

**UFRRJ  
INSTITUTO DE AGRONOMIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA  
CIÊNCIA DO SOLO**

**DISSERTAÇÃO**

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA E  
AVALIAÇÃO DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE  
NITROGÊNIO ENTRE ACESSOS DE AMENDOIM  
(*Arachis hypogaea* L.).**

**Wardsson Lustrino Borges**

**2006**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE AGRONOMIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA  
CIÊNCIA DO SOLO**

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA E AVALIAÇÃO DA  
FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO ENTRE ACESSOS DE  
AMENDOIM (*Arachis hypogaea* L.).**

**WARDSSON LUSTRINO BORGES**

*Sob a Orientação da Pesquisadora*  
**Maria Cristina Prata Neves**

*e Co-orientação da Pesquisadora*  
**Norma Gouvêa Rumjanek**

Dissertação submetida como  
requisito parcial para obtenção do  
grau de **Mestre em Ciências**, no  
Curso de Pós-Graduação em  
Agronomia, Área de Concentração  
em Ciência do Solo

Seropédica, RJ  
Março de 2006

633.368  
B732a  
T

Borges, Wardsson Lustrino, 1981-

Análise da variabilidade genética e avaliação da fixação biológica de nitrogênio entre acessos de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) / Wardsson Lustrino Borges. – 2006.

48 f. : il.

Orientador: Maria Cristina Prata Neves.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia.

Bibliografia: f. 41-48.

1. Amendoim – Cultivo – Teses. 2. Amendoim – Genética - Teses. 3. Amendoim - Variedades – Teses. 4. Nitrogênio – Fixação - Teses. I. Neves, Maria Cristina Prata, 1950-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Instituto de Agronomia. III. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta Dissertação, desde que seja citada a fonte

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE AGRONOMIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – CIÊNCIA DO SOLO**

**WARDSSON LUSTRINO BORGES**

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de Concentração em Ciência do Solo, como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, em Agronomia.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 28/3/2006.

---

Norma Gouvêa Rumjanek. Ph.D. Embrapa Agrobiologia  
Co-Orientadora

---

Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos. Dr. UFRPE

---

Sonia Regina de Souza. Dr. UFRRJ

---

Gustavo Ribeiro Xavier Dr. Embrapa Agrobiologia

## **DEDICATÓRIA**

Dedico a meu Avô Antônio  
Ferreira Lustrino (*in memória*)  
pela sua história de vida, a qual  
orgulho-me muito.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao CNPq pela bolsa concedida durante 43 meses de Iniciação Científica e durante o período do Mestrado.

Ao curso de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo pela oportunidade.

A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela excelente formação que recebi nos níveis de Graduação e Pós Graduação.

A Embrapa Agrobiologia por possibilitar a infra-estrutura necessária aos trabalhos.

A Maria Cristina Prata Neves pela oportunidade de iniciar como bolsista de Iniciação Científica na Embrapa Agrobiologia.

A Norma Gouvêa Rumjanek pela orientação durante estes seis anos e principalmente pela confiança depositada em mim durante o Mestrado.

A Gustavo Ribeiro Xavier pelas sugestões neste trabalho de Mestrado.

A Ignácio Godoy, José Francisco Montenegro Valls e Tais Moraes Falleiro Suassuna pelo fornecimento dos acessos utilizados neste estudo.

Aos amigos do Laboratório de Ecologia Microbiana que contribuíram diretamente para a minha formação: Jerri Édson Zilli, Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos, Flávia Venâncio, Fernanda Cíntia Pires e Teixeira e Claudia Miranda Martins.

Aos amigos do Laboratório de Ecologia, pela amizade e pelo entusiasmo diário: Rejane Guedes, Alanir Bratti, Adriano Knupp, Jamileh Carvalho, Samuel Passos, Anelise Dias, Enderson Brito, Gloria Botelho, Marcela Drecshel, Marcela Aboim, Sheila Vasconcelos e Rachel Pinton.

A Paulo Ivan Fernandes Junior, Carlos Brasil Batista Júnior e João Luiz Bastos pela amizade e pelo companheirismo.

A minha mãe Maria Antônia Lustrino Borges pelo cuidado dedicado a mim.

Aos meus irmãos Wallysson, Danilo, Sheila e Cristian e ao meu cunhado Jair Rodrigues pela ajuda.

A Ana Amélia dos Santos Cordeiro, minha namorada, pela atenção e carinho durante este tempo que estamos juntos.

A Sociedade Brasileira por ter financiado os meus estudos, do primeiro dia até o presente momento.

## **BIOGRAFIA**

Wardsson Lustrino Borges filho de Maria Antônia Lustrino Borges e Juracy Borges do Rego nasceu em Varzelândia, norte de Minas Gerais no dia 21 de outubro de 1981. Passou a sua infância em Varzelândia onde cursou o ensino fundamental na Escola Estadual Padre José Silveira, concluindo em 1995. De 1996 a 1998 morou em Januária, tradicional cidade do norte do estado, ribeirinha ao Rio São Francisco onde conclui o curso de Técnico em Agropecuária, na Escola Agrotécnica Federal de Januária, atual Centro Federal de Educação Tecnológica de Januária. Wardsson diplomou-se Engenheiro Agrônomo pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (Antiga Escola Nacional de Agronomia). No período da graduação foi orientado por pesquisadoras da Embrapa Agrobiologia.

## RESUMO

BORGES, Wardsson Lustrino. **Análise da variabilidade genética e Avaliação da fixação biológica de nitrogênio entre acessos de amendoim (*Arachis hypogaea* L.)**. 2006. 48f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2006.

O amendoim é uma cultura cultivada em todo o mundo que apresenta elevado potencial para fixação biológica de nitrogênio (FBN). Entretanto o amendoim é considerado uma espécie promíscua, o que faz necessário um extenso trabalho de seleção de estirpes de rizóbio eficientes e competitivas para a produção de inoculantes para esta cultura. A seleção de uma associação eficiente depende do conhecimento da variabilidade genética do macro e do microsimbionte, uma vez que o padrão de variabilidade pode revelar níveis de especificidade da associação. O conhecimento a respeito de interações mais específicas e eficientes pode permitir a otimização do processo de fixação biológica de nitrogênio via seleção de pares simbioses. O objetivo deste trabalho foi avaliar por meio de marcador molecular (RAPD) a variabilidade genética entre 29 acessos da espécie *A. hypogaea* L. e avaliar a fixação biológica de nitrogênio em acessos representantes de grupos, em condição de não inoculação. Foram testados 55 iniciadores randômicos, sendo selecionados 31, que geraram um total de 145 fragmentos amplificados, destes 35 foram polimórficos (24,0%), com médias de 4,67 e 1,13 fragmentos e fragmentos polimórficos por iniciador, respectivamente. Apesar da existência de substancial diversidade entre genótipos de amendoim para várias características morfológicas, pouca variação tem sido detectada quando se utiliza marcadores baseados em DNA. Pelos dendrogramas construídos com os dados de RAPD, foi possível observar a formação de dois grupos principais entre os acessos estudados. Não foi observado agrupamento em função da origem dos acessos nem em função da caracterização em subespécies. A diferença na capacidade de nove acessos em fixar nitrogênio em condições de não inoculação foi avaliada em dois solos. As avaliações deste experimento permitiram concluir que os acessos IAC Tatu-ST, IAC 886 Runner, Sapucaia Vermelha, Sapucaia Bege e CV Tatuí mostraram um rendimento superior quando comparado com os demais acessos. Observou-se também que, a definição dos acessos mais eficientes quanto à FBN não está necessariamente relacionada ao relacionamento genético, uma vez que, estes acessos pertencem a grupos distintos pelo ensaio RAPD.

**Palavras chave:** Diversidade genética, FBN, AP-PCR.



## ABSTRACT

BORGES, Wardsson Lustino. **Analisis of genetic variability and assessment of biological nitrogen fixation among peanut (*Arachis hypogaea* L.) accessions**. 2006. 49f. Dissertation (Master Science in Agronomy, Soil Science) Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2006.

The peanut is a crop worldwide cultivated and it presents a high potential to biological nitrogen fixation (BNF). However peanut is considered a very promiscuous crop, what makes necessary a hard work of selection of rhizobial efficient and competitive strains to produce inoculants for this crop. The selection of an efficient association depends of the knowledge of genetic variability between both symbionts, since the levels of compatibility may reveal specificity association levels. The knowledge of more efficient and specific associations may optimize of BNF by selection of symbiont partners. The aim of this study was evaluate, by a molecular marker (RAPD), the genetic variability among 29 accessions of *A. hypogaea* L. and evaluate the BNF of clusters representing accessions, above non inoculated conditions. Were tested 55 arbitrary primers and selected 31, that generated 145 amplified fragments, which 35 showed polymorphism (24%), with averages of 4.67 and 1.13 fragments and polymorphic fragments by primer, respectively. In despite of the substantial diversity among peanut genotypes by several morphologic characteristics, low variation had been detected using DNA based markers. In the dendrograms constructed using the RAPD data was possible to observe two principal clusters among the accessions studied. It was not observed clustering neither by the origin of accessions nor about characterization of subspecies. The BNF capability differences of nine accessions in non inoculation conditions were evaluated in two soils. The evaluations of this experiment permitted conclude that the accessions IAC Tatu-ST, IAC 886 Runner, Sapucaia vermelha, Sapucaia Bege and CV Tatuí had shown a higher performance when compared with the other accessions. It was also observed that, the definition of the accessions more efficient to BNF, necessarily is not related to its genetic relationship, once this accessions belonged to distinct groups by assay RAPD.

**Keywords:** Genetic diversity, BNF, AP-PCR.

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Área plantada e a produção observada para a cultura do amendoim, no Brasil e nas regiões do país. Dados referentes ao ano de 2005 de acordo com levantamento do IBGE. 6	
<b>Tabela 2:</b> Identificação dos acessos de amendoim utilizados para a extração de DNA total e posterior ensaio por RAPD. ....	15
<b>Tabela 3:</b> Reagentes e concentrações testadas para a padronização do ensaio RAPD. ....	16
<b>Tabela 4:</b> Temperaturas utilizadas no gradiente (45°C +/- 10 °C), para o passo de anelamento. ....	17
<b>Tabela 5:</b> Nome e seqüência dos 40 iniciadores randômicos dos kits A e B da Operon testados na etapa de seleção. ....	18
<b>Tabela 6:</b> Seqüência e a temperatura de anelamento (°C) de 15 iniciadores propostos por HE & PRAKASH (1997). ....	19
<b>Tabela 7:</b> Resultado da análise química das amostras de terra utilizadas no experimento. ....	19
<b>Tabela 8:</b> Acessos utilizados para a extração de DNA, a concentração obtida para cada produto de extração e a relação entre os valores de absorbância obtidos com leituras a 260 e 280nm para inferência sobre a qualidade do produto. ....	22
<b>Tabela 9:</b> Resultados obtidos com os diferentes iniciadores utilizados no ensaio RAPD com os 29 acessos de amendoim. ....	25
<b>Tabela 10:</b> Valores médios de matéria fresca e matéria seca da parte aérea das plantas dos nove acessos utilizados no experimento de casa de vegetação. ....	34
<b>Tabela 11:</b> Teores médios de nitrogênio e acúmulo total de nitrogênio na parte aéreas das plantas dos nove acessos utilizados no experimento de casa de vegetação. ....	35
<b>Tabela 12:</b> Valores médios de etileno produzido pelos nove acessos utilizados no experimento de casa de vegetação, analisados pela técnica de redução de acetileno. ....	35
<b>Tabela 13:</b> Valores médios de número de nódulos e massa seca de nódulos dos nove acessos de amendoim utilizados no experimento de casa de vegetação. ....	37
<b>Tabela 14:</b> Valores médios de massa seca de raiz e massa seca total do sistema radicular dos nove acessos de amendoim utilizados no experimento de casa de vegetação. ....	38
<b>Tabela 15:</b> Correlação observada entre os parâmetros analisados no experimento com os nove acessos de amendoim. ....	39

