

A todos os professores do CITA, pela sua contribuição durante as aulas e nas conversas.

À pesquisadora Giselle Mariano Lessa de Assis, pelo apoio na execução do projeto.

Aos funcionários da Embrapa Rafael, Clovis, Josy e Luciélío pela ajuda na realização das atividades desse trabalho.

Aos professores que contribuíram de alguma forma durante toda a minha formação acadêmica.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos amigos de laboratório Hellen, Renata e Vanessa, que me ensinaram tudo que precisei para conseguir executar meu trabalho e me motivaram, apoiaram e aconselharam em vários momentos.

Aos bolsistas Hermesson, Ingrid e Estéfanny, que me ajudaram durante a execução do experimento.

A Polinar, que me ajudou durante a maior parte do trabalho no laboratório. Sem sua ajuda não teria conseguido.

Ao Dr. Alexandre Sebbenn, que contribuiu na análise dos dados.

A todos que contribuíram, ajudaram e apoiaram em algum momento do trabalho.

OBRIGADO!!!

## Resumo

O Brasil tem-se destacado no mercado exportador de carne, pela capacidade de atender a diversas demandas. Por possuir cerca de 20% do seu território coberto por pastagens, a maior parte do gado é criada a pasto. Porém, dentre os fatores que limitam o aumento da produtividade da pecuária brasileira, o vigor e a qualidade das pastagens possuem destaque. Para solucionar esses problemas, o uso de leguminosas forrageiras, em especial *Arachis pintoi*, tem sido cada vez maior. *A. pintoi* possui um alto valor nutritivo, boa produção de forragem (matéria seca), fixação de nitrogênio ao solo diminuindo os custos do produtor e aumentando a produção. O objetivo desse estudo foi avaliar a taxa de cruzamento natural de *A. pintoi*, utilizando marcadores microssatélites. Foram analisadas 14 matrizes, sendo realizado o plantio em dezembro de 2012 e a coleta das sementes oito meses após o plantio. Cerca de 60 sementes por matriz foram plantadas e o DNA foi extraído de folhas jovens, das matrizes e progênies. As análises genéticas basearam-se na genotipagem de oito locos microssatélites. Quanto aos parâmetros de diversidade genética, foram estimados heterozigosidade observada ( $H_O$ ) e esperada ( $H_E$ ), número de alelos por loco e conteúdo de polimorfismo (PIC). Agrupamentos foram realizados pelo método UPGMA. Estimamos os seguintes parâmetros da biologia reprodutiva: Taxa de cruzamento multiloco ( $t_m$ ), Taxa de cruzamento uniloco ( $t_s$ ), Taxa de cruzamento entre aparentados ( $t_p = t_m - t_s$ ), Coeficiente de endogamia na geração maternal ( $F_m$ ), Correlação de paternidade ( $r_{p(m)}$ ), Doadores de pólen efetivos ( $1/r_{p(m)}$ ), Correlação de  $t$  entre progênies ( $r_t$ ), Correlação de  $t$  entre os locos ( $r_{ta}$ ). No total, foram coletadas 6771 sementes. O genótipo Amarillo MG-100 foi o maior produtor de sementes (915) e o Belomonte o menor (10). Foram plantadas 1316 sementes, com taxa de germinação média de 53,7%. Os oito locos microssatélites foram polimórficos, com um total de 65 alelos e média de 8,1 alelos/loco. A heterozigosidade observada ( $H_o$ ) foi maior do que a esperada ( $H_e$ ), com médias de 0,83 e 0,79, respectivamente, o que demonstrou uma seleção para heterozigotos. Baseados nas distâncias genéticas, as 14 matrizes formaram seis grupos. A taxa de cruzamento total foi de 36,7%, mostrando um sistema misto de cruzamento com predominância de autogamia. A correlação de paternidade multiloco identificou cruzamentos biparentais (0,768). O coeficiente de endogamia foi negativo, mostrando um baixo índice de endogamia na geração parental (-0,031). A análise da taxa de cruzamentos por família identificou uma grande variação na taxa de cruzamento, variando de 1,9 a 91,6%. Estes

resultados indicam que genótipos específicos poderão ser utilizados com maior sucesso nos experimentos de hibridação do programa de melhoramento de *A. pintoi*. A taxa de cruzamento encontrada representa a primeira estimativa deste parâmetro com base em marcadores moleculares e deve ser levada em consideração na manutenção do banco de germoplasma, a fim de manter a representatividade de cada acesso, além de orientar futuras coletas de material nos centros de origem, visando uma melhor amostragem da variabilidade genética da espécie.

**Palavras-chave:** Amendoim forrageiro. *Arachis pintoi*. Taxa de cruzamento. Marcadores microssatélites.



## Abstract

Brazil has stood out in the international exporting meat market, as a result of its ability to meet various demands. By owning about 20% of its territory covered by pastures, most of the cattle are raised on pasture. However, among the factors that limit the increase in Brazilian livestock productivity, vigor and quality of pastures have highlighted. To solve these problems, the use of forage legumes, especially *Arachis pintoi*, has been increasing. *A. pintoi* has a high nutritional value, good forage production (dry matter) and biological nitrogen fixation capacity. The objective of this study was to evaluate the natural outcrossing rate of *A. pintoi*, using microsatellite markers. Fourteen genotypes were analyzed. Planting was done in December 2012. Seeds were collected eight months after planting. About 60 seeds per matrix were analyzed. Young leaves were collected from the matrix plants and progenies for DNA extraction. Eight microsatellite loci were used. For the genetic diversity the following parameters were estimated: observed ( $H_O$ ) and expected ( $H_E$ ) heterozygosity, number of alleles per locus and polymorphism information content (PIC). Groupings were performed by the UPGMA method. The following parameters regarding the reproductive biology were estimated: Multilocus outcrossing rate ( $t_m$ ), Singlelocus outcrossing rate ( $t_s$ ), Outcrossing rate between related individuals ( $t_p = t_m - t_s$ ), Inbreeding coefficient of maternal parents ( $F_m$ ), Correlation of paternity ( $r_p$ ), Effective pollen Donors ( $1/r_p$ ), Outcrossing rates among progenies ( $r_t$ ), outcrossing rate among loci ( $r_{la}$ ). In total, 6771 seeds were collected. The Amarillo genotype was the largest seed producer (915) and the lowest was Belmonte (10). It was planted 1316 seeds, average germination rate of 53.7%. The eight microsatellite loci were polymorphic, with a total of 65 alleles and average of 8.1 alleles/locus. The observed heterozygosity ( $H_o = 0.83$ ) was higher than expected ( $H_e = 0.79$ ), demonstrating heterozygosity of the progenies. Based on genetic distances, the 14 genotypes formed six groups. The total outcrossing rate was 36.7%, showing a mixed mating system with predominance of autogamy. The correlation multilocus paternity identified two-parent crossings (0.768). The inbreeding coefficient was negative, showing a low rate of inbreeding (-0.031), which indicates a selection for heterozygous. The analysis of the outcrossing's per family identified a large variation in crossing rate ranging from 1.9 to 91.6%. These results indicate that specific genotypes may be used most successfully in hybridization experiments in the *A. pintoi* breeding program. The outcrossing rate found is the first estimate of this parameter based on molecular markers and should be taken into account in maintaining the germplasm bank, in order to maintain the representativeness of each access, and guide future

collections of material in the centers of origin, to improve sampling of the genetic variability of the species.

**Keywords:** Forage peanut. *Arachis pintoii*. Outcrossing rate. Microsatellite markers.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Acessos de <i>Arachis pinto</i> (A) e <i>Arachis repens</i> (B).....	17
Figura 2 – Flor de <i>A. pinto</i> .....	20
Figura 3 – <i>Apis mellifera</i> coletando pólen em flor de <i>Arachis pinto</i> .....	21
Figura 4 – Seleção e coleta dos estolões de <i>Arachis pinto</i> (A), vasos com <i>A. pinto</i> (B).....	29
Figura 5 – Lavagem das sementes (A); sementes germinadas de <i>A. pinto</i> em casa de vegetação (B); detalhe da germinação e identificação (C).....	30
Figura 6 – Perfil do loco Ag 39 em gel de poliacrilamida (5%) com a matriz (♀) e 24 progênes de amendoim forrageiro.....	35
Figura 7 – Agrupamento gerado para oito microssatélites com 14 genótipos de <i>A. pinto</i> pela Distância Modificada de Rogers e UPGMA.....	37

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Acessos de <i>Arachis pinto</i> i selecionadas como matrizes (genitores maternos).....	28
Tabela 2 – Sequência dos iniciadores utilizados incluindo a temperatura de anelamento (Ta °C) e amplitude alélica (pb).....	31
Tabela 3 – Quantidade de sementes produzidas por família, sementes plantadas, número de progênies obtidas e taxa de germinação.....	33
Tabela 4 – Caracterização dos locos quanto ao número de alelos por loco, heterozigosidade esperada ( $H_e$ ), heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) para as 14 matrizes.....	35
Tabela 5 – Distâncias genéticas obtidas pelo método de Rogers modificado e calculadas a partir de 8 locos microssatélites e 14 genótipos.....	37
Tabela 6 – Estimativas da taxa de cruzamento da espécie <i>A. pinto</i> i.....	39
Tabela 7 – Estimativas da taxa de cruzamento para as famílias.....	41
Tabela 8 – Comparação entre os parâmetros classe* (densidade e comprimento de tricomas), taxa de cruzamento multiloco ( $t_m$ ) e número de sementes produzidas em cada família.....	42

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1 Gênero <i>Arachis</i>.....</b>	<b>16</b>
<b>2.2 <i>Arachis pintoi</i>.....</b>	<b>17</b>
2.2.1 Cultivares de <i>A. pintoi</i> .....	18
<b>2.3 Biologia Floral e Polinizadores.....</b>	<b>20</b>
<b>2.4 Sistemas de Reprodução e Taxa de Cruzamento.....</b>	<b>22</b>
<b>2.5 Marcadores Moleculares.....</b>	<b>24</b>
2.5.1 Marcadores Microssatélites.....	24
2.5.2 Avaliação da Taxa de Cruzamento com Marcadores Microssatélites.....	26
2.5.3 Estudos Moleculares no Gênero <i>Arachis</i> .....	27
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
<b>3.1 Seleção e Coleta do Material Vegetal.....</b>	<b>28</b>
<b>3.2 Coleta e Plantio de Sementes.....</b>	<b>29</b>
<b>3.3 Extração de DNA.....</b>	<b>30</b>
<b>3.4 Locos Microssatélites.....</b>	<b>30</b>
<b>3.5 Análises Estatísticas.....</b>	<b>31</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>32</b>
<b>4.1 Produção de Sementes e Germinação.....</b>	<b>32</b>
<b>4.2 Diversidade Genética das Matrizes.....</b>	<b>34</b>
<b>4.3 Taxa de Cruzamento.....</b>	<b>38</b>
4.3.1 Taxa de Cruzamento Natural de <i>A. pintoi</i> .....	38
4.3.2 Estimativa da Taxa de Cruzamento Individual.....	40
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>43</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>44</b>

# 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um país privilegiado por apresentar extensão territorial continental, com grande parte das terras cultiváveis, recursos hídricos abundantes e diferentes biomas, que o insere entre os países com a maior biodiversidade do planeta. Cerca de 20% do território é coberto por pastagens, e a maior parte do gado brasileiro é criada a pasto. Entre os fatores que afetam o preço do gado em cada região, as variações edafoclimáticas possuem destaque (ABIEC, 2015).

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2015), a produção nacional de carnes fornecerá, aproximadamente, 44,5% ao mercado mundial até 2020. Porém, dentre os fatores limitantes ao aumento da produtividade, o vigor e a qualidade das pastagens têm-se destacado.

Uma alternativa para amenizar esse problema é o cultivo de gramíneas consorciadas com leguminosas forrageiras. A utilização de leguminosas permite a incorporação de nitrogênio atmosférico ao sistema solo-planta-animal, através da ação de bactérias do gênero *Rhizobium*, presentes em nódulos nas raízes dessas plantas.

