

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
CAMPUS DE BOTUCATU**

Vanusa do Socorro Leite

**Determinação do grau de heterozigose de progênies do acesso BRA
041122 da espécie *Arachis Pintoi* krapov. & gregory por meio de
marcador molecular ssr**

**BOTUCATU – SP
2008**

Vanusa do Socorro Leite

**Determinação do grau de heterozigose de progênies do acesso BRA
041122 da espécie *Arachis Pintoi* krapov. & gregory por meio de
marcador molecular ssr**

Dissertação apresentada à Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
UNESP, para a obtenção do Título de Mestre
em Ciências Biológicas, Área de Concentração:
Genética

Orientadora: Profa. Dra. CATALINA ROMERO LOPES

BOTUCATU – SP

2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Leite, Vanusa do Socorro.

Determinação do grau de heterozigose de progênies do acesso BRA 041122 da espécie *Arachis Pintoi* Krapov. & Gregory por meio de marcador molecular SSR / Vanusa do Socorro Leite. – Botucatu: [s.n.], 2008.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2008.

Orientadora: Catalina Romero Lopes

Assunto CAPES: 20203004

1. Genética vegetal 2. Leguminosas - Melhoramento genético

CDD 581.15

Palavras-chave: *Arachis Pintoi*; *Caulorrhizae*; Heterozigose; Genótipos; Microssatélites

A minha família pelo apoio, amor, compreensão e confiança,

Aos amigos pelo carinho,

A Deus pela minha vida,

A Neito *in memoriam*.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela presença em minha vida e por mais esta oportunidade de crescimento e amadurecimento pessoal e profissional.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, particularmente ao Instituto de Biociências, Departamento de Genética, pela oportunidade de realizar o curso.

Aos meus pais e ao meu avô pelos ensinamentos e trabalho para que eu chegasse onde eles nunca tiveram a oportunidade de estar.

Aos meus irmãos, pela amizade e momentos agradáveis que passamos juntos.

Ao meu esposo Julio, pelo carinho e companheirismo, e a sua família pelo carinho dedicado.

À Profa. Dra. Catalina Romero Lopes, pela oportunidade, orientação e amizade.

Ao Prof. Dr. Sandremir de Carvalho, pela amizade, exemplo de dedicação, profissionalismo e valiosos ensinamentos transmitidos antes e durante o desenvolvimento do trabalho.

À Prof^a. Dra. Lucy Monçato, pela confiança e pelas valiosas informações sobre a cultura.

Aos pós-graduandos, Akemi, Edna, Marcelo, Flavio, Fabio, Carla e ao Pós-Doc Antonio, pela amizade e colaboração em todo o período em que esse trabalho foi realizado.

À FFALM/UENP- Bandeirantes – PR e EMBRAPA/CERNAGEN – Brasília DF, pelo fornecimento dos materiais vegetais utilizados no trabalho.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Genética.

Aos funcionários da pós-graduação: Maria Helena, Luciene e Serginho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro na realização do projeto.

Sumário

Resumo	vi
1 Introdução	1
2 Revisão de Literatura	2
2.1 Gênero <i>Arachis</i>	4
2.2 Seção <i>Caulorrhizae</i>	7
2.3 A espécie <i>Arachis Pintoi</i>	9
2.4 Histórico do Acesso BRA-031143	13
2.5 Reprodução	14
2.6 Cruzabilidade	14
2.7 Características Agronômicas	16
2.8 Produção de Forragem	18
2.9 Potencial de consórcio	19
2.10 Produção Animal	21
2.11 Cobertura verde	22
2.12 Caracterização do Germoplasma	24
2.12.1 Caracterização Agronômica	24
2.12.2 Caracterização Morfológica e Molecular	25
2.13 Diversidade Genética	26
2.14 Melhoramento de plantas autógamas	27
2.15 Tipos de marcadores	29
2.15.1 Marcadores Morfológicos	30
2.15.2 Marcadores Moleculares isoenzimáticos	30
2.16 Marcadores de DNA	31
2.16.1 “Polymerase Chain Reaction” (PCR)	33
2.16.2 Marcadores de Sequências Simples Repetidas (SSR)	33
2.17 Caracterização molecular de genótipos	35
3 Material e métodos	37
3.1 Material	37
3.1.1 Histórico do pré-melhoramento	37
3.1.2 Material vegetal para determinação do grau de homozigose	38
3.1.3 Oligonucleotídeos (“primers”) de microssatélites	39
3.2 Métodos	40
3.2.1 Germinação das sementes	40
3.2.2 Extração e Quantificação de DNA	42
3.2.3 Amplificação de DNA e Eletroforese	43
3.2.4 Coleta e análise dos dados	44
3.2.5 Análise de agrupamento	45
4 Resultados	46
5 Discussão	52
6 Conclusão	59
7 Referências	60
8 Apêndice 1- Tabela com a homozigose completa por planta em cada genótipo	76

Lista de tabelas

Tabela 1 - Nomenclatura utilizada para identificação individual de cada planta dos genótipos utilizados. Do genótipo G5 a G18 o numero de plantas acima de duas, do genotipo G19 a G25 duas plantas, do genótipo G26 a G 41 apenas uma planta.....	38
Tabela 2 - Seqüências, temperaturas de anelamento, variações no tamanho dos alelos em pb e concentrações de MgCl ₂ para cada um dos 20 “primers” testados.....	39
Tabela 3 - Resultado da avaliação dos locos microssatelites: Heterozigose observada (Ho) e esperada (He), número de alelos por loco e variação no tamanho dos alelos.....	47
Tabela 4 - Homozigose média observada por planta e homozigose média total dos 37 genótipos avaliados do acesso BRA 041122 pertencente à espécie <i>A. Pinto</i>	51
Tabela 5 – Homozigose média observada de cada planta individual do genótipo G5, onde 0= heterozigoto e 100= homozigoto e xx dados perdidos.....	76

Lista de figuras

- Figura 1 - Local de ocorrência natural da espécie *Arachis Pintoi* (Valls & Pizarro. 1994). Coleção de germoplasma de *Arachis silvestres* p. 19-27. In P.C. Kerridge and B. Hardy (ed.). *Biology and Agronomy of Forage Arachis*, CIAT, Cali, Colombia).....9
- Figura 2 - Características da planta *Arachis pintoii* (Krapovickas, A. and W.C. Gregory. 1994. *Taxonomy of the genus Arachis (Leguminosae)*. *Bonplandia* 8: 1-186) 12
- Figura 3 - Ilustração das flores no exemplar típico de *Arachis Pintoii*..... 13
- Figura 4 - Germinação de sementes em placa de petri com a utilização do fitormônio comercial Ethrel41
- Figura 5 - Plantas em crescimento em copos de plástico na sala de germinação e na casa de vegetação.....41
- Figura 6 - Fases da extração de DNA. Na primeira figura os tubos de 1,5 ml contem o material vegetal fresco e macerado com nitrogênio líquido. Na segunda figura pode-se observar os ácidos nucleicos. 43
- Figura 7 - Padrão de microssatélites gerado por 44 indivíduos de 37 genótipos avaliados, pelo loco AP190. 46
- Figura 8 - Dendrograma UPGMA dos 37 diferentes genótipos avaliados do acesso BRA 041122 de *A. Pintoii*. A distância genética foi estimada usando o programa popgene usando o método de Nei (1978), com base em 15 locos microssatélites, num total de 109 alelos 58

Resumo

O uso de espécies silvestres do Gênero *Arachis* para o estabelecimento de pastagens, cobertura em culturas perenes, conservação do solo, como planta ornamental, além de obtenção de compostos de interesse farmacológico ou cosmetológico vem sendo intensificado, a partir do aumento no número de acessos disponíveis para pesquisa, nas últimas décadas. Dentre as espécies com potencial uso em sistemas de cultivo e pastagem e como cobertura e controle de erosão, se destacam *A. Pintoi* e *A. repens* da Seção *Caulorrhizae*, apontadas como as mais promissoras do gênero. Entre os acessos da espécie *A. Pintoi*, o híbrido intraespecífico W34b (BRA 041122) vem se destacando devido à sua grande produção de forragem, alto teor de proteína, alto nível de fixação de N₂ atmosférico, rápida ocupação de solo, adaptação a ambientes variados e capacidade de consorciação com diferentes gramíneas. O presente trabalho teve por objetivo principal a avaliação molecular de progênies de gerações avançadas do acesso BRA 041122 para definir o grau médio de homozigose, visando a seleção de genótipos para o processo de melhoramento da espécie e futuro lançamento de cultivares e, para tanto, foi usado o marcador molecular microssatélite. Foram avaliados 83 indivíduos adultos de 37 genótipos do acesso BRA 041122 a partir de 20 locos microssatélites. Dos vinte pares de “primers” utilizados 15 amplificaram produtos de PCR, e foram polimórficos. Nos 15 locos SSR polimórficos foram observados 109 alelos, com média geral de 7,2 alelos por loco. Os locos AP190, AP40, AP161 e Ag39 apresentaram dez alelos cada e o loco Ah7 três alelos. O genótipo G25 apresentou o maior grau de homozigose com média geral de 90%. O genótipo com menor grau de homozigose foi o G13 com média geral de 41,67%. As plantas individuais G9-2, G9-3, G9-4 e G25-1 apresentaram o maior grau de homozigose observado, 93,33% e as plantas individuais G8-1, G13-1 e G13-3 apresentaram o menor grau de homozigose observada, 33,33%. A heterozigose média observada foi de 0,3571. A avaliação dos indivíduos do acesso BRA 041122 permitiu detectar variabilidade genética entre as plantas de cada genótipo e distingui-los entre si.

Palavras-chave: *Arachis Pintoi*; *Caulorrhizae*; microssatélites; heterozigose; genótipos

1 Introdução

A agropecuária nacional tem apresentado um padrão de crescimento notável nos últimos anos, resultado de um cenário econômico e de mercado favoráveis, o que tem permitido ao Brasil alcançar patamares de produção e exportação nunca antes atingidos (Paris, 2006). A competitividade de custos da pecuária bovina nacional fundamenta-se na capacidade de colher, transformar e concentrar os nutrientes da pastagem pelos ruminantes. A produção por animal e por hectare pode ser comprometida pela baixa qualidade da forragem e pela produção estacional, especialmente quando em cultivos de gramíneas puras e sem a correção da fertilidade do solo (Barcellos et al., 2000). A pecuária tem despertado interesse crescente e renovado, quanto ao desenvolvimento de tecnologias, o uso de pastagens para a geração de produtos de origem animal, o que deverá tornar os preços competitivos e elevada qualidade do produto (Silva et al, 2005).

A abertura dos mercados de exportação, o aumento do consumo interno e a melhoria da qualidade do produto se contrapõem à realidade de um sistema de produção fortemente desestruturado. Pastagens com baixa capacidade produtiva, exauridas pelos anos de exploração e a descapitalização do setor evidenciam a dificuldade de resposta a esse novo cenário (Barcellos et al., 2000). Segundo os autores uma das alternativas para resolver o problema constitui-se na introdução de leguminosas forrageiras nas pastagens.

A partir da década de 60, as leguminosas têm sido estudadas como alternativa para fornecimento de nitrogênio (N₂) aos ecossistemas de pastagens, em regiões de solos ácidos dos trópicos, com baixo uso de insumos nitrogenados (Almeida et al., 2002). A contribuição da área da ecologia aliada a um avanço das ciências agrárias, na preocupação com o ambiente, direcionou um esforço na compreensão de como os animais e as plantas forrageiras se relacionam (Carvalho & Moraes, 2005).

A consorciação das leguminosas com gramíneas incrementa a produtividade animal, por meio da manutenção do nível adequado de proteína bruta (PB) na dieta, seja pelo efeito direto da ingestão de leguminosas ou pelo efeito indireto do acréscimo de N₂ no sistema pela sua capacidade de fixar o N₂ atmosférico, contribuindo para o

aumento da produção de forragem (Santos et al., 2002, Valentim & Andrade, 2004, Andrade et al., 2004). O uso de leguminosas em pastagens, no Brasil, ainda é muito limitado, seja porque o portfólio de cultivares é pequeno, ou porque o preço da semente ou do material vegetativo é elevado (Valentim, 2004).

Nesse aspecto, a caracterização e o melhoramento do germoplasma do Gênero *Arachis*, exclusivo da América do Sul que conta, até o momento, com 81 espécies das quais 69 ocorrem no Brasil sendo 62 delas restritas ao território brasileiro, vem trazendo perspectivas interessantes (Krapovickas & Gregory, 1994, Valls & Simpson, 2005). O gênero ainda conta com uma espécie cultivada *A. hypogaea* e uma espécie cultígena *A. villosulicarpa* que foi parcialmente melhorada pelos índios nhambiquaras. Do ponto de vista do potencial forrageiro, os maiores esforços estão concentrados principalmente nas espécies *A. glabrata* da Seção *Rhizomatosae* e *A. Pintoi* da Seção *Caulorrhizae* (Valls, 1992, Valle, 2001).

O uso de espécies silvestres de *Arachis* para o estabelecimento de pastagens, cobertura em culturas perenes, conservação do solo e como planta ornamental, vem sendo intensificado (Pizarro, 2001), a partir do aumento no número de acessos disponíveis nas últimas décadas, para pesquisa. Dentre as espécies com uso potencial em sistemas de cultivo e pastagem, se destaca *A. Pintoi* da Seção *Caulorrhizae*, sendo esta apontada como a mais promissora das espécies silvestres do gênero tendo sido usada predominantemente para produção de forragem (Carvalho, 2004).

Diante disso, o presente trabalho teve por objetivo avaliar, utilizando o marcador molecular microssatélite, o nível de heterozigose das plantas pertencentes aos genótipos selecionados de uma população do híbrido intra-específico BRA 041122, da espécie *A. Pintoi*, para dar continuidade ao processo de melhoramento dos mesmos, visando a obtenção de genótipos com desempenho mais eficiente na formação de pastagens consorciadas com braquiárias, na formação de bancos de proteína e na produção de feno.

2 Revisão de Literatura

O território brasileiro por estar situado em grande parte na região tropical apresenta ótimo potencial para produção de forrageiras, devido às condições

adequadas de temperatura e luminosidade. A desvantagem que ocorre na região tropical é a alteração sazonal, onde ocorrem períodos de chuvas regulares e temperaturas elevadas com excelente produção forrageira e períodos de ausência de chuvas e temperaturas mais amenas com diminuição da produção forrageira (Moreira, 2001).

O Brasil por ser detentor do maior rebanho comercial de bovinos do mundo, com 207,1 milhões de cabeças, além de cerca de 1,13 milhões de bubalinos, 5,7 milhões de eqüínos, 15 milhões de ovinos e 10 milhões de caprinos (IBGE, 2005), possui 176,2 milhões de hectares de pastagens (Scot Consultoria, 2006) dos quais, cerca de 100×10^6 ha são de pastos cultivados, representando 55% da área de pastagens que passam a ter importância econômica porque constituem a base dos sistemas de produção de ruminantes. Por isso, há necessidade de se continuar tendo nas pastagens a principal fonte de nutrientes do rebanho, pois é a forma mais prática e econômica de alimentação dos bovinos (Souza et al., 2005).

A baixa produção animal em pastagens, especialmente a produção de carne/ha/ano é resultado do processo de degradação das pastagens, que tem sua origem na acidez e baixa fertilidade do solo, falta de adubação corretiva e de manutenção de nutrientes, práticas inadequadas de formação e por último, mas não menos importante o manejo (Cecato et al. 2005). Um dos fatores que contribuem para as perdas na produção são as variações sazonais que influenciam as características produtivas das pastagens, exercendo forte impacto na produção animal. Na estação seca a produção forrageira é severamente reduzida, a senescência de folhas e perfilhos acelerada, e as pastagens tropicais, especialmente aquelas mantidas sob pastejo, apresentam normalmente baixa qualidade e disponibilidade (Santos et al., 2004).

A incapacidade dos sistemas de produção em ajustar suprimento com demanda de alimentos, quantitativa e qualitativamente, tem resultado, com muita frequência, na subnutrição dos animais durante esse período crítico, com conseqüente redução da produtividade dos rebanhos de corte (Santos et al., 2004). A fertilidade natural dos solos é fator limitante da produtividade e sustentabilidade das pastagens tropicais, assim como o manejo inadequado, principalmente, com taxas de lotação acima da

capacidade de suporte das pastagens e da falta de adubação de manutenção o que pode acentuar a deficiência de nutrientes especialmente o nitrogênio (Almeida et al., 2003; Paciullo et al., 2003). A isso, se soma, como fatores condicionantes e predisponentes deste processo, entre outros, o emprego de germoplasma não adaptado às condições edafoclimáticas, falhas no estabelecimento do germoplasma escolhido e falhas no controle de pragas, de doenças e de plantas invasoras (Rodrigues & Quadros 2000).

O benefício da inclusão de leguminosas em pastagens tropicais pode ser explicado pela manutenção do nível adequado de proteína na dieta animal, quer seja pelo efeito direto da ingestão de leguminosas, quer seja pelo efeito indireto do acréscimo do conteúdo de nitrogênio à gramínea (Almeida et al., 2003). Nesse sentido, a utilização de leguminosas forrageiras como banco de proteínas ou em consorciação com gramíneas nas pastagens, constitui uma importante prática para a suplementação protéica dos animais, bem como para o fornecimento de nitrogênio ao solo e às plantas, por meio da fixação biológica, devido à relação entre a leguminosa e as bactérias que vivem em simbiose em suas raízes.

2.1 Gênero *Arachis*

A partir da década de 80 os esforços internacionais de pesquisa em recursos genéticos foram orientados, principalmente, para os gêneros de leguminosas com potencial forrageiro, dentre os quais se destacaram *Centrosema* e *Stylosanthes*. As espécies silvestres do Gênero *Arachis* foram avaliadas, exclusivamente, quanto ao seu potencial de participação no melhoramento genético do amendoim cultivado, *A. hypogaea*, (Valls, 1993).

Porém, já na década de 60, vários pesquisadores da área de forrageiras haviam identificado o alto potencial de muitas espécies silvestres do Gênero *Arachis*, para pastagens e para cobertura de solos nos trópicos e subtropicais (Valls et al., 1993). Conseqüentemente, nos últimos 40 anos, as coletas e a conservação do germoplasma desse gênero foram direcionados para ampliar a base genética das espécies com potencial forrageiro, principalmente *A. glabrata*, da Seção *Rhizomatosae* e *A. Pintoi* da

Seção *Caulorrhizae* (Valls & Pizarro, 1994). Somente na espécie *A. Pintoi* da Seção *Caulorrhizae* há mais de 150 acessos disponíveis (Valls, 2001).

O Gênero *Arachis* é composto por espécies herbáceas, anuais e perenes, espécies diplóides com $2n=2x=20$, ou $2x=18$ e, tetraplóides com $2n=4x=40$ (Fernández, & Krapovickas, 1994, Lavia, 1998, Peñaloza & Valls, 1999). Pertence a família *Fabaceae*, subfamília *Papilionoideae*, tribo *Aeschynomeneae* e subtribo *Stylosanthinae*. (Krapovickas & Gregory, 1994). De acordo com a maior parte das informações publicadas na literatura, as espécies do Gênero *Arachis* são consideradas predominantemente autógamas e com fluxo gênico limitado a pequenas populações. No entanto há evidências de alogamia em alguns acessos da Seção *Caulorrhizae* (Oliveira & Valls, 2003) e nas espécies da Seção *Rhizonmatosae*.

Com base nas características morfológicas, as espécies do gênero *Arachis* não podem dispersar suas sementes a um raio acima de um ou dois metros ao ano, a partir do local de germinação. Ocupando uma área de aproximadamente 4000 km de extensão é evidente que, outros mecanismos estão envolvidos na sua disseminação. A dispersão fluvial é bastante significativa, pois muitas espécies mostram-se associadas às bacias de grandes rios, além do que a dispersão zoófila e a ação do homem, também podem ter contribuído na fixação das espécies em novos locais de colonização (Krapovickas & Gregory, 1994, Valls & Simpson, 1994).

O Gênero *Arachis* é nativo da América do Sul, sendo a Serra do Amambá, no limite do Mato Grosso do Sul e Paraguai, considerada o local de origem do gênero, e também da espécie cultivada *A. hypogaea*, por ser o centro de origem de *A. guaranítica* possivelmente a espécie mais antiga do gênero, cujo centro de diversidade se estende por todo o Planalto Central brasileiro (Gregory et al., 1980, Hammons, 1994). As espécies estão amplamente distribuídas no Cerrado e em outros ambientes de vegetação aberta, tendo por limites a Ilha de Marajó ao norte, o Uruguai e nordeste da Argentina ao sul, o nordeste brasileiro a leste, e o sopé da Cordilheira dos Andes a oeste (Silva, 1997).

Todas as espécies do gênero são exclusivas da América do Sul ocorrendo somente em cinco países, sendo encontradas mais de 69 no Brasil, com

aproximadamente 62 exclusivas, 15 na Bolívia, 15 no Paraguai, 6 na Argentina e 2 no Uruguai. As espécies descritas até o momento foram distribuídas em nove seções taxonômicas: *Arachis*, *Caulorrhizae*, *Erectoides*, *Extranervosae*, *Heteranthae*, *Procumbentes*, *Rhizomatosae*, *Trirectoides* e *Triseminata* (Krapovickas & Gregory, 1994, Valls & Simpson, 2005).

A revisão taxonômica realizada por Krapovickas & Gregory (1994), considerando aspectos morfológicos, citológicos, genético-bioquímicos e observação a campo, levaram à classificação de 69 espécies e, a partir do uso das mesmas características, onze novas espécies foram posteriormente, publicadas por Valls & Simpson, (2005). As novas espécies já tiveram também seu número cromossômico publicado por Peñaloza & Valls, (1999). Além disso, o futuro encontro de novas espécies é previsível, uma vez que importantes áreas do perímetro de ocorrência de espécies do Gênero *Arachis* ainda não foram cobertas por expedições de coletas (Valls & Simpson, 1997, Valls & Simpson, 2005).

A realização de coletas em cooperação, a várias décadas, tem coberto áreas dos cinco países onde ocorre o gênero, estando preservados, atualmente, mais de 1600 acessos, representando todas as espécies conhecidas do mesmo, com exceção de *A. martii* Handro, bem como de híbridos intra e interseccionais. Isto possibilita, pela primeira vez, um amplo estudo citogenético, e avaliação da variabilidade genética disponível por meio de marcadores moleculares, fornecendo resultados importantes sobre o aspecto evolutivo e as relações entre as espécies, além de disponibilizar informações valiosas para aplicação direta desses materiais em programas de melhoramento (Valls e Pizarro, 1994).

A caracterização do germoplasma obtido ao longo das coletas vem trazendo perspectivas interessantes, como a descoberta de novas fontes de resistência a doenças e até de plantas com ciclo extremamente curto, caráter de grande utilidade para adaptação de variedades cultivadas em áreas com maior carência de chuvas. Por sua vez, a ampla disponibilidade do germoplasma de espécies perenes tem dado grande realce ao potencial de várias delas para uso forrageiro e para culturas de cobertura, controladoras da erosão, hoje muito procuradas diante da crescente

demanda por programas de agricultura sustentável (Pizarro, 2001). Na situação atual, porém, o enfoque é mais objetivo e aprofundado, o que resultou na criação da “Associação dos Produtores de Amendoim Perene”, nos Estados Unidos, para estudo e utilização de *A. glabrata* Bentham principalmente, planta rizomatosa multiplicada somente vegetativamente, e de programas de produção comercial de sementes, do “*mani forrajero perene*”, *A. Pintoi* Krapov & Gregory, (Ferguson, 1994).

São várias as espécies do gênero que produzem forragem verde de alta palatabilidade e digestibilidade para os animais. O conteúdo em proteína crua (PC) e a digestibilidade “in vitro” da matéria seca (DIVMS) são geralmente equivalentes ou ainda, melhores que os de outras leguminosas tropicais forrageiras comerciais. Porém, as espécies forrageiras do Gênero *Arachis* têm maior importância uma vez que são capazes de produzir volumes significativos de forragem verde por períodos prolongados. As espécies do gênero apresentam ainda uma ou mais das seguintes características: persistência sob pastejo e pisoteio, competição com gramíneas agressivas, razoável resistência a períodos de seca prolongados e a inundações, resistência a baixas temperaturas, e a doenças e pragas (Valls & Simpsom, 1994).

Do ponto de vista do potencial forrageiro, os maiores esforços estão concentrados nas espécies das Seções *Rhizomatosae* e *Caulorrhizae* mas, as demais seções do gênero apresentam características de interesse quanto a esse aspecto, características que estão sendo ou precisam ser adequadamente avaliadas em tais seções (Valls, 1992, Valle, 2001).

2.2 Seção *Caulorrhizae*

A Seção *Caulorrhizae* é composta por apenas duas espécies, *A. Pintoi* Krapov. & Gregory e *A. repens* Handro. Segundo Valls & Pizarro, (1994) a distribuição geográfica da secção compreende as bacias dos Rios Jequitinhonha, São Francisco e Paranã, região que cobre parte dos Estados de Goiás, Bahia e Minas Gerais, chegando até o litoral atlântico, onde foi coletado o acesso original de *A. Pintoi*, GKP 12787 (**Figura 1**). Há indícios de que a maior variabilidade genética, dos acessos desta secção, tanto com base em descritores morfológicos (Monçato, 1995), como moleculares (Gimenes et al., 2000) concentra-se na bacia do Rio São Francisco.