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1:** Subespécies, variedades botânicas e tipos agronômicos da espécie *Arachis hypogaea* L. (Adaptado de HERSELMAN, 2003). ..... 4
- Figura 2:** Gel de agarose (0,8%p/v) mostrando o produto da extração com um (canaletas de 1 a 6) e com três discos de tecido vegetal (canaletas de 7 a 12). Sendo que as canaletas 1, 2, 7 e 8 correspondem ao produto da extração com o acesso 193AM, canaletas 3, 4, 9 e 10 correspondem ao produto da extração com o acesso 184AM e, canaletas 5, 6, 11 e 12 correspondem ao produto da extração com o acesso 218AM. .... 21
- Figura 3:** Perfis de bandas obtidos com quatro misturas diferentes das oito testadas, em cada gel podem ser observadas duas misturas. A concentração de DNA utilizada foi de  $1\text{hg.mL}^{-1}$  para ambos os géis, a concentração de iniciador utilizada foi de  $1,0\text{hg.mL}^{-1}$  no gel da parte superior da figura e  $1,5\text{hg.mL}^{-1}$  no gel da parte inferior da figura. A concentração de  $\text{MgCl}_2$  variou de  $1,5\text{mM}$  (1 a 12) para  $2,0\text{mM}$  (13 a 24) em cada gel.. 23
- Figura 4:** Perfis de bandas obtidos com quatro misturas diferentes das oito testadas, em cada gel podem ser observadas duas misturas. A concentração de DNA utilizada foi de  $1,5\text{hg.mL}^{-1}$  para ambos os géis, a concentração de iniciador utilizada foi de  $1,0\text{hg.mL}^{-1}$  no gel da parte superior da figura e  $1,5\text{hg.mL}^{-1}$  no gel da parte inferior da figura. A concentração de  $\text{MgCl}_2$  variou de  $1,5\text{mM}$  (1 a 12) para  $2,0\text{mM}$  (13 a 24) em cada gel... 23
- Figura 5:** Perfis de bandas obtidos com o iniciador opA5 para os acessos (1) Tatu-St, (2) IAC 8112, (3) IAC Caiapó, (4) V12549, (5) Md1678, (6) V12548, (7) CV Tatuí, (8) Mf 1538, (9) IAC Runner, (10) Sapucaia Bege, (11)Mf 1560 e (12) CV Tatu. B e M correspondem ao branco e ao marcador X174, respectivamente..... 26
- Figura 6:** Perfil de bandas obtido com o iniciador opB15 para os acessos (1) 76AM, (2) Sapucaia vermelha, (3) 174AM, (4) 192AM, (5)198AM, (6) 214AM, (7) 178AM, (8) 208AM, (9) 185AM, (10) Serrinha, (11) 184AM, (12)193AM, (13) 158AM, (14) 206AM, (15) 218AM, (16) 180AM e (17) 202AM. M corresponde ao marcador X174. .... 26
- Figura 7:** Dendrograma de similaridade construído com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de similaridade Simple Match (SM), a partir da matriz binária de dados RAPD com os 12 iniciadores randômicos em que se observou polimorfismo. Mostrando os grupos formados entre os 29 acessos de amendoim..... 28
- Figura 8:** Dendrograma de similaridade construído com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de similaridade DICE, a partir da matriz binária de dados RAPD com os 12 iniciadores randômicos em que se observou polimorfismo. Mostrando os grupos formados entre os 29 acessos de amendoim. .... 29
- Figura 9:** Análise de componentes principais de 29 acessos de amendoim, com base nos dados da matriz binária de 12 iniciadores RAPD, mostrando a ordenação dos acessos... 33

## SUMÁRIO

<b>1 – INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2 - REVISÃO DE LITERATURA</b>	2
2.1 - Gênero <i>Arachis</i>	2
2.1.1 - Origem do genoma de <i>Arachis hypogaea</i>	3
2.1.2 – A espécie <i>Arachis hypogaea</i> L – amendoim	3
2.1.3 – A cultura do amendoim	5
2.2 - Fixação Biológica de Nitrogênio em Amendoim	6
2.2.1 - Diversidade de rizóbio que nodula amendoim	8
2.3 - Marcadores Moleculares	8
2.3.1 – Marcadores moleculares do tipo RAPD	11
<b>3 - MATERIAL E MÉTODOS</b>	14
3.1 - Obtenção dos Acessos de Amendoim	14
3.2 - Extração de DNA Total	14
3.3 - Otimização das Condições de Amplificação	16
3.4 - Seleção dos Iniciadores Randômicos	17
3.5 – Ensaio RAPD	18
3.6 – Experimentos em Condição de Casa de Vegetação	19
3.7 – Análise Estatística dos Dados	20
<b>4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	21
4.1 - Extração do DNA	21
4.2 - Otimização das Condições de Amplificação	22
4.3 – Ensaio RAPD	24
4.4 – Avaliação da Nodulação e Fixação Biológica de Nitrogênio	34
<b>5 – CONCLUSÕES</b>	40
<b>6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	41

## 1 – INTRODUÇÃO

O Nitrogênio é o nutriente considerado como sendo o mais crítico para a produtividade agrícola, desta forma, a introdução de práticas culturais que maximizem o aproveitamento e reduzam os custos com este nutriente devem ser buscadas. Dentro deste contexto a otimização do processo de fixação biológica de nitrogênio resultante da seleção de simbiontes eficientes poderia contribuir para aumentar a produtividade e diminuir os custos com fertilizantes nitrogenados.

Desta forma, revestem-se de grande importância, os estudos dos fatores que regulam o estabelecimento da simbiose, que são mais efetivos no caso da associação entre rizóbio e soja. No entanto, para outras leguminosas muitas outras oportunidades de estudos são eminentes, a fim de otimizar a FBN em condições tropicais.

A otimização da fixação biológica de nitrogênio em espécies tropicais, considerada a questão relacionada à promiscuidade destas espécies, que é a capacidade destas em formar associação com um grupo diverso de bactérias nativas do solo e, a possibilidade do incremento de produtividade via otimização da FBN costuma ser questionada, uma vez que estes rizóbios nativos são considerados de pouca eficiência e competitivos.

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é considerado uma espécie promíscua, desta forma a prática de inoculação não é muito comum. No entanto, a seleção de uma associação eficiente depende do conhecimento da variabilidade genética do macro e do microsimbionte, uma vez que o padrão de variabilidade e o conhecimento de interações mais eficientes podem revelar níveis de especificidade da associação permitindo-se a maximização do processo de FBN via seleção de pares simbiontes.

A característica simbiótica da cultura do amendoim não tem sido considerada nos diferentes programas de melhoramento de cultivares de amendoim, onde predominam questões como a qualidade das sementes, o rendimento das sementes, bem como a resistência às principais doenças causadas por fungos de parte aérea. Por esse motivo não se conhece com profundidade os níveis de especificidade das cultivares de amendoim nem a capacidade simbiótica destas.

Com base neste cenário, o incremento da fixação biológica em amendoim deve ser parte integrante de um programa de melhoramento e deve ser conduzido de forma contínua, ou seja, a seleção de microsimbionte deve ser realizada a cada seleção de um novo macrosimbionte. Assim como, para a seleção de um microsimbionte deve se ter conhecimento da capacidade de fixação que o germoplasma vegetal apresenta, sua especificidade com o microsimbionte e a eficiência do par em relação ao processo de FBN.

O objetivo deste trabalho foi avaliar por meio de marcador molecular (RAPD) a variabilidade genética de 29 acessos da espécie *A. hypogaea* L. e avaliar a fixação biológica de nitrogênio em acessos representantes de grupos obtidos por RAPD.

## 2 - REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 - Gênero *Arachis*

O gênero *Arachis*, da família *Fabaceae*, é nativo da América do Sul, provavelmente da região que inclui o Brasil Central e o Paraguai (GREGORY et al., 1980). HOLBROOK & STALKER (2002) destacam que as espécies do gênero *Arachis* são nativas de uma extensa região da América do Sul que se estende desde os contrafortes dos Andes ao Atlântico e, da costa norte brasileira até 34° S no Uruguai. PEÑALOSA (1995) corrobora esta observação citando que as espécies deste gênero ocorrem naturalmente em cinco países da América do Sul: Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai e Uruguai.

KRAPOVICKAS & GREGORY (1994) descreveram 69 espécies neste gênero, as quais estão classificadas em nove seções, de acordo com as características morfológicas, citogenéticas, genéticas, distribuição geográfica e na fertilidade de híbridos interespecíficos. Segundo estes mesmos autores os dados citogenéticos são importantes para auxiliar o estudo taxonômico das espécies do gênero *Arachis*. As nove seções são: *Arachis*, *Caulorrhizae*, *Erictoides*, *Extranervosae*, *Heteranthae*, *Procumbentes*, *Rizomatosae*, *Trierectoides* e *Triseminatae*. Recentemente, onze novas espécies, de seis diferentes seções foram identificadas (VALLS & SIMPSON, 1997) e analisadas quanto ao número cromossômico (PEÑALOSA & VALLS, 1999).

As espécies do gênero *Arachis* se distinguem da maioria das outras espécies de plantas por florescerem acima do solo, mas produzirem frutos abaixo da superfície do solo. Dados citogenéticos identificaram três genomas na seção *Arachis* (A, B e D) e a maior parte das espécies diplóides possuindo o genoma A, que é caracterizado pela presença de um par de cromossomos menor do que os outros cromossomos enquanto o genoma B não apresenta este par. STALKER (1991) descreveu a espécie *Arachis glandulifera* como pertencente ao genoma D, por ser a única espécie a apresentar seis pares de cromossomos subteloentéricos.

Dentre as espécies do gênero *Arachis*, o amendoim é a espécie mais estudada em função da sua importância econômica. Entretanto, outras espécies apresentam características de interesse agrônomo, como forrageiras, tais como *Arachis glabrata* Benth. da seção *Rizomatosae* (PRINE et al., 1981) e duas da seção *Caulorrhizae*: *Arachis repens* Handr. e *Arachis pintoii* Krapov. & Gregory (KERRIDGE & HARDY, 1994). *Arachis glabrata* é um tetraplóide, de ocorrência natural na Argentina, Brasil e Paraguai, já as espécies da seção *Caulorrhizae* são diplóides e têm sido encontradas crescendo naturalmente apenas no Brasil.

GIMENES et al. (2002) ressaltaram que o grande número de acessos coletados recentemente ampliou a distribuição geográfica de muitas seções e que novas questões sobre a posição taxonômica e parentesco entre algumas espécies têm sido levantadas neste gênero. Uma vez que alguns destes novos acessos apresentam características morfológicas intermediárias entre diferentes espécies, mudanças na taxonomia podem ocorrer quando estes acessos forem considerados.

VALLS et al. (1985) relataram que a distribuição das espécies neste gênero é quase contínua e há uma quantia extensa de distribuição sobreposta entre alguns taxa em diferentes seções. O gênero ocupa uma região de 4000 km de extensão desde o Nordeste do Brasil até os Andes (KRAPOVICKAS & GREGORY, 1994), com espécies que crescem desde o nível do mar até 1450m de altitude, em ambientes com floresta descontínuas até vegetação de gramíneas, em regiões com média superior a 2000 mm de chuva/ano ou mesmo em pedregulho árido (SINGH & SIMPSON, 1994; apud FÁVERO, 2004).

### 2.1.1 - Origem do genoma de *Arachis hypogaea*

*Arachis hypogaea* é um anfidiplóide cujos progenitores não têm sido determinados de forma conclusiva, sendo que várias espécies já foram propostas como doadoras dos genomas A e B. A identificação das doadoras dos genomas A e B, envolvidos na origem do amendoim tem grande importância teórica e prática (FERNÁNDEZ & KRAPOVICKAS 1994).

Quase todas as espécies do gênero *Arachis* são diplóides, mas o amendoim cultivado é um tetraplóide (genoma AABB). Este é um membro da seção *Arachis*, onde também, estão incluídas 25 espécies diplóides e uma espécie selvagem tetraplóide (*Arachis monticola*) (KRAPOVICKAS & GREGORY, 1994).