De acordo com o Balanço Social da Embrapa em 2013, aproximadamente, 42 milhões de hectares utilizados com cultivo de gramíneas associado com leguminosas recomendadas ou desenvolvidas pela Embrapa, o que gerou benefícios econômicos em torno de R\$ 8,9 bilhões por ano aos produtores brasileiros (EMBRAPA, 2013).

Dentre as leguminosas forrageiras, as espécies do gênero *Arachis*, conhecidas como amendoim forrageiro, tem-se destacado na utilização em pastagens por possuir alta rentabilidade e fornecer benefícios ambientais aos sistemas de produção (CARVALHO; PIRES, 2008).

No estado do Acre existem cerca de 138 mil hectares de pastagens consorciadas com amendoim forrageiro, o que equivale a aproximadamente 7,65% do total de área de pasto. O incremento da produtividade foi de 44% quando comparado às pastagens consorciadas com as pastagens formadas apenas por capim estrela. O ganho de peso animal foi de 600g/animal/dia. Além disso, a redução dos custos decorrente da fixação biológica de nitrogênio foi de aproximadamente R\$ 321,05 por hectare por ano (EMBRAPA, 2013).

A espécie *Arachis pintoi* tem sido destaque em pastagens consorciadas e está associada a um programa de melhoramento conduzido pela Embrapa Acre. A conservação de uma espécie em BAG tem por objetivo preservar a variabilidade genética, evitando a perda de

alelos. Para este fim, são coletados acessos silvestres e domesticados, visando obter uma representatividade de toda a variabilidade genética da espécie (BORÉM; MIRANDA, 2009). Atualmente o Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Acre possui 84 acessos da espécie *A. pintoi*.

O sistema reprodutivo define como os genes são transmitidos para a próxima geração, por isso, seu conhecimento é fundamental para estudos de conservação *ex situ* e melhoramento de plantas, pois permite delinear estratégias que aperfeiçoem a amostragem da variabilidade genética, além de nortear as melhores formas de multiplicação de sementes e os melhores modelos de melhoramento. Apesar disso, informações sobre a taxa de cruzamento no gênero *Arachis*, são limitadas a espécie *Arachis hypogaea*, o amendoim comum (COFFELT, 1989; KNAUFT et al.; 1992).

Baseado no sistema reprodutivo, as plantas podem ser classificadas em autógamas, alógamas e mistas. Os métodos tradicionais de determinação do sistema de reprodução consistem na observação dos cruzamentos, comportamento dos polinizadores, exame da morfologia floral e resultados de experimentos controlados de polinização (MORAES; MONTEIRO, 2002).

A determinação do sistema reprodutivo pode ser feita por meio de marcadores moleculares, que possuem muitos locos com alelos codominantes e segregantes, e são encontrados frequentemente nas populações, possibilitando a obtenção de estimativas mais efetivas da taxa de cruzamento (RITLAND; JAIN, 1981).

Os marcadores microssatélites (*Simple Sequence Repeats* – SSR), têm mostrado um grande sucesso em estudos de diversidade e variabilidade em plantas (HOSHINO et al., 2006; GIMENES et al., 2007; LEITE, 2008; PALMIERI et al., 2010; KALIA et al., 2011). SSRs são repetições curtas de um a seis nucleotídeos em sequência, que ocorrem no genoma de eucariotos e procariotos. Apresentam alto grau de polimorfismo, possibilitam a transferência de locos entre espécies diferentes, além da facilidade e eficiência do seu uso.

Estudos realizados com espécies do gênero *Arachis* têm observado a presença de polinizadores em suas flores (HAMMONS, 1963; NIGAM et al., 1990; KRAPOVICKAS; GREGORY, 1994; DRUMOND; CARDOSO, 2010; COSTA, 2012), porém ainda não foram realizados estudos para verificar a influência deles na taxa de cruzamento das espécies selvagens do gênero, utilizando marcadores microssatélites. O objetivo deste estudo foi estimar a taxa de cruzamento natural e a diversidade genética em acessos de *A. pintoi* utilizando marcadores microssatélites.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Gênero *Arachis*

O gênero *Arachis* foi descrito por Linnaeus (1753), considerando apenas o amendoim comum, *Arachis hypogaea*, que é o seu representante mais conhecido. É formado por espécies diplóides ( $2n = 2x = 20$ ) e tetraplóides ( $2n = 4x = 40$ ), pertencendo à família Fabaceae, subfamília Papilonoideae, tribo Dalbergieae e subtribo Stylosanthinae (JUDD et al. 2009; LEWIS et al. 2005).

Possui ocorrência natural apenas na América do Sul, estendendo-se do leste dos Andes, sul da Amazônia, norte da Planície Platina e nordeste da Argentina, até o nordeste do Brasil. Acredita-se que o centro de origem do gênero seja na serra de Amambaí, próximo a fronteira do Mato Grosso do Sul e o Paraguai, de onde se dispersou por um raio de mais de 4 mil quilômetros (KRAPOVICKAS; GREGORY, 1994).

Atualmente, o gênero *Arachis* está dividido em nove seções (*Arachis*, *Erectoides*, *Caulorrhizae*, *Extranervosae*, *Heteranthae*, *Procumbentes*, *Rhizomatosae*, *Trirectoides* e *Triseminatae*), de acordo com sua morfologia, modo de reprodução e modo de dispersão ao longo da América do Sul (KRAPOVICKAS; GREGORY, 1994; VALLS; SIMPSON, 2005).

A seção *Caulorrhizae* possui apenas duas espécies: *Arachis pintoii* e *Arachis repens* (Figura 1). São plantas perenes, com raízes axonomorfas sem engrossamentos, ramos estendidos, procumbentes, com entrenós ocos, folhas quadrifoliadas, frutos subterrâneos biarticulados e pericarpo liso (KRAPOVICKAS; GREGORY, 1994).



Fotos: Jônatas C. de Oliveira



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

## 2.2 *Arachis pintoi*

É uma espécie perene, que possui hábito de crescimento estolonífero e produz raízes nos nós. A espécie é exclusiva da flora brasileira, ocorrendo desde o Planalto Central, no estado de Goiás, até o litoral da Bahia (ASSIS, 2011).

Seu uso como forrageira tem crescido nos últimos anos, principalmente por sua prolificidade, altos teores de proteína e digestibilidade, elevada produção de forragem, excelente palatabilidade, resistência ao pastejo e ótima competitividade quando associado à outras gramíneas (NASCIMENTO, 2006; CARVALHO; PIRES, 2008).

O reconhecimento comercial da espécie surgiu primeiramente nos Estados Unidos e Austrália. Após estudos no Centro Internacional de Agricultura Tropical – CIAT, foi selecionado o acesso CIAT-17434, considerado altamente promissor em virtude das muitas características biológicas e agronômicas encontradas nesse acesso (VILLARREAL; VARGAS, 1996).

*A. pintoi* possui raiz pivotante, podendo atingir profundidade no solo de 0,3 a 1,6 m, proporcionando a absorção de água mesmo em condições menos favoráveis. As folhas podem variar do verde claro ao escuro, sendo compostas por quatro folíolos alternados (LIMA et al., 2003; MONTENEGRO; PINZÓN, 1997).

As flores são papilionáceas que se autopolinizam, mas também podem apresentar polinização cruzada por ação de espécies de abelhas. Após a fecundação, surge na base do ovário um meristema intercalar (pedúnculo do ovário, ginóforo ou “peg”), que possui

geotropismo positivo. Quando atinge o solo, enterra-se aproximadamente 10 cm abaixo da superfície, onde ocorre o desenvolvimento do fruto, que favorece a regeneração e a persistência da espécie (RINCÓN et al., 1992; VALLS et al., 1994; MONTENEGRO; PINZÓN, 1997). O fruto apresenta normalmente uma semente, estando contida em uma vagem indeiscente, classificada como cápsula (RINCÓN et al., 1992).

A espécie se estabelece em clima tropical e subtropical, com temperaturas em torno de 25-30°C, precipitação anual maior que 1500 mm e menos de quatro meses de seca, e em altitudes até 1800 m (MONTENEGRO & PINZÓN, 1997; RINCÓN et al., 1992). As principais dificuldades enfrentadas por *A. pinto* em clima subtropical são a umidade elevada e as baixas temperaturas durante o inverno, sendo necessário o estabelecimento de espécies hibernais durante o verão, para suprir a deficiência de forragem (NASCIMENTO, 2006).

A propagação do amendoim forrageiro pode ser feita de forma sexuada, através do plantio das sementes, e assexuada, pela propagação dos estolões (PEREZ, 1999; VALENTIM et al., 2000). A principal dificuldade para o uso em larga escala da espécie é a forma de propagação, pois os estolões, que são a principal forma de propagação, têm estabelecimento mais lento do que as sementes, mas alguns acessos produzem uma quantidade muito pequena de sementes, além da dificuldade para colheita das sementes (FISHER; CRUZ, 1994).

Valentim et al. (2003) comentam que outros fatores podem influenciar no estabelecimento do amendoim forrageiro, dentre os quais destacam-se: a forma de preparo da área, tipo do solo, disponibilidade de água no solo, densidade de plantio, viabilidade das sementes ou mudas, incidência de plantas invasoras e tratos culturais.

### 2.2.1 Cultivares de *A. pinto*

A cultivar Amarillo MG - 100 foi a primeira a ser lançada. Foi obtida a partir do primeiro acesso de *A. pinto* coletado em 1954, chegando até o CIAT, onde recebeu a identificação CIAT 17434. A partir daí, foi levada à Austrália, onde foi lançada com o nome de cultivar Amarillo, em virtude das muitas características biológicas e agrônômicas encontradas. Esse genótipo foi liberado comercialmente na Colômbia em 1992 (Maní Forrajero Perene), no México e Honduras em 1993 (Pico Bonito), na Costa Rica em 1994 (Maní Mejorador), e no Brasil em 1995 (Matsuda Genética 100), onde recebeu o BRA 013251 (VALLS, 1992; BARCELLOS et al., 2000).

A cultivar Alqueire 1 foi obtida de forma diferente das demais. Alguns acessos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia foram enviados para a Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Após a introdução, poucos acessos sobreviveram, os quais foram agrupados em um único canteiro demonstrativo para aula prática, perdendo as respectivas identificações. Em 1992, foram levadas a campo 100 plantas recém germinadas, para a Fazenda Alqueire, município de Rio Pardo, RS, onde foram testadas. As plantas apresentaram resistência natural às geadas severas, em virtude do inverno, e alta resistência ao pastejo. A cultivar foi lançada no mercado pela UFRGS, com apoio da EMATER e IVOMECA Gold. Apresenta produção de 8 a 10 t.ha<sup>-1</sup>.ano<sup>-1</sup> de matéria seca e valor nutritivo superior as demais leguminosas forrageiras, com 23% de proteína bruta e 72% de digestibilidade (NASCIMENTO et al., 2003).

A cultivar Belomonte foi lançada no Brasil em 1999, tendo sua propagação por estolões, uma vez que possui baixa produção de sementes (PEREIRA et al., 1999; PAGANELLA; VALLS, 2002). Em estudos realizados no estado do Acre, a cultivar Belomonte apresentou uma produção de matéria seca em torno de 15 a 21 t.ha<sup>-1</sup>.ano<sup>-1</sup>, cerca de 19% de proteína bruta e 60 a 70% de digestibilidade, além possuir uma boa compatibilidade em consorciação com gramíneas, apresentando peso vivo dia maior do que o monocultivo de gramínea adubada com nitrogênio (VALENTIM et al., 2000; 2001).