A caracterização taxonômica das espécies desta seção foi praticamente baseada em apenas dois acessos amplamente difundidos, GKP 10538 de *A. repens* e GKP 12787 de *A. Pintoi* (Valls & Simpson, 1994). Com o aumento do germoplasma disponível de *A. Pintoi* foi possível observar uma grande variação no formato e na dimensão dos folíolos, densidade e localização dos pêlos e cerdas. Da mesma forma, uma variação paralela foi observada nas novas coletas de *A. repens*, tornando a circunscrição individualizada das espécies da seção *Caulorrhizae* bastante difícil (Valls, 1992). A análise do dendrograma resultante da avaliação morfológica de 51 acessos da Seção *Caulorrhizae* mostra os acessos típicos de *A. repens* separados dos demais, com um grupo composto por formas intermediárias entre *A. Pintoi* e *A. repens* mais semelhantes a *A. repens* e, em seguida, um grupo de acessos típicos de *A. Pintoi* seguindo-se das demais formas intermediárias entre *A. Pintoi* e *A. repens*, confirmando a separação das duas espécies (Monçato, 1995).

A avaliação de 64 acessos da Seção *Caulorrhizae* utilizando-se marcadores Random Amplified Polimorphic DNA (RAPD) resultou em um dendrograma com a maioria dos acessos de *A. repens* compondo um grupo distinto, embora tenha sido detectado um relacionamento muito próximo entre as duas espécies (Gimenes et al., 2000), já análise, com base em marcadores Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), de 74 acessos da Seção *Caulorrhizae*, permitiu a distinção das duas espécies. Dois grandes grupos foram originados, o primeiro formado por acessos de *A. repens* e o segundo subdividido em seis subgrupos, apresentando apenas acessos de *A. Pintoi* (Barata et al., 2001). Fortalecendo os achados morfológicos e moleculares, a esterilidade encontrada nos híbridos interespecíficos, *Arachis Pintoi* x *A. repens*, justifica a manutenção de ambos, como espécies distintas (Oliveira e Valls, 1997; Carvalho, 2000).

O acesso original de *A. repens* (GKP 10538) tem sido propagado vegetativamente para cobertura do solo e como planta ornamental, sem nenhuma evidência de produção de sementes, enquanto que o acesso original de *A. Pintoi* (GKP 12787) tem sido propagado por mudas e/ou pequenas quantidades de sementes (Valls & Simpson, 1994).



Figura 1 - Local de ocorrência natural da espécie *Arachis Pintoï* (Valls & Pizarro. 1994). Coleção de germoplasma de *Arachis silvestres* p. 19-27. In P.C. Kerridge and B. Hardy (ed.). *Biology and Agronomy of Forage Arachis*, CIAT, Cali, Colombia).

2.3 A espécie *Arachis Pintoï*

É uma planta herbácea, estolonífera perene de trópico e subtropico úmido (Fisher & Cruz, 1994), alcançando de 20 a 60 cm de altura. O primeiro ramo é sempre ereto e de sua base partem ramos, que se estendem até 1,50 m ou mais, horizontalmente ou mais altos em todas as direções (**Figura 2**). Em condições de sombreamento ou em determinada fase do crescimento quando atinge o índice de área foliar crítico, apresenta ramos mais verticais com maior alongamento do caule e menor densidade de folhas (Lima et al., 2003). Apresenta raiz pivotante com profundidade de 0,3 a 1,60 metros, a qual determina a capacidade da planta de extrair água das camadas mais profundas, quando em condições menos favoráveis. As folhas são alternadas, compostas, com quatro folíolos de cor verde claro a escuro (Montenegro & Pinzón, 1997, Lima et al., 2003).

A biologia floral encontrada na maioria das espécies silvestres de *Arachis* é considerada favorável à autofecundação, pois a flor é hermafrodita e geralmente apresenta autopolinização, mas pode apresentar polinização cruzada por ação de diversas espécies de abelhas (Simpson et al., 1994). A produção de flores é fortemente dependente do fotoperíodo, necessitando de dias de 12 horas como valor mínimo crítico (Ketring, 1979), embora nem todas as espécies sejam tão fortemente sensíveis ao fotoperíodo (Simpson et al., 1994). A curva de florescimento de 14 acessos de *A. Pintoi* e *A. repens* em Planaltina, DF, mostrou que a intensidade máxima do florescimento ocorre entre novembro e dezembro e está, para alguns acessos, associada à precipitação pluviométrica e temperatura (Peñaloza, 1995).

Os botões florais apóiam-se no ápice de um cálice tubular denominado de hipanto. A flor possui corola papilionada, com uma pétala grande, o estandarte, duas pétalas menores denominadas de asas e, duas pétalas soldadas, formando a quilha, que envolve a porção apical do estilete, o estigma e os estames. Todas as peças estão envolvidas por cinco brácteas. As flores possuem estigma tipo plumoso ou tipo bastão, com 10 estames, dos quais quatro possuem anteras biloculadas, quatro globosas e dois estaminódios (Simpson, 1994). O estigma encontra-se assentado no ápice de um longo estilete que percorre internamente todo o comprimento do hipanto até o ovário, que se situa na axila das brácteas da inflorescência contendo dois a três óvulos (Simpson et al., 1994). Segundo Krapovickas & Gregory, (1994) as espigas são axilares com quatro a cinco flores, esparsas, com corola amarela no exemplar típico (**Figura 3**).

Estudos da morfologia do ápice do estigma de espécies anuais e perenes de *Arachis* demonstraram a presença de pêlos unicelulares no ápice dos estigmas de algumas espécies. Estes se desenvolvem a partir das células da epiderme, subjacentes ao estilete. As espécies perenes, pouco prolíferas, apresentam estes pêlos, enquanto que a ausência de tais pêlos está associada às espécies anuais. A presença de muitos pêlos no ápice do estigma pode dificultar, ou até mesmo impedir, o contato dos grãos de pólen viáveis com as papilas da superfície estigmática, resultando em uma barreira física à polinização (Banks, 1990, Lu et al. 1990). Além da morfologia do estigma, a germinação do pólen tem sido examinada com o intuito de verificar a existência de barreiras reprodutivas nos cruzamentos. A porcentagem de fertilidade dos híbridos

permite avaliar barreiras genéticas, que podem ter grande importância na formação de espécies simpátricas (Krapovickas & Gregory, 1994).

A fertilização ocorre 12 horas após a polinização e, em seguida, o embrião sofre de quatro a cinco divisões, e torna-se dormente. Ao mesmo tempo, um meristema intercalar é ativado na base do ovário e inicia o desenvolvimento do ginóforo denominado de peg, o qual é geotrópico positivo. O comprimento do “peg” depende de fatores genéticos e ambientais e, continua a crescer até penetrar no solo, podendo sofrer engrossamento em algumas espécies, ou se tornar bastante fino em outras. Na maioria das espécies silvestres encontram-se dois segmentos de frutos e um istmo entre eles (Simpson et al., 1994). O pequeno fruto localizado sob o solo é uma vagem, classificada como cápsula indeiscente, normalmente contendo uma única semente (Rincón et al., 1992). O pericarpo é resistente e coberto por pelos finos que o protegem do solo (Krapovickas e Gregory, 1994).

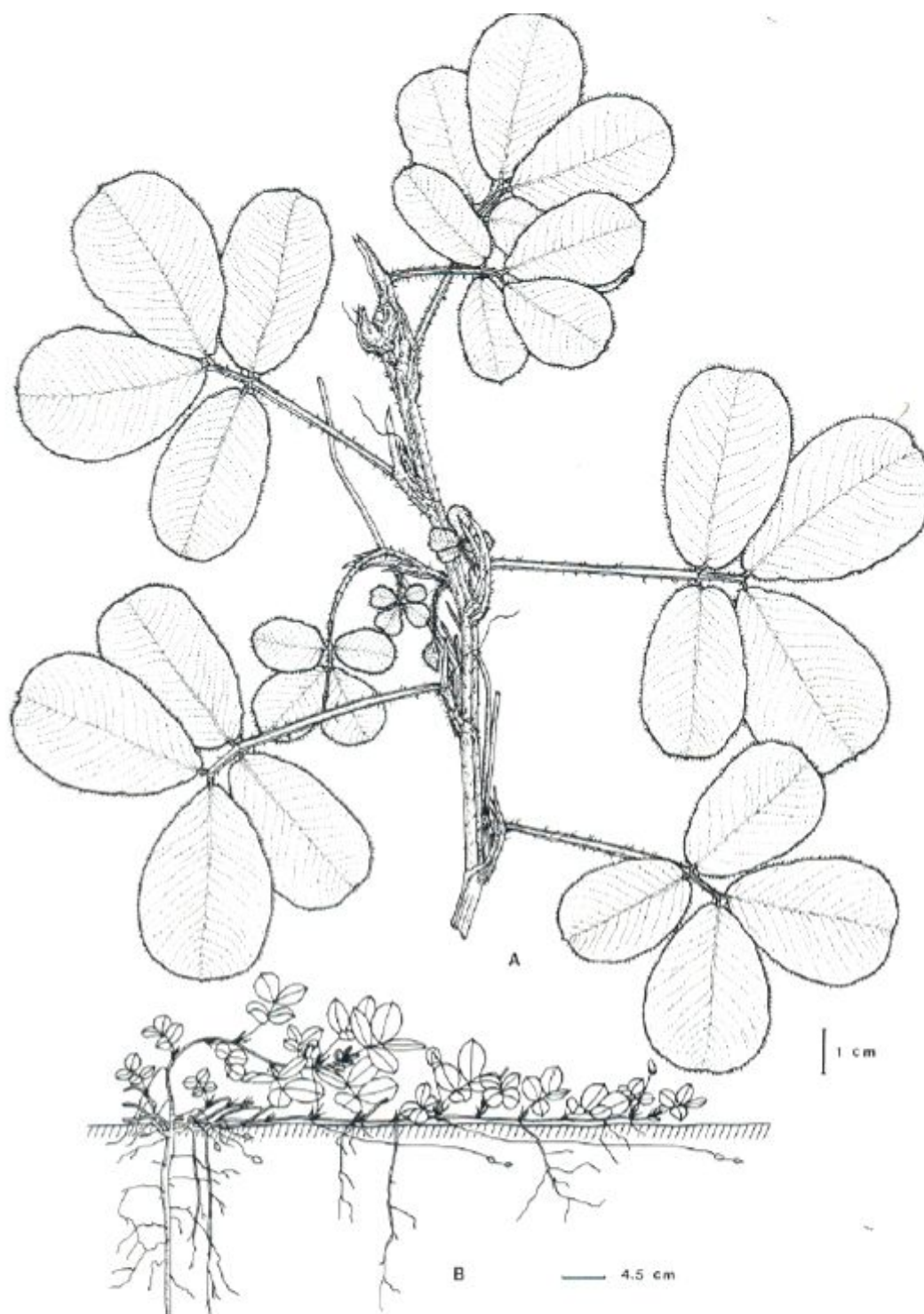


Figura 2 - Características da planta *Arachis pintoii* (Krapovickas, A. and W.C. Gregory. 1994. Taxonomy of the genus *Arachis* (Leguminosae). *Bonplandia* 8: 1-186)



Figura 3 - Morfologia das flores no exemplar típico de *Arachis Pinto*

2.4 Histórico do Acesso BRA-031143

Dois híbridos naturais identificados em parcelas experimentais foram introduzidos na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília-DF. Um deles é interespecífico e denominado de “Ag 1”, provavelmente oriundo de um cruzamento natural entre *A. Pinto* (GKP 12787) com *A. kretschmeri* (KrRy s/n), da Secção *Procumbente* (Teixeira, 1999). Outro é intraespecífico e denominado de “W34b”, tendo sido encontrado de um canteiro experimental de *A. Pinto* localizado na Embrapa Cerrados, em Planaltina-DF (Carvalho, 2000).

O acesso BRA-031143, denominado W34b, não representa uma população natural de *A. Pinto*, pois foi selecionado no CPAC / EMBRAPA, por E. A. Pizarro e M. A. Carvalho, de um canteiro experimental do acesso W34 (BRA-015253). Essa planta diferia das demais por apresentar florescimento precoce e foi intensamente estudada por S. Carvalho (FFALM, Bandeirantes/PR), sob a orientação de C.R. Lopes – BIOGEM / UNESP Botucatu. O híbrido natural intraespecífico W34b (BRA-031143), vem se destacando por sua alta produtividade e adaptação a ambientes variados (Carvalho et al., 1997).

Diversos estudos têm demonstrado que o acesso é mais produtivo que a cultivar ‘Amarrillo’ e a cultivar Belmonte. No Estado do Acre o acesso de *A. Pinto* BRA-031143, submetido a níveis de sombreamento de 30, 50 e 70 %, apresentou boa adaptação,

produtividade e persistência, indicando o potencial de utilização desta leguminosa como cobertura do solo em sistemas agroflorestais e silvipastoris (Andrade & Valentim, 1997). O mesmo acesso quando manejado de forma intensiva, com intervalos de rebrota entre 14 e 21 dias e altura de corte entre 5 a 10 cm, propiciou a obtenção de produtividade de matéria seca superior a 30 t/ha/ano, sem comprometer a persistência da pastagem (Wendling et al., 1999).

2.5 Reprodução

A propagação sexuada é realizada através de sementes maduras, estágio alcançado de 15 a 18 meses após plantio. Na propagação assexuada (material vegetativo) podem ser utilizados segmentos de estolões, obtidos através de pedaços cortados com 3 a 5 nós (Perez, 1999, Valentim et al., 2000) ou mudas preparadas em viveiro (segmentos com 20 cm), transplantadas à campo com 30 a 35 dias de idade (Montenegro & Pinzón, 1997). Há dificuldades na colheita das sementes, as quais crescem e desenvolvem-se abaixo da superfície do solo (geotropismo). Os custos operacionais da colheita oneram o preço da semente no mercado, fato que leva normalmente ao emprêgo do material vegetativo para o estabelecimento de novas áreas (Fisher & Cruz, 1994).

A característica principal da Secção *Caulorrhizae* está na capacidade de enraizamento dos nós, o que a distingue da Secção *Rhizomatosae*. Este fato permite que seja mais fácil propagar vegetativamente as plantas da Secção *Caulorrhizae* (Simpson et al., 1994). Entretanto, as duas seções, *Rhizomatosae* (*A. glabrata* e outras) e *Caulorrhizae* (*A. Pintoi* e *A. repens*) são de interesse imediato como plantas forrageiras (Simpson et al., 1994, Valls & Simpson, 1994), destacando-se a espécie *A. Pintoi* por apresentar o desenvolvimento de densas camadas de primórdios radiais (Simpson et al., 1994)

2.6 Cruzabilidade

As várias espécies de *Arachis* mostram potencial diferente de recombinação. As duas espécies de maior interesse forrageiro *A. glabrata* e *A. Pintoi* apresentam limitada oportunidade de recombinação (Simpson et al. 1994). As espécies da Secção *Rhizomatosae* praticamente não produzem sementes. Mesmo com viabilidade de pólen

alta, a falha na obtenção de híbridos pode ser devido a causas além da incompatibilidade genética, como a pequena superfície estigmática e a presença de pêlos unicelulares no ápice do estigma (Lu et al., 1990).

Há certo grau de cruzabilidade entre algumas espécies e isto pode representar uma chance para transferência de genes de uma espécie para outra. A introgressão de genes de espécies selvagens para o amendoim cultivado com obtenção de híbridos férteis, foi apresentada por Starr et al. (1990), Simpson e Starr (2001), e Mallikarjuna e Sastri (2002). A cultivar "Spancross" foi gerada pelo cruzamento de *A. hypogaea* e *A. monticola* (Starr et al., 1990) e a cultivar "COAN" (Simpson e Starr 2001), derivada de um retrocruzamento envolvendo um híbrido anfidiplóide interespecífico, entre *A. cardenasii* x *A. diogeni*, cruzada com a cv "Florunner" como doador de pólen (Norden et al., 1969), são exemplos reais do potencial das espécies selvagens no programas de produção do amendoim cultivado.

A variabilidade quanto à produção de sementes é encontrada entre acessos de *A. Pintoi* (Carvalho, 1996), que são aparentemente autógamos preferenciais, exibindo pouca ou nenhuma heterozigose, apresentando potencial para polinização cruzada e recombinação genética para o melhoramento de plantas (Simpson et al., 1994). A hibridação interespecífica dentro da Seção *Caulorrhizae* tem sido bem melhor sucedida que na Seção *Rhizomatosae*. O primeiro híbrido interespecífico resultante do cruzamento entre *Arachis Pintoi* e *A. repens* apresentou 86,8 % de viabilidade dos grãos de pólen, fertilidade bem maior do que a freqüentemente encontrada em cruzamentos interespecíficos de outras seções (Gregory & Gregory, 1979).

Híbridos foram obtidos a partir de cruzamentos envolvendo cinco acessos de *A. Pintoi* e dois acessos de *A. repens*. Os híbridos F1 intra-específicos de *A. pintoi* mostraram-se bastante vigorosos, e por autofecundação produziram sementes F2. Os híbridos interespecíficos F1 não produziram frutos, e foram considerados estéreis. A dificuldade na realização dos cruzamentos existe por causa da pouca informação sobre seu comportamento reprodutivo, e o período de antese e deiscência não foram estabelecidos para espécies da secção *Caulorrhizae*. (Oliveira & Valls, 2003).

Resultados de combinações envolvendo diferentes acessos da Seção *Caulorrhizae* e acessos de outras secções do Gênero *Arachis* mostraram que alguns híbridos intra-específicos de *A. Pintoi* produzem linhas segregantes para programas de melhoramento genético, enquanto que híbridos interespecíficos e interseccionais podem ser propagados vegetativamente, disponibilizando o potencial genético das secções (Valls et al., 2001). Nos cruzamentos entre as espécies da Seção *Caulorrhizae* com as espécies das Secções *Procumbentes* e *Erectoides*, os híbridos herdaram estolhos, com capacidade de enraizamento tão boa ou superior à dos paternos (Teixeira, 1999).

Estudos citológicos evidenciam um potencial para apomixia, reprodução biológica sem fertilização (produção de gametas) em *A. hypogaea*, resultando em sementes geneticamente idênticas à planta mãe. O fluxo gênico de *A. hypogaea* é considerado muito limitado, ocasionalmente ocorrendo fecundação cruzada por insetos. Caso este evento ocorra nas espécies de potencial forrageiro, a produção de linhas heterozigóticas estáveis seria favorecida (Simpson et al., 1994).

2.7 Características Agronômicas

A grande importância das leguminosas está na capacidade de obterem o nitrogênio necessário para o seu crescimento a partir do N₂ atmosférico, devido à relação simbiótica entre a planta hospedeira e o microssimbionte, o *rizóbio*, principalmente dos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* e *Sinorhizobium* que ocorre nos nódulos da raiz e caule das leguminosas (Loureiro, 1994). A simbiose entre plantas leguminosas e bactérias fixadoras de N₂ ocorre em sua maioria nas raízes. Poucas leguminosas, contudo, formam nódulos não somente nas raízes, mas também no caule (Evans et al., 1990).

O uso de leguminosas é o meio mais econômico de introduzir N₂ nas pastagens. Isto é essencial principalmente nos sistemas de produção animal nas quais os retornos econômicos são insuficientes para justificar o uso de fertilizantes (Valentim, 1985). Durante o ciclo de vida ou após a morte, as leguminosas adicionam nitrogênio ao solo, por meio da decomposição de suas folhas, ramos e raízes, beneficiando as gramíneas

consorciadas. Em termos globais, as leguminosas adicionam mais N₂ ao solo que os fertilizantes industriais (National Academy of Sciences, 1977; Gomide, 1986).

A plasticidade no uso de *Arachis* como forragem, feno, silagem, uso paisagístico e como cultivo de cobertura, juntamente com a capacidade de produzir sementes debaixo do solo, tornam esta forrageira uma leguminosa ideal para os trópicos latino-americanos e mundiais, tanto do ponto de vista nutricional, como social (Pizarro, 2001). A espécie *A. Pintoi* é uma leguminosa forrageira de alta qualidade (Ladeira et al., 2002), sendo que o valor nutritivo da espécie é maior do que da maioria das leguminosas tropicais de importância comercial, podendo ser encontrados valores de 18 a 27% de proteína bruta (PB), de 60 a 67% de digestibilidade in vitro da MS (DIVMS) e de 60 a 72% de digestibilidade da energia bruta. (Lascano, 1994; Argel & Pizarro, 1992; Nascimento et al., 2003; Deschamps et al., 2000; Paulino et al., 2008), além de apresentar grande aceitabilidade pelos animais (Lascano & Thomas, 1988, Carulla et al., 1991).

A. Pintoi cresce bem em clima, tropical ou subtropical, e áreas que ofereçam precipitação anual superior a 1500 mm e secas inferiores a quatro meses têm condições para o estabelecimento e uso da espécie (Rincón et al., 1992). Cresce bem desde o nível do mar até 1800 m de altitude (Montenegro & Pinzón, 1997, Rincón et al., 1992). Os solos ideais são de textura franca, de média fertilidade, com matéria orgânica igual ou superior a 3%, bem drenado, com longo período de precipitação (Pizarro e Rincón, 1994) e pH em torno de 6,0 a 6,5, tolerando condições de má drenagem e encharcamento temporário apresentando rápido rebrotamento e excelente capacidade de captação de luz. Adapta-se a solos pobres em nutrientes, deficientes em fósforo, potássio, cálcio e magnésio, ácidos (pH 5,0) e suporta alta toxicidade de alumínio (75%), fato que tem maior influência durante o desenvolvimento inicial, no estabelecimento (Rincón et al., 1992, Simpson et al., 1994). De acordo com Rao e Kerridge (1994), *A. Pintoi* CIAT 17434 ou (PI 338447) ou BRA013251 mostra boa adaptação a solos ácidos, com crescimento ocorrendo em pH 5,4, em uma variedade de solos do arenoso ao argiloso, embora seu crescimento ótimo ocorra em solos arenosos (Argel e Pizarro, 1992). Apresenta habilidade em absorver P (fósforo) em solos com baixa concentração deste elemento.

2.8 Produção de Forragem

As espécies de *Arachis* revitalizaram o interesse em leguminosas tropicais devido ao seu valor como forrageira e densa cobertura do solo apresentando elevado valor nutritivo e palatabilidade (Valle, 2001). Praticamente todas as espécies de *Arachis* produzem forragem de boa qualidade e em razoável quantidade, quando comparadas com espécies de outros gêneros de leguminosas utilizadas comercialmente (Valls & Simpson, 1994).

Quanto à produtividade de forragem, Andrade & Valentim (1999) afirmam que esta leguminosa possui boa capacidade de produção, mesmo em condições elevadas de sombreamento. Segundo os autores, áreas de amendoim forrageiro, sombreadas entre 50 e 70%, demonstram melhor distribuição sazonal de produção de biomassa aérea, sendo este um fator de grande importância, para maior estabilidade da produção de forragem durante o ano. As espécies pertencentes às Seções *Rhizomatosae*, *Arachis*, *Erectoides*, *Procumbentes*, *Caulorrhizae* e *Triseminatae* têm sido avaliadas na Austrália há 50 anos, tendo muitas destas espécies apresentado grande potencial forrageiro, principalmente no que se refere à persistência sob pastejo (Cook et al., 1994). Dentre as várias espécies do gênero que apresentam potencial para utilização em pastagens, visando à melhoria da qualidade da forragem ofertada, destacam-se as espécies da Seção *Caulorrhizae*, *A. Pintoi* e *A. repens* e espécies da Seção *Rhizomatosae* *A. glabrata* (Valls, 1992).

A. glabrata foi a primeira espécie cultivada como forragem em 1936 na Florida (USA). A universidade da Florida liberou no sudeste dos Estados Unidos duas cultivares, “Florigraze” (Prine et al., 1986) e “Arbrook” (Prine et al., 1990) da espécie *A. glabrata*. As duas cultivares citadas são utilizadas principalmente para produção de feno de alta qualidade nutricional para alimentação de gado de corte e leite e para alimentação de cavalos de corrida. Embora *A. glabrata* apresente excelente características de forragem, o fato de produzir pouca semente e a propagação ser exclusivamente vegetativa, causa dificuldade no estabelecimento, o que tem impedido a utilização em grandes áreas (French et al., 1994). Considera-se que a maior promessa para uso forrageiro encontra-se entre as espécies da seção *Caulorrhizae*, estas exclusivas da flora brasileira (Valls & Simpson, 1994). De acordo com os autores a

espécie com maior potencial forrageiro é *A. Pintoi* uma espécie endêmica do Brasil que produz matéria seca de alta qualidade.

2.9 Potencial de consórcio

Nos sistemas de produção pecuários tropicais o uso de leguminosas em pastagens consorciadas vem ganhando espaço uma vez que as gramíneas geralmente são responsáveis pela maior parte da produção de forragem, enquanto as leguminosas aumentam a qualidade da forragem produzida. Dos nutrientes minerais essenciais às plantas e aos animais, o N₂ é considerado o mais dinâmico do sistema, tendo suas formas minerais absorvíveis (íons amônio e nitrato), extremamente variáveis e dependentes das condições climáticas e da qualidade dos resíduos culturais (Oliveira, 2000, Cantarutti et al., 2002).