*Arachis hypogaea* L. (AABB;  $2n=4x=40$ ) teria se originado por domesticação da espécie tetraplóide *A. monticola* (AABB) e esta, pelo cruzamento entre duas espécies silvestres da seção *Arachis*, uma de genoma “A” (com o par de cromossomos “A”), e outra de genoma “B” (sem o par de cromossomos “A”) (GREGORY & GREGORY 1976, 1979). *Arachis monticola* e *A. hypogaea* são as únicas espécies tetraplóides da seção *Arachis* e formam híbridos férteis quando cruzados entre si.

Em função das diferenças entre as duas subespécies de *Arachis hypogaea*, KRAPOVICKAS & GREGORY (1994) ressaltam que a possibilidade do envolvimento de mais de uma espécie na origem desta espécie não deve ser descartada. Estes autores, baseados em dados de distribuição geográfica das espécies silvestres da seção *Arachis* sugerem que a subsp. *hypogaea* tenha originado no Sudeste da Bolívia e que a subsp. *fastigiata* tenha se diferenciado mais ao Norte, possivelmente no Peru, onde apresenta sua maior variabilidade, observando a presença das vars. *fastigiata*, *peruviana* e *aequatoriana*.

Com base em evidências citogenéticas, aliadas ou não a dados moleculares e de cruzamentos interespecíficos, a hipótese mais aceita é de que *A. duranensis* teria sido a doadora do genoma “A” (FERNANDES & KRAPOVICKAS, 1994; KOCKER et al., 1991, 1996; SINGH, 1986) e *A. batizocoi*, do genoma “B” (CAI et al., 1987, SINGH 1986, SMARTT et al., 1978).

Em uma revisão sobre os doadores dos genomas para o amendoim baseados em dados de citogenética SINGH & SMARTT (1998) concluíram que *A. duranensis* e *A. batizocoi* ainda são os mais prováveis progenitores de *A. hypogaea* e, que a possibilidade de *A. ipanensis* ser doador do genoma B só deveria ser considerada quando híbridos férteis forem produzidos entre *A. hypogaea* e o produto do cruzamento entre *A. duranensis* e *A. ipanensis*. Posteriormente, FÁVERO (2004) produziu híbrido fértil entre *Arachis hypogaea* e o produto do cruzamento entre *A. duranensis* e *A. ipanensis*, o que indica que *A. ipanensis* pode ser um dos progenitores de amendoim.

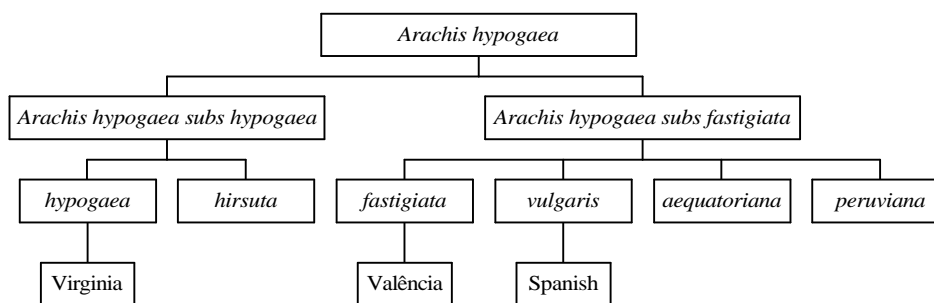
### 2.1.2 – A espécie *Arachis hypogaea* L – amendoim

Muito antes dos portugueses chegarem ao Brasil em 1500, o amendoim já era conhecido e utilizado pelos índios brasileiros. Em algumas tribos ele era chamado de mandubi ou mandobim e em outras de manobi. Mas tarde, provavelmente por causa do gosto semelhante do “*Manobi*” com as amêndoas já largamente conhecidas na Europa, os colonizadores portugueses foram adaptando o seu nome para “Amendoim” – derivado de amêndoa – surgindo o seu nome atual - amendoim (MARTIN, 1985).

*A. hypogaea* é classificado conforme a ausência ou a presença de flores no eixo principal em duas subespécies, *hypogaea* e *fastigiata* e, estas subespécies foram então divididas em seis variedades botânicas conforme o hábito de crescimento (*hypogaea*, *hirsuta*, *fastigiata*, *vulgaris*, *aequatoriana* e *peruviana*) (KRAPOVICKAS & GREGORY, 1994).

Outra diferença notável entre as duas subespécies é a cor da folhagem, verde escura na subespécie *hypogaea* e verde claro na subespécie *fastigiata*.

O amendoim, também é classificado, agronomicamente, como pertencente aos grupos Valência, Spanish ou Virginia, de acordo com os caracteres reprodutivos e vegetativos (Figura 1). As cultivares ou acessos de *A. hypogaea* pertencentes aos grupos Valência e Spanish possuem eixo central com flores, hábito ereto ou semi-ereto, poucos ramos secundários e as vezes terciários, ciclo curto, vagens com duas (Spanish), três ou quatro sementes (Valência). Morfologicamente acessos de amendoim do grupo Spanish podem ser enquadrados em *A. hypogaea* subsp *fastigiata* var. *vulgaris* e, aqueles do grupo Valência podem ser considerados pertencentes à *A. hypogaea* subsp *fastigiata* var. *fastigiata*. Acessos do grupo Virginia são pertencentes à *A. hypogaea* subsp. *hypogaea* var. *hypogaea*, já que mostram hábito rasteiro e ramificação abundante, ciclo longo, ausência de flores no eixo central e vagens com duas sementes (GODOY et al., 1999, apud FÁVERO, 2004). No entanto, a classificação agrônômica, não abrange todas as variedades de *A. hypogaea* e as cultivares podem ter em seu pedigree acessos pertencentes a distintas subespécies e variedades (FÁVERO, 2004).



**Figura 1:** Subespécies, variedades botânicas e tipos agrônômicos da espécie *Arachis hypogaea* L. (Adaptado de HERSELMAN, 2003).

Depois da domesticação o amendoim dispersou-se pela América do Sul o que levou a diferenciação de seis variedades botânicas que atualmente estão distribuídas em sete (I a VII) centros de diversidade (centros secundário e terciário). *A. hypogaea* subsp *hypogaea* var. *hypogaea* está presente em três centros, III – Rondônia e Noroeste do Mato Grosso (Brasil), IV - Os contrafortes orientais do Andes na Bolívia e V – Peru; *A. hypogaea* subsp *hypogaea* var. *hirsuta* está presente no centro V – Peru; *A. hypogaea* subsp *fastigiata* var. *fastigiata* está presente em cinco centros, I - Guarani, II – Goiás e Minas Gerais (Brasil), IV - Os contrafortes orientais do Andes na Bolívia, V – Peru, VI – Nordeste do Brasil; *A. hypogaea* subsp *fastigiata* var. *vulgaris* está presente nos centros, I- Guarani e IV - Nordeste do Brasil; *A. hypogaea* subsp *fastigiata* var. *peruviana* está presente no centro V – Peru e, por fim *A. hypogaea* subsp *fastigiata* var. *aequatoriana* está presente no centro VII Equador (FERGUSON et al., 2004a).

Apesar da dificuldade de classificação e catalogação, são conhecidas algumas características desses materiais, como por exemplo, para BR1, IAC Tatu-ST, IAC Caiapó e IAC Runner 886, conforma abaixo:

*Arachis hypogaea* subsp. *fastigiata* var. *fastigiata*

1. BR 1: Ciclo curto (89 dias), hábito ereto, maior tolerância aos estresses hídricos, com grãos de cor vermelha e vagens com 3 a 4 sementes.



2. IAC-TATU-ST: Porte ereto, ciclo de 90 a 110 dias, suscetível à mancha-castanha, mancha-preta, verrugose, mancha-barrenta e ferrugem, rendimento em sementes após descascamento de 70%, peso de 100 sementes de 40g, tamanho de sementes de 18 a 20 mm, cor vermelha da película das sementes, não possui dormência das sementes e rendimento em óleo de 41%

*Arachis hypogaea* subsp. *hypogaea* var. *hypogaea*

1. IAC-Caiapó: cultivar de ciclo longo (130-135 dias), de hábito rasteiro, produtividade de 2,5 a 3,0 t/ha, grãos de tamanho médio, de cor castanha e com dormência. Possui alto teor de óleo (44%) de alta qualidade com relação oléico/linoléico de 1,6 a 2,0. É moderadamente resistente a cercosporiose, ferrugem e verrugose e resistente à mancha barrenta. Melhor adaptada para semeadura e colheita mecanizada.
2. Runner IAC 886: cultivar de ciclo longo (125 a 130 dias), com grãos de cor castanha, alta produtividade e características de grão tipo exportação. Indicada para lavouras tecnificadas.

O amendoim é considerado como uma espécie autógama, com uma estrutura reprodutiva, que facilita a autofecundação, sendo composta por oito anteras e estigma na mesma altura ou ligeiramente acima das anteras, sendo que todas as estruturas são envoltas por uma quilha (SANTOS & GODOY, 1999 *apud* FÁVERO 2004).

### 2.1.3 – A cultura do amendoim

Dentre as espécies do gênero *Arachis* a maior parte das pesquisas genéticas são dirigidas à seção *Arachis* que contém o amendoim cultivado, que é amplamente cultivado em mais de 80 países da América, Ásia e África (MORETZSOHN et al., 2004, SINGH & SINGH, 1992). Considerada como apreciável fonte de matéria graxa, o amendoim é tido como uma das principais oleaginosas cultivadas em larga escala mundial, principalmente na África, na América, incluindo os Estados Unidos e em diversos países da América Latina, inclusive no Brasil e, na Indonésia (Ásia) (MARTIN, 1985; SANTOS et al., 1997). É a quarta maior cultura oleaginosa mundial, seguindo a soja (56,8%), o algodão (11,3%) e a canola (11,8%). Participa com 10% da produção mundial de óleo comestível. A China, os EUA e a Índia são os maiores produtores mundiais (HE et al., 2003). Já a China, os Estados Unidos e a Argentina são os maiores exportadores devido à qualidade dos grãos, enquanto, o Japão e a Europa os maiores importadores (RANGEL, 2005).

Cerca de oito milhões de toneladas anuais de grãos destinam-se ao consumo como alimento “*in natura*” ou industrializado, e 15 a 18 milhões são esmagados para fabricação de óleo comestível. Os Estados Unidos e a China, além de produtores, são grandes consumidores de amendoim como alimento. Juntos consomem cerca de três milhões de toneladas. Nos Estados Unidos, além de outras utilizações em confeitaria, cerca de 500 mil toneladas são destinadas especificamente à fabricação da pasta ou manteiga de amendoim (“peanut butter”), consumida diariamente em sanduíches, em substituição a manteigas ou margarinas convencionais (GODOY, 2005).

De acordo com estimativa da FAO (2004), a produção mundial de amendoim está sendo incrementada e tem alcançado 37 milhões de toneladas na casca e 5,8 milhões de toneladas de óleo.

No Brasil, o nível tecnológico e os sistemas agrícolas em que o amendoim é produzido apresentam variações, que podem ser observadas pela produção de cada região (Tabela 1). O estado de São Paulo é o maior produtor nacional onde, destacam-se os municípios de Ribeirão Preto e Marília, sendo que em Ribeirão Preto, o amendoim assume uma especial importância, em função de estar entre as culturas de ciclo curto, que é uma opção juntamente com a soja, na ocupação das áreas de reforma dos canaviais e, também, por existirem na região empresas

produtoras de sementes. Estima-se que 80% da área de reforma de canavial seja ocupada pela cultura do amendoim (RANGEL, 2005).

No estado de São Paulo as cultivares IAC Tatu Vermelho, IAC-Tatu-ST e IAC Caiapó têm uma participação no mercado de sementes fiscalizadas ou certificadas de 53%, 34% e 13% respectivamente, enquanto na região Nordeste, as cultivares mais plantadas são Tatu e BR1 (FÁVERO, 2004).

**Tabela 1:** Área plantada e a produção observada para a cultura do amendoim, no Brasil e nas regiões do país. Dados referentes ao ano de 2005 de acordo com levantamento do IBGE.