A cultivar BRS Mandobi foi obtida por meio de seleção massal, através de uma rede de avaliação de acessos instalada em 1999 (ASSIS; VALENTIM, 2009). Foi registrada em 2008 no Registro Nacional de Cultivares, e foi protegida segundo as normas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento em 2011 (BRASIL, 2011). É uma cultivar bem adaptada a região tropical e equatorial, com boa produtividade de biomassa, bom estabelecimento, boa tolerância a solos bem drenados ou com baixa permeabilidade (ASSIS, 2011). Entretanto, a principal característica dessa cultivar é a elevada produção de sementes, aproximadamente 3 t.ha<sup>-1</sup> de sementes puras, após 18 a 21 meses de plantio, o que a coloca como uma alternativa para a redução de custo do plantio do amendoim forrageiro pelos produtores, pois a cultivar Amarillo MG-100 tem um elevado custo por quilo, quando comparado com a cultivar BRS Mandobi (ASSIS et al., 2013).

### 2.3 Biologia floral e polinizadores

A espécie *Arachis pintoii* apresenta flores papilionáceas sésseis, originárias de inflorescências axilares em forma de espigas contendo até 8 flores. As flores possuem cálice bilabiado pubescente, com lábio inferior simples e um lábio superior amplo, com quatro dentes pequenos no ápice, resultante da fusão de quatro sépalas (ARGEL; PIZARRO, 1992). A corola possui variação de cor (branca, creme, amarela e laranja) sendo formada por um estandarte que possui quilha pontiaguda, curvada e aberta ventralmente na base, muito delgada (ARGEL; PIZARRO, 1992; SIMPSON et al., 1994; ASSIS et al., 2010).

Foto: Jônatas C. de Oliveira



Figura 2 - Flor de *A. pintoii*. \*: Estandarte; seta: asa.

O estilete ultrapassa as anteras, após a ocorrência da antese, captando o pólen que ficou reunido no estigma. O pólen é liberado primeiro pelas anteras oblongas, enquanto que os estames menores abrem suas anteras oblatas, as quais por alongamento dos filetes ocasionam a abertura e liberação do pólen, que movido para cima, alcança o estigma (PERIASAMY; SAMPOORNAM, 1984; COSTA, 2012). O estigma é bilobado com presença de papilas na cavidade estigmática. Peñaloza (1995) em estudo com diferentes acessos de *A. pintoii* observou que podem ocorrer gradações de quantidade e densidade de tricomas no bordo do estigma. Suas flores são frágeis, murcham e perdem a coloração, aproximadamente, seis horas após a antese, que ocorre por volta de 6 horas da manhã, com pico da floração entre 8h15 às 12h00, nos meses de novembro a meados de abril (COSTA, 2012).

Segundo Costa (2012), a presença de flores chamativas indica a evolução de caracteres florais visando favorecer a visita de insetos. Os principais visitantes das flores de *A. pintoii* são

himenópteros e coleópteros, como *Paratrigona lineata*, *Apis mellifera*, *Diabrotica* sp, *Cerotoma* sp, *Pheidole* sp, *Camponotus* sp, *Trigona spinipes*, *Acyloscelis* sp e *Centris* sp.

Apesar de algumas peculiaridades, o comportamento dos insetos que visitam as flores é parecido. Eles pousam nas pétalas das asas da flor, e após coletarem o pólen o transferem para o terceiro par de patas, voando em seguida para outra flor e repetindo o processo (NIGAM et al., 1990; COSTA, 2012).

Dentre as abelhas que visitam as flores, *P. lineata* possui comportamento agressivo. Ao pousar na flor, ela força sua entrada abrindo um orifício, cortando as pétalas das asas e quilhas, juntamente com o estigma e parte do filete. Com isso, impossibilita a formação do fruto e do “peg” (NIGAM et al., 1990; COSTA, 2012).

Foto: Jônatas C. de Oliveira



Figura 3. *Apis mellifera* coletando pólen em flor de *Arachis pintoi*.

Segundo Nigam et al. (1990), a espécie *A. hypogaea* é autógama, porém cerca de 10% das flores têm polinização cruzada, em decorrência da visita de insetos como *Apis mellifera* e membros do gênero *Bombus*, *Megachiline*, *Nomia*, *Pithitis* e *Lasioglossum*.

Em estudo realizado por Drumond e Cardoso (2010), foram coletados 559 insetos que visitavam as flores de *Arachis* no BAG da Embrapa Acre, dos quais a espécie *Trigona chanchamayoensis* (SCHWARZ, 1948), correspondeu a 62,8% dos indivíduos coletados. Ainda segundo os autores, durante uma observação foi possível identificar a espécie *Exomalopsis auropilosa* abrindo as pétalas da asa da flor, forçando a quilha e, conseqüentemente, entrando em contato com o estigma.

Em sua busca por pólen, esses insetos podem tanto preda as flores impedindo a produção dos frutos e do “peg”, como também contribuir para a polinização, mesmo que indiretamente, proporcionando a autopolinização da flor.

Diversos autores confirmam a presença de polinizadores nas flores de *Arachis* (HAMMONS, 1963; NIGAM et al., 1990; KRAPOVICKAS; GREGORY, 1994; DRUMOND; CARDOSO, 2010; COSTA, 2012), entretanto ainda não foi realizado um estudo para verificar, efetivamente, a influência da presença de polinizadores sobre a taxa de cruzamento de espécies silvestres do gênero *Arachis*.

## 2.4 Sistemas de Reprodução e Taxa de Cruzamento

O conhecimento do sistema de reprodução é essencial, pois determina o modo como os genes serão transmitidos para a próxima geração (BROWN, 1989), afetando não somente as frequências genótípicas das gerações subsequentes, mas também parâmetros genéticos como tamanho populacional, fluxo gênico e seleção (HAMRICK, 1990). Por esse motivo o sistema reprodutivo orienta as práticas adotadas na condução eficiente dos programas de melhoramento, conservação e manejo de espécies.

As plantas podem ser divididas em: alógamas, que possuem, principalmente, polinização cruzada; plantas autógamas, que são, predominantemente, autopolinizadas; e plantas mistas formadas por aquelas que possuem um sistema intermediário, mas apresentando tendência para um dos lados.

As plantas alógamas são altamente heterozigotas e, praticamente em sua totalidade, apresentam deterioração do vigor e outros efeitos adversos, quando submetidas à endogamia. Já as plantas autógamas são altamente homozigotas, originando-se de cruzamentos entre linhagens altamente aparentadas. Mesmo convivendo próximas, ou até mesmo lado a lado, permanecem mais ou menos independentes na reprodução (ALLARD, 1971; RAMALHO et al., 2012).

Em espécies hermafroditas, o sistema de cruzamento é determinado por fatores genéticos como autoincompatibilidade, que é a incapacidade de uma planta fértil ser fecundada pelo mesmo pólen, e por fatores ecológicos como movimentação de polinizadores, fenologia do florescimento e densidade populacional (MURAWSKI; HAMRICK; 1991).

A taxa de cruzamento, que consiste na proporção de progênies obtidas por autopolinização e polinização cruzada, era determinada através de marcadores morfológicos. Através da substituição por marcadores moleculares, foi possível obter estimativas mais precisas, pois muitos locos com alelos co-dominantes e segregantes são encontrados

frequentemente nas populações (RITLAND; JAIN, 1981). Além disso, a taxa de cruzamento indica que procedimentos são necessários para evitar uma possível contaminação nos materiais genéticos. As taxas de cruzamento de espécies do mesmo grupo podem variar. Segundo Allard (1971), mesmo entre variedades da mesma espécie podem ocorrer grandes variações nas proporções de cruzamentos.

Coffelt (1989) avaliou a taxa de cruzamento natural, com o uso de marcadores morfológicos, em dois genótipos de *A. hypogaea*. Após três anos de avaliações, e mais de cinco mil progênies avaliadas, o autor encontrou uma taxa de cruzamento média de 1,9%, indicando que *A. hypogaea* é uma espécie autógama.

Dutta et al. (1986) avaliaram a herança da polinização cruzada em seis genótipos de *A. hypogaea*, pertencentes aos subgrupos Virginia e Valência, através da indução de mutações por raios Gama. O genótipo que apresentou maior taxa de cruzamento foi “M13”, com 20,8%. Entretanto, não foi possível concluir nesse estudo se a elevada taxa de polinização cruzada foi influenciada ou não pelas mutações causadas pelos raios Gama.

Knauft et al. (1992) trabalharam com acessos da cultivar Valência de *A. hypogaea*. Esperava-se que após 21 gerações de autopolinização, a cultivar fosse autógama restrita. Porém, ainda foram encontradas taxas de cruzamento que variaram de 1,5 a 8%. A partir desse trabalho, os autores sugeriram um aumento na distância entre as parcelas do BAG, para evitar a polinização cruzada.

Angelici et al. (2008) observaram em seu estudo de diversidade genética da secção *Rhizomatozae*, que *Arachis glabrata* apresentou uma frequência de locos heterozigotos maior do que o esperado para espécies do gênero *Arachis*. Valls (1996) comenta que essa espécie produz uma menor quantidade de sementes quando isolada em casas de vegetação do que no ambiente aberto, fazendo da propagação vegetativa o principal meio de multiplicação. A produção de sementes em menor quantidade, ou mesmo a ausência delas, pode estar relacionada a sistemas de autoincompatibilidade (COOK; CROSTHWAITE, 1994; FRENCH et al., 1994), pois a viabilidade de pólen em *A. glabrata* aparenta ser alta, não sendo um obstáculo para a produção de sementes (NILES; QUESENBERRY, 1992).

Hammons (1963) avaliou a viabilidade do pólen de *A. hypogaea* coletado de abelhas. Foi realizada a polinização artificial em flores emasculadas, das quais 66% foram fertilizadas, o que indica que o pólen coletado das abelhas é viável e capaz de proporcionar a polinização cruzada.

Não foram encontrados estudos avaliando a taxa de cruzamento em espécies silvestres do gênero *Arachis* e em especial, *Arachis pintoi*. Entretanto, por apresentar flores chamativas

e presença de polinizadores em suas flores, espera-se que esses fatores possam ter alguma influência na taxa de cruzamento de *A. pintoii*.

## 2.5 Marcadores Moleculares

Cada vez mais os marcadores moleculares têm-se mostrado uma ferramenta útil nos estudos genéticos, pois possibilitam o acesso do polimorfismo ao nível de DNA, independentemente da influência ambiental.

Os marcadores disponíveis atualmente atendem as diversas necessidades dos pesquisadores em estudos com genética de plantas, favorecendo os laboratórios com maior ou menor estrutura, destacando-se: a) marcadores de hibridação – (*Restriction Fragment Length Polymorphism* – RFLP, BOTSTEIN et al., 1980); b) marcadores à base de PCR – RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (WILLIAMS et al., 1990); AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (VOS et al., 1995); SSR (*Simple Sequence Repeats*) (HAMADA et al., 1982; TAUTZ; RENZ, 1984); SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*) (WANG et al., 1998).

As aplicações dos marcadores moleculares em estudos de genética de plantas são variadas, como: determinação da diversidade genética de uma população, identificação de linhagem parental e teste de paternidade, certificação de pureza genética, proteção e identificação de cultivares, caracterização de germoplasma, mapeamento genético, identificação de QTLs (locos de caracteres quantitativos).

### 2.5.1 Marcadores Microsatélites

São conhecidos como STR (*Short Tandem Repeats*) ou SSR (*Simple Sequence Repeats*). Consistem de repetições de um a seis nucleotídeos com extensão de até 100 pares de bases que ocorrem em todos os organismos. Essas sequências estão distribuídas por todo o genoma, sendo flanqueadas por sequências altamente conservadas, a partir das quais são desenhadas as sequências de iniciadores (*primers*) que amplificam a região microsatélite via PCR (BORÉM; CAIXETA, 2009; RAMALHO et al., 2012).



As sequências de repetições mais comuns em plantas são  $(AT)_n$ ,  $(GT)_n$  e  $(AG)_n$ , sendo que em animais  $(AC)_n$  é a mais frequente. Os microssatélites podem ser classificados em: repetições perfeitas, quando não possuem nenhuma interrupção  $(ATATAT)_n$ ; repetições imperfeitas, quando apresentam bases não repetidas interrompendo os motivos  $(ATATCATAT)_n$ ; repetições simples, quando ocorre apenas uma classe de repetição  $(ATAT)_n$ ; repetições compostas, quando ocorre duas ou mais classes de repetições  $(ATAC)_n$ . As repetições simples e compostas podem ser perfeitas ou imperfeitas (WEBER, 1990; JARNE; LAGODA, 1996; WANG et al., 2009).