Pastagens consorciadas de gramíneas com leguminosas apresentam acréscimos de 10 a 30% na produção animal, em relação às pastagens exclusivas de gramíneas (Lascano & Euclides, 1996). O efeito das leguminosas em pastos consorciados com gramíneas, em regiões tropicais, pode ser atribuído à maior capacidade de suporte da pastagem, ao maior período de ganho de peso e a redução das perdas em peso vivo animal durante a estação seca. As leguminosas são fontes de proteína e nitrogênio solúvel, bem como de minerais e contribuem para aumentar a quantidade e a qualidade nutricional das pastagens, sendo importantes nos sistemas de produção de carne (Purcino et al., 2005).

O consórcio de gramíneas e leguminosas para as condições edafoclimáticas de determinada região, pode apresentar dificuldades de encontrar espécies adaptáveis a baixos níveis de nutrientes, alagamento etc. Comastri & Pott (1995), principalmente porque está disponível apenas um pequeno número de cultivares das diferentes leguminosas adaptadas às diferentes regiões geográficas do país (Velentim, 2004). Dentre as leguminosas forrageiras, os gêneros *Stylosanthes* (estilosantes), *Leucaena* (leucena), *Cajanus* (guandu), *Glycine* (soja perene), *Calopogonium* (calopogônio) e *Arachis* (amendoim forrageiro), apresentam potencial de utilização quando consorciados com gramíneas (Purcino et al., 2005).

A introdução de *Arachis Pintoï* para restabelecimento de pastagens degradadas permitiu a melhora na disponibilidade de biomassa total e comestível, assim como o consumo e qualidade nutritiva da dieta (Gonzalez et al. 1996). Para o sucesso no estabelecimento de uma associação entre gramínea e leguminosa deve-se considerar o grau de compatibilidade existente entre estas espécies. O crescimento das plantas forrageiras e a competição que se estabelece entre elas por água, nutrientes e luz determinam sua produtividade e persistência (Maldonado et al., 1995). O *Arachis Pintoï* vem despertando interesse dos pesquisadores em forragicultura, devido à sua rusticidade, qualidade nutricional, tolerância ao pisoteio, produção subterrânea de sementes, cobertura vegetal do solo, tendo apresentado resultados promissores para persistência do consórcio com gramíneas forrageiras (Argel & Pizarro, 1992, Rincón et al., 1992, Rivas & Holmann, 2000), devido à capacidade de persistência desta leguminosa, quando consorciada com gramíneas.

O *A. Pintoï* persiste ao pastoreio devido ao hábito de crescimento rasteiro, habilidade de enraizar nos estolhos e reserva de sementes no solo (Jones, 1993), possuindo seus pontos de crescimento protegidos, permitindo que uma área foliar residual satisfatória seja mantida, mesmo quando submetido a um pastejo contínuo (Grof, 1985). A persistência do amendoim forrageiro tem sido reportada na literatura mesmo quando submetido a altas intensidades de pastejo. Em ensaio conduzido na Bahia, em pastagens consorciadas com *Brachiaria dictioneura*, submetidas ao pastejo contínuo, não se observou efeito da taxa de lotação sobre a oferta de pasto de amendoim forrageiro, mas a proporção da leguminosa aumentou em todas as taxas no decorrer do experimento que teve duração de quatro anos (Santana et al., 1998).

A qualidade da forragem do amendoim forrageiro é considerada melhor que a da maioria das leguminosas tropicais utilizadas, a palatabilidade é alta e os animais em pastejo selecionam o *A. Pintoï* durante todo o ano (Purcino et al., 2005). Esta característica contrasta com o pastejo de outras leguminosas como *puerária* e *estilosantes*, duas leguminosas das mais consumidas pelos animais no período seco do ano, ou ainda de *desmódio* que é pouco aceito por animais (Zimmer et al., 2003). Segundo Lascano (1994), Santana et al (1998) e Barcellos et al (2000), o amendoim forrageiro pode ser usado na formação de pastagens consorciadas com braquiárias,

suportando taxas de lotação de até 4 novilhos/ha com ganhos de peso de 550g/animal/dia e 500 kg/ha/ano. Em clima tropical, consorciado com *Brachiaria brizantha*, o ganho de peso vivo por hectare variou entre 534 e 937 g de acordo com a baixa e alta pressão de pastejo (Hernandez et al., 1995), com persistência acima de dez anos (Argel & Villarreal, 2000).

Experimentos realizados por Pereira et al. (1990, 1996) mostraram que o consórcio de *A. Pintoi* e *B. humidicola* teve melhor desempenho quanto ao ganho de peso dos animais que quando comparado com outra leguminosa e com adubação nitrogenada. O consórcio de *A. Pintoi* com capim estrela roxa (*Cynodon nlemfuensis*) proporcionou um ganho significativo na produção de leite quando comparado com a pastagem formada somente pelo capim (Gonzalez et al, 1996). Valentim & Moreira (2001) utilizando diferentes acessos de *Panicum maximum* consorciados com *A. Pintoi* tiveram aumento de produtividade variando entre 30% e 50% quando comparada à pastagem utilizando-se apenas a gramínea.

Na Costa Rica, em consorciação com capim-estrela africana, Gonzalez, et al. (1996) conseguiram a proporção média de *A. Pintoi* de 37,9% para os dois anos a que se referem os dados. Lascano (1994) relata dados obtidos em Carimágua, Colômbia, em pastagem de *B. humidicola* + *A. Pintoi*, com duração de quatro anos, onde a disponibilidade de *A. Pintoi* aumentou em 5 a 6 vezes do primeiro para o quarto ano, não se observando efeitos das taxas de lotação de 2, 3 e 4 cabeças/ha sobre esta disponibilidade. A espécie *A. Pintoi* vem ocupando lugar de destaque por apresentar associações estáveis com gramíneas vigorosas C4, sob pastejo intensivo, durante períodos superiores há 10 anos, aumentando a produtividade em relação a pastagens de gramíneas puras, Hernandez et al. (1995).

2.10 Produção Animal

A produção de massa seca de *A. Pintoi* quando manejado de forma intensiva, com intervalos de rebrota entre 14 e 21 dias e altura de corte entre 5 a 10 cm, propiciou a obtenção de produtividade de matéria seca superior a 30 t/ha/ano, sem comprometer a persistência da pastagem (Wendling et al., 1999). O valor de digestibilidade da massa seca (MS) do feno de *A. Pintoi* foi maior que o encontrado por outros autores para

algumas leguminosas de clima tropical, sendo que somente a alfafa, que é de clima temperado apresenta digestibilidade próxima ao *Arachis* (Ladeira et al, 2002), embora seja mal adaptada aos trópicos e de maior preço.

A digestibilidade encontrada está dentro da faixa citada por Lascano (1994) para ensaio “in vitro”, que foi de 60% a 67%. O feno de *A. Pintoi* apresentou consumo e digestibilidade elevados, permitindo fornecer nutrientes em quantidades suficientes para atender o potencial de produção dos animais, recomendando-se seu uso na alimentação de ruminantes. (Ladeira et. al, 2002).

Filhotes de avestruzes alimentados com *A. Pintoi* tiveram a taxa de mortalidade registrada (período mais delicado da vida do avestruz) caindo para 3,8%, índice surpreendente até mesmo para os técnicos, que esperavam algo em torno de 6%. O ganho de peso nesta fase de vida aumentou 18%. Além disso, a mudança também trouxe economia. Os custos com alimentação dos filhotes diminuíram em torno de 12%. (SEAGRI, 2007). Suínos mantidos em pastagens de *A. Pintoi* e *Cynodon dactylon* reduziram voluntariamente em 28% o consumo de ração comercial, suportando restrição alimentar de 35% na oferta de ração, sem perdas significativas de peso quando comparadas com os animais confinados (Both & Saibro, 2003).

2.11 Cobertura verde

O uso de leguminosas ou gramíneas herbáceas perenes como cobertura viva, além de proteger o solo dos agentes climáticos, mantém ou eleva o teor de matéria orgânica do solo, mobiliza e recicla nutrientes e favorece a atividade biológica do solo (Barradas et al., 2001; Duda et al., 2003; Castro et al., 2004; Faria et al., 2004). Estes benefícios podem melhorar a estabilidade do sistema produtivo e culminar com menores custos de produção.

De acordo com Espindola (2001), 91% do nitrogênio presente no tecido vegetal do amendoim forrageiro foi obtido pela fixação biológica e, quando esta leguminosa encontrava-se consorciada com bananeiras, esse valor foi de 61%. Perin et al. (2003) em dois anos de experimentação encontraram produção total de forragem de 20ton/ha, acumulando aproximadamente 250kg/ha/ano de nitrogênio, destacando o alto potencial do amendoim forrageiro como cobertura viva, representando uma estratégia para a

auto-suficiência em nitrogênio no sistema em que está inserido, minimizando ou dispensando a utilização da adubação nitrogenada com fertilizantes sintéticos ou outras fontes.

A espécie *A. Pintoi* apresenta ciclo de vida perene e hábito de crescimento estolonífero e vem mostrando um grande potencial para cobertura do solo em vários sistemas agrícolas (De La Cruz et al., 1994). Segundo Pizarro & Rincón (1994), o amendoim forrageiro possui duas características que contribuem para o seu sucesso como cultivo de cobertura e de proteção do solo, habilidade de crescer sob sombreamento e a densa camada de estolões enraizados que protegem o solo dos efeitos erosivos das chuvas pesadas. Quando comparada com outras leguminosas tropicais, tradicionalmente utilizadas como cobertura do solo em frutíferas, o amendoim forrageiro, tem a vantagem de não possuir o hábito de crescimento trepador, reduzindo os custos de manutenção das áreas (De La Cruz et al., 1994).

O plantio direto de alface sobre cobertura viva de *A. Pintoi* acarretou desempenho semelhante ao desta hortaliça, em sistema de preparo convencional do solo, com nível máximo de produtividade de 55,99 T/ha-1 de massa fresca e houve controle total de invasoras pelas plantas de cobertura durante o período experimental sem uso de capina ou herbicida (Oliveira et al. 2006a). Como ocorrido com a alface, o cultivo do feijão-vagem, cv. Alessa, diretamente sobre cobertura viva perene de amendoim forrageiro apresentou viabilidade comparável ao cultivo em solo mobilizado (Oliveira et al. 2006b).

A produção de milho/grão com utilização de *A. Pintoi* como cobertura de solo foi equivalente à adubação com 80 kg N/ha, sendo uma opção para reduzir os custos da produção com a vantagem de não poluir o meio ambiente (Purcino et al. 2004). Quando utilizado como cobertura verde em plantios de bananeiras *A. Pintoi* ocasionou aumento da altura das bananeiras consorciadas, da produtividade e da proporção de cachos colhidos, com redução do tempo até a colheita quando comparado com a vegetação espontânea (Espindola et al., 2006).

No sul de Minas Gerais, numa avaliação dos efeitos da cobertura do solo de lavoura de café em formação, observou-se que a cobertura verde de *A. Pintoi* nas

entrelinhas formou uma vegetação rasteira e densa, impedindo o desenvolvimento de plantas daninhas, causando economia na prática de capina e maior proteção ao solo no controle da erosão. (AGROONLINE, 2007). Em pomares de laranja, o acesso de *A. Pintoi* CIAT 17434 (BRA- 013251) se comportou como uma espécie adequada para cobertura do solo, obtendo uma maior produção de frutos, uma cobertura mais rápida do solo e uma menor competição com o cultivo (Perez et al., 1996). *A. Pintoi* também tem sido indicado como "cobertura viva" nos plantios de mamão e maracujá (Almeida et al., 1998).

2.12 Caracterização do Germoplasma

2.12.1 Caracterização Agronômica

A espécie *A. Pintoi* até 1991 apresentava base genética muito estreita com aproximadamente 30 acessos conhecidos. A partir da intensa coleta de materiais da espécie teve início vários projetos e a base genética do germoplasma foi ampliada para mais de 150 acessos (Valls & Simpson, 1994).

O grande número de acessos hoje disponível insinua a necessidade de discriminação entre eles, pois os mesmos podem apresentar desempenho agronômico diferente. O conhecimento da variabilidade genética de *A. Pintoi* poderá ser útil na caracterização dos acessos. A caracterização e a avaliação da grande variedade do germoplasma de *A. Pintoi* é realizado de acordo com as prioridades e estratégias para controlar os recursos genéticos do gênero *Arachis* (Valls 1988).

A espécie *A. Pintoi* foi distribuído mundialmente pela troca de germoplasma internacional que consiste de materiais de centros internacionais sujeito ao International Plant Genetic Resources Institute Instituto (IPGRI). Apesar da larga distribuição do germoplasma, a avaliação foi conduzida somente com o acesso original BRA 013251 (PI 338447). Como resultado *A. Pintoi* foi liberado comercialmente como cultivar em alguns países como Austrália, USA, Costa Rica, Honduras, Colômbia e Brasil (Carvalho, 2004).

Porém novas cultivares foram liberadas a partir de acessos oriundos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, aliados ao esforço de diversos pesquisadores em âmbito nacional e internacional, por longos anos de avaliação sistemática de *A. Pintoi* foi possível o surgimento de algumas cultivares. Mesmo assim, a utilização com sucesso das cultivares, oficialmente comercializada, somente é possível a partir do conhecimento da adaptação regional (Nascimento, 2006).

De acordo com Pizarro e Carvalho (1996), o CIAT (International Center for Tropical Agriculture) distribuiu sementes do acesso BRA 013251 de *A. Pintoi* na Europa, África, Ásia, Sudeste da Ásia e América Central suprindo de sementes um total de 61 países. A espécie *A. Pintoi* passou por caracterização e avaliação baseada somente em características agronômicas, enfatizando a produção de pastagem, utilizando poucos acessos em diversos locais na América do Sul, na América Central e Austrália.

2.12.2 Caracterização Morfológica e Molecular

A principal caracterização do germoplasma de *A. Pintoi* encontrada na literatura se baseia nas características agronômicas, porém há trabalhos de caracterização morfológica e molecular. Monçato (1997) trabalhou com 51 acessos de *A. Pintoi* e *A. repens* da seção *Caulorrhizae*, aplicando uma série de descritores morfológicos para descrever a variabilidade do germoplasma. Oliveira et al. (1999) demonstraram diversidade morfológica e herança na cor da flor. De acordo com os autores a flor amarela é dominante em relação as demais.

Maass & Torres & Ocampo (1993) usaram 60 descritores morfológicos para caracterizar e demonstrar variabilidade entre oito acessos. Os resultados relatados pelos autores apontaram uma falta de padrão contínuo de variação morfológica e realçaram a necessidade de coleção adicional do germoplasma. Paganella e Valls (2002) avaliaram sete cultivares e 13 acessos de *A. Pintoi* com 12 descritores para confirmar a origem das cultivares e conferir as descrições na literatura do germoplasma que deu origem às cultivares comerciais. O resultado demonstrou que cinco das sete cultivares derivaram do acesso original coletado BRA 013251. Carvalho (2000) verificou por meio de marcadores morfológicos e moleculares RAPD, qual seria o provável progenitor

masculino do acesso W34b, através do monitoramento de populações segregantes de *A. Pintoi* W34b (BRA031143). O autor relatou que se trata de um híbrido natural entre o acesso W34 como genitor feminino e o acesso BRA 015121 como genitor masculino.

O germoplasma do Gênero *Arachis* também foi avaliado a nível molecular, empregando marcadores moleculares tais como RAPD, RFLP e SSR. As seções *Extranervosae*, *Caulorrhizae*, *Heteranthae*, e *Triseminatae* foram avaliadas com os marcadores RFLP e RAPD para determinar a variação genética intra e inter acessos. O marcador RAPD mostrou nível maior de diversidade genética comparado ao marcador RFLP mas, menor valor genético uma vez que não identifica os heterozigotos (Galgaro et al., 1998). Gimenes et al. (2000) trabalhando com sessenta e quatro acessos da seção *Caulorrhizae* utilizou análise de RAPD para caracterizar a variação genética e o relacionamento filogenético.

Carvalho (2004) trabalhou com diferentes acessos de *A. Pintoi* para estudos de diversidade genética a nível molecular utilizando o marcador molecular RAPD, caracterização morfológica e caracterização agrônômica. Os resultados da pesquisa mostraram grande diversidade entre os acessos tanto com o marcador molecular quanto com os resultados morfológicos e agrônômicos. Além disso, marcadores moleculares microssatélites tem sido utilizado para caracterizar e determinar a transferabilidade entre os acessos do gênero *arachis* bem como a diversidade genética (Bravo et al.,2006; Hoshino et al.,2006; Angelici et al., 2007).

2.13 Diversidade Genética

Para um desenvolvimento econômico e social que garanta a sustentabilidade do ambiente, torna-se necessário conhecer melhor os recursos naturais, com fundamentos científicos, de forma a gerar tecnologias compatíveis com os ecossistemas. A variação encontrada entre os organismos vivos e as complexidades ecológicas nas quais elas ocorrem pode ser entendida como associação de vários componentes hierárquicos: ecossistema, comunidade, espécies, populações e genes em uma área definida (Carvalho, 2004)

Na diversidade, a nível de espécie, procura-se observar as diferenças entre os indivíduos sejam elas morfológicas ou moleculares. A diversidade genética está

associada ao grau de diferenciação no material genético de indivíduos de uma determinada população, o que é importante porque permite a evolução e adaptação das espécies sempre que há mudanças ambientais (Carvalho, 2004). As populações naturais possuem, em geral, altos níveis de variabilidade genética intra-populacional, que é aumentada continuamente por mutação, migração ou fluxo gênico (Morand et al., 2002). A diversidade dentro de uma espécie, medida pelas diferenças morfológicas, atualmente tem sido avaliadas por métodos de detecção, baseados em dados moleculares, considerados como vantajosos sobre os métodos antigos devido ao maior número de caracteres estudados (Ferreira & Grattapaglia, 1998, Karp et al., 1996).

As pesquisas genéticas têm priorizado as espécies com potencial para produção de forragem, envolvendo estudos de germoplasma das seções *Caulorhizae* e *Rhizomatosae* do Gênero *Arachis*, para caracterização da variabilidade a nível molecular, fisiológico e agrônômico. Diante disso, vem ocorrendo um amplo desenvolvimento de marcadores moleculares para identificação de genótipos e estudos de produção, quantificação da variabilidade genética, herança de características importantes, identificação de características de interesse agrônômico e pesquisa de resistência genética para doenças e insetos em populações naturais (Carvalho, 1996, Carvalho, 1997, Carvalho, 1998, Carvalho, 2000, Carvalho, 2004,, Carvalho, 2005, Palmieri et al., 2002, 2004, Hoshino et al., 2006, Bravo et al., 2006, Gimenes et al., 2007, Otto, 2007).

Considerando a importância da espécie *A. Pintoi* como planta potencialmente útil na recuperação de áreas degradadas e nos consórcios com gramíneas, bem como sua ampla distribuição no território brasileiro, torna-se importante conhecer sua diversidade. Esta informação pode ser útil na identificação de acessos que tenham maior capacidade de ocupar áreas desprovidas de vegetação.

2.14 *Melhoramento de plantas autógamas*

As espécies vegetais nas quais predominam a autofecundação são denominadas de autógamas. Espécies cultivadas de importância econômica pertencem a este grupo tais como o trigo, a cevada, a aveia o arroz, a soja, a ervilha, o amendoim, o feijoeiro

comum, o feijão caupi, o tomate, o quiabo, a alface, a berinjela, o café arábica, o pêssego e a nectarina (Borém & Miranda, 2005 e Ramalho et al., 2001).

As espécies autógamas caracterizam-se por apresentarem mecanismos morfológicos e fisiológicos que favorecem ou conduzem à formação de sementes a partir da união de gametas oriundos da mesma planta (Fehr, 1987). Em geral, a taxa de fecundação cruzada natural em plantas autógamas é inferior a 5% (Allard, 1999). Contudo, é relatada a ocorrência de variações nas quantidades relativas de polinização cruzada dentro da mesma espécie, que pode variar com o genótipo, e também com condições ambientais durante o período de polinização e da disponibilidade de populações de insetos polinizadores (Ramalho et al., 1993, Vieira et al., 2005).

Para as espécies autógamas a autofecundação é o sistema de acasalamento predominante. Este sistema é o que mais rapidamente conduz à endogamia (Miranda, 2001). O efeito da endogamia sobre a estrutura genética das populações constitui-se a principal diferença entre espécies autógamas e alógamas (Allard, 1999). As plantas alógamas sofrem severa depressão por endogamia, já as espécies autógamas quase não a exibem, e provavelmente ao longo do processo evolutivo, a carga genética contida no heterozigoto deve ter sido gradativamente eliminada. Desse modo, os métodos de melhoramento apropriados para cada uma destas espécies são bem diferentes. Especificamente para culturas autógamas, os métodos devem, em geral, direcionarem-se para a condução e a manutenção da homozigose nas progênies e potenciais cultivares (Wricke & Weber, 1986).

O fluxo alélico em plantas autógamas é reduzido devido às baixas taxas de polinização cruzada. Nestas espécies, os genótipos produzem gametas idênticos que se unem originando progênies genotipicamente idênticas (Wricke & Weber, 1986). Quanto ao padrão de distribuição da variação genética em populações naturais de plantas autógamas, é esperado que a maior diversidade encontre-se entre as populações (Loveless & Hamrick, 1984).

O melhoramento de espécies autógamas tem como objetivo, em geral, a obtenção de linhagens que detenham alelos favoráveis no maior número de locos (Ramalho et al., 2001). Nas sucessivas gerações de uma população segregante é

possível observar que a cada geração de autofecundação, há uma redução de 50% na frequência dos locos em heterozigose. Desta forma, na geração F2, 50% dos locos estão em heterozigose e 50% estão em homozigose. Na F3, a frequência de heterozigotos passa a ser de 25%, enquanto que a de homozigotos passa para 75%, e assim, sucessivamente (Rodrigues, 2004).

Nos processos de melhoramento há dificuldade de se identificar genótipos homozigóticos desejáveis, já nas gerações iniciais, sendo esta tarefa mais facilitada após a realização de algumas gerações de autofecundação, a qual promove um incremento concomitante na frequência de homozigotos na população com a conseqüente redução da proporção de heterozigotos (Ramalho et al., 2001, Wricke & Weber, 1986). Desse modo, a seleção deverá ser iniciada após a maioria dos locos estarem em homozigose. Na ausência de seleção, nas gerações seguintes, a população será apenas constituída de genótipos homozigóticos (BB e bb, considerando um gene com dois alelos), com frequência de 50% de cada (Rodrigues, 2004).

As populações de plantas autóгамas geralmente são constituídas por muitas linhagens homozigotas, estreitamente aparentadas, as quais, embora existindo lado a lado, permanecem mais ou menos independentes na reprodução. Em tais populações há uma tendência a diminuir os heterozigotos, conduzindo a uma fixação de alelos e, portanto, a uma maior uniformidade genética (Machado, 1984). Portanto o melhorista deve determinar as taxas de alogamia que ocorrem nos genótipos que compõem a base de melhoramento da espécie autóгama que está sendo trabalhada, nos seus respectivos ambientes (Allard, 1999). Este conhecimento é fundamental, sobretudo, em atenção às etapas finais de um programa de melhoramento de plantas autóгamas em que se almeja manter a pureza genética das linhagens.

2.15 Tipos de marcadores

A forma alélica originada de um genoma pode ser utilizada como um marcador genético, que pode ser de três tipos principais: marcador morfológico, que é um fenótipo de fácil identificação, que esteja intimamente ligado ao alelo de interesse, marcador bioquímico, aquele derivado da análise de proteínas, e marcador de DNA ou

molecular, que revela variações em regiões do DNA, as quais podem ser expressas ou não (Jones et al., 1997, Winter & Kahl, 1995).

2.15.1 Marcadores Morfológicos

Os marcadores morfológicos são utilizados para a identificação de genótipos como efetuados por Mendel. Apesar dos marcadores morfológicos terem contribuído significativamente para o estabelecimento dos princípios teóricos do mapeamento genético e das análises de ligação gênica, o número reduzido de marcadores fenotípicos disponíveis, a falta de ligação com caracteres de importância econômica, a influência do ambiente e os efeitos deletérios das mutações limitaram sua utilização (Guimarães e Moreira, 1999).

O efeito dos genes determinantes de marcadores morfológicos pode afetar a análise genética de caracteres de importância agrônômica. Poucos caracteres podem ser estudados ao mesmo tempo devido aos efeitos das interações gênicas, como a epistasia. O ambiente pode modificar a expressão dos marcadores morfológicos, causando uma má interpretação (Paterson et al., 1991). No entanto diversos trabalhos têm utilizado marcadores morfológicos para caracterizar agrupamentos de variedades em diferentes espécies (Souza & Sorrells, 1991a, Souza & Sorrells, 1991b, Sorrells et al., 1993, Zhong-Hu, 1991) mas, como indicam os dados das publicações, o uso desse marcador vem sendo substituído por marcadores mais polimórficos e menos trabalhosos.