Região	Cultivo	Produção (Mg)	Área (ha)	Produtividade Mg.ha <sup>-1</sup>
Nordeste	1 <sup>a</sup> Safra	698	573	1.218
	2 <sup>a</sup> Safra	10.303	8.629	1.194
Sudeste	1 <sup>a</sup> Safra	219.351	84.721	2.589
	2 <sup>a</sup> Safra	26.500	14.700	1.803
Sul	1 <sup>a</sup> Safra	11.822	8.952	1.321
	2 <sup>a</sup> Safra	----	----	----
Centro-Oeste	1 <sup>a</sup> Safra	----	----	----
	2 <sup>a</sup> Safra	23.292	7.915	2.943
Brasil	1 <sup>a</sup> Safra	231.871	94.246	2.460
	2 <sup>a</sup> Safra	60.095	31.244	1.923

Fonte: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?z=t&o=22&i=P>.

A cultura caracteriza-se por ser de ciclo curto, resistente à seca e de adaptabilidade ampla, sendo cultivada por pequenos e médios produtores em vários estados da federação, especialmente na região Nordeste, tanto em sistema de produção de sequeiro, quanto de irrigado. O óleo, seu principal produto, é muito rico em ácidos graxos insaturados, média de 51,0% de oléico e de 28,0% de linoléico e, cada 100g é capaz de fornecer 580 Kcal. O amendoim é ainda uma rica fonte de proteínas (25% da massa dos grãos) e vitamina E (antioxidante), além de conter vitaminas do complexo B, ácido fólico e, minerais como cálcio, fósforo, potássio e zinco (BELTRÃO, 2004).

A recomendação de plantio do amendoineiro tem sido para solos de textura arenosa ou franco-arenosa, bem drenados e de fertilidade média, com pH entre 6,0 e 6,5, bem preparados e corrigidos, se for o caso, via calagem e fertilização (BELTRÃO, 2004).

A diversidade na forma de consumo faz com que esta cultura tenha uma expressividade econômica. Os grãos são consumidos “*in natura*” ou processados industrialmente, originando alguns derivados (óleo e farelo) ou ainda, sendo utilizados na fabricação de produtos alimentícios, ou no ramo das conservas, confeitarias, enlatados e, também, na indústria farmacêutica (GODOY, 1985; MARTIN, 1985).

## 2.2 - Fixação Biológica de Nitrogênio em Amendoim

Vários membros da Família *Leguminosae* são de considerável importância ecológica e econômica, devido, em parte, a habilidade destes em formar simbiose fixando nitrogênio com bactérias dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*. A introdução de bactérias específicas, promotoras de crescimento, nos solos pode suprir nutrientes para as espécies cultivadas, como o nitrogênio no caso de bactérias que realizam a fixação biológica, pode promover o crescimento de plantas pela produção de fitohormônios e controlar ou inibir atividade de patógenos de plantas (CASTRO et al., 1999).

A inoculação com bactérias do grupo rizóbio é uma prática de significativo benefício agrônomico em áreas onde a espécie vegetal é cultivada pela primeira vez (BROWCKELL et al., 1988; HUME & BLAIR, 1992) ou em solos onde o número de rizóbios é tão baixo para permitir uma eficiente nodulação da planta (SINGLETON et al., 1992). O número e as espécies de rizóbios no solo dependem das condições bióticas e abióticas deste ambiente e das espécies de leguminosas silvestres ou cultivadas (SIMON et al., 1996 apud CASTRO et al., 1999).

Segundo THIES et al. (1991) na cultura do amendoim (*Arachis hypogaea* L.) a prática de inoculação não é muito comum, uma vez que esta é considerada como sendo capaz de nodular com uma ampla faixa de rizóbios tropicais do grupo miscelânea caupi. Entretanto, a inoculação com estirpes selecionadas, é capaz de aumentar a efetividade da simbiose e aumentar o rendimento do amendoim (HUANG, 1987, 1988).

SANTOS (2001), avaliando a diversidade e a eficiência simbiótica de isolados de rizóbio nativos da região Nordeste do Brasil, na cultura do amendoim, concluiu que as associações amendoim e rizóbio são dependentes do genótipo da planta. Dos genótipos estudados, a cultivar IAC Tatu foi a que estabeleceu as associações mais eficientes, apresentando valores de massa seca de parte aérea semelhante ao tratamento com adição de N mineral, enquanto a cv. BR1 foi dependente do N aplicado ao solo, só sendo capaz de se beneficiar da FBN com um dos isolados estudados (A-105). A cultivar Sertão apresentou taxa de eficácia superior à 80% com os isolados S10 e S11 e, todos os isolados testados neste estudo foram eficazes com as cultivares IAC Tatu, Embrapa 142-L7 e Sertão, apresentando taxa de eficácia variando de 50 a 90%. Estes resultados sugerem ser possível otimizar o processo de FBN para a cultura de amendoim através da seleção de associações eficientes.

A competitividade também é uma característica importante no processo de inoculação já que se refere à habilidade de uma dada estirpe de dominar a nodulação na presença de outras estirpes. A alta competitividade da estirpe inoculada é tão importante quanto a efetividade simbiótica (TRIPLETT, 1990). É desejável que a seleção de um inoculante para amendoim contemple não somente estirpes que apresentem uma maior competitividade em relação às estirpes nativas, como também, que sejam capazes de manter níveis eficientes de FBN.

Numa compilação dos principais resultados obtidos nos mais importantes programas de melhoramento a nível mundial visando incremento da fixação biológica de nitrogênio em feijoeiro, HERRIDGE & DANSO (1995), concluíram que quando a nodulação é usada como principal critério de seleção, o progresso é limitado. Estes autores sugerem que o parâmetro mais adequado seja a fixação de nitrogênio, estimada através nitrogênio total da planta ou da semente, sob condições de baixa disponibilidade de nitrogênio.

Tendo em vista a demanda da planta por nitrogênio, o mercado brasileiro por amendoim e seus derivados, e a área plantada desta cultura no Brasil, programas de melhoramento que visem o incremento da FBN em amendoim podem trazer contribuições significativas em termos de geração de renda e riqueza no país, além de contribuir com o desenvolvimento econômico das regiões produtoras desta cultura.

### 2.2.1 - Diversidade de rizóbio que nodula amendoim

O amendoim é considerado como sendo uma espécie promíscua por ser nodulada por rizóbios capazes de nodular um grupo diverso de leguminosas (ALWI et al., 1989). Em um estudo amplo de caracterização polifásica de isolados de amendoim YANG et al. (2005) concluíram, baseados em dados de testes fenotípicos, RFLP 16S rDNA, RFLP-ITS 16S-23S, ERIC, REP, BOX-PCR e seqüenciamento do 16S, que o grupo de isolados de distintas regiões da China são bastante próximos da espécie *Bradyrhizobium japonicum* ou de *Bradyrhizobium* spp. Os autores concluíram que o grupo de isolados exibiu uma grande variabilidade embora pertencessem ao mesmo gênero. Todos os isolados de amendoim foram capazes de nodular *Arachis hypogaeae* e *Phaseolus vulgaris*, mas não mostraram capacidade de fixar nitrogênio com *P. vulgaris* e alguns dos isolados foram capazes de nodular e fixar nitrogênio quando em associação com *Glycine soja*.

Estudos conduzidos sobre a diversidade genética de isolados de amendoim por URTZ & ELKAN (1996) e VAN ROSSUM et al. (1995), concluíram que os isolados que nodulam eficientemente o amendoim são de crescimento lento, apresentando uma diversidade dentro do grupo com relação às características de resistência a antibióticos e são comumente classificados no gênero *Bradyrhizobium*.

CHEN et al. (2003) avaliaram por meio de marcadores AFLP, a diversidade de 125 isolados de amendoim, e observaram, por análise de agrupamento, que os isolados distribuíram-se em três grupos principais. Representantes destes grupos foram utilizados em estudo de compatibilidade com acessos vegetais de amendoim e foi observado que os isolados de um grupo apresentaram capacidade de nodulação restrita, enquanto que os isolados dos demais grupos são geralmente bons noduladores.

Embora isolados de rizóbio de crescimento rápido tenham sido relatado como nodulando amendoim (HUANG, 1990, apud CHEN et al., 2003, SANTOS, 2001), a maioria das estirpes eficientes de amendoim é de crescimento lento (CHEN et al., 2003).

Nos últimos anos, vários estudos têm indicado que isolados de amendoim são fenotípica e genotipicamente diversos (LI et al., 1999; ZHANG et al., 1999, YANG et al., 2005, SANTOS, 2001) abrindo a possibilidade de seleção de diferentes bactérias com inoculantes rizobianos para os diferentes acessos, dentro do germoplasma vegetal utilizados comercialmente. Dentro deste contexto, a disponibilidade de variabilidade no germoplasma vegetal se torna importante para a seleção de associações eficientes.

### 2.3 - Marcadores Moleculares

No início deste século foram fundamentadas algumas questões na recente ciência da Genética que proporcionaram, posteriormente, avanços significativos no melhoramento vegetal. Uma destas questões foi a descrição da primeira exceção a um dos postulados de Mendel, que inicialmente levantada por Bateson e Punnet em 1905, quando em estudo com ervilhas indicaram a possibilidade de existência de “reduplicação” (mais tarde rebatizada de “ligação”) entre genes controlando a cor da pétala e forma do grão de pólen. Tomas Hunt Morgan foi o primeiro a demonstrar claramente que havia uma exceção a um dos postulados de Mendel, isto é, que nem todos os genes têm segregação independente, pelo contrário, estão ligados em grupos pelo mesmo filamento de material em que residem, os cromossomos (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Fundamentada esta questão, surgiu a possibilidade de utilização de marcadores em programas de melhoramento, uma vez que a seleção de um determinado marcador de fácil identificação física que esteja ligado a uma pequena distância de um gene que controla um caráter de interesse agrônômico, resulta na seleção indireta deste gene. Por marcador

molecular entende-se todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Para os primeiros estudos de genética utilizando marcadores, foram utilizados os marcadores morfológicos (cor de pétala, nanismo, morfologia foliar, etc) de fácil identificação ou avaliação, para seleção de fenótipos complexos. A.H. Sturtevant desenvolveu o primeiro mapa genético, o mapa da mosca-de-fruta *Drosophila* sp (STURTEVANT, 1913, apud FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Com o advento das técnicas bioquímicas e moleculares, baseadas na análise de polimorfismo de proteínas e fragmentos de DNA, uma rápida proliferação da utilização de marcadores foi observada. A primeira classe de marcadores baseava-se no polimorfismo de proteínas, as isoenzimas, que compreendem um grupo de proteínas com mesma função catabólica, mas que são codificadas por genes de seqüências diferentes, o que resulta em estruturas protéicas diferentes, que por sua vez confere diferenças a essas proteínas com relação à mobilidade em géis de amido ou poliacrilamida. Esta classe de marcadores ainda é bastante utilizada, entretanto como o número de sistemas enzimáticos disponíveis para análise é pequeno, a técnica apresenta-se limitada a alguns estudos (DIAS et al., 2003).

Uma outra classe de marcadores amplamente utilizada são os marcadores RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism – polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição), onde o polimorfismo é evidenciado pela fragmentação do DNA total através do uso de enzimas de restrição e observação da hibridização dos fragmentos com seqüências homólogas de DNA, marcadas com radioatividade ou por compostos que desencadeiam uma reação de luminescência (GRODZICHER et al., 1974). Ao se submeter à clivagem com uma enzima de restrição, o DNA de indivíduos geneticamente distintos é cortado nos sítios de restrição gerando fragmentos de diferentes tamanhos, que são detectados por hibridização. A base genética de detecção desta classe de marcador são as mutações nos sítios de restrição ou inserções, deleções e rearranjos entre os sítios de restrição (LOPES et al., 2003). Esta classe de marcador é bastante informativa do ponto de vista do polimorfismo identificado, uma vez que é possível identificar vários alelos do mesmo loco (marcador co-dominante), entretanto, apresenta a limitação de ser bastante laboriosa, exigindo mais tempo para a identificação da informação genética. Além disso, é difícil de ser automatizada, uma vez que é executada através de várias etapas (DIAS et al., 2003).

Com o desenvolvimento da técnica da PCR (Polymerase Chain Reaction - reação de polimerase em cadeia), que utiliza uma enzima Taq polimerase termoestável (MULLIS & FALONA, 1987) possibilitando a amplificação de grande quantidade de um determinado fragmento de DNA, novas classes de marcadores foram descritas, tais como, os marcadores do tipo RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA – polimorfismo de DNA amplificado ao acaso) (WILLINANS et al., 1990) e, os marcadores do tipo AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism – polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados) (VOS et al., 1995).