Os microssatélites são originados a partir de emparelhamento desigual das fitas de DNA (*crossing-over* desigual) ou erro da DNA polimerase durante a replicação (*slippage*). Esses fatores fazem com que o tamanho das unidades repetitivas varie dentro da população, possibilitando que cada fragmento microssatélite tenha comprimento diferente, que podem ser identificados em eletroforese. Em estudo realizado por Buteler et al., (1999) e Hu et al., (2004), foi observado que essas variações ocorrem não somente nas unidades repetitivas, mas também podem ocorrer deleções/adições e substituições de bases nas regiões flangeadoras. Este fator permite que os microssatélites sejam um dos marcadores com maior variabilidade alélica.

Vários trabalhos têm demonstrado que microssatélites desenvolvidos para uma espécie podem ser utilizados com sucesso em outras espécies (HU et al., 2004; BRAVO et al., 2006; HOSHINO et al., 2006; GIMENES et al., 2007; PALMIERI et al., 2010), além da expansão de seu uso em estudos de genética de populações, manutenção e conservação de fontes biológicas e em estudos forenses (JARNE; LAGODA, 1996; ZANE et al., 2002).

Entretanto, o desenvolvimento de microssatélites ainda é limitado às espécies com maior interesse econômico. Isto porque para o seu desenvolvimento, é necessário que eles sejam isolados para cada espécie a partir de uma biblioteca genômica, impedindo o uso de marcadores universais (BORÉM; CAIXETA, 2009). Apesar desse “gargalo”, após o seu desenvolvimento essa desvantagem é compensada pela eficiência e facilidade do uso desses marcadores.

Foram desenvolvidos aproximadamente três mil marcadores microssatélites para o 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). Porém, a maioria deles foi obtida para o amendoim comum (*A. hypogaea*), em virtude de sua grande importância econômica. Estão disponíveis cerca de 25 locos microssatélites desenvolvidos para *A. pintoi*

(PALMIERI et al., 2002; 2005; 2010), os quais possuem elevado grau de polimorfismo e transferibilidade entre espécies do gênero *Arachis*, permitindo estudos intra e interespecíficos.

### 2.5.2 Avaliação da Taxa de Cruzamento com Marcadores Microsatélites

Apesar dos avanços na área molecular, existem poucos trabalhos de taxa de cruzamento em plantas autógamas e mistas. Sousa et al. (2012) estudaram a taxa de cruzamento de *Calopogonium mucunoides*, conhecida como autógama, e utilizaram marcadores microsatélites. A taxa de fecundação cruzada encontrada foi de 16,3%, apontando para um sistema de cruzamento misto com predominância de autogamia.

Maas e Torres (1992) avaliaram a taxa de cruzamento em *Centrosema brasilianum* utilizando marcadores morfológicos e encontraram valores que variaram de 31,2% a 53,5% de polinização cruzada. Sousa et al. (2011) analisaram a taxa de cruzamento em *Centrosema pubescens* utilizando marcadores microsatélites e encontraram 26,9% de polinização cruzada para essa espécie, sugerindo um sistema misto com predominância de autogamia.

Santos-Garcia et al. (2010) avaliando a taxa de cruzamento em *Stylosanthes guianensis* e *Stylosanthes capitata* utilizando marcadores microsatélites, encontraram valores de taxa de cruzamento de 26% e 31%, respectivamente. Esses valores foram superiores aos valores encontrados na literatura utilizando marcadores morfológicos, os quais relatavam valores que variavam de 14% a 20% (Miles, 1983; 1985), dependendo do marcador morfológico analisado.

Em feijão-fava, as taxas de cruzamento avaliadas por microsatélites foram de aproximadamente 38%, resultado superior aos valores encontrados com base em marcadores morfológicos, os quais variaram de 3,2% a 24,2% (PENHA, 2014).

Esses estudos têm confirmado a eficiência dos marcadores microsatélites na determinação da taxa de cruzamento em espécies vegetais. Além disso, a precisão dos resultados, a quantidade de marcadores disponíveis e a facilidade do uso dos marcadores têm sido alguns dos fatores que proporcionam a sua aplicação em estudos genéticos.

### 2.5.3 Estudos Moleculares no Gênero *Arachis*

Estudos realizados com marcadores RAPD em *Arachis hypogaea* e outras espécies da secção *Arachis* identificaram variabilidade genética entre espécies e variedades, permitindo fazer o agrupamento das mesmas a partir da proximidade genética, corroborando com os estudos de classificação morfológicos (HILU; STALKER, 1995; CRESTE et al., 2005; BORGES et al., 2007).

Na secção *Caulorrhizae*, foram realizados estudos com RAPD para determinar a distância genética entre as espécies *A. pintoi* e *A. repens*. Entretanto, Gimenes et al. (2000) identificaram cerca de 74% do total de fragmentos compartilhados entre as duas espécies, o que dificultou a separação entre as duas espécies. Em análise realizada com 34 acessos por Carvalho et al. (2010), utilizando RAPD, observou-se grande variabilidade genética dentro do germoplasma de *A. pintoi* nos Estados Unidos.

Em estudo realizado por Tang et al. (2008) e Angelici et al. (2008) utilizando microssatélites, foi possível verificar a relação filogenética e a diversidade genética entre espécies de diferentes secções do gênero *Arachis*. Os autores comentam que uma das vantagens dos microssatélites é a possibilidade de transferência entre espécies das diferentes secções do gênero.

A transferência de locos entre espécies do gênero *Arachis* tem permitido acessar a variabilidade genética existente no germoplasma. Vários locos têm mostrado polimorfismo para diferentes espécies, o que tem favorecido os estudos moleculares no gênero *Arachis*. Dentre esses, alguns autores comprovaram a transferência de locos de outras espécies (*A. hypogaea* e *A. glabrata*) para as espécies da secção *Caulorrhizae* (HOSHINO et al., 2006; GIMENES et al., 2007; PALMIERI et al., 2010; LEITE, 2008).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Seleção e Coleta do Material Vegetal

O estudo foi desenvolvido no Centro de Pesquisa Agroflorestral do Acre – Embrapa Acre, localizado na BR 364. As análises foram realizadas com 20 famílias, compostas pelas matrizes (genitores maternos) e as sementes germinadas (progênes). As matrizes foram 16 acessos e quatro cultivares do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Acre (Tabela 1), as quais vêm sendo avaliadas no programa de melhoramento de *Arachis pintoi*. De cada uma das matrizes, foi retirado apenas um estolão (Figura 4A), que foi plantado em vasos de 1,0 x 0,90 m, preenchidos com solo (Figura 4B). Os vasos ficaram dispostos próximos ao BAG, para favorecer o fluxo natural de pólen por meio dos insetos polinizadores. O plantio foi feito em dezembro de 2012.

Tabela 1 - Acessos de *Arachis pintoi* selecionadas como matrizes (genitores maternos).

Identificação LabMol	BRA	Nº do coletor/Cultivar	Identificação LabMol	BRA	Nº do coletor/Cultivar
1	14931	V 6727	11	30325	V 13196 = V 13110
2	37036	Alqueire 1	12	30601	V 13198
3	39985	V 14951	13	31097	V 6791wf
4	30333	V 13330	14	31828	Belomonte
5	14991	V 6741	15	39772	Sv 8311
6	15083	V 6784	16	30384	W 1000 = V 13153
7	15253	W 34	17	40550	BRS Mandobi
8	34142	W 647	18	13251	Amarillo MG-100
9	12122	V 5895	19	34355	V 13888
10	14982	V 6740	20	31143	W 34 (B)

As observações dos vasos foram feitas duas vezes por semana, para avaliar o desenvolvimento das plantas e retirada de invasoras, além de irrigação, quando necessário. Foi estabelecida uma frequência de irrigação de três vezes por semana. Também foram feitas podas dos estolões, o que auxiliou na maior produção de flores.

Para assegurar uma maior produção de sementes foi feita uma poda, deixando a parte vegetativa com aproximadamente 2 cm de altura, e suspensa a irrigação, com o objetivo de

causar um estresse hídrico nas plantas. Após ser observada a perda de água do solo e da planta durante um período de aproximadamente duas semanas, foi restabelecida a irrigação, para estimular a produção de flores.

Fotos: Jônatas C. de Oliveira

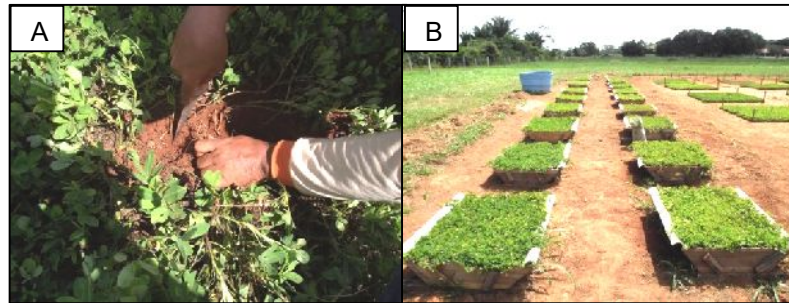


Figura 4 - Seleção e coleta dos estolões de *Arachis pintoi* (A), vasos com *A. pintoi* (B).

### 3.2 Coleta e Plantio de Sementes

A coleta de sementes foi realizada após oito meses do plantio dos estolões, em agosto de 2013. Devido à baixa produção de sementes esperada em algumas famílias, foi feito o replantio de todas as parcelas, logo após a retirada do solo e sua substituição nos vasos. Após sete meses, foi feita nova coleta de sementes e o descarte das matrizes.

O solo coletado foi lavado (Figura 5A), para separação das sementes, e as mesmas foram armazenadas em uma sala da Embrapa Acre à temperatura ambiente (média de 27°C) durante dois meses, para ocorrer o início do processo de quebra natural da dormência. Posteriormente, foram tomadas aleatoriamente 60 sementes de cada família, e aplicado outro tratamento de quebra de dormência, ficando sete dias em estufa à 50°C com circulação forçada de ar, e depois 16 horas imersas em Ethrel 0,5%.

As sementes foram plantadas em copos plásticos de 200 mL com areia autoclavada, para evitar a contaminação por fungos e parasitas (Figura 5B). Cada copo foi identificado com uma placa, contendo o número da família seguido do número do indivíduo (Figura 5C). Esse padrão de identificação foi mantido até o final do experimento.

Fotos: Jônatas C. de Oliveira



Figura 5 - Lavagem das sementes (A); sementes germinadas de *A. pintoi* em casa de vegetação (B); detalhe da germinação e identificação (C).

### 3.3 Extração de DNA

Foram coletadas folhas jovens, das matrizes e progênies, em envelopes confeccionados com tela, os quais foram devidamente identificados. O material foi armazenado em gelo até o transporte para o Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular (LabMol) da Embrapa Acre. As amostras foram liofilizadas por quatro dias, e armazenadas em freezer, a temperatura média de  $-18^{\circ}\text{C}$ . O DNA genômico total foi extraído usando o protocolo descrito por Hoisington et al. (1994) modificado. A quantificação do DNA foi feita em agarose (1%).

### 3.4 Locos Microsatélites

Foram selecionados oito locos microsatélites (Tabela 2), os quais foram desenvolvidos por Palmieri et al. (2002), Hoshino et al. (2006) e Gimenes et al. (2007), conforme Tabela 2.

As reações de amplificação dos fragmentos de DNA foram feitas com 7,5 ng de DNA genômico; tampão 1x; 0,25 mM de dNTP's; 0,25 mg/mL de BSA (Albumina Sérica Bovina); 2,0 mM de  $\text{MgCl}_2$ ; 0,8  $\mu\text{M}$  de cada primer e 1 U de *Taq polimerase* (Thermo Scientific).