2.15.2 Marcadores Moleculares Isoenzimáticos

Os primeiros a serem desenvolvidos foram os marcadores embasados em variantes alélicas de isoenzimas, o que permitiu a ampliação do uso de marcadores de, pelo menos, uma ordem de magnitude em relação aos marcadores morfológicos (Ferreira e Grattapaglia, 1998). O termo isoenzima define um grupo de múltiplas formas moleculares da mesma enzima que ocorre em uma espécie, como resultado da presença de mais de um gene codificando, cada uma das enzimas (Moss, 1992).

O princípio básico da técnica reside no uso de eletroforese em gel de poliacrilamida (Smithies, 1955) e na visualização do produto enzimático por métodos

histoquímicos (Hunter & Markert, 1957). Segundo Murphy et al. (1990), as diferenças observadas na mobilidade de isoenzimas submetidas a um campo elétrico são devidas a diferenças na seqüência de DNA que são codificadores de tais enzimas. Assim, se os padrões de bandas de dois indivíduos diferem, assume-se que essas diferenças possuam base genética e sejam herdáveis.

O controle genético das isoenzimas ocorre através de vários genes, que podem ser alelos de um mesmo loco, ou estar situados em diferentes locos (Ferreira & Grattapaglia, 1995). Inúmeras são as vantagens do uso de isoenzimas, como rapidez de análise dos locos analisados, embora o número destes seja limitado, são marcadores codominantes, permitindo, assim, a discriminação de locos homozigóticos de heterozigóticos, possuem baixo custo e são facilmente obtidos quando comparados com outros marcadores.

Os marcadores isoenzimáticos possuem algumas limitações, a saber: sofrem uma considerável influência na atividade enzimática em resposta a condições ambientais, o estágio de desenvolvimento da planta pode ocasionar diferenças nas atividades isoenzimáticas, não permitem a cobertura completa do genoma e limitam a construção de mapas genéticos saturados com base em isoenzimas, para análise de caracteres quantitativos (Ferreira & Grattapaglia, 1998, Desborough & Peloquin, 1968, Ford & Taylor, 1997).

2.16 Marcadores de DNA

Os marcadores moleculares tiveram sua utilização iniciada na década de 1980, com o aprimoramento das técnicas de Biologia Molecular, o DNA passou a ser o ponto focal no desenvolvimento de novos marcadores de DNA. A tecnologia dos marcadores moleculares também chamados de marcadores genômicos ou genotípicos oferece a possibilidade, ao melhorista, de acessar o genótipo da planta ao invés de simplesmente o fenótipo. A técnica viabiliza a caracterização genética de grande número de genótipos através de procedimentos relativamente simples e rápidos, podendo ser executada em qualquer estágio do ciclo de vida de um organismo (Oliveira et al., 2007).

São capazes de detectar o polimorfismo diretamente ao nível do DNA, não sofrendo qualquer tipo de influência ambiental (Souza, 2001). Além disso, são livres de

efeitos epistáticos e pleiotrópicos, permitindo, dessa forma, que qualquer número de marcadores seja monitorado em uma única população. Muitos marcadores de DNA apresentam expressão co-dominante, permitindo que genótipos sejam determinados em qualquer esquema de melhoramento (Kumar, 1999). Segundo Lanza et al. (2000), os marcadores moleculares aumentam a probabilidade do desenvolvimento de variedades melhoradas, visto que fornecem aos melhoristas informações genéticas adicionais e mais detalhadas dos genótipos.

O desenvolvimento de marcadores de DNA proporcionou um grande impulso para a determinação da variabilidade genética dentro e entre espécies de um mesmo gênero, determinação da conservação e ordem de genes em espécies de gêneros diferentes (sintenia) e em estudos genômicos mais elaborados, como a identificação de genes específicos (Brondani, 2003). Os marcadores de DNA podem ser utilizados, no melhoramento de plantas, em gerações altamente segregantes, permitindo a eliminação dos genótipos indesejáveis nas primeiras gerações de seleção. Podem, também, minimizar os problemas associados aos métodos de melhoramento clássico, reduzindo trabalho e tempo, principalmente, em se tratando de culturas perenes (Federizzi, 1998). O papel dos marcadores moleculares não é substituir as atuais técnicas de seleção e sim, auxiliá-las, visando incrementar os ganhos genéticos do programa (Federizzi, 1998).

No melhoramento de plantas as aplicações dos marcadores moleculares em estudos genéticos são inúmeras como identificação de genes de resistência a doenças e pragas, avaliação e caracterização de germoplasma, melhoramento dos progenitores de híbridos, introgressão gênica e seleção auxiliada por marcadores, determinação de grupos heteróticos e associação com regiões genômicas que afetam a heterose, elaboração de mapas genéticos de ligação, reconstituição de pedigrees, testes de pureza genética, estudos de interação genótipo-ambiente, mapeamento de QTLs (locos de características quantitativas), seleção assistida por marcadores, entre outros (Ferreira e Grattapaglia, 1998, Milach, 1998).

2.16.1 “Polymerase Chain Reaction” (PCR)

A técnica da PCR (“Polymerase Chain Reaction”) foi desenvolvida em 1984, por Kary Mullis (Mullis & Falloona, 1987). A facilidade, rapidez, versatilidade e sensibilidade da PCR tornam a técnica particularmente poderosa para estudos genético-moleculares, mesmo envolvendo grande número de indivíduos de qualquer organismo vivo. É uma metodologia para a amplificação *in vitro* de seqüências de DNA usando oligonucleotídeos (pequenas moléculas de DNA de fita simples) como iniciadores ou “primers” de seqüência conhecida e complementares às extremidades do segmento a ser amplificado, direcionando a síntese de DNA alvo em ciclos repetidos (Mullis, 1990). Os “primers” são sintetizados artificialmente, de maneira que suas seqüências de nucleotídeos venham a complementar e permitir amplificar as seqüências específicas flanqueadas pelo par de “primers” (Ferreira & Grattapaglia, 1998). A reação de PCR é realizada em um termociclador, que fornece as temperaturas e os respectivos tempos adequados à desnaturação da molécula de DNA, separando as fitas complementares e o anelamento dos “primers” e a extensão do DNA em cada ciclo de replicação, durante 25 a 40 ciclos. Com o uso da tecnologia de PCR, as moléculas simples de DNA podem ser seletivamente amplificadas, em alguns milhões de vezes, em poucas horas (Rasmussen & Rasmussen, 1995).

2.16.2 Marcadores de Seqüências Simples Repetidas (SSR)

Os genomas eucariotos são densamente povoados por diferentes classes de seqüências repetidas, umas mais complexas (minissatélites) e outras mais simples (microsatélites) (Hamada et al., 1982, Tautz & Renz, 1984). O DNA repetitivo é composto por DNA satélite, altamente repetitivo, seqüências de DNA microsatélites e minissatélites, moderadamente repetitivo e os elementos transponíveis, DNA moderadamente repetitivo, móvel e de seqüências dispersas (Rodrigues, 2004).

Seqüências simples repetidas (“SSR – Simple Sequence Repeats”), denominadas também de “microsatélites” (Litt & Luty, 1989), consistem de pequenas seqüências de 1 a 4 nucleotídeos de comprimento, repetidas em tandem. Devido ao grande número de sítios (locos) repetitivos, o SSR é considerado marcador altamente polimórfico e multialélico, constituindo uma das classes mais polimórficas de

marcadores moleculares disponíveis. As seqüências das regiões que flanqueiam os SSRs são conservadas, em indivíduos da mesma espécie. Dessa maneira, os SSRs são amplamente distribuídos em todo o genoma de eucariotos e podem ser amplificados por oligos específicos sintetizados a partir destas regiões flanqueadoras (Poncet et al., 2004).

A variabilidade do comprimento das regiões repetitivas pode ser analisada por PCR usando pares de “primers” que flanqueiam a região do microssatelite. A análise da amplificação mostra as diferenças entre indivíduos de acordo com o número de repetições da seqüência, ou seja, bandas de tamanhos diferentes são produzidas. O polimorfismo nestes locos é resultado de variações do número de repetições das seqüências de nucleotídeos (Akkaya et al., 1992). Segundo Saghai-Marroof et al., (1994) as repetições são divididas em perfeitas (sem interrupção), imperfeitas (interrompida por bases não repetidas) e repetições compostas (duas ou mais repetições contínuas adjacentes uma à outra)

A variação encontrada nos microssatélites pode ser devida tanto ao “escorregamento” da DNA polimerase durante a replicação ou devido a recombinação desigual, durante a meiose, resultando em diferenças no número de cópias das seqüências de nucleotídeos. Os SSRs aumentam a possibilidade de detecção de diferenças alélicas entre espécies próximas, dentro de uma espécie, ou até mesmo entre indivíduos numa população (YU et al., 1999). O polimorfismo é detectado após a amplificação do DNA via PCR e separação dos produtos por eletroforese em gel de poliacrilamida ou agarose (Wu & Tanksley, 1993).

Os microssatélites têm sido observados em diversos organismos incluindo seres humanos (Litt & Luty, 1989), baleias, *Drosophila* (Tautz, 1989), camundongos (Love et al., 1990), bovinos e caprinos (Moore et al., 1991), entre outros. De maneira geral, nas plantas, os sítios microssatélites são largamente distribuídos com uma freqüência de um a cada 50 mil pares de bases (Morgante & Olivieri, 1993; Ferreira & Grattapaglia, 1998). Sua presença é determinada em muitas espécies de plantas, como culturas anuais, espécies arbóreas, ornamentais e frutíferas. Nos genomas das plantas a

repetição AT/TA é predominante, mas relativamente baixa comparada a repetição AC/TG em humanos (Powell et al. 1996).

Os marcadores microssatélites apresentam vantagens pela sua característica codominante, ou seja, distinguem os indivíduos heterozigotos dos homozigotos, sendo assim, são os que possuem o mais elevado conteúdo de informação polimorfica. A principal vantagem dos SSR é que as seqüências amplificadas são altamente estáveis e ideais para o uso de PCR. A sua distribuição, ao longo de todo o genoma, possibilita que um ou mais locos sejam identificados próximos ou mesmo dentro de genes de interesse, constituindo-se em um marcador ideal. Além disso, como são muitos pequenos e distribuídos ao acaso, permitem a mais completa cobertura do genoma eucarioto.

Os microssatélites têm sido muito utilizados em programas de melhoramento de plantas sendo úteis para uma variedade de aplicações genéticas pela reprodutibilidade, natureza multialélica, alto grau de polimorfismo, herança co-dominante, relativa abundância e boa cobertura do genoma (Powell et al., 1996). Os marcadores SSR têm sido úteis também para integração de mapas genéticos e mapas físicos e, têm fornecido aos melhoristas e geneticistas uma ferramenta eficiente para associar variações genéticas e fenotípicas (Gupta & Varshney, 2000). Todas as características reunidas fazem com que marcadores baseados em SSR sejam ideais para mapeamento genético e físico de genomas, para identificação e discriminação de genótipos e estudos de genética de populações. Assim, toda e qualquer população segregante pode ser utilizada como população referência para estudos de ligação e mapeamento genético (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

2.17 Caracterização molecular de genótipos

Todo indivíduo possui uma seqüência de nucleotídeos que compõe o conteúdo do seu DNA. A identificação de diferenças entre essas seqüências, por meio de marcadores moleculares, revela um padrão único, uma impressão digital genética, denominada "DNA fingerprint", que pode ser utilizada para detectar diferenças e similaridades entre indivíduos. O "DNA fingerprint" tem sido muito utilizado para revelar a diversidade genética dos acessos de bancos de germoplasma de várias espécies

vegetais, fornecendo novas ferramentas para a conservação e utilização mais eficiente dos recursos genéticos, pelos melhoristas (Etienne et al., 2002).

Até meados da década de 60, a diferenciação de genótipos nos estudos de genética e melhoramento estava associada às características morfológicas das plantas. Porém, este método de análise tem como limitações as influências ambientais sobre o fenótipo, além do gasto excessivo de tempo e dinheiro (Sansavini, 1998). O conhecimento da divergência genética entre os genótipos utilizados em programas de melhoramento, permite a organização da variabilidade desses materiais auxiliando a seleção de genitores e potencializando os ganhos genéticos obtidos (Padilha, 2002).

O padrão molecular de um genótipo pode ser obtido a partir de vários tipos de marcadores moleculares. A caracterização molecular da diversidade genética entre os genótipos fornece informações fundamentais para auxiliar o melhorista na escolha de genitores, que poderão integrar esquemas de cruzamentos, visando à constituição de populações básicas no estabelecimento de esquemas de seleção. Tais cruzamentos são direcionados para maximizar a distância genética, com a finalidade de recombinar genes ou complexos gênicos em novas combinações favoráveis (Oliveira et al., 2007).

Os marcadores moleculares geram grandes quantidades de informações que, combinadas às características morfoagronômicas, fornecem um quadro mais completo para o agrupamento de genótipos e o planejamento de cruzamentos. As informações são eficientemente aplicadas em programas de seleção de genótipos, onde o estudo da diversidade genética da população permite a identificação dos genótipos mais divergentes. Dessa forma, proporcionará a recombinação de grupos de genótipos para assegurar a manutenção da variabilidade genética da população e, garantir que se alcance um maior ganho genético com o programa (Pereira, 2006; Gabriel, 2004).

As informações moleculares a respeito da diversidade genética podem, ainda, auxiliar no direcionamento do enriquecimento da base genética durante o andamento de um programa de melhoramento, bem como na avaliação de redundância e deficiências das coleções de germoplasma, gerando informações sobre a eficiência do processo de coleta, manutenção e ampliação de um banco de germoplasma. Esses dados podem ser utilizados no estabelecimento de coleções nucleares de espécies

“core collection”, que podem minimizar a repetibilidade da diversidade genética recolhida ao banco de germoplasma da cultura e facilitar o acesso do melhorista a tais coleções (Ferreira e Grattapaglia, 1998)

3 Material e métodos

3.1 Material

3.1.1 Histórico do pré-melhoramento

O híbrido intra-específico W34b (BRA 031143) da espécie *A. Pintoi* selecionado no canteiro experimental do acesso W34 (BRA 015253), no campo da EMBRAPA Cerrado (CPAC), Planaltina, DF, foi multiplicado por estolhos e essa população chamada hipoteticamente de geração F1. Das sementes obtidas em Planaltina, a partir deste híbrido em 1992, parte delas ficou armazenada no CENARGEN/EMBRAPA, Brasília, DF e o restante foi enviado a Correntina, BA e Uberlândia, MG, para teste a campo. Novas coletas foram efetuadas no canteiro da geração F1 e as sementes obtidas foram armazenadas como Planaltina safras 1994 e 1996 (Carvalho, 2000).

Como parte inicial do projeto de tese de doutorado, desenvolvido pelo hoje Dr. Sandremir de Carvalho, da Fundação Faculdade de Agronomia Luiz Meneguel (FFALM), Bandeirantes, PR, hoje denominada Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP), sob orientação da Prof^a. Dra. Catalina Romero Lopes, UNESP, Botucatu, SP, decidiu-se avaliar as diferentes coletas de sementes dos testes a campo do acesso W34b. Para tanto o Prof. Dr. Jose Francisco Montenegro Valls, curador do banco ativo de germoplasma de espécies silvestres do Gênero *Arachis*, sediado na EMBRAPA/Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), Brasília, DF, enviou à Bandeirantes, PR, sementes do acesso W34b (BRA 031143) coletadas em Correntina, BA, em Uberlândia, MG e em Planaltina, DF, nos anos de 1994 e 1996, que foram semeadas sob telado. Após a formação desse novo campo experimental foram selecionadas pelo Prof. Sandremir de Carvalho 40 plantas dentre aquelas procedentes de material de Correntina, 40 planta dentre as procedentes de Uberlândia, 31 plantas dentre as procedentes de Planaltina, safra 1994 e 40 plantas dentre as procedentes de Planaltina, mas da safra de 1996, compondo-se uma nova população de 151 plantas que passaram a ser avaliadas pelo processo de plantas individuais no Campus da

FFALM/UENP, utilizando-se espaçamento de três metros entre plantas e quatro metros entre linhas (Carvalho, 2000, Carvalho & Lopes, 2005).

Uma vez que parte do material inicial do acesso W34b havia sofrido pelo menos cinco anos de multiplicação em diferentes ambientes com seleção para altura da planta, vigor, densidade foliar, resistência ao consórcio com gramíneas e florescimento precoce, enquanto outras diferentes sementes passaram por outros experimentos tendo sido levadas finalmente para a Ásia e submetidos a procedimentos de seleção de interesse local, o curador do Banco de Germoplasma, Prof. Dr. Valls, houve por bem considerar a população que se originou das 151 plantas citadas, como um novo acesso, considerando-o como acesso BRA 041122.

3.1.2 Material vegetal para determinação do grau de homozigose

Foram avaliados 83 indivíduos de 37 genótipos oriundos de seleção do acesso BRA 041122. A coleta do material vegetal foi realizada no Campus da FFALM/UENP, Bandeirantes-PR onde se deu início ao processo de melhoramento do híbrido natural intra-específico acesso BRA 041122 da espécie *A. Pintoi*. Foram coletadas sementes de 37 genótipos que permaneceram no campo por pelo menos cinco anos sem passar por nenhum tipo de avaliação (**Tabela1**).

Tabela 1 - Nomenclatura utilizada para identificação individual de cada planta dos genótipos utilizados. Do genótipo G5 a G18 o numero de plantas acima de duas, do genótipo G19 a G25 duas plantas, do genótipo G26 a G 41 apenas uma planta.

G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14	G15
G5-1	G6-1	G7-1	G8-1	G9-1	G10-1	G11-1	G12-1	G13-1	G14-1	G15-1
G5-2	G6-2	G7-2	G8-2	G9-2	G10-2	G11-2	G12-2	G13-3	G14-2	G15-2
G5-3	G6-3	G7-3	G8-3	G9-3	G10-3	G11-3	G12-3	G13-4	G14-3	G15-3
G5-5	G6-5	G7-4	G8-4	G9-4				G13-5		
	G6-6		G8-5	G9-5						
	G6-7			G9-6						
G16	G17	G18	G19	G20	G21	G22	G23	G24	G25	
G16-1	G17-1	G18-1	G19-1	G20-1	G21-1	G22-1	G23-1	G24-1	G25-1	
G16-2	G17-2	G18-2	G19-2	G20-2	G21-2	G22-2	G23-2	G24-2	G25-2	
G16-3	G17-3	G18-3								
G26-1	G27-1	G28-1	G29-1	G30-1	G31-1	G32-1	G33-1	G34-1	G35-1	G36-1
G37-1	G38-1	G39-1	G40-1	G41-1						

3.1.3 Oligonucleotídeos (“primers”) de microssatélites

Foram utilizados vinte pares de “primers” microssatélites, dos quais 15 foram selecionados utilizando como critério de escolha a qualidade das bandas apresentadas. Treze pares foram desenvolvidos a partir da espécie *A. Pintoi* da Seção *Caulorrhizae* (AP18, AP33, AP40, AP152C, AP154, AP158, AP161CV, AP166, AP175C, AP176C, AP183, AP190CV, AP192CV), descritos por Palmieri et al. (2002 e 2004), quatro desenvolvidos a partir da espécie *A. glabrata* (Ag39, Ag140, Ag167 e Ag171), descrito por Moretzsohn et al. (2005) e três desenvolvidos a partir da espécie *A. hypogaea* da Seção *Arachis* (Ah7, Ah126, e Ah283), descritos por Gimenes et al. (2007), como mostra a (Tabela 2).

Tabela 2 - Seqüências, temperaturas de anelamento, variações no tamanho dos alelos em pb e concentrações de MgCl₂ para cada um dos 20 “primers” testados

"Primers" que amplificaram e foram avaliados					
Pares de "Primer"	"Primer forward" (5' - 3')	"Primer reverse" (5' - 3')	Tamanho dos alelos em pb	Temp. de anelamento	Conc. MgCl ₂
AH126	CCCTGCCACTCTCACTCACT	CGTACAAGTCAGGGGGTGAC	188-215	60°C	1,5
Ah7	CAGAGTCGTGATTTGTGCACTG	ACAGAGTCGGCCGTCAAGTA	102-115	50°C	1,5
AP40	CTGTTTGATCGCCGCTATG	GTCAAGTGCTTCCTCCGATG	164-200	56°C	2,0
AP152C	AGAGGATGCAGCGGAGTAGA	CTGGCCAATTCCTATGATCG	255-304	52°C	2,0
AP161CV	ACCGTCCTTCTCTCCTC	CCCTCTCCAAATGGACACAT	154-240	55°C	2,0
AP166CV	CGGCAGTCAACGAAGCTAT	TCGCCAAAGGTTAGATTGC	165-235	52°C	2,0
AP175C	CCCAATAGGCTAATTCAGAAGG	GCCTTATTTTGC GACTGAGG	178-192	52°C	2,0
AP176C	CCAACACAGGGCTTACCAAG	TCACCGATCCCACTTTTCC	205-212	52°C	2,0
AP183CV	CATCGTGTGGAGACGAAGGT	GAACCAACAGAGAGCGGATG	185-255	56°C	2,0
AP33	CAGCCTAGAGCCGAAAACAC	GATGGCATGGCTGT CAGTAA	180-255	52°C	2,0
AP190CV	CTGTTTGATCGCCGCTATG	GTCAAGTGCTTCCTCCGATG	168-198	55°C	2,0
AP192CV	TTCGTCCAGCTGAAAGTGCT	GTGAATGAATCTGCGCCTCT	111-124	55°C	2,0
Ag39	TGTAGTCAGCTGCTCCAAAA	ATGAAAGTTCACTTGAGCAAA	150-200	50°C	2,0
Ag140	CAGCATTCAATTCAGTTTCG	TCAACCTCGAACACACAAAA	125-157	50°C	2,5
Ag171	TGACCGTTGGGGTTTTTG	CAAACCCAAACACACGTCAC	158-170	50°C	2,0
"Primers" que não amplificaram					
AP18	TGCAGCCCACTGTATATTCG	TACACAGCGTAACAACCTATTTAGTG			
AP154	TGTCCAAATCACCTGAGACG	GGAACGGAGATGACAGAAGG			
AP158	GTCTGCAGAGGAGCCAACAT	TCTTCCTCTCCTCGCGTTC			
Ag167	CTCACCTTCAAAGCCCTTGT	AGAGGGGACAACGACAACC			
Ah283	GGGGTTCGAAGCTTAATTC	CAAGAGCAACTCAATCTTCTCTAGA			

3.2 Métodos

3.2.1 Germinação das sementes

As sementes coletadas foram colocadas para germinar em placas de petri, sendo as mesmas descascadas para acelerar o processo de germinação. As placas foram preparadas com algodão umedecido, água destilada e o produto Ethrel, nome comercial do fithormônio ácido 2-cloroetilfosfônico, à proporção de 100 miligramas por litro para a quebra da dormência das sementes, cobertos com papel filtro e, em seguida colocadas em câmara climatizada para a germinação (**Figuras 4**). As plântulas foram transferidas para vasos individuais, com capacidade de 6 litros de solo, sendo mantidos nas casas de vegetação pertencentes ao BIOGEM (Laboratório de Biotecnologia e Genética Molecular) do Departamento de Genética, UNESP, Botucatu/SP (**Figura 5**).

O substrato utilizado teve como composição, uma mistura de terra, areia e esterco bovino curtido, na proporção de 1:1:1. As plantas foram protegidas com sombrite a 50% e o controle da irrigação foi feito utilizando-se um temporizador programado para 3 minutos de irrigação a cada hora durante o dia, no período de setembro a março e de abril a agosto por 2 minutos a cada hora, sem irrigações noturnas.

As adubações foram efetuadas uma vez por semana por meio de fertirrigação (adubos aplicados na água da irrigação) e aplicações de inseticidas, fungicidas, acaricidas e herbicidas, quando necessário. Obteve-se como resultado da germinação das sementes utilizadas quatro plantas representantes do genótipo G5, seis do genótipo G6, três do genótipo G10, quatro do genótipo G7, quatro do genótipo G8, cinco do genótipo G9, três dos genótipos G11, G12, G13, G14, G15, G16, G17 e G18, duas dos genótipos G19, G20, G21, G22, G23, G24 e G25, apenas uma planta dos genótipos G26, G27, G28, G29, G30, G31, G32, G33, G34, G35, G36, G37, G38, G39, G40 e G41. As plantas de cada genótipo foram numeradas ao acaso utilizando-se a letra e o número do genótipo, seguido por outro número, indicativo de cada planta dentro do genótipo (**Tabela 1**).