Com o desenvolvimento da tecnologia da PCR, surgiu uma limitação para a implantação imediata em larga escala de análises genéticas para os diversos organismos de interesse, que foi a necessidade do conhecimento de seqüências de nucleotídeos no genoma dos organismos para o desenho e a síntese de iniciadores. Para sanar esta limitação, de forma independente e quase simultânea, três grupos de pesquisadores nos Estados Unidos propuseram a utilização de iniciadores curtos de seqüência arbitrária para a amplificação via PCR de segmentos de DNA. WILLIAMS et al. (1990) foram os primeiros a publicar a tecnologia com o nome mais comumente utilizado RAPD; WELSH & McCLELLAND (1990), utilizaram o nome mais adequado para a técnica AP-PCR (Arbitrarily Primed – Polymerase Chain Reaction – reação de polimerase em cadeia com iniciadores arbitrários), uma vez que a amplificação não ocorre de forma aleatória e, sim em sítios específicos do

DNA onde o iniciador encontra uma seqüência complementar, em orientação oposta nas duas fitas, dentro de uma distância amplificável pela polimerase. CAETANO-ANÓLES et al. (1991) propuseram a tecnologia para a identificação de diferenças genética entre organismos e utilizaram o nome DAF (DNA Amplification Fingerprint – impressão digital por amplificação de DNA). Esta classe de marcador foi mundialmente difundida durante os primeiros anos da década de 90 e desde então, está sendo utilizada para estudos moleculares, tanto em organismos eucariotos quanto em procariotos.

Os marcadores do tipo AFLP constituem-se numa conversão dos marcadores RFLP para marcadores dependentes da reação de PCR, uma vez que o DNA dos indivíduos analisados é clivado com enzimas de corte raro e de corte freqüente que formam extremidades coesivas, cujos fragmentos resultantes são ligados a adaptadores específicos (segmentos de DNA de fita dupla, de seqüência conhecida) e, iniciadores são desenhados para a reação de PCR baseando-se nas seqüências de base dos adaptadores e das seqüências de bases reconhecidas pelas enzimas de restrição (VOS et al., 1995). Uma vez que milhares de fragmentos são gerados na restrição do DNA total, cada iniciador reconhece um subconjunto dos fragmentos de restrição que são amplificados via PCR. Portanto, visando a obtenção de um grau mais alto de polimorfismo, podem ser utilizados na extremidade 3` nucleotídeos seletivos, um na pré-amplificação e três ou quatro na amplificação seletiva, dependendo da complexidade do genoma analisado (LOPES et al., 2003).

Mais recentemente, com o avanço nos projetos de seqüenciamento de genomas completos, principalmente o genoma humano e do arroz (*Oriza sativa*), uma nova classe de marcadores foi identificada. Os marcadores microsatélites (SSR – Simple Sequences Repeat – seqüências simples repetidas), que são constituídos de seqüências pequenas de uma a seis pares de bases que se repetem em tandem (uma trás da outra) em número variável, dispersadas por todo o genoma (WELL, 1990 apud HE et al., 2003). A análise de locos microsatélites é realizada por meio da reação de PCR utilizando iniciadores complementares às regiões que os flanqueiam.

Estes marcadores têm sido uma ferramenta molecular muito utilizada em estudos ecológicos e genéticos, em função do seu caráter codominante, que permite a detecção de todos os alelos de um dado loco. A amplificação utilizando iniciadores específicos que permitem a amplificação de locos individuais tem sido responsável pela observação de um elevado número de alelos o que possibilita a identificação de maior polimorfismo e proporciona informação genética de melhor qualidade, além de permitir uma praticidade na integração e comparação dos dados (HOSHINO et al., 2002; MORETZSOHN et al., 2004). Recentemente, alguns estudos revelaram polimorfismo em amendoim usando SSR (HOPKINS et al., 1999; FERGUSON et al., 2004b; KRISHNA et al., 2004; HE et al., 2003, 2005).

A principal limitação dos marcadores moleculares do tipo SSR reside no fato de serem dependentes de um extenso e caro trabalho de seqüenciamento para a identificação das seqüências que se repetem e das seqüências que flanqueiam os locos hipervariáveis. Para identificação das regiões que flanqueiam os locos microsatélites para o desenho dos iniciadores faz-se necessário a clonagem e seqüenciamento de elevadas quantidades de seqüências, que podem ser conseguidas através da construção de bibliotecas genômicas, seqüenciamento de fragmentos RAPD, etc. Os produtos da amplificação dos marcadores SSR devem ser necessariamente revelados em géis de poli(acrilamida), uma vez que as diferenças de comprimento entre os fragmentos são pequenas. Estas características tornam os marcadores baseados em locos SSR caros, trabalhosos (DIAS et al., 2003). Conferindo uma limitação para a implantação desta classe de marcador em alguns laboratórios que não disponham de recursos para implantar este tipo de eletroforese, bem como em análise de rotina em programas de melhoramento, onde uma grande quantidade de amostras é analisada.

### 2.3.1 – Marcadores moleculares do tipo RAPD

WILLIAMS et al. (1990) mostraram que os marcadores moleculares do tipo RAPD podem ser utilizados como marcadores genéticos, uma vez que estes apresentam segregação mendeliana. Dado isto, estes marcadores passaram a ser utilizados para diferentes estudos de genética de população, mapeamento, identificação de fragmentos ligados a genes de interesse e análises de similaridade e distância genética, bem como para a produção de marcas que possibilitaram a correta identificação de acessos de germoplasma vegetal e/ou de microrganismos.

Dados de marcadores RAPD são analisados usando o algoritmo UPGMA (Umweighted Pair Group Method with Avareges - método da média aritmética não ponderada) como método de agrupamento de uma matriz de similaridade ou distância genética. A similaridade ou dissimilaridade e a distância genética são calculadas através de uma matriz de presença e ausência para comparações entre os indivíduos. Os índices de similaridade comumente utilizados são Simple Match (coincidência simples) [ $S = (a+d)/(a+b+c+d)$ ], Jaccard [ $J = a/(a+b+c)$ ], e Dice [ $D = 2a/(2a+b+c)$ ], onde a é o número de fragmentos presentes nos dois indivíduos analisados, b é o número de fragmentos presentes em apenas um deles, c é o número de fragmentos presentes apenas no outro e d é o número de alelos nulos ou duplas ausências. BUSSELL et al. (2005), MEYER et al. (2004), indicaram que os índices Jaccard e Dice são os mais apropriados para este marcador uma vez que os alelos nulos podem não corresponder a locos homólogos.

Para o cálculo de distância genética o coeficiente comumente utilizado é o de Nei & Li [ $DG = 1 - 2N_{ij}/(N_i + N_j)$ ], onde,  $N_{ij}$  é o número de bandas compartilhados pelos genótipos I e J,  $N_i$  é o número de bandas presentes apenas no genótipo I e  $N_j$  é o número de bandas presentes apenas no genótipo J.

Com o objetivo de caracterizar um grupo de marcadores moleculares capazes de identificar 15 genótipos de eucalipto, ROCHA et al. (2002), utilizaram marcadores SSR e RAPD. A utilização de 29 iniciadores RAPD permitiu a amplificação de 210 fragmentos, sendo que 134 foram polimórficos. A partir destes dados os genótipos foram individualmente identificados e o dendrograma produzido mostrou uma clara separação entre os grupos formados. Neste ensaio dos 20 pares de iniciadores SSR utilizados 16 revelaram polimorfismo detectável em gel de agarose e, estes produziram, em média, cinco formas alelicas, variando de três a sete alelos por par de iniciador. Neste estudo os dendrogramas produzidos pelas duas classes de marcadores, RAPD e SSR, foram ligeiramente diferentes, mas uma correlação significativa foi observada entre eles.

Marcadores do tipo RAPD foram utilizados por JUNGHANS et al. (2003), para estudar o modo de herança e mapear um gene de efeito principal que confere resistência à ferrugem em eucalipto, dos 980 iniciadores utilizados foi possível identificar seis fragmentos ligados ao gene de resistência (mesmo grupo de ligação), sendo que o marcador denominado de AT9/970, para o qual nenhuma recombinação foi observada, apresentou-se fortemente ligado ao gene Ppr1 (*Puccini psidi* resistance gene 1).

Marcadores RAPD foram utilizados por Martin et al. (1997) para estudar a identificação de espécies dentro de germoplasma de *Oriza*. Neste estudo 60 acessos identificados como sendo das espécies *O. meridionalis*, *O. glumaepatula*, *O. nivara* ou *O. rufipogon* e três híbridos de *O. nivara* foram analisados com nove iniciadores e produziram 81 bandas polimórficas. Cinco dos sete acessos de *O. meridionalis* apresentaram-se mais relacionados a *O. rufipogon*, enquanto a maioria dos acessos de *O. glumaepatula* formaram um grupo bem definido. Entretanto como quatro acessos desta espécie ficaram separados dos demais, os autores sugeriram que estes foram mal identificados no momento do depósito no

banco. A diferenciação entre os acessos de *O. nivara* e *O. rufipogon* não ficou muito clara, uma vez que estes formaram um grupo complexo com acessos suspeitos de pertencerem às espécies *O. meridionalis* e *O. glumaepatula*. Neste grupo é possível identificar três subdivisões, um grupo composto principalmente por acessos de *O. nivara*, outro composto por acessos da espécie *O. rufipogon* e, um último com um acesso de *O. glumaepatula* e quatro como *O. nivara*.

Utilizando apenas cinco iniciadores RAPD 30 acessos de arroz foram individualmente identificados, sendo que estes iniciadores produziram 32 bandas polimórficas e sete monomórficas. Neste ensaio os agrupamentos gerados pelos dados moleculares e os descritores morfológicos utilizados não foram os mesmos e os dados de RAPD não agruparam os acessos em função das duas subespécies (*indica e japonica*) (ARAÚJO et al., 2003).

Cinco iniciadores RAPD foram selecionados de um grupo de 42 para análise de relacionamento genético entre 70 acessos de 11 espécies do gênero *Passiflora*. O agrupamento formado permitiu uma perfeita distinção entre os acessos mostrando que os marcadores RAPD são úteis para distinção de genótipos relacionados e os resultados confirmaram a hipótese de que *Passiflora edulis* f *flavicarpa* surgiu a partir de uma mutação de *Passiflora edulis*, e não como resultado de um cruzamento entre *Passiflora edulis* e qualquer uma das outras espécies estudadas (CROCHEMORE et al., 2003).

Acessos de caupi foram analisados por meio de marcadores do tipo RAPD e 40% dos iniciadores testados foram polimórficos gerando 62,5% de fragmentos informativos. Todos os acessos foram individualmente identificados e houve uma tendência de agrupamento em função da origem dos acessos, uma vez que a maior parte dos acessos utilizados no Brasil ficou em um grupo. Entretanto, os acessos da Nigéria foram distribuídos pelos quatro grupos formados, evidenciando uma maior variabilidade. Através do agrupamento gerado observou-se a formação de quatro grupos distintos, sendo observada variação de similaridade entre 81 e 98 % entre os 45 acessos analisados. O alto nível de similaridade encontrado foi atribuído pelos autores ao processo de domesticação que levou ao estreitamento genético (XAVIER et al., 2005).

*Arachis pintoii* e *Arachis repens* são duas espécies do gênero *Arachis* que são facilmente distinguidas, tomando por base a forma e tamanho das folhas, quando se trabalha com acessos tipos. Entretanto a crescente coleta de novos acessos tem dificultado esta classificação com a identificação de formas intermediárias. Neste sentido, dez iniciadores randômicos foram utilizados por GIMENES et al. (2000), para avaliar o nível de variação genética entre acessos distintos de *Arachis pintoii* e *Arachis repens*. Neste estudo, os autores concluíram que apesar do percentual de fragmentos polimórficos ter sido elevado (93,3%), o número de fragmentos compartilhados pelos acessos das duas espécies foi bastante alto, enquanto e o número de genótipos únicos identificados foi baixo. Cinco fragmentos foram específicos para *A. repens* e 23 para *A. pintoii* e, o dendrograma gerado pelos dados de RAPD não é capaz de corroborar a proposta de separação das duas espécies, pois, a maioria dos acessos de *A. repens* agrupou com um específico grupo de *A. pintoii*. Uma vez que os marcadores RAPD são usualmente eficientes em detectar polimorfismo, os resultados sugerem que as duas espécies devem ser muito próximas.