As ampliações foram realizadas utilizando termociclador (Analitikjena). As etapas de amplificação foram compostas de: 95°C por 5 minutos, 94°C por um minuto, 30 ciclos de 94°C por um minuto, temperatura de anelamento definida para cada iniciador (Tabela 2) por um minuto, 72°C por 1 min, e uma fase final de extensão de 72°C por 5 minutos. Os produtos da amplificação foram visualizados em gel de agarose 3%.

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)
Ah7	F: CAGAGTCGTGATTTGTGCACTG R: ACAGAGTCGGCCGTCAAGTTA	52,1	97-122
Ah21	F: CTTGGAGTGGAGGGATGAAA R: CTCACACTCGCACCTAACC	50,2	100-135
Ap175	F: CCAATAGGCTAATTCAGAAGG R: GCCTTATTTTGC GACTGAGG	58,5	174-230
Ap176	F: CCAACACAGGGCTTACCAAG R: TCACCGATCCCACTTTTCC	55,4	194-246
Ag39	F: TGTAGTCAGCTGCTCCAAAA R: ATGAAAGTTCACTTGAGCAAA	52,1	150-190
Ag140	F: TGACCGTTGGGGTTTTG R: CAAACCCAAACACACGTCAC	50,2	164-191
Ap40	R: GTCAAGTGCTTCCTCCGATG F: CTGTTTGATCGCCGCTATG	50,2	164-220
Ah11	R: TTCCACCAAGGCAAGACTATG F: AAATAATGGCATACTTGTGAACAATC	57,3	140-204

### 3.5 Análises Estatísticas

Para a análise do sistema reprodutivo, foram selecionadas 14 famílias, sendo estabelecido um mínimo de 40 filhos para cada uma das famílias. Os genótipos Alqueire 1, V 14951, V 13330, V 6741, Sv 8311 e W 34b não foram utilizados, pois as estimativas foram priorizadas para famílias que apresentaram tamanho amostral adequado. As cultivares Belomonte e BRS Mandobi, apesar de não terem apresentado o padrão mínimo de produção de sementes foram mantidas devido o interesse da informação para o programa de melhoramento. A taxa de cruzamento foi avaliada com base no modelo de cruzamento misto (RITLAND; JAIN, 1981), com o auxílio do programa MLTR (*Multilocus Mating System*

*Program*) (Ritland, 2002), no qual foram estimados os seguintes parâmetros: taxa populacional de cruzamento multiloco ( $t_m$ ), taxa populacional de cruzamento loco simples ( $t_s$ ), taxa de cruzamento entre aparentados ( $t_p = t_m - t_s$ ), coeficiente de endogamia na geração maternal ( $F_m$ ), correlação de paternidade ( $r_{p(m)}$ ), correlação de  $t$  entre progênies ( $r_t$ ) e correlação de  $t$  entre os locos ( $r_{ta}$ ).

O número de doadores de pólen para cada progênie ( $1/r_{p(m)}$ ) foi estimado seguindo a metodologia descrita por Ritland (1989). As variâncias das estimativas foram encontradas pelo método *Bootstrap*, cujas plantas dentro das famílias foram as unidades de reamostragens, obtendo-se, então, os desvios padrão a 95% de intervalo de confiança e, com isso, a significância dos índices das taxas de cruzamento.

Foram avaliados os seguintes parâmetros de diversidade genética: heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) e heterozigosidade observada ( $H_o$ ), número de alelos por loco, conteúdo de polimorfismo (PIC) pelo programa *Tools for Population Genetic Analyses* – TFPGA, versão 1.3 (MILLER, 1997). Foi calculada a distância modificada de Rogers a partir da qual foi realizado um agrupamento pelo método UPGMA.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Produção de Sementes e Germinação

A produção de sementes variou entre as famílias analisadas (Tabela 3). Foi observada uma inesperada baixa produção em alguns acessos, como no caso do BRS Mandobi, anteriormente caracterizado por Assis (2013) como um destaque na produção de sementes. O mês do plantio pode ter interferido na quantidade de sementes produzidas, pois o mês de dezembro é considerado como um período de maior dificuldade para estabelecimento da cultivar e, conseqüentemente, afetando na produção de sementes nos meses posteriores (ASSIS, 2011).

Amarillo MG-100 foi o maior produtor de sementes (915 sementes), seguido do W 34, com 795 sementes. Em estudo realizado por Damé et al. (1998) ao avaliar sete acessos em *A. pintoi* foi observada uma grande variação na produção de sementes, sendo que a cultivar Amarillo MG-100 também apresentou a maior produção de sementes. Variações na produção



têm sido observadas em vários estudos (CARVALHO, 1996; ANDRADE; KARIA, 1997; DAMÉ et al., 1998; PIZARRO, 2001b; ROJAS et al., 2005), exemplificando que a produtividade de sementes é fruto da interação do genótipo com o ambiente.

Tabela 3 - Quantidade de sementes produzidas por família, sementes plantadas, número de progênies obtidas e taxa de germinação.

Famílias	Nº do coletor/Cultivar	Nº de sementes	Sementes plantadas	Nº progênies	Taxa germinação (%)
1	V 6727	392	59	42	71,2
2	Alqueire-1	38	38	18	47,4
3	V 14951	399	61	30	49,2
4	V 13330	663	60	3	5
5	V 6741	69	62	24	38,7
6	V 6784	249	61	43	70,5
7	W 34	795	60	45	75
8	W 647	127	86	40	46,5
9	V 5895	406	60	56	93,3
10	V 6740	149	102	45	44,1
11	V 13196 = V 13110	455	120	64	53,3
12	V 13198	231	118	55	46,6
13	V 6791wf	593	61	50	82
14	Belomonte	10	10	2	20
15	Sv 8311	46	46	15	32,6
16	W 1000 = V 13153	463	63	48	76,2
17	BRS Mandobi	55	55	8	14,5
18	Amarillo MG-100	915	60	46	76,7
19	V 13888	643	61	47	77
20	W 34 (B)	73	73	26	35,6
<b>Total</b>		<b>6771</b>	<b>1316</b>	<b>707</b>	<b>53,7</b>

Belomonte produziu a menor quantidade de sementes (10 sementes). Este resultado era esperado para essa matriz, uma vez que ela é propagada por estolões por usualmente apresentar baixa produção de sementes (PAGANELLA; VALLS, 2002; PEREIRA et al., 1999). Um fator que pode interferir na produção de sementes dessa cultivar é a autoincompatibilidade, comportamento que ainda precisa ser melhor estudado, uma vez que foi observado presença de flores em número semelhante aos demais genótipos. Em *A. glabrata*, Angelici et al. (2008) apresentaram a suspeita da ocorrência desse mecanismo de

autoincompatibilidade, o que justificaria a baixa produção de sementes, ou mesmo a ausência delas.

A taxa de germinação variou entre as famílias, onde a família 9 (V 5895) apresentou a maior taxa (93,3%). A menor taxa de germinação ocorreu na família 4 (V 13330), com 5%. Carrega et al. (2011) observaram variações na taxa de germinação em virtude da quebra de dormência das sementes. Segundo esses autores, a utilização do etileno garantiu melhores resultados (74,5%) de germinação das sementes. Apesar da utilização do etileno no processo de quebra de dormência e tratamento pré-germinativo, a taxa de germinação em algumas famílias foi inferior ao encontrado por Carrega et al. (2011).

Alguns fatores podem ter influenciado na formação das sementes. Um desses fatores foi um ataque de ácaros ao BAG e aos vasos, que causou morte significativa da parte vegetativa dos acessos. Com isso, os acessos deixaram de produzir flores durante o período de recuperação. Pizarro (2001a) descreveu que desfolhar drasticamente a pastagem aproximadamente seis meses após o plantio, reduz significativamente a produção de sementes. Durante o período da germinação das sementes em casa de vegetação, foi observado o ataque de ácaros e fungos, o que pode ter interferido na germinação das sementes, além de causar o enfraquecimento e morte de plântulas recém-germinadas.

## 4.2 Diversidade Genética das Matrizes

A análise de oito marcadores microsatélites polimórficos em 14 acessos detectou um total de 65 alelos, com média de 8,1 alelos/loco (Tabela 4). Otto (2007) utilizando 14 locos microsatélites encontrou um total de 85 alelos em aproximadamente 70 genótipos, com média de 8,5 alelos/loco. Palmieri et al. (2010) utilizaram 20 locos microsatélites e encontraram 174 alelos em 33 acessos de *A. pintoii*, com média de 9,2 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 está relacionado ao maior número de locos e genótipos utilizados.

Os valores de PIC (Conteúdo de Informação de Polimorfismo) variaram de 0,518 (Ap40) a 0,901 (Ag39), com média de 0,762 (Tabela 4). De acordo com a classificação de Botstein et al. (1980), marcadores com valores de PIC superiores a 0,5 são considerados altamente informativos. O loco Ag 39 (Figura 6), que destacou-se por apresentar o maior

valor de PIC, foi desenvolvido a partir de uma sequência de *Arachis glabrata*. Esse valor elevado de PIC deve-se ao fato de que as sequências flangeadoras do motivo microssatélite são conservadas mesmo em outras espécies dentro do gênero *Arachis*, ocorrendo variação somente no motivo repetido. Valor similar foi encontrado por Azêvedo (2014), utilizando o loco Ag39 observou valor elevado de PIC (0,92), indicando que este loco é altamente informativo e transferível entre espécies correlacionadas.

Tabela 4 - Caracterização dos locos quanto ao número de alelos por loco, heterozigosidade esperada ( $H_e$ ), heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) para as 14 matrizes.

Loco	Nº de Alelos	$H_e$	$H_o$	PIC
Ap40	6	0,537	0,571	0,518
Ah11	8	0,788	0,929	0,760
Ag39	15	0,934	0,857	0,901
Ah07	5	0,675	0,857	0,651
Ah21	6	0,828	1,000	0,799
Ap175	8	0,847	0,714	0,816
Ap176	8	0,870	0,929	0,839
Ag140	9	0,786	0,839	0,809
Média	8,125	0,790	0,830	0,762
Total	65	-	-	-

Foto: Jônatas C. de Oliveira



Figura 6 - Perfil do loco Ag 39 em gel de poli-acrilamida (5%) com a matriz (♀) e 24 progênies de amendoim forrageiro.

A heterozigosidade esperada foi moderadamente alta para a maioria dos locos, variando de 0,537 a 0,934, com média de 0,790. A heterozigosidade observada foi alta para a maioria dos locos, variando de 0,571 a 1, com média de 0,830. Como o gênero *Arachis* é considerado autógamo, esses valores foram maiores do que o esperado. Azêvedo (2014) encontrou valores de heterozigosidade esperada similares, variando de 0,33 a 0,92, com média de 0,71. Entretanto, essa autora encontrou valores de heterozigosidade observada menores do que os observados nesse estudo (0,07 a 0,80, com média de 0,33). Otto (2007), encontrou valores de heterozigosidade observada variando de 0 a 0,870, com média de 0,640. Valores de heterozigosidade observada maiores do que a heterozigosidade esperada já foram observados em estudos de diversidade genética na secção *Caulorrhizae* (PALMIERI et al., 2005; 2010).

Foram obtidas as distâncias genéticas entre os genitores através do método de Rogers modificado (Tabela 5) variando de 0,395 a 0,750. A menor distância, 0,395 foi observada entre os genótipos 10 e 18 (V 6740 e Amarillo MG-100), e entre os genótipos 13 e 18 (V 6791wf e Amarillo MG-100). A maior distância (0,750) foi observada entre os genótipos 7 e 14 (W 34 e Belomonte). Esses valores de distâncias genéticas indicam uma baixa similaridade entre W 34 e Belomonte. Palmieri et al. (2010) verificaram distâncias genéticas variando de 0,064 a 0,566.