Figura 4 - Germinação de sementes em placa de petri com a utilização do fitormônio comercial Ethrel



Figura 5 - Plantas em crescimento em copos de plástico na sala de germinação e na casa de vegetação

3.2.2 Extração e Quantificação de DNA

O DNA genômico total foi extraído usando o protocolo descrito por Grattapaglia & Sederoff (1994), modificado. Para a extração do DNA genômico coletaram-se folhas novas (não totalmente expandidas), que foram maceradas em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. Cerca de 250 a 300 mg de folhas maceradas foram colocadas em tubos de 1,5 mL, aos quais foram adicionados 700 µL de tampão de extração (3% CTAB, 100 mM Tris-HCl-pH 8,0, 20 mM EDTA-pH 8,0 e 1,4 M NaCl). Ao volume do tampão foi adicionado no momento de uso, 1,5% de β-mercaptoetanol, agitando-se até homogeneização, seguindo-se incubação por 60 minutos a temperatura de 65°C, com agitação periódica. A seguir, adicionou-se 700 µL de CIA (clorofórmio: álcool isoamilíco 24:1), seguindo-se agitação rápida dos tubos utilizando-se vortex e centrifugação a 12.000 rpm, por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL, ao qual foi adicionado 300 µL de isopropanol a -20°C. Essa mistura foi mantida em repouso, à temperatura de -20°C, por, no mínimo, 60 minutos. Após a precipitação do DNA genômico os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante descartado, virando-se rapidamente os tubos sobre papel toalha. Em seguida, os “pellets” foram lavados duas vezes com etanol 70% e uma vez com etanol absoluto, por 5 minutos, e colocados para secar à temperatura de 37°C. Os precipitados (“pellets”) foram ressuspensos com 100 a 300 µL de TE com RNase (10 mM Tris-HCl-pH 8,0, 1 mM EDTA-pH 8,0 e 20 mg/ml de RNase), de acordo com o tamanho do “pellet” e incubados à temperatura de 36°C, por no mínimo 3 horas. O DNA foi quantificado e armazenado à -20°C. A qualidade do DNA foi testada em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio e a concentração estimada em espectrofotômetro.

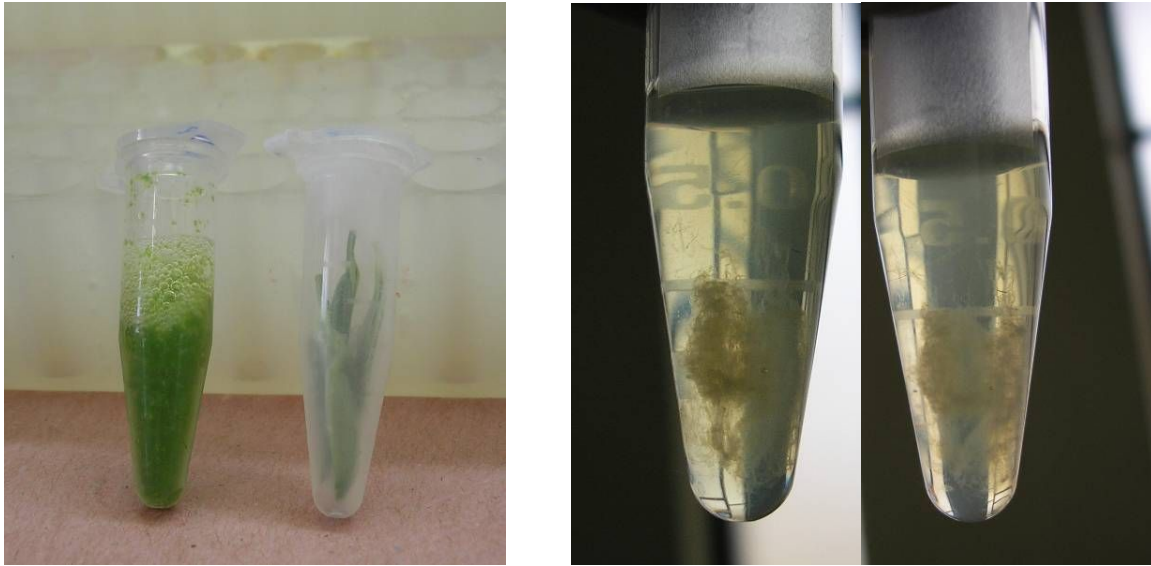


Figura 6 - Fases da extração de DNA. Na primeira figura os tubos de 1,5 ml contêm o material vegetal e o material macerado com nitrogênio líquido. Na segunda figura pode-se observar os ácidos nucleicos.

3.2.3 Amplificação de DNA e Eletroforese

Composição da mistura para a reação em cadeia da polimerase (PCR): 10 ng de DNA genômico, 0,6U de Taq DNA polimerase (Fermentas), 1× PCR buffer (200 mM Tris pH 8,4, 500 mM KCl), 1,5-2,0 mM MgCl₂, 200 μM de cada dNTP e 0,3 μM de cada “primer”, em um volume final de 10 μl. As amplificações foram efetuadas em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc., Watertown, MA, USA). As condições da PCR foram as seguintes: 96 °C por 5’, seguidos de 32 ciclos de 96 °C por 30” para desnaturação e de temperatura de anelamento específica para cada oligonucleotídeo (variando de 52 °C a 60 °C) por 45” seguindo-se uma extensão por 1’ a 72 °C, e uma extensão final de 10’ à 72 °C.

Na PCR foram adicionados 5 μl de solução desnaturante (95% (v/v) de formamida, 10 mmol de EDTA, 0,1% (p/v) azul de bromofenol e 0,1% (p/v) xileno cianol), seguido de tratamento térmico a 95°C por 10’. Uma alíquota de 1,5 μl da reação amplificada foi aplicada no gel. A eletroforese foi conduzida em gel de poli(acrilamida) desnaturante a 5% (acrilamida/bisacrilamida 29:1, 7M uréia), em placa de seqüenciamento vertical de 38 x 50 cm, com tampão 1X TBE, à potência de 95 W,

primeiro efetuando-se o aquecimento da placa até aproximadamente 50°C, seguindo-se corrida eletroforética por um período que variou de 1 h 30' até 2 h 30', de acordo com o tamanho do fragmento amplificado. A coloração do gel foi realizada utilizando-se nitrato de prata, segundo o protocolo proposto por Creste et al. (2001).

3.2.4 Coleta e análise dos dados

Os tamanhos dos fragmentos em pares de base foram estimados comparando-se com DNA padrão de peso molecular 10 pb Ladder (Invitrogen). O programa PopGene Versão 1.31 (Yeh et al., 1999) foi usado para estimar a partir das frequências alélicas os seguintes Índices de Diversidade Genética: Heterozigose Observada (H_O), Heterozigose Esperada (H_E), estimadas pelo método proposto por (Nei, 1973), Distância Genética (Nei, 1978) e Número de Alelos por Loco. A Heterozigose Observada (H_O) para cada loco foi obtida pela razão entre o número total de heterozigotos e o número de indivíduos. Para se obter a Heterozigose Média Observada, as proporções obtidas para cada loco foram somadas e divididas pelo número total de locos polimórficos.

$$H_O = 1 - \sum P_{ii}$$

em que:

H_O = Heterozigose Observada,

P_{ii} = frequência dos genótipos homozigotos.

A Heterozigose Esperada (H_E) para cada loco foi obtida com a fórmula:

$$H_E = 1 - \sum_i p_i^2$$

em que:

H_E = estimativa de Heterozigose Esperada

P_i = a frequência do alelo i no loco.

A homozigose de cada planta foi calculada utilizando-se a média aritmética simples (total de locos homozigotos dividido pelo total de locos avaliados).

O número médio de alelos por loco foi obtido pela divisão do número total de alelos pelo número total de locos.

3.2.5 Análise de agrupamento

A análise de agrupamento tem por finalidade discriminar geneticamente os indivíduos e permite separá-los em grupos pela análise de um conjunto de características de cada indivíduo agrupando os mesmos por algum critério de classificação, de tal forma que exista homogeneidade dentro do grupo e heterogeneidade entre grupos. Este processo de agrupamento envolve basicamente duas etapas, onde a primeira relaciona-se com a estimativa de uma medida de similaridade (ou dissimilaridade) entre os materiais a serem amostrados e a segunda, com a adoção de uma técnica de agrupamento para a formação dos grupos (Cruz et al., 2004).

Dentre os métodos de agrupamento mais comumente utilizados no melhoramento de plantas, citam-se os hierárquicos e os de otimização. Nos métodos hierárquicos, o agrupamento dos genitores é realizado por meio de um processo que se repete em vários níveis até que seja construído o dendrograma, que permitirá estabelecer a relação entre esses genitores (Cruz et al., 2004).

O método UPGMA (“Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages”) é baseado em distâncias genéticas, que considera a similaridade geral no agrupamento das unidades taxonômicas. Nesse método para o cálculo dos valores médios atribui-se sempre o mesmo peso a cada indivíduo do grupo que estão sendo integrados, é um agrupamento com base na média aritmética (Meyer, 2002). Segundo estudos de comparação do método de agrupamento UPGMA com o outro tipo de agrupamento foi verificado que o mesmo apresentou melhor ajuste para distâncias originais e estimadas e apresentou complementaridade na formação dos grupos, Arriel et al. (2006).

No melhoramento genético e em estudos biológicos, o método UPGMA é um dos mais utilizados, sendo indicado quando os possíveis grupos naturais são de diferentes dimensões e é recomendado quando nos genótipos a serem agrupados, há expectativa de formação de grupos próximos daqueles considerados naturais. O método UPGMA

proporciona um agrupamento dos genótipos com muitas propriedades desejáveis, como a alta estabilidade (Cattaneo, 2001).

4 Resultados

O protocolo utilizado, (Grattapaglia & Sederoff 1994), permitiu a extração de DNA de boa qualidade. Alguns indivíduos apresentaram padrão de bandas composto por um fragmento, enquanto outros apresentaram padrão de banda composto por dois fragmentos, tais plantas foram consideradas homozigotas e heterozigotas respectivamente, pois os microssatélites são marcadores codominantes e permitem a detecção de ambos os alelos de um loco (**figura 6**). Como a espécie analisada é diplóide o número máximo de alelos diferente no loco será dois.

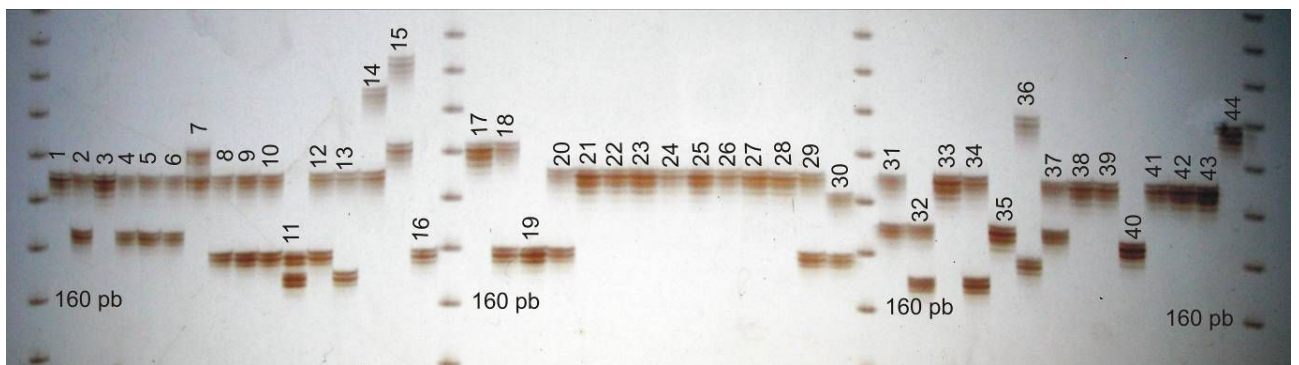


Figura 7 - Padrão de microssatélites gerado por 44 indivíduos de 37 genótipos avaliados, pelo loco AP190. Onde: de 1 a 3 (G15), de 4 a 6 (G14), de 7 a 10 (G13), de 11 a 13 (G12), de 14 a 16 (G11), de 17 a 19 (G10), de 20 a 25 (G9), de 26 a 30 (G8), de 31 a 34 (G7), de 35 a 40 (G6) e de 41 a 44 (G5).

Um total de vinte pares de “primers” foi testado para a amplificação de produtos, para os trinta e sete genótipos do acesso BRA 041122 da espécie *A. Pintoi*. Do total, quinze produziram bandas polimórficas Ah126, Ah7, AP33, AP40, AP152C, AP175C, AP176C, AP190CV, AP192CV, AP161, AP166, AP183, Ag39, Ag140 e Ag171, cinco pares de “primers” não produziram produtos específicos AP18, AP154, AP158, Ag167 e Ah283 e cinco pares de “primers” apresentaram falhas de amplificação em alguns indivíduos AP33, AP166, Ah7, Ag39 e Ag171. A ausência de amplificação em alguns genótipos pode refletir diferenças nas seqüências que flanqueiam os microssatélites, produzindo alelos nulos.

Nos quinze locos polimórficos o número de alelos variou de 3 a 10, sendo observados 109 alelos em 83 indivíduos, com média de 7,2 alelos por loco. O número efetivo de alelos variou de 1, 3210 para o loco Ag171 a 7, 0482 para o loco AP166. O tamanho dos alelos variou de 102 pb para o microssatélite do loco Ah7 a 300 pb para o microssatélite do loco AP152 e, o maior polimorfismo foi obtido com os “primers” AP40, AP161, AP190 e Ag39 (10 alelos) e o menor polimorfismo obtido com “primer” Ah7 (3 alelos). A heterozigose observada para o conjunto de 37 genótipos avaliados variou de 0, 0000 para o microssatélite do loco Ag171 até 0,7805 para o microssatélite do loco AP166, com média geral de 0,3571 (**Tabela 3**). A heterozigose observada (H_o) foi, em geral, menor que a heterozigose esperada (H_e), a qual foi estimada a partir das frequências alélicas.

Tabela 3 - Resultado da avaliação dos locos microssatélites: Heterozigose observada (H_o) e esperada (H_e), número de alelos por loco e variação no tamanho dos alelos

Loco	H_o	H_e^*	Nº de alelos por loco	Tamanho dos alelos em pb
AP33	0.3049	0.7001	6	180-255
AP40	0.3855	0.7924	10	164-200
AP152	0.7590	0.8122	8	255-304
AP161	0.4819	0.7749	10	154-240
AP166	0.7805	0.8634	9	165-235
AP175	0.4217	0.6786	6	178-192
AP176	0.0723	0.7049	5	205-212
AP183	0.0843	0.7677	7	185-255
AP190	0.4337	0.8025	10	168-198
AP192	0.4217	0.7646	6	111-124
Ah7	0.1707	0.5308	3	188-215
Ah126	0.4337	0.7449	6	188-215
Ag39	0.3780	0.7925	10	150-200
AG140	0.2289	0.8340	9	125-157
Ag171	0.0000	0.2445	4	158-170
Total*			109	
Média**	0.3571	0.7209	7,2	

* Heterozigose esperada de Nei (Nei, 1973)

** Baseado somente em locos polimórficos

O genótipo G5 apresentou quatro níveis diferentes de homozigose distribuídos da seguinte forma: duas plantas com 80%, uma com 60% e uma com 53,33% e media geral de 68,33% de homozigose. O genótipo G6 apresentou seis níveis diferentes de homozigose distribuídos da seguinte forma: uma planta com 86,67%, uma planta com 73,33%, uma planta com 60%, uma planta com 53,33%, uma planta com 47,33% e uma

planta com 40%, tendo média geral de 60,11% de homozigose. O genótipo G7 apresentou três níveis diferentes de homozigose distribuídos da seguinte forma: uma planta com 80%, uma planta com 60% e duas plantas com 46,67%, tendo média geral de 58,33% de homozigose. O genótipo G8 apresentou cinco níveis diferentes de homozigose distribuídos da seguinte forma: uma planta com 86,67%, uma planta com 73,33%, uma planta com 66,67%, uma planta com 46,67% e uma planta com 33,33% tendo média geral de 61,33% de homozigose. O genótipo G9 apresentou seis níveis diferentes de homozigose distribuídos da seguinte forma: três plantas com 93,33%, uma planta com 66,67%, uma planta com 46,67% e uma planta com 40%, tendo média geral de 72,22% de homozigose. O genótipo G10 apresentou três níveis diferentes de homozigose distribuídos da seguinte forma: uma planta com 73,33%, uma planta com 60% e uma planta com 53,33%, tendo média geral de 62,22% de homozigose. O genótipo G11 apresentou três níveis de homozigose distribuído da seguinte forma: uma planta com 53,33%, uma planta com 50% e uma com 46,67% tendo média geral de 50% de homozigose. O genótipo G12 apresentou dois níveis diferentes de homozigose distribuídos da seguinte forma: uma planta com 50% e duas plantas com 46,67%, tendo média geral de 47,78% de homozigose. O genótipo G13 apresentou três níveis diferentes de homozigose distribuídos da seguinte forma: uma planta com 53,33%, uma planta com 46,67% e duas plantas com 33,33%, tendo média geral de 41,37% de homozigose. O genótipo G14 apresentou dois níveis de homozigose distribuído da seguinte forma: duas plantas com 80% e uma planta com 73,33%, tendo média geral de 77,78% de homozigose. O genótipo G15 apresentou três níveis diferentes de homozigose distribuídos da seguinte forma: uma planta com 80%, uma planta com 73,33% e uma planta com 53,33%, tendo média geral de 68,89% de homozigose. O genótipo G16 apresentou três níveis diferentes de homozigose distribuídos da seguinte forma: uma planta com 66,67%, uma planta com 60% e uma planta com 53,33%, tendo média geral de 60% de homozigose. O genótipo G17 apresentou dois níveis diferentes de homozigose distribuídos da seguinte forma: uma planta com 64,29% e duas plantas com 53,33%, tendo média geral de 56,98% de homozigose. O genótipo G18 apresentou dois níveis diferentes de homozigose distribuídos da seguinte forma: uma planta com 60% e duas plantas com 53,33% e uma planta com 53,33%, tendo média geral de

55,56% de homozigose. O genótipo G19 apresentou apenas um nível de homozigose distribuídos da seguinte forma: duas plantas com 73,33%, tendo média geral de 73,33% de homozigose. O genótipo G20 apresentou dois níveis diferentes de homozigose distribuídos da seguinte forma: uma planta com 66,67% e uma planta com 53,33%, tendo média geral de 60% de homozigose. O genótipo G21 apresentou dois níveis diferentes de homozigose distribuídos da seguinte forma: uma planta com 80% e uma planta com 73,33%, tendo média geral de 76,67% de homozigose. O genótipo G22 apresentou dois níveis diferentes de homozigose distribuídos da seguinte forma: uma planta com 86,67% e uma planta com 71,43%, tendo média geral de 79,05% de homozigose. O genótipo G23 apresentou dois níveis diferentes de homozigose distribuídos da seguinte forma: uma planta com 69% e uma planta com 73,33%, tendo média geral de 71,17% de homozigose. O genótipo G24 apresentou dois níveis diferentes de homozigose distribuídos da seguinte forma: uma planta com 80% e uma planta com 60%, tendo média geral de 70% de homozigose. O genótipo G25 apresentou dois níveis diferentes de homozigose distribuídos da seguinte forma: uma planta com 93,33% e uma planta com 86,67%, tendo média geral de 90% de homozigose. O genótipo G26 representado por somente uma planta apresentou nível de homozigose de 73,33%. O genótipo G27 representado por somente uma planta apresentou nível de homozigose de 40%. O genótipo G28 representado por somente uma planta apresentou nível de homozigose de 86,67%. O genótipo G29 representado por somente uma planta apresentou nível de homozigose de 80%. O genótipo G30 representado por somente uma planta apresentou nível de homozigose de 66,67%. O genótipo G31 representado por somente uma planta apresentou nível de homozigose de 53,33%. O genótipo G32 representado por somente uma planta apresentou nível de homozigose de 57,14%. O genótipo G33 representado por somente uma planta apresentou nível de homozigose de 86,67%. O genótipo G34 representado por somente uma planta apresentou nível de homozigose de 60%. O genótipo G35 representado por somente uma planta apresentou nível de homozigose de 73,33%. O genótipo G36 representado por somente uma planta apresentou nível de homozigose de 53,33%. O genótipo G37 representado por somente uma planta apresentou nível de homozigose de 60%. O genótipo G38 representado por somente uma planta apresentou nível de

homozigose de 53,33%. O genótipo G39 representado por somente uma planta apresentou nível de homozigose de 66,67%. O genótipo G40 representado por somente uma planta apresentou nível de homozigose de 80%. O genótipo G41 representado por somente uma planta apresentou nível de homozigose de 80% (**Tabela 4**).

Dos 37 genótipos avaliados, 16 foram representados por uma planta, sete foram representados por duas plantas, oito genótipos por três plantas, três genótipos por quatro plantas, dois genótipos por seis plantas e um genótipo com cinco plantas. O G13 foi o genótipo que apresentou o menor grau de homozigose geral, com média de 41,67% e o genótipo G25 apresentou o maior grau de homozigose geral, com média de 90%. As plantas individuais G9-2, G9-3, G9-4 e G25-1 apresentaram maior grau de homozigose, 93,33%. As plantas individuais G8-1, G13-1 e G13-3 apresentaram o menor grau de homozigose, 33,33% (**Tabela 4**).

Os genótipos foram agrupados pelo método hierárquico UPGMA, cujo dendrograma em forma de árvore encontra-se na **Figura 7**. O dendrograma representa as relações genéticas entre os genótipos e discrimina-os dando origem a dois grupos principais. O grupo 1 agrupou dois subgrupos 1a, 1b. O subgrupo 1a agrupou os genótipos G5, G6, G14, G10, G11, G7, G15, G8, G13, G9 e G12. O subgrupo 1b reuniu um grande grupo de genótipos, G16, G40, G17, G31, G30, G22, G37, G24, G42, G29, G38, G19, G25, G39, G28, G27, G33, G35, G21, G34, G18, G26, G23 e G32. O grupo 2 reuniu os genótipos G20 e G36, (**Figura 7**).

Tabela 4 - Homozigose média observada por planta e homozigose média total dos 37 genótipos avaliados do acesso BRA 041122 pertencente à espécie *A. Pinto*.

Genótipo	Homozigose média por planta	Genótipo	Homozigose média por planta	Genótipo	Homozigose média por planta	Genótipo	Homozigose média por planta	Genótipo	Homozigose média por planta	Genótipo	Homozigose média por planta
G5-1	60,00	G6-1	86,67	G7-1	46,67	G8-1	33,33	G9-1	66,67	G10-1	60,00
G5-2	80,00	G6-2	73,33	G7-2	80,00	G8-2	46,67	G9-2	93,33	G10-2	53,33
G5-3	80,00	G6-3	47,33	G7-3	46,67	G8-3	66,67	G9-3	93,33	G10-3	73,33
G5-5	53,33	G6-5	40,00	G7-4	60,00	G8-4	86,67	G9-4	93,33		
		G6-6	53,33			G8-5	73,33	G9-5	46,67		
		G6-7	60,00					G9-6	40,00		
Média	68,33		60,11		58,33		61,33		72,22		62,22
G11-1	50,00	G12-1	46,67	G13-1	33,33	G14-1	73,33	G15-1	80,00	G16-1	66,67
G11-2	46,67	G12-2	46,67	G13-3	33,33	G14-2	80,00	G15-2	53,33	G16-2	53,33
G11-3	53,33	G12-3	50,00	G13-4	46,67	G14-3	80,00	G15-3	73,33	G16-3	60,00
				G13-5	53,33						
Média	50,00		47,78		41,67		77,78		68,89		60,00
G17-1	53,33	G18-1	53,33	G19-1	73,33	G20-1	66,67	G21-1	80,00	G22-1	71,43
G17-2	53,33	G18-2	53,33	G19-2	73,33	G20-2	53,33	G21-2	73,33	G22-2	86,67
G17-3	64,29	G18-3	60,00								
Média	56,98		55,56		73,33		60,00		76,67		79,05
G23-1	69,00	G24-1	60,00	G25-1	93,33						
G23-2	73,33	G24-2	80,00	G25-2	86,67						
Média	71,17		70,00		90,00						
G27-1	40,00	G31-1	53,33	G35-1	73,33	G39-1	66,67				
G28-1	86,67	G32-1	57,14	G36-1	53,33	G40-1	80,00				
G29-1	80,00	G33-1	86,67	G37-1	60,00	G41-1	80,00				

5 Discussão

Os produtos amplificados foram analisados quanto ao polimorfismo usando géis de poliacrilamida e os resultados revelaram 15 locos polimórficos detectados entre os genótipos avaliados. O número de alelos nos 15 locos microssatélites variou de três a dez alelos por loco com quatro locos apresentando dez alelos (AP40, AP161, AP190 e Ag39), quatro locos com seis alelos (AP33, AP175, AP192 e Ah126), dois locos com nove alelos (AP166 e Ag140), um loco com oito alelos (AP152), um loco com sete alelos (AP183), um loco com cinco alelos (AP176), um loco com quatro alelos (Ag171) e um loco com três alelos (Ah7).

Considerando que esta pesquisa foi realizada com genótipos de um único acesso, o número de locos polimórficos foi bastante variável, de 3 a 10, com média de 7,2 alelos por loco totalizando 109 alelos. O número total de alelos observado foi menor que o observado por Palmieri et al., (2002, 2004) provavelmente devido ao maior número de acessos utilizados por esses autores, 23 acessos de *A. Pintoi* e 10 acessos de *A. repens*. Foi observado alelo comum a todos os genótipos como no “primer” Ag171 com frequência de 0,8659, e também ocorrência de alelos raros presentes em apenas alguns genótipos como nos “primers” AP40, AP161, AP176, AP190 e Ah126 com frequência de 0,0060. Para o processo de melhoramento o alelo raro permitirá o monitoramento de progênes oriundas de cruzamento entre os genótipos.