Todos estes estudos anteriores revelam a aplicabilidade dos marcadores moleculares do tipo RAPD em estudos básicos e aplicados de genética. Esta tecnologia por ser baseada em PCR, utilizar iniciadores pequenos e possibilitar a revelação dos dados em géis simples de agarose, apresenta uma grande vantagem com relação às outras classes de marcadores, uma vez que os marcadores AFLP e RFLP exigem trabalhos mais intensivos no laboratório, e os marcadores do tipo SSR demandam uma maior disponibilidade de recursos e desenvolvimento inicial dos iniciadores. Além disso, a aplicabilidade dos marcadores RAPD depende da espécie vegetal que está sendo estudada. A crítica mais importante cunhada aos



marcadores tipo RAPD, deve-se a considerada baixa reprodutibilidade dos dados entre laboratórios diferentes. Entretanto, uma etapa de otimização, adequação às condições laboratoriais e um conhecimento prévio das ferramentas moleculares são requisitos necessários para iniciar um estudo baseado nesta classe de marcadores, o que proporciona a obtenção de dados confiáveis.

### **3 - MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 - Obtenção dos Acessos de Amendoim**

Inicialmente foram selecionados 29 acessos de amendoim para o início do ensaio RAPD (Tabela 2). Estes acessos foram provenientes de dois centros da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Centro Nacional de Pesquisa em Algodão (Campina Grande - Paraíba) e Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen - Brasília-DF) e do Instituto Agronômico de Campinas (IAC Campinas – SP).

Para os acessos provenientes do Cenargen, as folhas foram coletadas nesta unidade e transportadas para a Agrobiologia onde se procedeu a extração imediata do DNA total. Os acessos provenientes da Embrapa Algodão e do IAC foram cultivados em casa de vegetação na Embrapa Agrobiologia para coleta de tecido vegetal. Para estes as sementes foram desinfestadas em etanol (70%) por 30 s e lavadas em água estéril por 10 vezes. A semeadura foi realizada diretamente nos vasos. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação, em vasos de Leonard, supridas com a solução nutritiva de Norris (NORRIS & T'MANNETJE, 1964), e com 25mg de N por semana na forma de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (ZILLI, 2001). Folhas foram coletadas 15 dias após plantio para a extração imediata do DNA total.

#### **3.2 - Extração de DNA Total**

Para a extração do DNA total foi utilizado o protocolo descrito em FERREIRA & GRATTAPAGLIA (1998) com algumas modificações. Testou duas quantidades de tecido vegetal para a extração (um e três discos de tecido foliar com diâmetro de 1,0 cm) (XAVIER et al., 2005). Para a obtenção destes discos, a folha foi colocada sobre um microtubo aberto e a tampa foi pressionada sobre a folha. Após este teste, utilizou-se para a extração um disco de tecido vegetal de folha jovem e fresca. O disco de tecido foliar foi macerado até o estado de pó fino em nitrogênio líquido, ressuspendido em tampão de extração (CTAB 2,0%, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 1% mercaptoetanol) e incubado a 65 °C por 60 min. Após esta incubação adicionou-se 600µL de clorofórmio - álcool isoamílico (24:1) e as amostras foram centrifugadas a 16100g (Centrífuga marca Eppendorf modelo 5415D) por 10 min. O sobrenadante foi transferido para um microtubo novo e, o DNA foi precipitado, adicionando-se 2/3 do volume de isopropanol gelado e incubando-se as amostras a 4 °C por 60 min. Após este período as amostras foram centrifugadas a 16100g (8 min), o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com etanol 70% (v/v) duas vezes por um período de 10 min e uma vez com etanol absoluto por 5 min. Posteriormente, o precipitado foi seco em centrifuga a vácuo e ressuspendido em 25µL de TE (Tris-HCl 10mM pH8, EDTA 1mM). As amostras foram congeladas para posterior diluição e realização do ensaio RAPD.

**Tabela 2:** Identificação dos acessos de amendoim utilizados para a extração de DNA total e posterior ensaio por RAPD.

	Acessos	Origem	Procedência	Variedade Botânica	Tipo botânico	Hábito de crescimento
1	76Am	África-Senegal	Embrapa Algodão	vulgaris	Spanish	Ereto
2	192AM	África	Embrapa Algodão	vulgaris	Spanish	Ereto
3	198AM	África	Embrapa Algodão	vulgaris	Spanish	Ereto
4	214AM	África	Embrapa Algodão	vulgaris	Spanish	Ereto
5	208AM	África	Embrapa Algodão	vulgaris	Spanish	Ereto
6	193AM	África	Embrapa Algodão	vulgaris	Spanish	Ereto
7	206AM	África	Embrapa Algodão	vulgaris	Spanish	Ereto
8	218AM	África	Embrapa Algodão	vulgaris	Spanish	Ereto
9	202AM	África	Embrapa Algodão	vulgaris	Spanish	Ereto
10	174AM	Argentina	Embrapa Algodão	hypogaea	Virgínia	Rasteiro
11	Sapucaia Bege	Brasil	Embrapa Algodão	fastigiata	Valência	Ereto
12	Sapucaia Vermelha	Brasil	Embrapa Algodão	fastigiata	Valência	Ereto
13	Serrinha	Brasil	Embrapa Algodão	fastigiata	Valência	Ereto
14	158AM	Brasil	Embrapa Algodão	fastigiata	Valência	Ereto
15	178AM	Brasil	Embrapa Algodão	fastigiata	Valência	Ereto
16	185AM	Brasil	Embrapa Algodão	fastigiata	Valência	Ereto
17	184AM	Brasil	Embrapa Algodão	fastigiata	Valência	Ereto
18	180AM	Brasil	Embrapa Algodão	vulgaris	Spanish	Ereto
19	IAC 886 Runner	Brasil	IAC	hypogaea	Virgínia	Rasteiro
20	IAC Tatu ST	Brasil	IAC	fastigiata	Valência	Ereto
21	IAC 8112	Brasil	IAC	vulgaris	Spanish	Ereto
22	IAC Caiapó	Brasil	IAC	hypogaea	Virgínia	Rasteiro
23	V12549	Brasil	Cenargen	nd*	**nc	**nc
24	V12548	Brasil	Cenargen	hypogaea	**nc	**nc
25	CV Tatuí	Brasil	Cenargen	vulgaris	Spanish	Ereto
26	CV Tatu	Brasil	Cenargen	fastigiata	Valência	Ereto
27	Mf 1538	Equador	Cenargen	hirsuta	**nc	**nc
28	Mf 1560	Equador	Cenargen	peruviana	**nc	**nc
29	Md 1678	Equador	Cenargen	aequatoriana	**nc	**nc

\*nd - variedade botânica não determinada

\*\*nc - acessos não cultivados

O produto de extração do DNA foi submetido à eletroforese por 40 min em gel de agarose (0,8% p/v) a voltagem constante (10V.cm<sup>-1</sup>). O gel foi corado com brometo de etídio e visualizado sob luz UV. Foi realizada a leitura da densidade ótica em espectrofotômetro, a 260nm, para calcular a concentração de DNA das amostras.

A concentração de DNA da amostra foi estimada pela equação abaixo:

$$[\text{DNA}] = L * 50 * f,$$

Onde:

$$[\text{DNA}] \text{ em } \eta\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$$

L = leitura observada à 260nm

f = fator de diluição utilizado (500)

### 3.3 - Otimização das Condições de Amplificação

A otimização da técnica de RAPD e padronização do ensaio foi iniciada com reações onde foi utilizado o DNA total extraído de um acesso (76 AM) e um iniciador opB11, selecionado na literatura (DWIVEDI et al., 2001). Para esta otimização foram testadas oito diferentes combinações entre duas concentrações de DNA molde, duas concentrações iniciadores e duas concentrações de cloreto de magnésio (Tabela 3), a fim de se obter uma condição capaz de produzir um padrão de bandas interpretável e reprodutível. Utilizou-se 200 μM de cada dNTP, 0,5μg.μl<sup>-1</sup> de BSA (soro de albumina bovina), 1X tampão (200mM Tris-HCl pH 8,0; 500mM KCl), 1U *Taq* polimerase (Invitrogen Life Technologies), a um volume total da reação de 25μL.

**Tabela 3:** Reagentes e concentrações testadas para a padronização do ensaio RAPD.

Misturas	DNA	Iniciador	MgCl <sub>2</sub>
I	1,0 ηg.μl <sup>-1</sup>	0,3μM	1,5 mM
II			2,0 mM
III		0,5μM	1,5 mM
IV			2,0 mM
V	1,5 ηg.μl <sup>-1</sup>	0,3μM	1,5 mM
VI			2,0 mM
VII		0,5μM	1,5 mM
VIII			2,0 mM

Para a reação de otimização/padronização foi utilizado o perfil térmico de: 94 °C por 1 minuto para desnaturação inicial, seguido de 34 ciclos de 92 °C por 1 minuto, o gradiente de 45°C +/- 10 °C na etapa de anelamento por 1 minuto e 72 °C por 2 min, com uma etapa final de extensão por 5 min a 72 °C. Com a utilização do gradiente foi possível testar 12 diferentes temperaturas (Tabela 4), onde se objetivou determinar a temperatura ideal para a etapa de anelamento. Utilizou-se o termociclador modelo Mastercycler Gradient marca Eppendorf.

**Tabela 4:** Temperaturas utilizadas no gradiente (45°C +/- 10 °C), para o passo de anelamento.

Condição	T (°C)	Condição	T (°C)
1	34,9	7	45,7
2	35,2	8	48,4
3	36,3	9	51
4	38	10	53,2
5	40,3	11	54,8
6	42,9	12	55,7

Os fragmentos gerados foram submetidos à separação eletroforética em gel de agarose 2% (p/v), com voltagem constante de 7V.cm<sup>-1</sup> de gel por um período de 105 min. O gel foi corado com brometo de etídio e fotografado sob luz UV. As imagens foram digitalizadas para posterior análise.

### 3.4 - Seleção dos Iniciadores Randômicos

A partir das análises das imagens dos géis obtidos com os produtos da reação de otimização da PCR-RAPD descrita acima, foi selecionada uma mistura com concentrações definidas para todos os reagentes. Definida a condição da reação de PCR, procedeu-se a seleção dos iniciadores decâmeros para a análise de RAPD com os 29 acessos de amendoim.

Para esta seleção realizou-se a reação de PCR-RAPD com 40 iniciadores (Kits A e B da Operon - Tabela 5) onde se utilizou a condição de amplificação anteriormente definida e o gradiente de 45 °C +/- 10 °C na etapa de anelamento, para cada iniciador. Utilizou-se o termociclador modelo Mastercycler Gradient marca Eppendorf.

Procedeu-se a separação eletroforética dos fragmentos amplificados como descrito acima na etapa de otimização. As imagens dos géis foram digitalizadas para posterior análise e seleção dos iniciadores e da temperatura de anelamento.

**Tabela 5:** Nome e seqüência dos 40 iniciadores randômicos dos kits A e B da Operon testados na etapa de seleção.

Nome	Seqüência	Nome	Seqüência
opA1	CAGGCCCTTC	opB1	GTTTCGCTCC
opA2	TGCCGAGCTG	opB2	TGATCCCTGG
opA3	AGTCAGCCAC	opB3	CATCCCCCTG
opA4	AATCGGGCTG	opB4	GGACTGGAGT
opA5	AGGGGTCTTG	opB5	TGCGCCCTTC
opA6	GGTCCCTGAC	opB6	TGCTCTGCCC
opA7	GAAACGGGTG	opB7	GGTGACGCAG
opA8	GTGACGTAGG	opB8	GTCCACACGG
opA9	GGGTAACGCC	opB9	TGGGGGACTC
opA10	GTGATCGCAG	opB10	CTGCTGGGAC
opA11	CAATCGCCGT	opB11	GTAGACCCGT
opA12	TCGGCGATAG	opB12	CCTTGACGCA
opA13	CAGCACCCAC	opB13	TTCCCCCGCT
opA14	TCTGTGCTGG	opB14	TCCGCTCTGG
opA15	TTCCGAACCC	opB15	GGAGGGTGTT
opA16	AGCCAGCGAA	opB16	TTTGCCCGGA
opA17	GACCGCTTGT	opB17	AGGGAACGAG
opA18	AGGTGACCGT	opB18	CCACAGCAGT
opA19	CAAACGTCGG	opB19	ACCCCCGAAG
opA20	GTTGCGATCC	opB20	GGACCCTTAC

### 3.5 – Ensaio RAPD

Com os iniciadores selecionados, definida a condição de amplificação e a temperatura de anelamento realizou-se o ensaio RAPD com os 29 acessos.