Foi obtido um agrupamento dos genitores com base das distâncias genéticas, obtidas pelo método de Rogers modificado (Figura 7). Os genótipos foram distribuídos em seis grupos, mostrando alta similaridade. Os acessos V 6727 e V 6784 formaram um grupo, enquanto que os acessos V 6791wf, a cultivar Amarillo MG-100, V 6740 e W 674 formaram outro grupo. As cultivares Belomonte e BRS Mandobi não ficaram incluídas em nenhum grupo, comprovando os dados da divergência morfológica entre elas.

Paganella e Valls (2002) fizeram o agrupamento de *A. pintoii* baseado em marcadores morfológicos. Esses autores também encontraram os acessos V 6727 e V6784 como parte de um mesmo grupo, juntamente com os acessos W 34 e V6791wf. Apesar de estar em grupos separados nesse estudo, a proximidade entre esses acessos corrobora com os dados encontrados por esses autores.

Tabela 5 - Distâncias genéticas obtidas pelo método de Rogers modificado e calculadas a partir de 8 locos microssatélites e 14 genótipos.

	1	6	7	8	9	10	11	12	13	14	16	17	18	19
1	*****													
6	0,559	*****												
7	0,612	0,661	*****											
8	0,586	0,637	0,530	*****										
9	0,729	0,637	0,661	0,612	*****									
10	0,612	0,586	0,637	0,530	0,637	*****								
11	0,612	0,559	0,685	0,612	0,500	0,586	*****							
12	0,661	0,586	0,729	0,637	0,559	0,612	0,468	*****						
13	0,586	0,586	0,637	0,530	0,637	0,468	0,661	0,637	*****					
14	0,637	0,685	0,750	0,637	0,707	0,586	0,685	0,612	0,612	*****				
16	0,637	0,637	0,637	0,612	0,586	0,612	0,500	0,500	0,612	0,685	*****			
17	0,612	0,661	0,637	0,586	0,559	0,612	0,612	0,586	0,637	0,586	0,637	*****		
18	0,586	0,586	0,637	0,530	0,637	0,395	0,612	0,637	0,395	0,559	0,612	0,637	*****	
19	0,707	0,685	0,500	0,530	0,559	0,559	0,637	0,637	0,586	0,729	0,637	0,612	0,612	*****

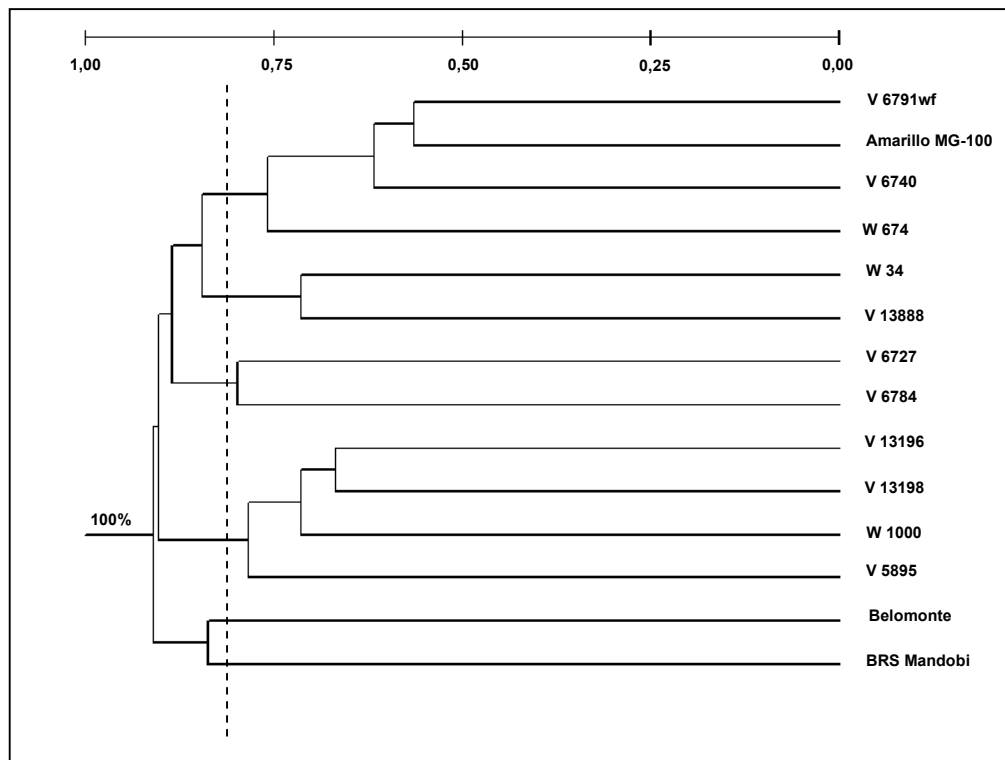


Figura 7 - Agrupamento gerado para oito microssatélites com 14 genótipos de *A. pintoii* pela Distância Modificada de Rogers e UPGMA.

### 4.3 Taxa de Cruzamento

#### 4.3.1 Taxa de Cruzamento Natural de *A. pintoi*

Na análise de taxa de cruzamento em *Arachis pintoi*, as estimativas das taxas de cruzamento multiloco ( $t_m$ ) foi, 0,367, indicando 36,7% de fecundação cruzada (Tabela 6). A taxa de cruzamento uniloco ( $t_s$ ) foi de 0,179, indicando 17,9% de cruzamento entre genótipos não aparentados. Tais resultados evidenciam um sistema de cruzamento misto ( $t < 0,95$ ) com predominância de autofecundação. Coffelt (1989), que estudou cultivares de *A. hypogaea* a partir de marcadores morfológicos, obteve taxa de cruzamento média de 1,9%. Knauff et al. (1992), encontrou resultados que variaram de 1,5 a 8% em alguns acessos da cultivar Valência de *A. hypogaea*. A taxa de cruzamento encontrada neste trabalho (36,7%) foi maior do que as relatadas por esses autores. Destaca-se que nenhum dos trabalhos anteriores utilizou marcadores moleculares. Os dados encontrados no presente trabalho foram a partir de estimativas diretas da genotipagem de cada progênie, onde foi possível identificar cada alelo maternal e parental.

A diferença entre a taxa de cruzamento multiloco e uniloco ( $t_m - t_s$ ) têm sido usada para quantificar a ocorrência de cruzamentos endogâmicos, ou seja, entre indivíduos aparentados. A diferença das taxas de cruzamento multiloco e uniloco foi positiva (0,188), mostrando a ocorrência de 18,8% de cruzamentos entre indivíduos aparentados. O cruzamento entre parentes aumenta a endogamia nas populações, juntamente com a autofecundação.

Os cruzamentos biparentais foram medidos pela correlação de paternidade multiloco ( $r_{p(m)}$ ), que mede a probabilidade de dois indivíduos ao acaso terem o mesmo doador de pólen, sendo de 0,768 (Tabela 6). Esse alto valor para correlação de paternidade indica que grande parte das progênies são aparentadas. A partir do coeficiente de paternidade é possível estimar o número de indivíduos polinizadores por plantas ( $1/r_p$ ), ou seja, a média de indivíduos que contribuíram com pólen para uma planta materna. O número de indivíduos polinizadores foi extremamente baixo (1,3). Penha (2014), estudando feijão-fava (*Phaseolus lunatus*), encontrou número de indivíduos polinizadores de 1,12. Santos-Garcia et al. (2010), em estudo realizado com *Stylosanthes capitata* e *Stylosanthes guianensis*, encontrou um número médio de indivíduos polinizadores de 2,24 e 5,524, respectivamente. Esses autores comentam que

esse número baixo de plantas que contribuíram com pólen pode ser devido ao florescimento não sincrônico entre as matrizes e a distância limitada de ação dos insetos polinizadores.

O coeficiente de endogamia na geração maternal ( $F_m$ ), foi negativo (-0,031) indicando um baixo coeficiente de endogamia na geração parental, sugerindo uma seleção para heterozigotos.

Tabela 6 - Estimativas da taxa de cruzamento da espécie *A. pintoi*.

Parâmetros	Estimativas	Desvio padrão
Coefficiente de endogamia na geração maternal ( $F_m$ )	-0,031	±0,057
Taxa populacional de cruzamento multiloco ( $t_m$ )	0,367	±0,076
Taxa populacional de cruzamento uniloco ( $t_s$ )	0,179	±0,046
Taxa de cruzamento entre aparentados ( $t_p = t_m - t_s$ )	0,188	±0,045
Taxa de autofecundação ( $s = 1 - t_m$ )	0,633	-
Correlação de paternidade multiloco ( $r_{p(m)}$ )	0,768	±0,158
Correlação de paternidade uniloco ( $r_{p(s)}$ )	-0,215	±0,101
Correlação de $t$ entre progênies ( $r_t$ )	0,481	±0,069
Correlação de $t$ entre os locos ( $r_{ta}$ )	0,503	±0,104

A baixa taxa de endogamia pode ser confirmada pela grande quantidade de heterozigotos na população estudada. Essa característica é desejável para manutenção da variabilidade genética e a capacidade de adaptação e resposta às mudanças ou estresses do ambiente, pois permite que as cultivares desenvolvidas a partir desses acessos sejam utilizadas em condições de clima variados, especialmente como ocorre no território brasileiro.

Não foram encontrados na literatura estudos avaliando a taxa de cruzamento de espécies do gênero *Arachis* utilizando marcadores moleculares, especialmente microssatélites. Estes resultados são inéditos e fornecem indícios de que os polinizadores podem influenciar positivamente na taxa de cruzamento em *A. pintoi*. Esse estudo demonstra a importância do conhecimento do sistema reprodutivo, não sendo possível generalizar o sistema de uma espécie para as demais do gênero, uma vez que existem particularidades nos processos reprodutivos.

#### 4.3.2 Estimativa da Taxa de Cruzamento Individual

Na análise da taxa de cruzamento multiloco, famílias 14, 17, 10 (Belomonte, BRS Mandobi e V 6740, respectivamente) apresentaram os maiores valores, 0,916, 0,864 e 0,792, respectivamente. As famílias 9, 11 e 18 (V 5895, V13196 e Amarillo MG-100, respectivamente) apresentaram os menores valores, 0,168; 0,118 e 0,019, respectivamente. Estes resultados demonstram a variação da taxa de cruzamento entre as matrizes, dentro da espécie *A. pintoi*. Entretanto, os resultados das famílias 14 e 17 podem não expressar a taxa de cruzamento real dos genitores, pois o número de progênies analisadas foi muito pequeno (duas e cinco progênies, respectivamente). Estes resultados fornecem indícios do comportamento desses genótipos, porém pode ser necessária a repetição da análise com um número maior de progênies.

Na análise da taxa de cruzamento entre aparentados (Tabela 7), as famílias 1, 10 e 12 (V 6727, V 6740 e V 13198, respectivamente) apresentaram os maiores valores, 0,355; 0,256 e 0,108, respectivamente. Esses valores positivos correspondem à existência de cruzamentos entre parentes, comprovados pelas estimativas multilocos de  $t$  maiores do que as estimativas uniloco. Os menores valores foram obtidos para as famílias 17, 11 e 9 (BRS Mandobi, V 13196 e V 5895, respectivamente), 0,003; 0,006 e 0,028, respectivamente, evidenciando a ausência de cruzamento entre parentes.

Estes resultados demonstram a influência da ação de polinizadores na taxa de cruzamento das famílias, onde foi possível observar quais os genótipos mais propensos à polinização cruzada e quais possuem preferência por autopolinização. Além disso, um fator que pode favorecer a fecundação cruzada é a deiscência tardia das anteras. Knauff et al. (1992) comentam que as taxa de cruzamento em torno de 8% encontradas em cultivares de *A. hypogaea*, pode ter sido influenciadas pela deiscência tardia das anteras. Entretanto, poucos estudos têm sido realizados sobre a biologia floral do gênero *Arachis*, estando limitados a poucos acessos em cada secção.



Tabela 7 - Estimativas da taxa de cruzamento para as famílias.  $t_m$ : taxa de cruzamento multilocos;  $t_s$ : taxa de cruzamento uniloco;  $t_m - t_s$ : taxa de cruzamento entre aparentados;  $1 - t_m$ : taxa de autofecundação.