A média da heterozigose observada foi baixa (0,3571), variando de 0,0000 no loco Ag171 a 0,7805 no loco AP166. A média de heterozigose observada foi menor que a observada por Palmieri et al., (2002, 2004), o que pode ser justificado pelo fato de que as amostras aqui utilizadas pertencem a um único acesso ainda que de origem híbrida. A alta frequência de locos homozigotos nos genótipos de *A. Pintoi* indica que esta é uma característica esperada entre as espécies do Gênero *Arachis* visto que as mesmas são geralmente consideradas preferencialmente autógamas, embora isto não seja necessariamente o caso de espécies pouco pesquisadas das seções do gênero.

Nos acessos de *A. glabrata* da Seção *Rhizomatosae* foi encontrada alta frequência de locos heterozigotos (Angelici et al., 2007). No entanto, populações silvestres dispersas dessa espécie só desenvolvem sementes ocasionalmente, que por

sua vez, somente são produzidas em pequena quantidade e, apenas esporadicamente, quando estas plantas são cultivadas em casas de vegetação e viveiros (Valls, 1996). Uma vez que a viabilidade do pólen é alta, conclui-se que na área de distribuição ocorre alta frequência de polinizações cruzadas, resultando na alta heterozigosidade. Como a propagação vegetativa é o meio de multiplicação nesta espécie, a heterozigosidade é mantida durante a propagação (Angelici et al., 2007).

Clement et al., (2001) avaliando a variabilidade genética da pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth, *Palmae*) a partir de 17 locos isoenzimáticos encontrou uma heterozigosidade média de 0,074, que fica mais próxima de espécies autógamas do que de espécies alógamas, sugerindo a ocorrência de alto grau de autopolinização e de polinização entre plantas aparentadas. Tal fato também pode ter sido observado devido ao baixo polimorfismo detectado pelo marcador em questão.

Trinta e cinco genótipos estudados foram discriminados com os 15 pares de “primers” utilizados, indicando que os microssatélites são altamente polimórficos e discriminativos nas espécies do Gênero *Arachis* da Seção *Caulorrhizae*. Resultados semelhantes a partir do uso de microssatélites foram obtidos em muitas espécies de plantas, incluindo *Prunus armeniaca* L. o damasco (Hormaza, 2002), a batata tetraplóide *Solanum tuberosum* L. (McGregor et al., 2000), uma coleção de trigo silvestre e cultivado (Medini et al., 2005) e até mesmo a espécie *A. Pintoi* (Pamieri, et al., 2002, 2004, Otto, 2007) quando os autores avaliaram a variabilidade genética. Na espécie *A. hypogaea* as análises de locos microssatélites mostraram maior polimorfismo do que em relação ao RFLP e RAPD (Hopkins et al., 1999) assim como neste trabalho com *A. Pintoi* indicando que técnicas que detectam até mesmo simples modificações de nucleotídeos como é o caso dos microssatélites são utilizadas com sucesso para identificar locos informativos.

Os resultados encontrados por Gimenes et al., (2002) indicaram que o marcador do tipo AFLP é um bom marcador para detectar o grau de variabilidade genética e estabelecer os relacionamentos entre as espécies do Gênero *Arachis*. O polimorfismo detectado em *A. hypogaea* por este método foi maior que o encontrado com outros marcadores, como RAPD e RFLP. No entanto, esses dados indicam que o polimorfismo

detectado é ainda muito baixo para ser utilizado nos estudos genéticos nesta espécie. Além disso, estudos comparando os marcadores moleculares tais como AFLP, RAPD, RFLP, e microssatélites indicaram que AFLP e microssatélites são altamente reprodutíveis entre e dentro dos laboratórios (Rafalski e Tingey, 1993, Cordeiro et al., 2000).

Além da reprodutibilidade relatada por Angelici et al., (2007) foi descoberto que há transferabilidade entre as espécies do Gênero *Arachis* pertencentes às diferentes Seções *Arachis*, *Caulorrhizae* e *Rhizomatosae*. No presente trabalho os locos Ah126 e Ah7 desenvolvidos a partir da espécie *A. hypogaea* da Seção *Arachis*, e Ag39, Ag140 e AG171 desenvolvidos a partir da espécie *A. glabrata* da Seção *Rhizomatosae* apresentaram transferabilidade para o acesso em estudo. Os resultados vêm confirmar que as regiões que flanqueiam os microssatélites são conservadas o bastante para permitir a amplificação dos locos em várias espécies inclusive em *A. Pintoi*.

A grande maioria dos locos microssatélites é flanqueada por regiões altamente conservadas (Zane et al., 2002) e, podem ser facilmente transferíveis entre espécies relacionadas sendo amplamente documentada para plantas superiores (Matsuoka et al., 2002; Rosseto et al., 2002). Em quatro espécies de feijão comum, (*Phaseolus vulgaris*), de 68 pares de “primers” microssatélites testados 33 amplificaram locos, sugerindo que o polimorfismo e a transferabilidade diminuem quando há um aumento da distancia genética entre as espécies das quais os locos foram isolados em relação às espécies para as quais foram transferidos Gaitán-Solís et al. (2002).

A amplificação cruzada ou transferabilidade entre as espécies do Gênero *Arachis* foi observada por Palmieri et al. (2002), utilizando sete pares de “primers” desenvolvido para a espécie *A. Pintoi*. “Primers” microssatélites isolados e caracterizados de *A. hypogaea* por Gimenes et al (2007) mostraram alta taxa de transferabilidade entre as espécies do gênero. Resultado semelhante também foi demonstrado por Hoshino et al., (2006), que avaliaram com 15 locos microssatélites, 76 acessos de 34 espécies de nove seções do Gênero *Arachis*, e por Bravo et al., (2006) que avaliaram com 14 locos microssatélites 60 acessos de 27 especies da Seção *Arachis*. Estudos relatados por Hopkins et al. (1999) e Moretzsohn et al. (2004) demonstraram alta taxa de

transferabilidade de primers microssatélites de *A. hypogaea* para *A. monticola*, *A. ipaënsis* e *A. duranensis*, espécies proximamente relacionadas à *A. hypogaea*.

O nível de polimorfismo foi alto para todos os pares de “primers” entre os genótipos analisados, sendo todos os pares de primers informativos. O nível de polimorfismo observado pelos marcadores microssatélites nos genótipos avaliados, também foi encontrado para várias espécies de leguminosas tais como soja (Akkaya et al., 1992), feijão (Yu et al., 1999, Li et al., 2001), ervilha (Burstin et al., 2001), alfafa (Diwan et al., 1997) e, em outros acessos de *A. Pintoi* (Palmieri et al., 2002, 2004). Resultado similar foi obtido para quatro genótipos do acesso BRA 041122 da espécie *A. Pintoi*, selecionados no processo de melhoramento utilizando 14 marcadores microssatélites (Otto, 2007). Blair et al., (2006) avaliaram 44 genótipos de feijão com 129 marcadores microssatélites para determinar a diversidade genética. Os dados dos microssatélites foram capazes de distinguir os genótipos andinos dos mesoamericanos, para incluir as raças em cada “pool gênico” e separar os acessos selvagens dos acessos cultivados.

As diferenças na variabilidade alélica nos locos microssatélites específicos podem ser devidos a diferenças na taxa de mutação e pressão de seleção para cada loco (Métais et al. 2002; Chen et al. 2002). Além disso, a variabilidade dos microssatélites pode ser influenciada por sua estrutura, pelo sequência de repetição (*motif*), pelo comprimento e pelo contexto da sequência de repetição genômica do loco (Cho et al. 2000; Temnykh et al. 2001).

De acordo com a maior parte das informações publicadas na literatura, as espécies do Gênero *Arachis* são preferencialmente autógamas, com fluxo gênico limitado a pequenas populações. Espécies preferencialmente autógamas preservam aproximadamente 56 % de seus alelos dentro de uma única população (Hamrick, 1983). Os resultados de análises de isoenzimas e RAPD mostraram a autogamia como sendo o sistema de reprodução predominante em acessos de *A. Pintoi* (Bertoza, 1997), mas, também há evidências de alogamia em alguns acessos da Seção *Caulorrhizae* (Oliveira & Valls, 2003), enquanto que alogamia preferencial foi detectada na Seção *Rrizomatosae* (Angelici et al., 2007).

O grau de homozigose observado nos 37 genótipos da espécie *A. Pintoi* variou de 33,33% nos genótipos G13 e G8 a 93,33% nos genótipos G9 e G25. A variação na taxa de homozigose observada nas plantas oriundas de sementes na espécie *A. Pintoi* pode ser explicada pelo fato de que a espécie é tida como preferencialmente autógama e, conseqüentemente, grande parte de suas sementes devem ser produzidas por autofecundação, permanecendo no solo por muito tempo a espera de oportunidade para germinar, havendo a possibilidade da coleta ter incluído sementes de varias gerações (Valls comunicação pessoal).

Os resultados parecem indicar que pode ter ocorrido uma taxa de cruzamento maior que o esperado, como já foi comprovado para a espécie *A. glabrata* da Seção *Rhizomatosae*, o que fica evidente pelos diferentes graus de homozigose e conseqüentemente de heterozigose observados nos 37 genótipos avaliados, decorrentes de autofecundações e fecundações ocorridas no canteiro matriz como esperado, já que as plantas são oriundas de um canteiro que teve inicio com uma única planta, porém híbrida, ainda que intraespecifica.

Considerando-se apenas as plantas de cada genótipo com homozigose acima de 70%, as plantas G5-2, G5-3, G6-1, G6-2, G7-2, G8-4, G8-5, G9-2, G9-3, G9-4, G10-3, G14-1, G14-2, G14-3, G15-1, G15-3, G19-1, G19-2, G21-1, G21-2, G22-1, G22-2, G23-2, G24-2, G25-1, G25-2, G26-1 G28-1 G29-1 G33-1 G35-1 G40-1 G41-1, podem ser selecionadas para avaliação agrônômica. Comprovada a produtividade, pode-se viabilizar o lançamento dos genótipos como cultivar, sem grandes riscos de variações nas gerações subseqüentes.

A análise de agrupamento utilizada (UPGMA) baseada em coeficientes de semelhança foi empregada para comprovar as relações de similaridade entre os genótipos analisados (**Figura 7**). Com exceção dos genótipos G20 e G36, todos os demais genótipos foram discriminados utilizando os 15 locos microssatélites polimórficos. Nesta caracterização, os genótipos ficaram posicionados em dois grupos principais no dendrograma, agrupamento esperado uma vez que todos os genótipos têm a mesma origem. A separação dos genótipos G20 e G36 pode ser explicada pelo fato desses genótipos estarem a campo, junto com outros acessos da espécie,

podendo ter ocorrido transferência de alelos por fecundação cruzada. A avaliação da similaridade entre os genótipos é importante para a melhoria da produção, mas também para administração eficiente e proteção dos recursos genéticos.

Nas avaliações do presente trabalho foram incluídos alguns genótipos representados por apenas uma planta, o que para o melhoramento vegetal da espécie pode ser importante, pois as mesmas podem apresentar características de resistência a vários fatores, visto que das sementes produzidas pelos diferentes genótipos foram as únicas que sobreviveram.

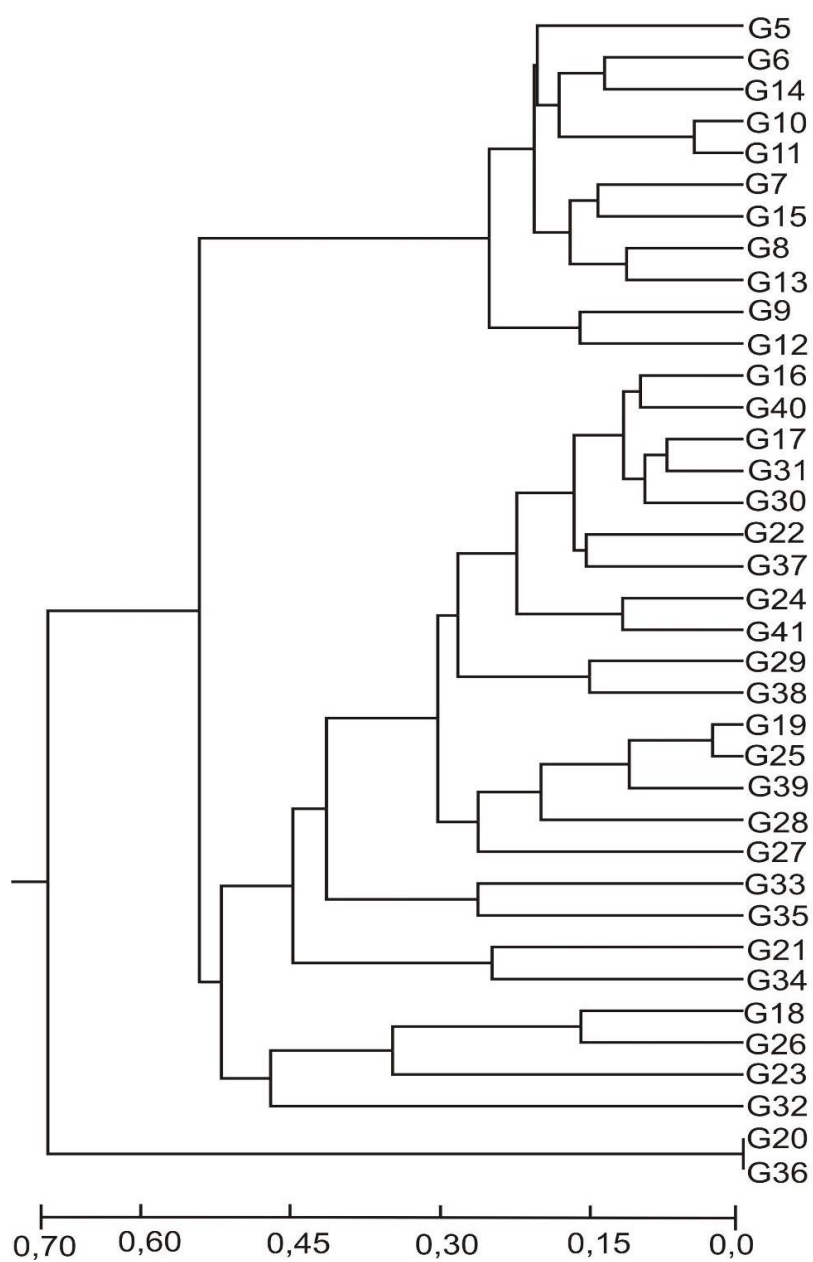


Figura 8 - Dendrograma UPGMA dos 37 diferentes genótipos avaliados do acesso BRA 041122 de *A. Pinto*. A distância genética foi estimada usando o programa popgene usando o método de Nei (1978), com base em 15 locos microssatélites, num total de 109 alelos

6 Conclusão

A caracterização molecular dos genótipos analisados no presente trabalho pôde ser realizada de forma eficiente por meio de marcadores SSR.

Foi detectada variabilidade genética entre os genótipos do híbrido intraespecífica BRA041122 da espécie *A. Pintoi*, o que possibilita cruzamentos entre os mesmos conduzindo a um aumento da diversidade genética e fornecendo mais oportunidades nos programas de melhoramento.

Do total de genótipos avaliados 21 já apresentam plantas com alto grau de homozigose e, após a confirmação da produtividade dos mesmos a campo, poderão ser lançados como novas cultivares de *A. Pintoi*.

Os demais genótipos ainda necessitam de algumas gerações de autofecundação, para aumentar a homozigose e, posteriormente, desenvolver uma nova cultivar de *A. Pintoi*.

O genótipo G25 apresentou o maior grau de homozigose, porém as características como produção de massa e estolhos indicam que o mesmo não é indicado para consórcio com gramíneas ou produção de banco de proteínas por apresentar pequena massa foliar e estolhos extremamente delgado. Deverá ser preservado por ser um bom produtor de sementes.

Os genótipos com apenas uma planta que apresentaram grau de homozigose acima de 70%, podem ser testados a campo para avaliar o desempenho dos mesmos e, a partir disso fazer cruzamentos com outros genótipos a fim de obter novas progênies para lançamentos de novas cultivares.

7 Referências

- AGROONLINE (Artigo de autoria: Julio César Freitas Santos – Pesquisador - EMBRAPA). **Cobertura verde na lavoura cafeeira**. Disponível em <http://www.agronline.com.br/artigos/artigo.php?id=344>. Acesso em 09/092008.
- AKKAYA M.S., BHAGWAT A. A., CREGRAN P.B. **Length polymorphism of simple sequence repeat DNA in soybean**. *Genetics* 1992, v.132, p. 1131-1139.
- ALLARD, R. W. **Principles of plant breeding**. 2. ed. New York: John Willey, 1999. 254 p.
- ALMEIDA, D.L., SUDO, A., EIRA, P.A., RIBEIRO, R.L.D., CARVALHO, S.R., FRANCO, A.A., TEIXEIRA, M.G., DE-POLLI, H., RUMJANEK, N.G., FEIDEN, A., AQUINO, A.M., STEPHAN, M.P., SILVA, E.M. R., ABOUD, A.C.S., GUERRA, J.G.M., LEAL, M.A.A., LIGNON, G.B., PEREIRA, J.A.R., BORJA, G.E.M., RICCI, M. dos S.F., SOUZA, E.R. de **Sistema integrado de produção agroecológica**. Seropédica: EMBRAPA *Agrobiologia*, nov. 1998. 14p. (EMBRAPA-CNPAB. Documentos, 70).
- ALMEIDA, R. G., NASCIMENTO JR, D., EUCLIDES, V. P. B. **Produção Animal em Pastos Consorciados sob Três Taxas de Lotação, no Cerrado**. Revista Brasileira de Zootecnia, v.32, n.2, p.852-857, 2002 (suplemento).
- ALMEIDA, R. G., NASCIMENTO JR. D., EUCLIDES, V. P. B. et al. **Disponibilidade, Composição Botânica e Valor Nutritivo da Forragem de Pastos Consorciados, sob Três Taxas de Lotação**. Revista Brasileira de Zootecnia, v.32, n.1, p.36-46, 2003.
- ANDRADE, C. M. S., VALENTIM, J. F. **Adaptação, produtividade e persistência de Arachis pintoi submetido a diferentes níveis de sombreamento, no Acre**. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 34, 1997, Juiz de Fora. Anais... Juiz de Fora: SBZ, 1997. p.341-343.
- ANDRADE, C. M. S., VALENTIM, J. F., CARNEIRO, J. C. et al. **Crescimento de gramíneas e leguminosas forrageiras sob sombreamento**. Pesquisa Agropecuária Brasileira Brasília, v. 39, n.3, p. 263-270, março de 2004.
- ANDRADE, C. M. S.; VALENTIM, J. F. **Adaptação e persistência de Arachis pintoi submetido a diferentes níveis de sombreamento**. Revista Brasileira de Zootecnia, v.28, n.3, p.439-445, 1999.
- 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*, 31, 1, 79-88, 2008.
- ARGEL, P. J., PIZARRO, E. A. **Germoplasm case study: Arachis pintoi**. In.: **Pastures for the tropical lowlands** – CIAT's Contribution. Cali: CIAT, 1992. p. 57-76
- ARGEL, P.J., VILLARREAL, M.M. **Cultivar porvenir – Nuevo Maní forrajero Perenne (Arachis pintoi Krapov y Greg nom. nud. CIAT 18744)**: Leguminosa herbácea para alimentación animal el mejoramiento y conservación del suelo el enbellecimiento del paisaje. 2000. Disponível em: [Thttp://www.ciat.cgiatropilecheat.org/documentos/articulos/articulos.pdf/mani.pdf/ARACHIS_3.pdf](http://www.ciat.cgiatropilecheat.org/documentos/articulos/articulos.pdf/mani.pdf/ARACHIS_3.pdf) . Acesso em 28/08/2007.
- ARRIEL, N.H.C., DI MAURO, A.C., DI MAURO, S.M.Z., BAKKE, O A., UNÊDATREVISOLI, S.H. COSTA, M.M., CAPELOTO, A., CORRADO, A.R. **Técnicas multivariadas na determinação da diversidade genética em gergelim usando marcadores RAPD**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.41, n.5, p.801-809, 2006.
- BANKS, D. J. **Hand-tripped flowers promote seed production in Arachis lignosa, a wild peanut**.

Peanut Science, v. 17, p. 22-24, 1990.

BARATA, T. E., ZELANDI, E. M., LOPES, C. R., GIMENES, M. A., PALMIERI, D. A. **Análise da variabilidade genética em acessos da Secção *Caulorrhizae*, Gênero *Arachis*, mediante o uso de marcadores moleculares AFLP com detecção fluorescente.** In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA A AMÉRICA LATINA E CARIBE, 3, 2001, Londrina, PR. Anais... Londrina: IAPAR, 2001. p. 214-215.

BARCELLOS, A. O., ANDRADE, R.P. , KARIA, C.T., VILELA, L. **Potencial e uso de leguminosas forrageiras dos gêneros *Stylosanthes*, *Arachis* e *Leucaena*.** In: PEIXOTO, A. M., PEDREIRA, C. G. S., FARIA, V. P. (ed.) In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM: A PLANTA FORRAGEIRA NO SISTEMA DE PRODUÇÃO, 17., 2000, Piracicaba, Anais... Piracicaba: FEALQ, 2000. p. 297-357.

BARRADAS, C.A.A., FREIRE, L.R., ALMEIDA, D.L., DE-POLLI, H. 2001. **Comportamento de alguns adubos verdes de inverno na Região Serrana Fluminense.** *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília 36: 1461-1468.

BERTOZO, M. R. **Estudo da variabilidade genética das espécies de *Arachis* da secção *Caulorrhizae* Krap. & Greg. por meio de proteínas de reserva, isoenzimas e RAPD.** Dissertação Doutorado, Instituto de Biociências, Botucatu, SP, 1997, 133 p.

BLAIR M. W., GIRALDO M. C., BUENDÍA H. F. TOVAR E. DUQUE M. C BEEBE· S. E. **Microsatellite marker diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)** *Theor Appl Genet* (2006) 113: 100–109

BORÉM, A., MIRANDA, G. V. **Melhoramento de plantas.** 4. ed.rev. amp. Viçosa: UFV, 2005. 525 p.

BOTH M. C. **Comportamento e produção de suínos mantidos em pastagem e submetidos a diferentes níveis de restrição alimentar.** 2003. 119 f. Tese (Doutorado em Zootecnia), Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS.

BRAVO, JULIANA PEREIRA, HOSHINO, ANDREA AKEMI, ANGELICI, CARLA MARIA LARA C.D. **Transferability and use of microsatellite markers for the genetic analysis of the germplasm of some *Arachis* section species of the genus *Arachis*.** *Genet. Mol. Biol.* [online]. 2006, vol. 29, no. 3 [cited 2007-10-01], pp. 516-524.

BRONDANI, C., BRONDANI, R. P. V., RANGEL, N. P. H., **Utilização de marcadores moleculares em programas de ampliação da base genética de espécies cultivadas:** Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 36 p. (Documentos / Embrapa Arroz e Feijão, ISSN 1678-9644, 155), 2003. Disponível em http://www.cnpaf.embrapa.br/publicacao/seriedocumentos/doc_155.pdf. Acesso 05/07/2008.

BURSTIN J., DENIOT G., POTIER C., AUBERT G., BARANGER A. **Microsatellite polymorphism in *Pisum sativum*.** *Plant Breeding* 2001, v120, p. 311-317.

CANTARUTTI, R. B., FONSECA, D. M., SANTOS, H. Q. **Adubação de Pastagens – Uma Análise Crítica.** In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO ESTRATÉGICO DA PASTAGEM, 2002, Viçosa-MG. Anais. Viçosa: SIMFOR, p. 43-84. 2002.

CARULLA, J. E., LASCANO, C. E., WARD, J. K. **Selectivity of resident and oesophageal fistulated steers grazing *Arachis pinto* and *Brachiaria dictyoneura* in the Llanos of Colombia.** *Tropical Grasslands*, v. 25, p. 317-324, 1991.

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

CARVALHO, M. A. Germplasm **Characterization of *Arachis Pintoi* Krap. And Greg. (Leguminosae)**. Tese (Doutorado), 2004- University of Florida.

CARVALHO, M. A., PIZARRO, E. A., VALLS, J. F. M. **Avaliação agrônômica de 32 acessos de *Arachis spp.* consorciados com *Paspalum atratum* BRA-009610 em LVE de cerrados**. IN: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 34, 1997, Juiz de Fora. Anais... Juiz de Fora: SBZ, 1997. p. 27-29.

CARVALHO, P. C. F & MORAES, A. **Comportamento Ingestivo de Ruminantes: Bases para o Manejo Sustentável do Pasto**. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO SUSTENTÁVEL EM PASTAGENS. CECATO, U, JOBIM, C. C. et al. Anais... Cd room. Maringá – PR. 2005.