Além destes iniciadores selecionados a partir dos Kits A e B da Operon, o ensaio RAPD foi complementado com 15 iniciadores randômicos (Tabela 6), propostos por HE & PRAKASH (1997), como capazes de revelar polimorfismo em amendoim. A reação de PCR-RAPD para estes iniciadores foi realizada utilizando 1ng.µL<sup>-1</sup> de DNA, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,3 µM de iniciador, 1U de *Taq* polimerase, Tampão 1X (200mM Tris-HCl pH 8,0; 500mM KCl), 0,5 µg.µl<sup>-1</sup> de BSA, 200 µM de cada dNTP, para um volume final de 25µl. O perfil térmico foi utilizado foi 94 °C por 5 min, 35 ciclos de 5 s a 94 °C, 20 s a 35 ou 45 °C dependendo do iniciador (Tabela 6), 30 s a 72 °C, e uma extensão final de 5 min a 72 °C.

**Tabela 6:** Seqüência e a temperatura de anelamento (°C) de 15 iniciadores propostos por HE & PRAKASH (1997).

Seqüência	T(°C)	Seqüência	T(°C)
UBC23 5'-CCC GCC TTCC-3'	35	UBC3555'-GTA TGG GGCT-3'	45
UBC25 5'-ACA GGG CTCA-3'	35	UBC3915'-GCG AAC CTCG-3'	35
UBC336 5'- GCC ACG GAGA-3'	35	UBC7765'- CTT CCC TCCT-3'	35
UBC302 5'- CGG CCC ACGT-3'	35	UBC400 5'-GCC CTG ATAT-3'	35
UBC346 5'-TAG GCG AACG-3'	45	UBC7885'-CCT TCC CTCT-3'	35
UBC23 5'-CCCGCCTTCC-3'	35	UBC348 5'-CACGGCTGCG-3'	45
UBC306 5'-GTCCTCGTAG-3'	35	Hairpin29 5'-GCGAAGCCTC-3'	45
UBC332 5'-AACGCGTAGA-3'	35		

### 3.6 – Experimentos em Condição de Casa de Vegetação

Para análise da variabilidade na capacidade de nodulação e fixação biológica de nitrogênio entre os acessos de amendoim, foram selecionados a partir do agrupamento realizado com os marcadores RAPD, nove acessos contrastantes, sendo: (1 - 202AM), (2 - 76AM), (3 - IAC Tatu-ST), (4 - IAC 886 Runner), (5 - IAC Caiapó), (6 - Sapucaia Bege), (7 - 198AM), (8 - Sapucaia Vermelha) e (9 - CV Tatuí).

Neste sentido foi realizado um experimento em condições de casa de vegetação e de não inoculação, no Município de Seropédica-RJ (Latitude 22°44'38" Sul e Longitude 43°42'27" Oeste) com os acessos selecionados e dois solos, sendo que os nove acessos foram casualizados dentro de cada solo. Foi utilizado no experimento o delineamento de blocos ao acaso com quatro repetições.

As amostras de terra foram coletadas no SIPA (Sistema Integrado de Produção Agroecológica) classificadas como sendo um Argissolo e um Planossolo. A coleta das amostras de terra foi realizada apenas no horizonte superficial do solo.

Estas amostras foram destorroadas, peneiradas e homogeneizadas. Amostras foram submetidas à análise de fertilidade (Embrapa, 1997) cujos resultados estão apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7:** Resultado da análise química das amostras de terra utilizadas no experimento.

Amostras	pH	Complexo sortivo					
		Al <sup>+3</sup>	Ca <sup>+2</sup> Mg <sup>+2</sup>	Ca <sup>+2</sup>	Mg <sup>+2</sup>	K <sup>+1</sup>	P
		cmol.c.kg <sup>-1</sup>				mg.kg <sup>-1</sup>	
Argissolo	6,4	0,0	4,4	3,8	0,6	215,5	85,5
Planossolo	5,1	0,4	0,9	0,8	0,1	36,2	13,0

Após a análise química das amostras de terra foram realizadas, a correção e adubação quando necessárias, preparando vasos de 2,5kg para posterior plantio. A amostra do Argissolo por apresentar boas características com relação à fertilidade, não recebeu nenhuma suplementação química, entretanto o Planossolo, em função do pH e dos baixos teores de nutrientes recebeu uma correção com a aplicação de 0,5g.kg<sup>-1</sup> de solo de carbonato de

magnésio e  $0,875\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  de solo de carbonato de cálcio, com o objetivo de elevar os valores de  $\text{Ca}^{+2} + \text{Mg}^{+2}$  para  $2\text{ cmol}_c\cdot\text{kg}^{-1}$  e manter uma relação entre estes elementos de 3:1. Esta aplicação corresponde a uma calagem com  $1100\text{kg}$  de calcário por ha, sendo que o solo foi incubado por um período de 41 dias, durante este período o solo foi regado com água a cada três dias para a manutenção da umidade. Transcorrido esse período de incubação os vasos com Planossolo receberam a aplicação de  $500\text{ mg}$  de superfosfato simples ( $80\text{ kg}$  de  $\text{P}_2\text{O}_5\cdot\text{ha}^{-1}$ ),  $200\text{ mg}$  de sulfato de potássio ( $80\text{ kg}$  de  $\text{K}_2\text{O}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) e  $60\text{ mg}$  de FTEBR12 ( $48\text{ kg}$  de  $\text{FTEBR12}\cdot\text{ha}^{-1}$ ). Tanto os carbonatos quanto os fertilizantes foram aplicados e misturados no solo em cada vaso.

As sementes dos nove acessos foram desinfestadas com álcool 70% (p/v) por 30 s e lavadas em água destilada por 10 vezes. As sementes foram germinadas em copos plásticos contendo substrato plantmax autoclavado ( $120^\circ\text{C}$ ,  $1,0\text{atm}$ ,  $20\text{ min}$ ) e 17 dias após o plantio as plantas foram transplantadas para os vasos contendo solo.

As plantas de amendoim foram colhidas com 29 e 30 dias após o transplante, sendo os blocos 1 e 2 coletados com 29 e os blocos 3 e 4 com 30 dias.

A parte aérea de cada planta foi colocada em sacos de papel e incubada em estufa de circulação forçada a  $65^\circ\text{C}$ , até massa constante, em seguida as massas foram determinadas em balança de precisão com três casas decimais. Foram determinados os teores de nitrogênio total na parte aérea das plantas pelo método Kjeldhal, em analisador automático Kjeltac 1030, de acordo com a metodologia descrita por Malavolta et al. (1989). Os nódulos foram retirados, armazenados em potes com sílica gel, posteriormente contados e pesados. O sistema radicular das plantas, após a retirada dos nódulos, foi incubado em estufa a  $65^\circ\text{C}$ , até massa constante, em seguida as massas foram determinadas em balança de precisão com três casas decimais.

No momento da colheita foi realizada a análise de redução de acetileno utilizando o sistema radicular completo das plantas, para isso, foi coletado o sistema radicular e incubado por um período de 15 min em mamadeiras de  $250\text{ mL}$  contendo 10% deste volume do gás acetileno. Para manutenção de valores de pressão iguais dentro e fora da mamadeira foi realizada a retirada de igual volume de ar antes da aplicação do gás acetileno. O gás acetileno foi produzido no momento da incubação, incubando pedras de carbureto com água em frascos tipo kitasato. Após o período de incubação foram realizadas coletas de amostras para análises em cromatógrafo gasoso com detecção por ionização de chama.

### 3.7 – Análise Estatística dos Dados

Para análise dos dados do ensaio RAPD, os perfis de bandas obtidos foram convertidos em uma matriz binária de presença e ausência de bandas (sendo 0 para ausência e 1 para presença). A partir desta matriz foram construídos dendrogramas utilizando o algoritmo UPGMA e os índices de SM (Simple Matching) e DICE (Dice, 1945). Estes dendrogramas foram construídos utilizando o programa NTSys2.1. Foi também performizada uma análise de componentes principais com a matriz de dados binários, utilizando o programa Canoco For Windows 4.5.

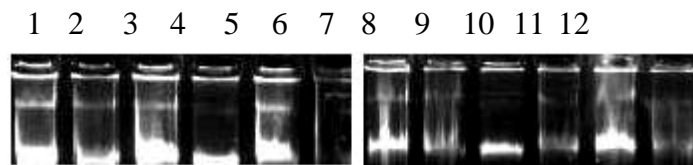
Com relação aos dados do experimento de casa de vegetação foi realizada a análise de variância e testes de média (Teste F, Scott-Knott e Tukey com nível de significância de 5%,  $\alpha$  igual a 0,05). Para estas análises utilizou-se o programa SISVAR (Universidade Federal de Lavras).



## 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 - Extração do DNA

Como descrito em Material e Métodos a extração foi padronizada com relação à quantidade de tecido foliar utilizada. Para isso utilizou-se um e três discos de tecido foliar jovem com o diâmetro do microtubo de 1,5mL, quantidade de tecido vegetal correspondendo a cerca de 10 e 30mg. Foi observado que este fator não interferiu no resultado da extração, uma vez que se observou uma banda bastante intensa no gel tanto para as amostras com um quanto para as amostras com três discos. Dessa forma optou-se por proceder as extrações dos demais acessos utilizando apenas um disco foliar (Figura 2).



**Figura 2:** Gel de agarose (0,8% p/v) mostrando o produto da extração com um (canaletas de 1 a 6) e com três discos de tecido vegetal (canaletas de 7 a 12). Sendo que as canaletas 1, 2, 7 e 8 correspondem ao produto da extração com o acesso 193AM, canaletas 3, 4, 9 e 10 correspondem ao produto da extração com o acesso 184AM e, canaletas 5, 6, 11 e 12 correspondem ao produto da extração com o acesso 218AM.

Os produtos obtidos da extração do DNA dos acessos de amendoim apresentaram-se de boa qualidade e quantidade, uma vez que, foi observada uma banda intensa nos géis e estes não apresentavam arraste excessivo como resultado da degradação do DNA extraído (Tabela 8), livres de polissacarídeos e proteínas, dessa forma prontos para as reações de PCR.

De acordo com os dados de quantificação e qualidade do produto de extração, foi observado uma variação entre 200 a 950 $\eta$ g. $\mu$ L<sup>-1</sup> de DNA. Essa quantidade de DNA extraída está dentro da faixa esperada quando se utiliza este protocolo (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

A extração de DNA pelo método CTAB foi eficiente, uma vez que o produto de extração apresentou-se de boa qualidade e em quantidade suficiente para o ensaio RAPD. Como a técnica de RAPD é uma variação da técnica de PCR, a etapa de extração de DNA se torna um passo crucial, pois excesso de impurezas na amostra pode limitar a extensão da enzima *Taq* polimerase. Dessa forma o produto da extração deve-se apresentar de boa qualidade e uniforme entre as amostras (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

**Tabela 8:** Acessos utilizados para a extração de DNA, a concentração obtida para cada produto de extração e a relação entre os valores de absorbância obtidos com leituras a 260 e 280nm para inferência sobre a qualidade do produto.