Famílias	Nº do coletor/cultivar	$t_m$	$t_s$	$t_m - t_s$	$1 - t_m$
1	V 6727	0,704 ±0,071	0,349 ±0,025	0,355 ±0,054	0,296
6	V 6784	0,625 ±0,154	0,521 ±0,058	0,104 ±0,144	0,375
7	W 34	0,173 ±0,074	0,224 ±0,032	-0,051 ±0,065	0,827
8	W 647	0,564 ±0,062	0,768 ±0,046	-0,204 ±0,045	0,436
9	V 5895	0,168 ±0,065	0,141 ±0,015	0,028 ±0,060	0,832
10	V 6740	0,792 ±0,096	0,536 ±0,041	0,256 ±0,087	0,208
11	V 13196	0,118 ±0,040	0,112 ±0,014	0,006 ±0,031	0,882
12	V 13198	0,425 ±0,074	0,317 ±0,017	0,108 ±0,059	0,575
13	V 6791wf	0,309 ±0,064	0,404 ±0,037	-0,095 ±0,041	0,691
14	Belomonte	0,916 ±0,001	0,859 ±0,002	0,057 ±0,002	0,084
16	W 1000	0,265 ±0,094	0,333 ±0,041	-0,068 ±0,085	0,735
17	BRS Mandobi Amarillo MG-	0,864 ±0,193	0,861 ±0,015	0,003 ±0,187	0,136
18	100	0,019 ±0,000	0,276 ±0,003	-0,257 ±0,003	0,981
19	V 13888	0,266 ±0,062	0,322 ±0,044	-0,056 ±0,040	0,734

A morfologia do estigma é um fator que pode influenciar na germinação do pólen e consequentemente na fecundação. Dentre as variações morfológicas, a presença de tricomas no bordo do estigma poderia configurar uma barreira para a chegada do pólen ao estigma, acarretando a baixa eficiência de cruzamentos intra e interespecíficos artificiais na secção *Caulorrhizae* (LU et al., 1990; PEÑALOZA, 1995; OLIVEIRA; VALLS, 2002; CASTRO et al., 2005).

Assis et al. (2009) avaliaram o comprimento e densidade de tricomas no bordo do estigma e sua relação com a produção de sementes em genótipos da secção *Caulorrhizae*. Baseado nos genótipos analisados por Assis et al. (2009), foi feita uma comparação entre a densidade e comprimento de tricomas, taxa de cruzamento multiloco e número de sementes produzidas (Tabela 8).

Não houve correlação entre os três fatores, indicando que a taxa de cruzamento e a produção de sementes não é influenciada pela densidade e comprimento dos tricomas nas famílias analisadas. Possivelmente, a autoincompatibilidade seja o fator limitante mais provável na produção de sementes. A taxa de cruzamento não afetou o número de sementes produzidas, uma vez que a família 18 teve a menor taxa de cruzamento apesar de ser a maior produtora de sementes. Porém, são necessários estudos mais criteriosos desses aspectos, uma

vez que não foi o objetivo principal desse estudo a comparação entre a biologia floral e a taxa de cruzamento.

Tabela 8. Comparação entre os parâmetros classe\* (densidade e comprimento de tricomas), taxa de cruzamento multiloco ( $t_m$ ) e número de sementes produzidas em cada família.

Famílias	Classe	$t_m$	Nº sementes
1	1	0,704 ±0,071	392
6	4	0,625 ±0,154	249
9	1	0,168 ±0,065	406
10	4	0,792 ±0,096	149
12	1	0,425 ±0,074	231
13	1	0,309 ±0,064	593
16	5	0,265 ±0,094	463
17	8	0,864 ±0,193	55
18	4	0,019 ±0,000	915

\*Classe 1: densidade baixa e comprimento curto. Classe 4: densidade média e comprimento curto. Classe 5: densidade média e comprimento médio. Classe 8: densidade alta e comprimento médio.

Com base nos resultados obtidos acredita-se que os acessos com maior taxa de cruzamento, possivelmente sejam os mais indicados para o uso como matrizes em programas de cruzamento visando a produção de híbridos, pois podem ser mais receptivos aos cruzamentos artificiais, obtendo maior sucesso. Entretanto, devem ser consideradas as características de interesse para o melhorista, pois a taxa de cruzamento indica apenas a possível receptividade dos acessos em cruzamentos artificiais. Além disso, são necessários novos estudos para a conservação desse material em BAG, uma vez que as elevadas taxas de cruzamento dos genótipos e a possibilidade de produção e germinação de sementes pode ocasionar a segregação de caracteres de interesse.

## 5 CONCLUSÕES

- A produção de sementes variou entre os genótipos, sendo a cultivar Amarillo MG-100 a maior e a cultivar Belomonte a menor produtora de sementes;
- A baixa taxa de germinação em algumas famílias pode ser resultado da dormência e má formação nas sementes;
- Os oito locos microssatélites foram eficientes para avaliar a taxa de cruzamento de *Arachis pintoi*, com média de 8,1 alelos/loco;
- A heterozigosidade observada foi maior do que a esperada na maioria dos locos testados, indicando a ocorrência de um grande número de heterozigotos entre as matrizes;
- A estimativa da taxa de cruzamento ( $t_m = 0,367$ ) para *A. pintoi* indicou a presença de um sistema de cruzamento misto com predominância de autogamia.
- A taxa de cruzamento individual identificou uma variação dentro da espécie *A. pintoi*, desde acessos com predominância de autogamia até acessos com preferência por alogamia;
- A estimativa da taxa de cruzamento é de grande importância para o melhoramento, para a multiplicação de sementes, para a manutenção dos bancos de germoplasma, e pode auxiliar no planejamento de coletas.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLARD, R. W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. São Paulo: Edgard Blucher, 1971. 381 p.

ANDRADE, R. P.; KARIA, C. T. Efeitos da aplicação de gesso, irrigação e cortes na produção de sementes de *Arachis pintoi* BRA-031143. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 34., 1997, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: SBZ, 1997. p. 320-321.

ARGEL, P. J.; PIZARRO, E. A. Germoplasm case study: *Arachis pintoi*. In.: Pastures for the tropical lowlands – CIAT's Contribution. Cali: CIAT, p. 57-76, 1992.

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, 2008.

ASSIS, G. M. L.; Principais características de *Arachis pintoi* cv. BRS BRS Mandobi. In: Produção de sementes de *Arachis pintoi* cv. BRS BRS Mandobi no Acre. Rio Branco, AC: Embrapa Acre, 2011. (Sistemas de produção, 4). Disponível em: 62 <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Amendoim/ProducaoSementesArachisAcre/index.htm> > Acesso em: 13 mai. 2015.

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. de; VALLS, J. F. M.; CARVALHO, M. A.; VALENTIM, J. F.; ANDRADE, C. M. S. Descritores morfológicos para condução de ensaios de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade em *Arachis pintoi* Krapov. & W.C. Greg. Rio Branco, AC: Embrapa Acre, 2010 (Embrapa Acre. Documentos, 117).

ASSIS, G. M. L.; VALENTIM, J. F.; ANDRADE, C. M. S. BRS BRS Mandobi: a new forage peanut cultivar propagated by seeds for the tropics. *Tropical Grasslands – Forrajes Tropicales* v. 1, p. 39–41, 2013.

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, 2009.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES. Pecuária Brasileira. [http://www.abiec.com.br/3\\_pecuaria.asp](http://www.abiec.com.br/3_pecuaria.asp) Acesso em: 10/02/2015.

AZÊVEDO, H. S. F. S. **Caracterização da diversidade genética de amendoim forrageiro com marcadores microssatélites**. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para Amazônia, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, AC, 2014, 72p.

BALANÇO Social 2013. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <<http://bs.sede.embrapa.br/2013/BalancoSocialEmbrapa2013.pdf>>. Acesso em: 07 jul. 2015.

BARCELLOS, A.O.; ANDRADE, R.P.; KARIA, C.T. Potencial e uso de leguminosas dos gêneros *Stylosanthes*, *Arachis* e *Leucaena*. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 17, 2000, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: Fundação de Estudos Agrários "Luiz de Queiroz", p.297-358, 2000.

BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. Viçosa: Editora UFV, 2009.

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

BORGES, W. L.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G. Variabilidade genética entre acessos de amendoim. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.42, n.8, p.1 151-1157, 2007.

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, 1980.

BRASIL. 2011. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Registro Nacional de Cultivares**. Brasília. Disponível em: <[http://extranet.agricultura.gov.br/php/snpc/cultivarweb/detalhe\\_protecao.php?codsr=3614](http://extranet.agricultura.gov.br/php/snpc/cultivarweb/detalhe_protecao.php?codsr=3614)>. Acesso em: 10 junho 2015.

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

BROWN, A.H.D. Genetic characterization of plant mating systems. In: Plant population genetics, breeding and germplasm resources (BROWN, A. H. D.; CLEGG, M. T.; KAHLER, A. L.; WEIR, B. S., eds.). Sinauer Associates, Sunderland, p.145-162, 1989.

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. 2015.

BUTELER, M. I.; JARRET, R. L.; LABONTE, D. R. Sequence characterization of microsatellites in diploid and polyploid *Ipomoea*. **Theoretical and Applied Genetics** 99:123-132. 1999.

CARREGA, W. C.; MICHELOTTO, M. D.; FINOTO, E. L.; FÁVERO, A. P.; GODOY, I. J. DE. Emergência de plântulas de espécies silvestres de amendoim. **Biotemas**, 24 (4): 31-38, 2011.

CARVALHO, G.; PIRES, A. Leguminosas tropicais herbáceas em associação com pastagens. **Archivos de Zootecnia**, v. 57, n. 1, p. 103-113, 2008.

CARVALHO, M. A. **Caracterização dos componentes agronômicos da produção de forragem e sementes de *Arachis pintoi* e *Arachis repens* (LEGUMINOSAE)**. 1996. 117 p. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Engenharia Agrônômica, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

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, 2010.

CASTRO, C.M.; VALLS, J.F.M.; KARIA, C.T. *Arachis*: Origen, variabilidad genética y potencial agronômico. Nota científica, Pasturas de América, 2005. Disponível em: <<http://www.pasturasdeamerica.org>>. Acesso em: 30 de março de 2015.

COFFELT, T. A. Natural crossing of peanut in Virginia. **Peanut Science**. 16:46-48, 1989.

COOK, B. G.; CROSTHWAITE, I. C. Utilization of *Arachis* species as forage. In: SMARTT, J (ed). The Groudnut Crop: A Basis for Scientific Improvement. Chapman & Hall, London, p 624-657, 1994.

COSTA, L. C. **Biologia floral de espécies do gênero *Arachis* L. (Fabaceae-Papilionoideae), com ênfase em aspectos da morfologia floral e na anatomia de ovários**. 2012. xxiv, 235 f., il. Tese (Doutorado em Botânica)-Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

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

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.

DAMÉ, P. R. V.; REIS, J. C. L.; SIEWERDT, L.; SILVA, J. B. Amendoim forrageiro: floração e produção de sementes de acessos no litoral sul do Rio Grande do Sul. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 35., 1998, Botucatu. Anais. Botucatu: SBZ, 1998. p. 681-683.

DRUMOND, P.M.; CARDOSO, G. A. As abelhas e a produção de sementes do amendoim forrageiro. Rio Branco: Embrapa Acre, 8 p. 2010. (Embrapa Acre. Comunicado Técnico, 177).

DUTTA, M.; ARUNACHALAM, V.; BANDYOPADHYAY, A. Enhanced cross pollination to widen the scope of breeding in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 74, p. 466-470, 1987.

FISHER, M.J.; CRUZ, P. Some ecophysiological aspects of *Arachis pintoi*. In: KERRIDGE, P. C. & HARDY, B. (ed.) **Biology and Agronomy of forage *Arachis***. Cali. CIAT, p.53-70 1994.

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

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**, v. 116, p. 187–195, 2000.