CARVALHO, S, LOPES, CR, **Estudo da adaptação e produção de forragem em populações segregantes de um acesso híbrido de *Arachis Pintoi* Krapov. & Gregory**. In: 51º Congresso Brasileiro de Genética, Águas de Lindóia • São Paulo, p 434, 2005

CARVALHO, S. **Monitoramento de populações segregantes de *Arachis pintoii* Krapov. & W. C. Gregory através de marcadores morfológicos e moleculares**. 2000. 102 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, Genética), Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.

CARVALHO, S., MONÇATO, L., VALLS, J. F. M., LOPES, C. R. **Avaliação da variabilidade de *Arachis pintoii* por marcadores moleculares e morfológicos**. In: 44º Congresso Nacional de Genética, 1998, Águas de Lindóia/SP. Resumos do 44º Congresso Nacional de Genética, 1998. v. 21. p. 199.

CASTRO CM, ALVES BJR, ALMEIDA DL, RIBEIRO RLD. 2004. **Adubação verde como fonte de nitrogênio para a cultura da berinjela em sistema orgânico**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília 39: 779-785.

CATTANEO, L. F. **Avaliação da divergência genética e análise de gerações em mamoeiro (*Carica papaya* L.)**. 2001. 94 f. Tese (doutorado em produção vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, Campos dos Goytacazes, RJ.

CECATO, U., GOMAS, L. H., ASSIS, M. A. **Avaliação de cultivares do gênero *Cynodon***. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 33, 1996, Fortaleza, CE. Anais. Fortaleza: SBZ, v.2, p.114-115, 1996.

CHEN X, CHO Y.G, MCCOUCH S.R (2002) **Sequence divergence of rice microsatellites in *Oryza* and other plant species**. Mol Genet Genom 268:331–343

CHO YG, ISHII T, TEMNYKH S, CHEN X, LIPOVICH L, MCCOUCH SR, PARK J, AYRES N, CARTINHO S (2000) **Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa* L.)**. Theor Appl Genet 100:713–722

CLEMENT, C.R., YUYAMA, K., CHÁVEZ FLORES, W.B. 2001. **Recursos genéticos de pupunha {Genetic resources of pejibaye}**. In: Sousa, N.R., Souza, A.G.C. (Eds.). Recursos fitogenéticos na Amazônia Ocidental: conservação, pesquisa e utilização. Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus. pp. 143-187. (Brasil) (ISBN 85-89111-01-6).

COMASTRI F. J. A., POTT, A. **Introdução e avaliação de forrageiras em cordilheira e campo cerrado na parte leste da sub-região de Paiaguás, Pantanal Mato-Grossense**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 30, p.1117-1127, 1995.

COOK, B. G., JONES, R. M. & WILLIAMS, R. J. **Regional experience with forage *Arachis* in Australia**. In.: KERRIDGE, P. C., HARDY, B. (eds.). Biology and Agronomy of Forage *Arachis*. Cali: CIAT, 1994.

Chapter 14. p. 158-168.

CORDEIRO, G.M., TAYLOR, G.O., HENY, R.J. **Characterisation of microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum sp.*), a highly polyploid species.** Plant Sci 155:161-168, 2000.

CRESTE, S., TULMANN NETO, A., FIGUEIRA, A. **Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining.** Plant Molecular Biology Reporter, Canadá, v. 19, p. 299-306, 2001

CRUZ, C.D., REGAZZI, A.J., CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético.** Vol. 1, Viçosa: UFV, cap. 5.,p. 171, 201., 2004a.

DE LA CRUZ, R.; SUÁREZ, S., FERGUSON, J. E. **The contibution of *Arachis pintoi* as a ground cover in some farming systems of Tropical America.** In: KERRIDGE, P.C., HARDY. B. Biology and Agronomy of forage *Arachis*. Cali, CIAT, chapter 9, p.102-108, 1994.

DESBOROUGH, S. L., PELOQUIN, S. J. **Potato variety identification of electrophoretic patters of tuber proteins and enzymes.** American Potato Journal, Orono, v 45, n. 6, p. 220-229, June 1968.

DESCHAMPS, F. C., TCACENCO, F. A. **Parâmetros nutricionais de forrageiras nativas e exóticas no Vale do Itajaí, Santa Catarina.** Pesq. agropec. bras. , Brasília, v. 35, n. 2, 2000.

DIWAN N., BRAGWAT A.A., BAUCHAN GB., CREGAN P.B. **Simple sequence repeat DNA markers in alfafa and perennial and annual *Medicago* species.** Genome, 1997, v. 40, p.887-895.

DUDA GP, GUERRA J.G.M., MONTEIRO M.T., DE-POLLI H. 2003. **Perennial herbaceous legumes as live soil mulches and their effects on C, N and P of the microbial biomass.** Scientia Agricola, Piracicaba 60: 139-147.

ESPINDOLA, J. A. A., GUERRA, J. G. M., PERIN, A. **Bananeiras consorciadas com leguminosas herbáceas perenes utilizadas como coberturas vivas.** Pesq. agropec. bras., Mar. 2006, vol.41, no.3, p.415-420.

ESPINDOLA, J.A.A. **Avaliação de leguminosas herbáceas perenes usadas como cobertura viva de solo e seus efeitos sobre a produção da bananeira (*Musa spp.*).** Seropédica. Rio de Janeiro, RJ, UFRJ, 2001, 144p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro.

ETIENNE, H., ANTHONY, F., DUSSERT, S. et al. **Biotechnological applications for the improvement of coffee (*Coffea arabica L.*).** In Vitro Cellular Developmental Biology - Plant, Charlotte, v. 38, p.129-138, 2002.

EVANS, W. R., FLEISCHMAN, D. E., CALVERT, H. E., PAYTI, P. V., ALTER, G .M., SUBBA RAO, N. S. **Bacteriochlorophyll and photosynthetic reaction centers in *Rhizobium* strain BTAi1.** Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 56, p. 3445-3449, 1990.

FARIA C.M.B., SOARES J.M., LEÃO PCS. 2004. **Adubação verde com leguminosas em videira no submédio São Francisco.** Revista Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa 28: 641-648.

FEDERIZZI, L.C. **Estrutura de um programa de melhoramento de plantas e possíveis aplicações de marcadores moleculares:** visão do melhorista. In: MILACH, S. (Ed.). Marcadores moleculares em plantas. Porto Alegre: S. C. K. Milach, 1998. p. 3-15

FEHR, W. R. **Principles of cultivar development: theory and technique.** New York: Macmillan, 1987. v. 1, 525 p.

- FERGUSON, J. E. **Seed biology and systems for *Arachis pintoi***. In: KERRIDGE, P. C., HARDY, B. (eds.). *Biology and Agronomy of Forage Arachis*. Cali, Colômbia: CIAT, 1994. Capítulo 11. p. 122-133.
- FERNÁNDEZ, A., KRAPOVICKAS, A. **Cromosomas y evolución em *Arachis (Leguminosae)***. *Bonplandia*, v.8, p.187-220. 1994.
- FERREIRA, M. E., GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 1998. p. 220.
- FERREIRA, M. E., GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 1995. 220p. (Documento 20).
- 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, 1994. p.53-70.
- FORD, R., TAYLOR, W. J. **The application of RAPD markers for potato cultivar identification**. *Australian Journal of Agricultural Research*, Victoria, v. 48, n. 8, p. 1213-1217, 1997.
- 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, pp 169-186, 1994.
- GABRIEL, A. P. C. **Marcadores de DNA como ferramenta para maximizar os ganhos genéticos em um programa de Seleção Recorrente Recíproco de famílias de irmãos completos em milho (*Zea mays L.*)** Monografia (Ciências Biológicas) Campos dos goytacazes, RJ. Universidade Estadual do Norte Fluminense- UENF, 36p, 2004.
- GAITÁN-SOLÍS, E., DUQUE, M.C., EDWARDS, K.J., TOHME, J. 2002. **Microsatellite repeats in common bean (*Phaseolus vulgaris*): Isolation, characterization, and cross-species amplification in *Phaseolus ssp.*** *Crop Sci* 42:2128-2136.
- GALGARO, M.L., GIMENES, M.A., VALLS, J. F. M., LOPES, C.R., KOCHERT, G. 1998. **Genetic variation between several species of sections *Extranervosae*, *Caulorrhizae*, *Heteranthae*, and *Triseminatae* (genus *Arachis*) estimated by DNA polymorphism**. *Genome* 41: 445- 454.
- GIMENES M. A., LOPES C. R., VALLS, J. F.M. **Genetic relationships among *Arachis* species based on AFLP**. *Genetics and Molecular Biology*, 25, 3, 349-353, 2002.
- GIMENES, M. A., HOSHINO, A. A., BARBOSA, A.V.G., PALMIERI, DARIO, A., LOPES, C.R. **Characterization and transferability of microsatellite markers of the cultivated peanut (*Arachis hypogaea*)**. In: *BMC Plant Biology* V. 7, 2007. Disponível em <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1829157>. 09/09/2008
- GIMENES, M. A., LOPES, C. R., GALGARO, 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.
- GOMIDE, D. N. **Leguminosas: espécie disponíveis, fixação de nitrogênio e problemas fisiológicos para o manejo da consorciação**. In: *Congresso Brasileiro de Pastagens*, 86 e Simpósio sobre Manejo de Pastagem, 8., Anais...Piracicaba, SP. PEIXOTO, A. M., MOURA, J.C. de, Faria, V. P. de. (eds.). FAEALQ., 1986. P. 389-411.
- GONZALEZ, M. S., NEURKVAN, L. M., ROMERO, F. **Produccion de leche en pasturas de estrella africana (*Cynodon nlemfluensis*) solo y asociado con *Arachis pintoi* o *Desmodium ovalifolium***.

Pasturas tropicales, v. 18, n. 1, p. 2-12. 1996.

GRATTAPAGLIA D, SEDEROFF R. **Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross**: mapping strategy and RAPD markers. *Genetics*. 137(4):1121-37. 1994.

GREGORY, M. P., GREGORY, W. C. **Exotic germplasm of *Arachis* L. interespecific hybrids**. *The Journal of Heredity*, v. 70, p. 185-193, 1979.

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

GROF, B. **Forage attributes of perenial groundnut *Arachis pintoi* in a tropical savana environment in Colombia**. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 15, Kyoto. 1985. *Proceedings... Kyoto, Japan*, 1985. p. 168-170.

GUIMARÃES, C.T., MOREIRA, M.A. **Genética molecular aplicada ao melhoramento de plantas**. In: BORÉM, A. (Ed.). *Melhoramento de espécies cultivadas*. Viçosa: Editora UFV, 1999. p.715-740.

GUPTA, P.K., VARSHNEY, R. K. **The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat**. *Euphytica*, v.113, p.163-185, 2000.

HAMADA, H., PETRINO, M.G, KAKUNAGA, T. **A novel repeated element with Z-DNA-forming potencial is widely found in evolutionary diverse eukaryotic genomes**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.79, p.6465-9, 1982.

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

HAMRICK, J. L. **The distribution of genetic variation within and among natural plant populations**. In: SCHONEWALD-COX, C.M., CHAMBERS, S. M., MACBRIDE, B., THOMAS, W. L. (Eds.). *Genetics and conservation: A reference for managing wild animal and plant populations*. Menlo Park, California, 1983. p. 335-349.

HERNANDEZ, M., ARGEL, P.J., IBRAHIM, M.A. **Pasture production, diet selection and liveweight gains of cattle grazing *Brachiaria brizantha* with or without *Arachis pintoi* at two stocking rates in the Atlantic Zone of Costa Rica**. *Tropical Grasslands*, Brisbane, v.29, n.3, p.134-141, 1995.

HOPKINS, M.S., CASA, A.M., WANG, T., MITCHELL, S.E., DEAN, R.E., KOCHERT, G., KRESOVICH, S. (1999). **Discovery and characterization of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in peanut**. *Crop Sci* 39:1243-1247.

HORMAZA, J.I. (2002). **Molecular characterization and similarity relationships among apricot (*Prunus armeniaca* L.) genotypes using simple sequence repeats**. *Theor Appl Genet* 104:321- 328.

HOSHINO, A. A., BRAVO, J. P., ANGELICI, C. M.L.C.D. , GOBBI, B. A. V., LOPES, C. R., GIMENES, M. A. **Heterologous microsatellite primer pairs informative for the whole genus *Arachis***. *Genet. Mol. Biol.* [online]. 2006, vol. 29, no. 4 [cited 2007-10-01], pp. 665-675.

HUNTER R.L., MARKERT C.L. **Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels** 125: 1294-1295. 1957.

IBGE, *Produção da Pecuária Municipal*, v.33, p. 3-9, 2005. Disponível em:

<http://200.255.94.70/home/estatistica/economia/ppm/2005/ppm2005.pdf>. Acesso em 09/09/2008

JONES, N., H. OUGHAM & H. THOMAS. Markers and mapping: We are all geneticists now. **New Phyto**, 137: 165-177, 1997.

JONES, R. M. **Persistence of *Arachis pintoii* cv. Amarillo on three soil types at Samford, south-eastern Queensland**. *Tropical Grasslands*, v. 27, p. 11-15, 1993.

KARP, A., SEBERG, O., BUIATTI, M. **Molecular techniques in the assessment of botanical diversity**. *Annals of Botany*, V.78, n.2, p.143-149, 1996.

KETRING, D. L. **Light effects on development of an indeterminate plant *Arachis hypogaea* cultivar Starr**. *Plant Physiology*, v. 64:665-667, 1979.

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

KUMAR, L.S. **DNA markers in plant improvement: an overview**. *Biotechnology Advances*, Amsterdam, v.17, p.143-182, 1999.

LADEIRA, M.M., RODRIGUEZ, N. M., BORGES, I., GONÇALVES, L. C., SALIBA, E. O. S., BRITO, S. C., SÁ, L. A. P. **Avaliação de feno de *Arachis pintoii* utilizando o ensaio de digestibilidade in vivo**. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 31, p. 2350-2356, 2002.

LANZA, M. A., GUIMARÃES, C. T., SCHUSTER, I. **Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético**. *Informe Agropecuário, Belo Horizonte*, v. 21, n. 197, p. 97-108, 2000.

LASCANO, C. E., THOMAS, D. **Forage quality and animal selection of *Arachis pintoii* in association with tropical grasses in the eastern plains of Colombia**. *Grass and Forage Science*, v. 43, p. 433-439, 1988.

LASCANO, C.E. **Nutritive value and animal production of forage *Arachis***. In: KERRIDGE, P.C., HARDY, B. (Eds.) *Biology and Agronomy of forages *Arachis**. Cali: CIAT, 1994. p.109-121.

LASCANO, C.E., EUCLIDES, V. P. B. **Nutritional quality and animal production of *Brachiaria* pastures**. In: MILES, J. W., MAASS, B. L., VALLE, C. B. (Ed.) *Brachiaria: biology agronomy, and improvement*. Cali/Campo Grande: CIAT/EMBRAPA-CNPq, 1996, p. 106-123.

LAVIA, G. I. **Karyotypes of *Arachis palustris* and *A. praecox* (Section *Arachis*), two species with basic chromosome number $x=9$** . *Cytologia*, v. 63, p.177-181. 1998.

LI C.D., FATAKUN C.A., UBI B., SUNGH B.B., SCOLES G.D. **Determining genetic similarities and relationships among cowpea breeding lines and cultivars by microsatellites markers**. *Crop Science*, v. 41, p. 189-197. 2001.

LIMA, J.A, PINTO, J.C., EVANGELISTA, A.R. **Amendoim forrageiro (*Arachis pintoii* Krapov. & Greg)**. 2003. UFLA/CNPq. Disponível em: < [Thttp://www.editora.ufla.br/Boletim/pdfextensao/bol01.pdf](http://www.editora.ufla.br/Boletim/pdfextensao/bol01.pdf) T>. Acesso 20/06/2008.

LITT, M., LUTY, J. A. **A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene**. *Journal of Human Genetic*, Chicago, v. 44, p. 398-491, 1989.

LOUREIRO, M. F. **Caracterização das estirpes de rizóbio e morfologia dos nódulos de raiz e caule de *Aeschynomene* spp. e *Discolobium* spp. nativas do Pantanal Mato-Grossense**. Rio de Janeiro:

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1994. 205p. (Tese de Doutorado).

LOVE, J. M., KNIGHT, A. M., MCALLER, M. A., TODD, J. A. **Toward construction of a high resolution map of the mouse genome using PCR-analysed microsatellites.** *Nucleic Acids Research*, Oxford, v. 18, p. 4123-4139, 1990.

LOVELESS, M. D., HAMRICK, J. L. **Ecological determinants of genetic structure in plant populations.** *Annual Review of Ecology and Systematics*, v. Palo alto, 15, p. 65-95, 1984.

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

MAASS, B.L., A.M. TORRES, AND C.H. OCAMPO. 1993. **Morphological and isozyme characterization of *Arachis pinto* Krap. & Greg.** *Nom. Nud. Germplasm. Euphytica* 70: 43-52.

MACHADO, C. A. E. **Padrões isoenzimáticos de superóxido dismutase de alguns genótipos de pessegueiro *Prunus persica* (L.) Batsch.** 1984. 36 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1984.

MALDONADO, H., KELLER-GREIN, G. **Produção de pastagens associadas sob três taxas de lotação.** *Pasturas Tropicales*, v. 17, n. 3, p. 23-26. 1995.

MALLIKARJUNA, N., SASTRI, D.C. (2002) **Morphological, cytological and disease resistance studies of the intersectional hybrid between *Arachis hypogaea* L. and *A. glabrata* Benth.** *Euphytica* 126:161-167.

MATSUOKA, Y., MITCHELL, S.E., KRESOVICH, S., GOODMAN, M., DOEBLEY, J. (2002). **Microsatellites in *Zea* - Variability, patterns of mutations, and use for evolutionary studies.** *Theor Appl Genet* 104:436-450.

MCGREGOR, C.E., LAMBERT, C.A., GREYLING, M.M., LOUW, J.H., WARNICH, L. (2000). **A comparative assesment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm.** *Euphytica* 113:135-144.

MEDINI, M., HAMZA, S., REBAI, A., BAUM, M. (2005). **Analysis of genetic diversity in Tunisian durum wheat cultivars and related wild species by SSR and AFLP markers.** *Genet Resour Crop Ev* 52:21-31.

MÉTAIS, I., HAMON, B., JALOUZOT, R., PELTIER, D. (2002). **Structure and level of genetic diversity in various bean types evidenced with microsatellite markers isolated from a genomic enriched library.** *Theor Appl Genet* 104:1346-1352

MEYER, A.S. **Comparação de coeficientes de similaridade usados em análise de agrupamento com dados de marcadores moleculares dominantes.** 2002. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba. 2002.

MILACH, S.C.K. (1998). **Marcadores Moleculares em plantas.** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, porto Alegre, p. 17-28.

MIRANDA, F. J. B. **Endogamia ou consanguinidade.** In: NASS, L. L., VALOIS, A. C. C., MELO, I. S., VALADARES-INGLIS, M. C. **Recursos genéticos e melhoramento – plantas.** Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 629-648.

Monçato, L. 1997. **Morphological descriptors applied to germplasm of species of section *Caulorrhizae*.** In Proc. do Simpósio Latino-Americano de Recursos Genéticos Vegetais. Campinas,

Brazil, IAC.

MONÇATO, L. **Caracterização morfológica de germoplasma de espécies de *Arachis* secção *Caulorrhizae*, pela análise multivariada.** Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 1995. 122 p.

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

MOORE, S. S., SARGEANT, L. L., KING, T. J., MATTICK, J. S., GEORGES, M. , HETZEL, D. J. S. **The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species.** *Genomics*, Orlando, v. 10, p. 654-660, 1991.

MORAND, M.E., BRACHET, S., ROSSIGNOL, P., DUFOUR, J., FRASCARIA-LACOSTE, N. **A generalized heterozygote deficiency assessed with microsatellites in French common ash populations.** *Molecular Ecology*, V.11, n.3, p.377-385, 2002.

MOREIRA, F.B. **Sistemas para crescimento e terminação de bovinos de corte: avaliação das pastagens, desempenho animal, características da carcaça e qualidade da carne.** Maringá PR: Universidade Estadual de Maringá – UEM, 2001. 224 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, 2001.

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

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. (2005). **A microsatellite-based, gene-rich linkage map for the AA genome of *Arachis* (*Fabaceae*).** *Theor Appl Genet* 111:1060-1071.

MORGANTE, M., OLIVIERI, A. M. **PCR- Amplified microsatellites as markers in plant genetics.** *The Plant Journal*, Oxford, v. 3, n. 1, p. 175-182, Jan. 1993.

MOSS, D.W. **Isoenzymes.** Capman & Hall, London & New York, 1992.

MULLIS, K., FALLONA, F. **Specific síntesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction.** *Methods Enzymol*, v. 55, p.335-350, 1987.

MULLIS, K.B. **The unusual origin of the polymerase chain reaction.** *Scientific American*, New York, v. 262, n. 4, p.36-43, Apr. 1990.

MURPHY, R. W., SITES, J. W. JR., BUTH, D. G., HANFLER, C. H. **Proteins lisozymes electrophoresis.** In: HILLS, D. M., MORITZ, C. (Eds). *Molecular systematics*. Sunderland MA: Sinauer Associaes, 1990. p. 45-126.

NASCIMENTO, I.S., MONKS, P.L., LÜDER, W.E. ***Arachis pinto* 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, **Annals...** Porto Alegre: 2003. CD-ROM.

NASCIMENTO. I. S. **Cultivo do Amendoim Forrageiro.** Revisão Bibliográfica. R. Bras. Agrociência, Pelotas, v. 12, n. 4, p. 387-393, out-dez, 2006.

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. **Leucema: ptomising forage and tree crop for the tropics.** National Academy of Sciences. Wahsigton D.C. 1977. 115p.

NEI, M. (1973). **Analysis of gene diversity in subdivided populations.** Proceedings of the National Academy of Sciences, 70: 3321-3323.

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

NI, J., COLOWIT, P. M., MACKILL, D. J. **Evaluation of genetic diversity in rice subspecies using microsatellite markers.** *Crop Science*, Madison, v. 42, n. 2, p. 601-607, Mar./Apr. 2002.

NORDEN, A.J., LIPSCOMB, R.W., CARVER, W.A. 1969. **Registration of 'Florunner' peanuts.** *Crop Science* 9: 850.

OLIVEIRA, A.C. B, CAIXETA, E.T, ZAMBOLIM, E. M, ZAMBOLIM, L., SAKIYAMA, N. S. **Aplicação Técnica de Marcadores Moleculares no Melhoramento de Plantas.** Documentos IAC, 81 Instituto Agrônômico, 2007-Campinas

OLIVEIRA, M. A. P., VALLS, J. F. M. **Caracterização de espécies silvestres de *Arachis* da seção *Caulorrhizae* por meio de cruzamentos intraespecíficos e interespecíficos.** In: SIMPÓSIO LATINOAMERICANO DE RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS, 1, 1997, Campinas, Programa e Resumos... Campinas: IAC, 1997. p. 40-41.

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

OLIVEIRA, M.A.P. AND J.F.M. VALLS. 1999. **Variability of the morphological characters and inheritance of flower color in wild peanut *A. pintoi* and *A. repens* species.** In Proc.do Congresso Nacional de Genética. Gramado, RS, SBG.

OLIVEIRA, N. G., DE-POLLI, H., ALMEIDA, D. L., GUERRA, J. G. M. **Feijão-vagem semeado sobre cobertura viva perene de gramínea e leguminosa e em solo mobilizado, com adubação orgânica.** *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 41, p. 1361-1367, 2006b.

OLIVEIRA, N.G., DE-POLLI, H., ALMEIDA DL, GUERRA JGM. **Plantio direto de alfaca adubada com cama de aviário sobre coberturas vivas de grama e amendoim forrageiro.** *Hortic. Bras.*, Jan./Mar. 2006a, vol.24, no.1, p.112-117. ISSN 0102-0536. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-05362006000100023&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 02/07/2008

OLIVEIRA, O. C. **Parâmetros químicos e biológicos relacionados com a degradação de pastagens de *Brachiaria* ssp. no cerrado brasileiro.** (Tese de doutorado) Seropédica, UFRRJ, 2000, 230p.

OTTO, J. C. S. **Determinação do grau de homozigose de genótipos selecionados do híbrido natural W34b (BRA 031143) da espécie *Arachis Pintoi* Krapov. & Gregory, por meio de marcadores moleculares.** *Dissertação* (mestrado), 2007-Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", UNESP, Botucatu-SP.

PACIULLO, D. S. C., AROEIRA, L. J. M. **Características produtivas e qualitativas de pastagens de Braquiária em monocultivo e consorciada com estilosantes.** *Pesquisa Agropecuária Brasileira* Brasília, v.38, n.3, p. 421-426, março de 2003.

PADILHA, L. **Marcadores moleculares semiautomatizados na caracterização e determinação da diversidade genética entre linhagens de milho tropical.** 2002. 85 f. Tese (Doutorado em Agronomia) –

Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PAGANELLA, M. B.; VALLS, J. F. M. **Caracterização morfo-agronômica de cultivares e acessos selecionados de *Arachis pinto* Krapov. & W. C. Gregory (Leguminosae)**. Pasturas Tropicales, v. 24, p. 23-30, 2002.