GIMENES, M. A.; HOSHINO, A. A.; BARBOSA, A. V. G.; PALMIERI, D. A.; LOPES, C. R. Characterization and transferability of microsatellite markers of the cultivated peanut (*Arachis hypogaea*). **BMC Plant Biology**, v. 7, n. 9, 2007.

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**, v. 79, p. 6465-6469, 1982.

HAMMONS, R. O. Artificial cross-pollination of the peanut with bee-collected pollen. **Crop Science**, v. 3, p. 562-563, 1963.

HAMRICK, J.L. Isozymes and the analysis of genetic structure in plant populations. In *Isozymes in plant biology* (SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S., eds.). Chapman & Hall, London, p.87-105, 1990.

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.

HILU, K. W.; STALKER, H. T. Genetic relationships between peanut and wild species of *Arachis* sect. *Arachis* (Fabaceae): evidence from RAPDs. **Plant Systematics and Evolution**, v. 198, p. 167-178, 1995.

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, 2006.

HU, J.; NAKATANI, M.; LALUSIN, A. G.; FUJIMURA, T. New microsatellite markers developed from reported *Ipomoea trifida* sequences and their application to sweetpotato and its related wild species. **Scientia Horticulturae** 102:375-386. 2004.

JARNE, P.; LAGODA, P. J. L. microsatellites, from molecules to populations and back. **Trends in Ecology and Evolution** 11:424-429. 1996.



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

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, 2011.

KNAUFT, D. A.; CHIYEMBEKEZA, A. J.; CORBET, D. W. Possible Reproductive Factors Contributing to Outcrossing in Peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Peanut Science**, v.19, p.29-31, 1992.

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

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.

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

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.

LIMA, J.A; PINTO, J.C.; EVANGELISTA, A.R. et al. **Amendoim forrageiro (*Arachis pintoi* Krapov. & Greg)**. 2003. UFLA/CNPq. Disponível em: <Thttp://www.editora.ufla.br/Boletim/pdfextensao/bol01.pdf T>. Acesso em 20 out. 2003.

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.

MAASS, B. L.; TORRES, A. M. **Outcrossing in the tropical forage legume *Centrosema brasilianum* (L) Benth**. Book of Poster Abstracts XIII<sup>th</sup> Eucarpia Congress. Angers, France, p. 465–466, 1992.

MILES J. Natural outcrossing in *Stylosanthes capitata*. **Tropical Grasslands**, v.17, p.114-117. 1983.

MILES J. Evaluation of potential genetic marker traits and estimation of outcrossing rate in *Stylosanthes guianensis*. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.36, p.259, 1985.

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.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Exportação**. <http://www.agricultura.gov.br/animal/exportacao>. Acesso em: 10/02/2015.

MONTENEGRO, R.; PINZÓN, B. **Maní forrajero (*Arachis pinto* Krapovickas e Gregory)**: Una alternativa para el sostenimiento de la ganaderia en Panamá. Panamá: IDIAP, 20p. 1997.

MORAES, P. L. R.; MONTEIRO, R. Taxas de cruzamento em uma população natural de *Cryptocarya moschata* Nees (Lauraceae). **Biota Neotropica**, v. 2, n. 2, p. 1-10, 2002.

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

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.

MURAWSKI, D. A. AND HAMRICK, J. L. The effect of the density of flowering individuals on the mating systems of nine tropical tree species. **Heredity**, n. 67, p. 167-174. 1991.

NASCIMENTO, I. S. O cultivo do amendoim forrageiro. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 12, n. 4, p. 387-393, 2006.

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.

NIGAM, S.N.; RAO, M.J.V.; GIBBONS, R.W. **Artificial hybridization in groundnut**. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics-ICRISAT, India. 1990. 27p.

NILES, W. L; QUESENBERRY, K. H. Pollen germination of *Rhizoma* peanut cv. Florigraze. **Peanut Science**, v. 19, p. 105-110, 1992.

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.

OTTO, J. C. S. **Determinação do grau de homozigose de genótipos selecionados do híbrido natural W34b (BRA 031143) da espécie *Arachis pintoii* Krapov. & Gregory, por meio de marcadores moleculares**. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2007. 76 p.

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

PAIVA, J. R.; KAGEYAMA, P. Y.; VENCOSKY, R. Genetic of rubber tree (*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex. ADR.) Mueller Arg.). 2. Mating system. **Silvae Genetica**, Frankfurt. v. 43, p. 373-376, 1994.

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, 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, 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**, v. 33, n. 1, p. 109-118, 2010.

PENALOZA, A.P.S. **Caracterização dos componentes biológicos da produção de sementes de *Arachis pintoi* (Leguminosae)**. Dissertação de Mestrado, Departamento de Engenharia Agrônômica, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 82p. 1995.

PENHA, J. S. **Determinação da taxa de fecundação cruzada natural e diversidade genética em feijão-fava por marcadores microssatélites**. Teresina, 2014. 37f. Dissertação – Mestrado em Genética e Melhoramento, Universidade Federal do Piauí, 2014.

PEREIRA, J.M.; RESENDE, C.P.; SANTANA, J.R. **Amendoim forrageiro cv. Belomonte (*Arachis pintoi* Krapov & Gregory): Uma nova opção de leguminosa forrageira**.

CEPLAC. 1999. Disponível em:

<<http://www.ceplac.gov.br/radar/amendoim%20forrageiro.htm>> Acesso em 01 março 2015.

PEREZ, N.B. Método de estabelecimento do amendoim forrageiro perene (*Arachis pintoi* Krap. & Greg). Porto Alegre. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Programa de Pós Graduação em Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1999. 83p.

PERIASAMY, K.; SAMPOORNAM, C. 1984. Studies on the hypanthial tube, androecium and pollination in *Arachis hypogaea* L. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen*, v.58, p.403-411.

PIZARRO, E. A. Progressos en la inserción de especies forrajeras de *Arachis* en la matriz agrícola latinoamericana y mundial. In: Simpósio de Recursos Genéticos para a América Latina e Caribe, 3., 2001, Londrina, PR. **Anais...** Londrina: IAPAR, 2001a.

PIZARRO, E. A. Novel grasses and legumes germplasm: Advances and perspectives for tropical zones. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 19., 2001, São Pedro-SP. **Proceedings...** Piracicaba: FEALQ, 2001b. CD ROM.

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

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B.; SOUZA, E. A.; GONÇALVES, F. M. A.; SOUZA, J. C. **Genética na Agropecuária**. 5 ed. Lavras: Ed. UFLA, 2012. 566 p.

RINCÓN, C.A., CUESTA, M.P.A., PEREZ, B.R., LASCANO, C.E., FERGURSON, J. 1992. **Maní forrajero perenne (*Arachis pintoi* Krapovickas & Gregory): Una alternativa para ganaderos y agricultores**. ICA/CIAT, Colombia, Boletín Técnico ICA, 219 p.

RITLAND, K. Correlated matings in the partial selfer *Mimulus guttatus*. **Evolution** n.43, p.848-859, 1989.

RITLAND K Estimation of gene frequency and heterozygosity from pooled samples. **Molecular Ecology Notes** n. 78, p.370–372, 2002.

RITLAND, K.; JAIN, S. K. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using independent loci. **Heredity**, v.47, p.35-52, 1981.

ROJAS, L. A.; MORA, B. V. de la; GALLEGOS, E. C.; RODRÍGUEZ, J. J. Dinámica de población de plantas de *Arachis pintoii* CIAT 17434, asociada a gramas nativas en pastoreo, en el trópico húmedo de México. **Técnica Pecuaria en México**, v. 43, n. 2, p. 275-286, 2005.

SANTOS-GARCIA, M. O.; RESENDE, R. M. S.; CHIARI, L.; ZUCCHI, M. I.; SOUZA, A. P. Mating systems in tropical forages: *Stylosanthes capitata* Vog. and *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. **Euphytica**, v. 178, n. 2, p. 185-193, 2011.

SIMPSON, C. E.; VALLS, J. F. M.; MILES, J. W. Reproductive biology and potencial for recombination in *Arachis*. In: P. C. KERRIDGE e B. HARDY, eds., *Biology and Agronomy of Forage Arachis*, Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Chapter 14. p. 43-52. 1994.

SOUSA, A. C. B.; CARVALHO, M. A.; RAMOS, A. K. B.; CAMPOS, T.; SFORÇA, D. A.; ZUCCHI, M. I.; JANK, L.; SOUZA, A. P. Genetic studies in *Centrosema pubescens* benth, a tropical forage legume: the mating system, genetic variability and genetic relationships between *Centrosema* species. **Euphytica**, v.181, p. 223–235, 2011.

SOUSA, A. C. B.; CARVALHO, M. A.; RAMOS, A. K. B.; CAMPOS, T.; SFORÇA, D. A.; ZUCCHI, M. I.; JANK, L.; SOUZA, A. P. Molecular diversity, genetic structure and mating system of *Calopogonium mucunoides* Desv. **Genetic Resources Crop Evolution**, v. 59, p. 1449–1464, 2012.

TANG, R. H.; ZHUANG, W.; GAO, G.; HE, L.; HAN, Z.; SHAN, S.; JIANG, J.; LI, Y. Phylogenetic Relationships in Genus *Arachis* Based on SSR and AFLP Markers. **Agricultural Sciences in China**, v. 7, n. 4, p. 405-414, 2008.

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

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

VALENTIM, J. F.; CARNEIRO, J.C.; SALES, M. F. L. **Amendoim forrageiro cv. Belomonte para a diversificação das pastagens e conservação do solo no Acre**. Rio Branco, AC: Embrapa-Acre, 2001. 18p. (Embrapa Acre. Circular técnico, 43).

VALENTIM, J. F.; ANDRADE, C. M. S.; MENDONÇA, H. A.; SALES, M. F. L. Velocidade de estabelecimento de acessos de amendoim forrageiro na amazônia ocidental. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.6, p.1569-1577, 2003.

VALLS, J. F. M. **Origem do germoplasma de *Arachis pintoï* disponível no Brasil**. In: REUNIÓN SAVANAS, 1, 1992, Brasília. Red International de Evaluación de Pastos Tropicales – RIEPT. Cali: CIAT, Brasília: EMBRAPA-CPAC, p. 81-96, 1992.

VALLS, J. F. M. Variability in genus *Arachis* and potential forage uses. In: SPRINGER, TL and PITTMAN, RN (eds) Identifying Germplasm for Successful Forage Legume-Grass Interactions. Proceedings of the Symposium of the Crop Science Society of America. American Society Agronomy, Seattle, p 15-27, 1996.

VALLS, J.F.M.; Maass, B. L.; Lopes, C. R. Genetic resources of wild *Arachis* and genetic diversity. In: Kerrige, P. C.; Hardy, B. (eds.). *Biology and agronomy of forage Arachis*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia, p. 28-42, 1994.

VALLS, J.F.M.; SIMPSON. New species of *Arachis* (Leguminosae) from Brazil, Paraguay and Bolivia. **Bonplandia**, v.14, p.35-65, 2005.

VILLARREAL, M.; VARGAS, W. Establecimiento de *Arachis pintoï* e producción de aterial para multiplicación. Experiencias regionales com *Arachis pintoï* e planes futuros de investigación y promoción de la especie en México, Centroamerica y el Caribe. In: ARGEL, P.J.; RAMIREZ, A.P. (Eds.) Cali: CIAT, 1996. p. 3-16. (Documento de trabajo, 159). Disponível em:<<http://livros01.livrosgratis.com.br/cp099548.pdf>>. Acesso em 17 jan. 2003.

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.

WANG, M. L.; BARKLEY, N. A.; JENKINS, T. M. Microsatellite markers in plants and insects. Part I. Applications of biotechnology. **Genes Genomes Genomics** v. 3, p. 54–67, 2009.

WEBER J.L. Informativeness of human (dC-dA)<sub>n</sub> (dG-dT)<sub>n</sub> polymorphisms. **Genomics** v. 7, p. 524-30, 1990.

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.

ZANE, L.; BARGELLONI, L; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 1-16, 2002.