PALMIERI, D.A., BECHARA, M.D., CURI, R.A., GIMENES, M.A., LOPES, C.R. **Isolation and characterization of microsatellite loci from forage species *Arachis pinto* (Genus *Arachis*)**. Mol. Ecol. Notes, 1 – 3, 2004.

PALMIERI, D.A., HOSHINO, A.A., BRAVO, J.P., LOPES, C.R., GIMENES, M.A. **Isolation and characterization of microsatellite loci from forage species *Arachis pinto* (Genus *Arachis*)**. Mol. Ecol. Notes, 2: 551-553, 2002.

PARIS, W. **Produção Animal em Pastagens de Coastcross-1 Consorciada com *Arachis Pinto* com e sem Adubação Nitrogenada**. Tese (doutorado), 2006-. Universidade Estadual De Maringá, UEM, Maringá- PR.

PATERSON, A. H., DAMON, S., HEWITT, J. **Mendelian factors underlying quantitative traits in tomato: comparison across species, generations, and environments**. Genetics, Chapel Hill, v. 127, p. 181-197, 1991.

PAULINO, V.T., FERRARI JUNIOR, E., LUCENA, M.A.C., POSSENTI, R.A. **Crescimento, composição química e biológica de *Arachis pinto* cv. Belmonte em função da calagem e da adubação fosfatada para diferentes alturas de corte**. PUBVET, Londrina, V. 2, N. 36, Set 2, 2008. Disponível em: <<http://www.pubvet.com.br/texto.php?id=352>>

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

PEÑALOZA, A.P.S., VALLS, J.F.M. **Número cromossômico de novas espécies de *Arachis*(leguminosae)**. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA A AMÉRICA LATINA E CARIBE, 2. 1999, Brasília. *Anais...* Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia. 1999. CD ROM. (Resumo nº 177).

PEREIRA, J.M., SANTANA, J.R. de, REZENDE, C. de P. **Pastagem formada por capim-humidicola (*Brachiarias* alternativas para aumentar o porte de nitrogênio em *B. humidicola* (Rendle) Schweickt)**. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 33., 1996, Fortaleza. *Anais...* Fortaleza: SBZ, 1996, p. 38-40.

PEREIRA, J.M., SANTANA, J.R. de. **Produtividade de pastagens de *Brachiaria decumbens* com a introdução de leguminosas e fertilização nitrogenada**. In: RED INTERNACIONAL DE EVALUACIÓN DE PASTOS TROPICALES – AMAZONIA, 1., 1990. Lima. *Anais...* Lima CIAT, 1990, p. 581-585.

PEREIRA, M. G., PEREIRA, T. N. S. (2006) **Marcadores moleculares no Pré-Melhoramento de plantas**. In: Borém, A. e Caixeta, E.T. *Marcadores moleculares*. Viçosa: UFV, p.85-106.

PÉREZ, J. S. C.; CASTILLO, E.; ESCALONA, M. A.; VALLES, B.; JARILLO, J. **Evaluación de *Arachis pinto* CIAT 17434 como Cultivo de Cobertura en una plantación de Naranja var. Valencia**. In.: P. J. ARGEL e A. RAMÍREZ, eds., *Experiencias Regionales con *Arachis pinto* y Planes Futuros de Investigación y Promoción de La Especie en Mexico, Centroamérica y el Caribe*, Cali, Colombia, p. 188-193. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 1996.

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

- PERIN, A.; GUERRA, J. G. M.; TEIXEIRA, M. G.; **Cobertura do solo e acumulação de nutrientes pelo amendoim forrageiro**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, vol.38 n.7, 2003.
- 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, 2001. p. 94-97.
- PIZARRO, E.A., CARVALHO, M.A. 1996. **Alternative forages for the tropics: Arachis and Paspalum**. In Proc.of Symposium of the Crop Science Society of America. Seattle. WA, CSSA.
- PIZARRO, E.A., RINCÓN, A.C. 1994. **Regional experience with forage Arachis in South America**. p. 144-157. In P.C. Kerridge and B. Hardy (ed.). Biology and Agronomy of Forage Arachis, CIAT, Cali, Colombia.
- PONCET, V., HAMON, P., MINIER, J., CARASCO, C., HAMON, S., NOIROT, M. **SSR cross-amplification and variation within coffee trees (Coffea spp.)**. Genome, v. 47, p.1071-1081, 2004.
- POWELL, W., MACHRAY, G. C., PROVAN, J. **Polymorphism revealed by simple sequence repeats**. Trends Plant Science, v.1, p.215-222, 1996.
- POWELL, W., OROZCO-CASTILLO, C., CHALMERS, K. J., PROVAN, J., WAUGH, R. **Polymerase chain reaction-based assays for the characterisation of plant genetic resources**. Electrophoresis, Weinheim, v. 16, n. 9, p. 1726-1730, Sept. 1995.
- PRINE, G., DUNAVIN, L.S., MOORE, J.E., ROUSH, R.D. 1986. **Registration of 'Florigraze' rhizoma peanut**. Crop Science 26: 1084-1085.
- PRINE, G.M., DUNAVIN, L.S., GLENNON, R.J., AND ROUSH, R.D. 1990. **Registration of 'Arbrook' rhizoma peanut**. Crop Science 30: 743-744.
- PURCINO, H. M. A., VIANA, M.C.M., FREIRE, F.M., Mcêdo, G.A.R., MARIEL, I.E., MENDES, I. **Avaliação da cobertura do solo com Arachis pintoii, como fonte de nitrogênio para produção de milho**. In: 41 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2004, Campo Grande. Anais da Sociedade Brasileira de Zootecnia. Campo Grande: SBZ, 2004. v. 41. p. 1-4.
- PURCINO, H. M. A., VIANA, M.C.M., FREIRE, F.M., Mcêdo, G.A.R., MARIEL, I.E., MENDES, I. **Utilização e contribuição de leguminosas na produção animal**. Informe Agropecuário, v. 26, n. 226, p. 76-97, 2005.
- RAFALSKI, J.A., TINGEY, S.V. (1993). **Genetic diagnostics in plant breeding -RAPDs, microsatellites and machines**. Trends Genet 9: 275-280.
- RAMALHO, M. A. P., ABREU, A. F. B., SANTOS, J. B. **Melhoramento de espécies autóгамas**. In: NASS, L. L., VALOIS, A. C. C., MELO, I. S. de, VALADARES-INGLIS, M. C. Recursos genéticos e melhoramento – plantas. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 201-230.
- RAMALHO, M. A. P., SANTOS, J. B. dos, ZIMMERMANN, M. J.O. **Genética quantitativa em plantas autóгамas: aplicações ao melhoramento do feijoeiro**. Goiânia: UFG, 1993. 271 p.
- RAO, I.M., KERRIDGE, P.C. 1994. **Mineral nutrition of forage Arachis**. p. 71-83 In P.C. Kerridge and B. Hardy (ed.). Biology and Agronomy of Forage Arachis, CIAT, Cali, Colombia.
- RASMUSSEN, J.O., RASMUSSEN, O.S. **Characterization of somatic hybrids of potato by use of RAPD markers and isozyme analysis**. Physiologia Plantarum, Copenhagen, v. 93, n.2, p. 357-364,

Feb. 1995.

RINCÓN, A.C., CUESTA, M.P.A., PÉREZ, B.R., LASCANO, C.E., FERGUNSON, J. 1992. **Maní forrajero perenne (*Arachis pinto* Krapovickas et Gregory): Una alternativa para ganaderos y agricultores.** In Boletín Técnico 219. IAC/CIAT, Cali, Colombia.

RIVAS, L., HOLMANN, F. **Early adoption of *Arachis pinto* in the humid tropics the case of dual-purpose livestock systems in Caquetá, Colombia.** Livestock Research Rural. Development. V.3., n.12., 2000.

RODRIGUES, L.R. de A., QUADROS, D.G., RAMOS, A. K. **Recuperação de Pastagens Degradadas.** In: SIMPÓSIO PECUÁRIA-PERSPECTIVA PARA O III MILÊNIO, 1. Pirassununga, 2000. Anais. Pirassununga: FZEA 2000. p. 18

RODRIGUES, T. B. **Efeito da Seleção Natural em Alelos Microssatélites (SSR) do Feijoeiro e Associação com Qtls de Caracteres Agronômicos.** Dissertação (Mestrado), 2004-Universidade Federal de Lavras- Minas Gerais.

ROSSETO, M., MCNALLY, J., HENRY, R.J. (2002). **Evaluating the potential of SSR flanking regions for examining taxonomic relationships in the Vitaceae.** Theor Appl Genet 104:61-66.

SAGHAI MAROOF, M. A., BIYASHEV, R. M., YANG, G. P., ZHANG, Q., ALLARD, R. W. **Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity, chromosomal locations, and population dynamics.** Proceedings of the National Academy Science, v.91, p.5466-5470, 1994.

SANSAVINI, S. **Biotechnologie frutticole: le nuove frontiere delle ricerche per il miglioramento genetico e la propagazione delle piante da frutto.** Frutticoltura, Bologna, n.5, p.75-81, 1998.

SANTANA, J. R., PEREIRA, J. M., REZENDE, C. P. **Avaliação de *Brachiaria dictyoneura* Stapf com *Arachis Pinto* Krapov & Gregory sob pastejo.** IN: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35, 1998, Botucatu. Anais... Botucatu: SBZ, 1998. p.406-408.

SANTOS, I. P. A., PINTO, J. C. **Influência do Fósforo, Micorriza e Nitrogênio no Conteúdo de Minerais de *Brachiaria brizantha* e *Arachis pinto* Consorciados.** Revista Brasileira de Zootecnia, v.31, n.2, p. 605-616, 2002.

SANTOS, P. M. **Aspectos Fisiológicos e Metabólicos da Nutrição Nitrogenada de Plantas Forrageiras.** In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 21^o, 2004, Piracicaba. Anais... Piracicaba: FEALQ, p. 139-154. 2004.

SCOT CONSULTORIA. **Áreas de pastagens versus a agricultura.** p2, 2006. Disponível em: http://www.arteeideias.com/site/download/pastagens_x_agricultura.pdf. Acesso em 12/08/2008.

SEAGRI (Secretaria da Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária, Ba). **Amendoim para o avestruz.** Disponível em <http://www.seagri.ba.gov.br/noticias.asp?qact=view&exibir=clipping¬id=4930>. Acesso em 09/09/2008.

SILVA, G.P. 1997. **O conhecimento da geografia do gênero *Arachis* (*leguminosae*) para a coleta de germoplasma.** In. VEIGA, R.F.A., BOVI, M.L.A., BETTI, J.A. E VOLTAN, R.B.Q. (Eds). Simpósio Latino-Americano de Recursos Genéticos Vegetais, 1, 1997. Campinas. Resumos... Campinas: IAC, 1997. p. 24

SILVA, S. C, NASCIMENTO, JR. D., MONTAGNER, D. B. **Desafios da produção intensiva de bovinos de corte em pastagens.** In: I Simpósio sobre desafios e novas tecnologias na bovinocultura de corte. Anais... UPIS, Brasília-DF, 2-3 abril de 2005.

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), 1994. Chapter 14. p. 43-52.

SIMPSON, C.E., STARR, J.L. 2001. **Registration of 'COAN' peanut**. *Crop Science* 41: 918.

SMITHIES, O. **Zone electrophoresis in starch gels: group variation in the serum proteins of normal human adults**. *Biochemical Journal*, v. 61, p. 629-641, 1955.

SORRELLS, M. E., NATCHIT, M. M., BARBOSA NETO, J. F., **Relationships among 81 Durum genotypes based on RFLPs, gliadins, parentage, and quality traits**. In: SEMINAR ON DURUM WHEAT QUALITY IN THE MEDITERRANEAN REGION, 1993. *Anais...C.I.H.E.A.M./ I C.A.R.D.A./ C.I.M.M.Y.T. Zaragoza, Espanha, 1993*, p. 20.

SOUZA, A.P. **Biologia Molecular aplicada ao melhoramento**. Recursos Genéticos e Melhoramento-Plantas, Fundação MT, 2001, p. 939-966.

SOUZA, E. M., ISEPON, O. J. , ALVES, J. B. **Efeitos da Irrigação e Adubação Nitrogenada sobre a Massa de Forragem de Cultivares de Panicum maximum Jacq**. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.34, n.4, p.1146-1155, 2005.

SOUZA, E., SORRELLS, M. E. **Relationship among 70 North American oat germplasms: I. Cluster analysis using quantitative caracteres**. *Crop Science, Madison*, v. 29, p. 595-601, 1991a.

SOUZA, E., SORRELLS, M. E. **Relationship among 70 North American oat germplasms: II. Cluster analysis using quantitative caracteres**. *Crop Science, Madison*, v. 31, p. 605-612, 1991b.

STARR, J.L., SCHUSTER, G.L., SIMPSON, C.E. 1990. **Characterization of the resistance to Meloidogyne arenaria in an interspecific Arachis spp. Hybrid**. *Peanut Science* 17:106-108.

TAUTZ, D. & RENZ, M. **Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukariotic genomes**. *Nucleic Acids Research, Oxford*, v 12, p. 4127-4138, 1984.

TAUTZ, D. **Hypervariability of simple sequences as general source of polymorphic DNA markers**. *Nucleic Acids Res.*, v.17 p.6463-71, 1989.

TEIXEIRA, C. C. **Estudo da cruzabilidade de espécies das secções Caulorrhizae, Erectoides e Procumbentes do gênero Arachis (Leguminosae)**. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 1999. 93p.

TEMNYKH, S., DECLERCK, G., LUKASHOVA, A., LIPOVICH, L., CARTINHO, S., MCCOUCH, S.R. (2001). **Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (Oryza sativa L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential**. *Genome Res* 11:1441–1452

VALENTIM, J. F. & ANDRADE, C. M. S. **Perspectives of grass-legume pastures for sustainable animal production in the tropics**. In: 41ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. Campo Grande – MS. *Anais... Campo Grande: SBZ*, p. 142-154. 2004.

VALENTIM, J. F. & MOREIRA P. **Produtividade de forragem de gramíneas e leguminosas em pastagens puras e consorciadas no Acre**. In: Boletim de Pesquisa, número 33, 2001 EMBRAPA Acre, 36p. Disponível em www.cpaafac.embrapa.br/pdf/bp33.pdf.

VALENTIM, J. F. **Yield, quality botanical composition and persistence of tropical grasses, a legume and grass-legumes associations as affected by fertilizer nitrogen**. 1985. 127 p. Dissertação

(Mestrado em Agronomia) – Universidade da Flórida, Gainesville, Flórida, EUA.

VALENTIM, J.F., CARNEIRO, J.C., VAZ, F.A. **Produção de mudas de *Arachis pintoi***. Rio Branco: EMBRAPA Acre, 2000. 4p. (Instruções técnicas, 33).

VALLE, C. B. **Genetic Resources for tropical areas: achievements and perspectives**. IN: GOMIDE, J. A., MATTOS, W. R. S., SILVA, S. C. (eds.). Proceedings of the 19th International Grassland Congress, Piracicaba, 2001. p. 477-481.

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

VALLS, J. F. M. **Situação atual da coleta e utilização de germoplasma de espécies silvestres de *Arachis*** In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA A AMÉRICA LATINA E CARIBE, 3, 2001, Londrina, PR. Anais... Londrina: IAPAR, 2001. p. 105-108.

VALLS, J.F.M. (1996) **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, pp 15-27.

VALLS, J.F.M. 1988. **Morphological characterization, reproductive and biochemical of vegetative germplasm**. In Proc. do Encontro sobre Recursos Genéticos. Jaboticabal, SP, Brazil, FCAV.

VALLS, J.F.M. **Variability in the genus *Arachis* and potential forage uses**. In: Springer, T.L., VanCoppenolle, B., Watanabe, I., VanHove, C., Second, G., Huang, N., McCouch, S.R. 1993. Genetic diversity and phylogeny analysis of *Azolla* based on DNA amplification by arbitrary primers. Genome, 36: 686-693.

VALLS, J.F.M., SIMPSON, C.E. 1994. **Taxonomy, natural distribution, and attributes of *Arachis***. In: Kerridge, P.C., Hardy, B. **Biology and Agronomy of Forage *Arachis***. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia, p. 1-18.

VALLS, J.F.M., SIMPSON, C.E. 2005. **New species of *Arachis (leguminosae)* from Brazil, Paraguay and Bolivia**. *Bonplandia* 14(-2): 35-65. ISSN: 0524-0476.

VALLS, J.F.M., SIMPSON, C.E. **Novas espécies de *Arachis (Leguminosae)***. In: VEIGA, R.F.A, BOVI, M.L.A, BETTI, J.A., QUEIROZ-VOLTAN, R.B. (Eds.). SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS, 1., 1997, Campinas. *Programas e Resumos...* Campinas: IAC/EMBRAPA-Cenargen, 1997. p.27.

VALLS, J.F.M.; PIZARRO, E.A. 1994. **Collection of wild *Arachis* germplasm**. p. 19-27. In P.C. Kerridge and B. Hardy (ed.). **Biology and Agronomy of Forage *Arachis***, CIAT, Cali, Colombia.

VIEIRA, C., BORÉM, A., RAMALHO, M. A. P., CARNEIRO, J. E. de S. **Melhoramento do feijão**. In: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 2005. p. 301-392.

WENDLING, I. J. , CARNEIRO, J. C., VALENTIM, J. F., CARNEIRO, J. C.. **Efeito da altura e frequência de corte na produção de matéria seca de *Arachis pintoi* (BRA-031143) nas condições edafoclimáticas do Acre**. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 1999, Porto Alegre. REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA. Viçosa: SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 1999. v. 36. p. 53.

WINTER, P. & KAHL, 1995. **Molecular marker technologies for plant improvement**. World Journal of

Microbiology & Biotechnology, 11: 438-448, 1995.

WRICKE, G., WEBER, W. E. **Quantitative genetics and selection in plant breeding**. Berlin: Walter de Gruyter, 1986. 395 p.

WU, K.S., TANKSLEY, S. D. **Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice**. *Molecular Genetics and Genomics*, v.241, p.225-235, 1993.

YEH F.C., YANG R.C., BOILEY T., YE Z.H., MAO J.X. (1999) **popgene, the user-friendly shareware for population genetic analysis**. *Molecular Biology and Biotechnology Center*, University of Alberta, Canada.

YU, K., PARK, S. J., POYSA, V. **Abundance and variation of microsatellite DNA sequences in beans (*Phaseolus* and *Vigna*)**. *Genome*, v.42, p.27-34, 1999.

ZANE, L., BARGELLONI, L., PATERNELLO, T. **Strategies for microsatellite isolation: a review**. *Mol. Ecol.*, v.11, p. 1-16, 2002.

ZHONG-HU, H. **An investigation of the relationship between the F1 potential and the measures of genetics distance among wheat lines**. *Euphytica*, Wageningen, v. 58, p. 165-170, 1991.

ZIMMER, A. H. et al. **Leguminosas em pastagens: novas opções e perspectivas**. In: Formação de pastagens. Curso... Campo Grande: Embrapa Gado de Corte. (apostila), 2003.

8 Apêndice 1- Tabela com a homozigose completa por planta em cada genótipo

Tabela 5 – Homozigose média observada de cada planta individual do genótipo G5, onde 0= heterozigoto e 100= homozigoto e xx dados perdidos.

Primer	AP33	AP40	Ap152	AP161	AP166	AP175	AP176	AP183	AP190	AP192	Ah7	Ah126	Ag39	Ag140	Ag171	Homozigose média de cada planta	
Genótipo																	
G5-1	100	100	0	100	0	0	0	100	100	100	100	0	100	0	100	60	
G5-2	100	100	0	100	0	100	100	100	100	100	100	100	100	0	100	80	
G5-3	100	100	0	100	0	100	100	100	100	100	100	100	100	0	100	80	
G5-5	100	100	0	0	0	0	100	0	100	0	100	100	0	100	100	53,33	
																Media	68,33
G6-1	100	100	100	100	0	100	100	100	100	100	0	100	100	100	100	86,67	
G6-2	0	100	100	100	0	100	100	100	100	0	100	0	100	100	100	73,33	
G6-3	0	100	0	0	0	100	100	100	100	0	100	0	0	100	100	47,33	
G6-5	100	0	0	0	0	100	100	100	0	0	0	0	0	100	100	40	
G6-6	0	0	0	100	100	100	100	100	0	0	0	0	100	100	100	53,33	
G6-7	100	100	0	0	100	0	100	100	100	0	0	100	0	100	100	60	
																Media	60,11
G7-1	0	100	100	0	0	0	100	100	0	0	100	100	0	0	100	46,67	
G7-2	100	100	100	100	0	100	100	100	100	100	0	0	100	100	100	80	
G7-3	0	0	100	0	0	0	100	100	0	100	0	0	100	100	100	46,67	
G7-4	100	0	100	0	0	100	100	100	0	100	100	0	0	100	100	60	
																Media	58,33
G8-1	0	0	0	0	0	0	100	100	0	100	0	0	100	0	100	33,33	
G8-2	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	100	100	100	100	100	46,67	
G8-3	0	100	100	0	0	0	100	100	100	100	100	0	100	100	100	66,67	
G8-4	100	100	100	100	0	100	100	100	100	100	100	0	100	100	100	86,67	
G8-5	0	100	0	100	0	100	100	100	100	100	100	0	100	100	100	73,33	
																Media	61,33

Continuação da tabela de homozigose

G9-1	0	100	100	0	100	100	100	100	100	0	100	0	100	0	100	66,67
G9-2	100	100	100	100	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	93,33
G9-3	100	100	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	93,33
G9-4	100	100	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	93,33
G9-5	0	100	0	0	0	0	100	100	100	0	100	0	0	100	100	46,67
G9-6	0	0	0	100	0	0	100	100	0	0	0	100	100	0	100	40
Media																72,22
G10-1	0	100	0	100	0	0	100	100	100	0	100	0	100	100	100	60
G10-2	100	0	0	100	0	0	100	100	0	0	100	0	100	100	100	53,33
G10-3	0	100	100	0	0	100	100	100	100	0	100	100	100	100	100	73,33
Media																62,22
G11-1	0	100	0	100	0	0	100	0	100	0	100	0	100	100	xx	50
G11-2	0	0	0	0	0	100	100	100	0	0	0	100	100	100	100	46,67
G11-3	100	0	0	0	0	0	100	100	0	100	100	100	0	100	100	53,33
Media																50
G12-1	100	0	100	0	0	0	100	100	0	0	100	0	0	100	100	46,67
G12-2	0	0	100	0	0	0	100	100	100	0	100	0	0	100	100	46,67
G12-3	100	100	0	0	xx	0	100	100	0	100	100	0	0	0	100	50
Media																47,78
G13-1	0	0	0	100	0	0	100	0	0	0	100	0	0	100	100	33,33
G13-3	100	0	0	0	0	0	100	100	0	0	100	0	0	0	100	33,33
G13-4	100	0	0	100	0	0	100	100	0	100	0	100	0	0	100	46,67
G13-5	0	100	0	0	100	0	100	100	0	0	100	100	100	0	100	53,33
Media																41,67
G14-1	0	0	100	100	100	100	100	100	0	100	100	0	100	100	100	73,33
G14-2	100	0	0	100	100	100	100	100	0	100	100	100	100	100	100	80
G14-3	100	0	0	100	100	100	100	100	0	100	100	100	100	100	100	80
Media																77,78

Continuação da tabela de homozigose

G15-1	0	100	100	100	0	100	100	100	100	0	100	100	100	100	100	80
G15-2	0	0	100	0	0	100	100	100	0	100	100	0	100	0	100	53,33
G15-3	100	100	100	0	0	0	100	100	100	0	100	100	100	100	100	73,33
Media															68,89	
G16-1	100	100	0	0	0	100	100	100	100	0	100	100	100	0	100	66,67
G16-2	0	100	0	0	0	100	100	100	100	0	100	0	0	100	100	53,33
G16-3	100	100	0	0	0	0	100	100	100	100	0	0	100	100	100	60
Media															60	
G17-1	0	100	0	0	100	0	100	0	100	100	100	100	0	0	100	53,33
G17-2	100	100	0	100	0	0	100	100	0	0	100	0	0	100	100	53,33
G17-3	100	100	0	0	0	100	100	100	0	100	xx	100	0	100	100	64,29
Media															56,98	
G18-1	100	0	0	100	0	0	100	100	0	0	100	0	100	100	100	53,33
G18-2	100	0	0	0	0	0	100	100	0	100	100	100	0	100	100	53,33
G18-3	100	0	0	100	100	100	0	100	0	0	100	0	100	100	100	60
Media															55,56	
G19-1	100	100	0	0	100	0	100	100	100	0	100	100	100	100	100	73,33
G19-2	100	100	0	0	100	0	100	0	100	100	100	100	100	100	100	73,33
Media															73,33	
G20-1	0	100	0	100	0	100	0	100	100	100	100	100	0	100	100	66,67
G20-2	100	0	0	0	0	100	100	100	0	100	100	100	0	0	100	53,33
G21-1	100	100	0	0	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	80
G21-2	100	100	0	100	0	100	100	100	100	0	0	100	100	100	100	73,33
Media															76,67	
G22-1	100	100	0	100	0	100	100	0	100	100	100	0	xx	100	100	71,43
G22-2	100	100	0	100	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	86,67
Media															79,05	