Acessos	[DNA] $\eta\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$	Acessos	[DNA] $\eta\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$
76Am	325	Sapucaia Vermelha	325
Sapucaia Bege	550	202AM	525
174AM	475	180AM	350
192AM	325	Runner	775
198AM	400	IAC Tatu ST	525
214AM	400	IAC 8112	950
178AM	250	IAC Caiapó	900
208AM	475	V12549	400
185AM	400	Md 1678	650
Serrinha	375	V12548	300
184AM	250	CV Tatuí	625
193AM	375	Mf 1538	325
158AM	550	Mf 1560	500
206AM	375	CV Tatu	200
218AM	425		

#### 4.2 - Otimização das Condições de Amplificação

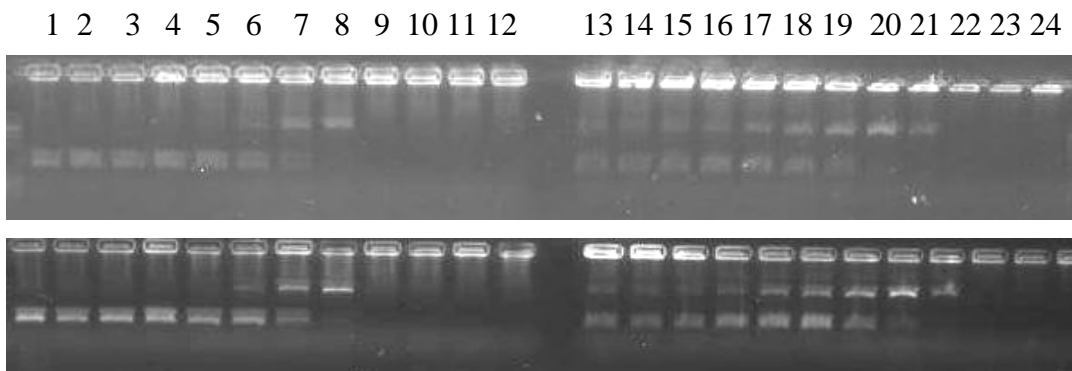
O ensaio RAPD deve ser iniciado por uma otimização das condições de amplificação, pois sua reprodutibilidade é fortemente influenciada pelas condições de amplificação. Uma vez que neste tipo de ensaio é possível a amplificação de fragmentos com pareamento imperfeito entre o iniciador e o DNA molde, é necessário a padronização das concentrações dos reagentes e o perfil térmico utilizado no termociclador (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Nas Figuras 3 e 4, são apresentados os géis da reação de otimização, mostrando o resultado obtido com as diferentes concentrações de reagentes testados, sendo que cada conjunto de 12 amostras corresponde às temperaturas testadas no gradiente (Tabela 4).

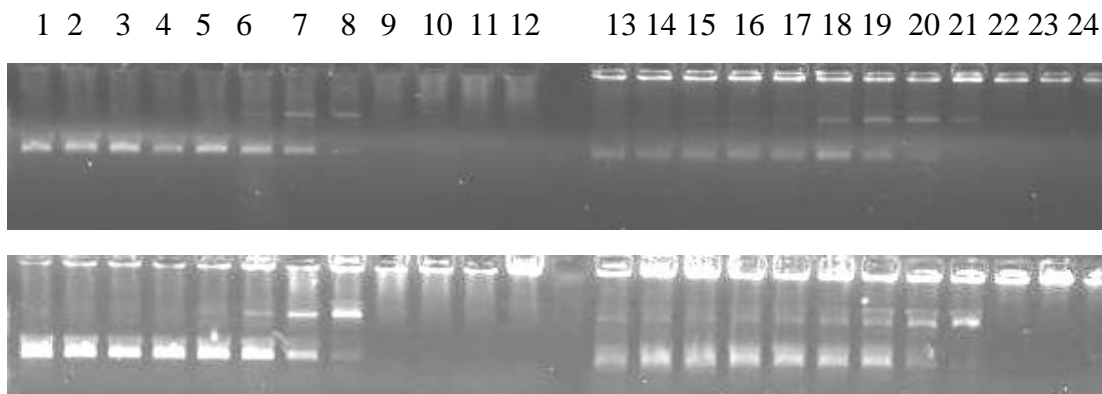
Pelo resultado observado nos géis das reações de otimização foi possível concluir que o produto obtido da extração apresentou-se de boa qualidade, uma vez que foram possíveis a amplificação e a detecção clara dos fragmentos no gel. No entanto, os géis obtidos da reação de otimização (Figura 3, Figura 4) permitiram observar o efeito da temperatura de anelamento, uma vez que nas temperaturas superiores a 51 °C não foi observada amplificação. A amplificação com o iniciador opB11 produziu duas bandas, sendo que uma banda de aproximadamente 600pb foi observada em todas as reações positivas, para todas as oito

combinações de concentrações dos três reagentes testados. Uma segunda banda, de aproximadamente 1200pb, foi observada principalmente nas temperaturas de 45,7 °C; 48,4 °C e 51°C.

Temperaturas mais baixas na etapa de anelamento podem acarretar amplificação inespecífica, limitando as análises e interpretações dos dados obtidos por RAPD. As concentrações de DNA, de iniciador e de  $MgCl_2$  influenciaram os resultados, uma vez que variações na intensidade das bandas foram observadas.



**Figura 3:** Perfis de bandas obtidos com quatro misturas diferentes das oito testadas, em cada gel podem ser observadas duas misturas. A concentração de DNA utilizada foi de  $1\eta g.\mu L^{-1}$  para ambos os géis, a concentração de iniciador utilizada foi de  $1,0\eta g.\mu L^{-1}$  no gel da parte superior da figura e  $1,5\eta g.\mu L^{-1}$  no gel da parte inferior da figura. A concentração de  $MgCl_2$  variou de  $1,5mM$  (1 a 12) para  $2,0mM$  (13 a 24) em cada gel.



**Figura 4:** Perfis de bandas obtidos com quatro misturas diferentes das oito testadas, em cada gel podem ser observadas duas misturas. A concentração de DNA utilizada foi de  $1,5\eta g.\mu L^{-1}$  para ambos os géis, a concentração de iniciador utilizada foi de  $1,0\eta g.\mu L^{-1}$  no gel da parte superior da figura e  $1,5\eta g.\mu L^{-1}$  no gel da parte inferior da figura. A concentração de  $MgCl_2$  variou de  $1,5mM$  (1 a 12) para  $2,0mM$  (13 a 24) em cada gel.

Este resultado pode ser atribuído à qualidade do produto de extração, que por não conter concentrações elevadas de impurezas não influenciou a reação uma vez que amplificações foram conseguidas utilizando a baixa concentração de  $1\eta g.\mu L^{-1}$ , além disso as concentrações do iniciador e do  $Mg^{+2}$  testadas são concentrações baixas, assim não houve interação entre altas concentrações destes, o que poderia levar a uma amplificação de fragmentos de menor especificidade, uma vez que altas concentrações de magnésio aumentam

a atividade da enzima *Taq* polimerase. Estas concentrações foram escolhidas a fim de facilitar a interpretação do padrão de bandas, onde se buscou a amplificação de fragmentos mais intensos no gel.

Desta forma selecionou-se a mistura III (200  $\mu\text{M}$  de cada dNTP,  $0,5\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  de BSA, 1X tampão 200mM Tris-HCl pH 8,0; 500mM KCl, 1U *Taq* polimerase,  $1,0\eta\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  de DNA molde,  $0,5\mu\text{M}$  de iniciador e 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$ ) (Tabela 3) para a realização da seleção dos iniciadores dos Kits A e B da Operon. A decisão por esta mistura foi definida evitando se combinar a mais elevada concentração de  $\text{MgCl}_2$  com a mais alta concentração de iniciador, a fim de se obter perfis mais nítidos, mesmo que com menos bandas, entretanto sendo estas presumidamente mais reprodutíveis.

Realizou-se a reação de PCR-RAPD com os 40 iniciadores, utilizando o gradiente de temperatura citado na metodologia e as concentrações definidas pela reação de otimização, com o DNA molde do acesso 76AM. Dos 40 iniciadores testados 21 produziram algum fragmento e foram considerados para a análise de RAPD com os 29 acessos.

Embora alguns destes iniciadores tenham amplificado até a temperatura mais elevada testada no gradiente, a temperatura selecionada para o ensaio RAPD foi a de  $38\text{ }^\circ\text{C}$ , pois foi a temperatura mais elevada em que houve amplificação, para todos estes 21 iniciadores. Esta etapa de seleção de iniciadores e temperatura de anelamento proporcionou um diferencial para este trabalho, visto que a temperatura de anelamento comumente utilizada em ensaios RAPD é de  $35\text{ }^\circ\text{C}$ .

Os iniciadores opB12, opB7; opB6, opA2 e opA3 amplificaram até a temperatura de  $55\text{ }^\circ\text{C}$ , mostrando que estes podem ser utilizados em ensaios RAPD com as temperaturas mais elevadas.

### 4.3 – Ensaio RAPD

A Tabela 9 sumariza os resultados obtidos com o ensaio RAPD, mostrando todos os iniciadores testados (Operon e UBC) e o número de fragmentos que cada um produziu, bem como o polimorfismo encontrado.

Dos 21 iniciadores, dos Kits A e B da Operon testados, sete revelaram polimorfismo entre os acessos de *Arachis hypogaea*, sendo que estes amplificaram um total de 83 fragmentos, sendo 15 polimórficos. Entre os 15 iniciadores da UBC (University of British Columbia) testados, apenas 10 amplificaram. Dentre estes, cinco foram capazes de revelar polimorfismo. Observou-se a amplificação de um total de 62 fragmentos, sendo 20 polimórficos. Interessante que cinco destes iniciadores, embora utilizados por HE & PRAKASH (1997), não produziram qualquer amplificação entre os acessos testados, mesmo utilizando as mesmas condições para amplificação.

Quando se analisaram todos os 31 iniciadores, observa-se um total de 145 fragmentos amplificados, destes 35 foram polimórficos (24,0%). Foi observada uma média de 4,67 fragmentos por iniciador e 1,13 fragmentos polimórficos por iniciador. Os fragmentos variaram entre aproximadamente 2300pb com o iniciador UBC302 e 300pb com o iniciador UBC346. Esta variação no comprimento está dentro da faixa esperada para marcadores RAPD, que podem teoricamente amplificar fragmentos de até 4000pb (FERREIRA & GRATAPAGLIA, 1998). BUSSELL et al. (2005), em revisão sobre marcadores moleculares (RAPD, AFLP e ISSR) citam que os fragmentos RAPD podem variar entre 200pb e 2000pb.

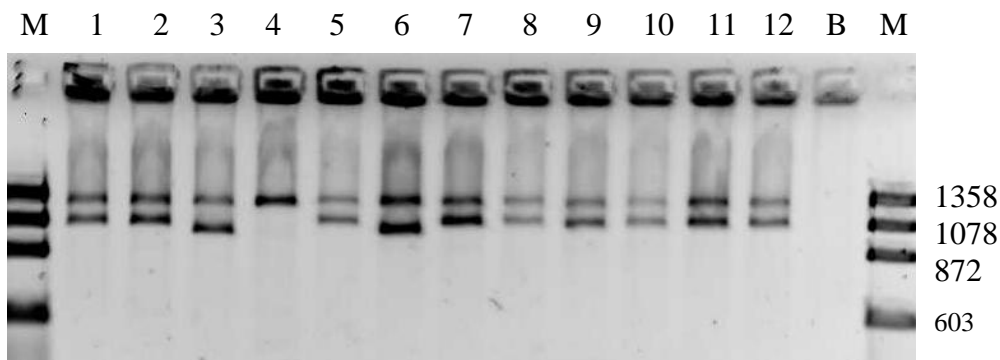
Embora, para cada iniciador que revelou polimorfismo, o número de fragmentos polimórficos em relação ao número de fragmentos amplificados, tenha sido elevado, o número de acessos em que se observou polimorfismo para estes mesmos iniciadores foi reduzido, variando entre 1 e 11, para um total de 29, para os iniciadores UBC25 e opA4, respectivamente (Tabela 9).

Observou-se que a maior parte (24 iniciadores) dos iniciadores testados não revelou qualquer polimorfismo entre os acessos estudados, e apenas 12 iniciadores revelaram polimorfismo (Tabela 9).

**Tabela 9:** Resultados obtidos com os diferentes iniciadores utilizados no ensaio RAPD com os 29 acessos de amendoim.

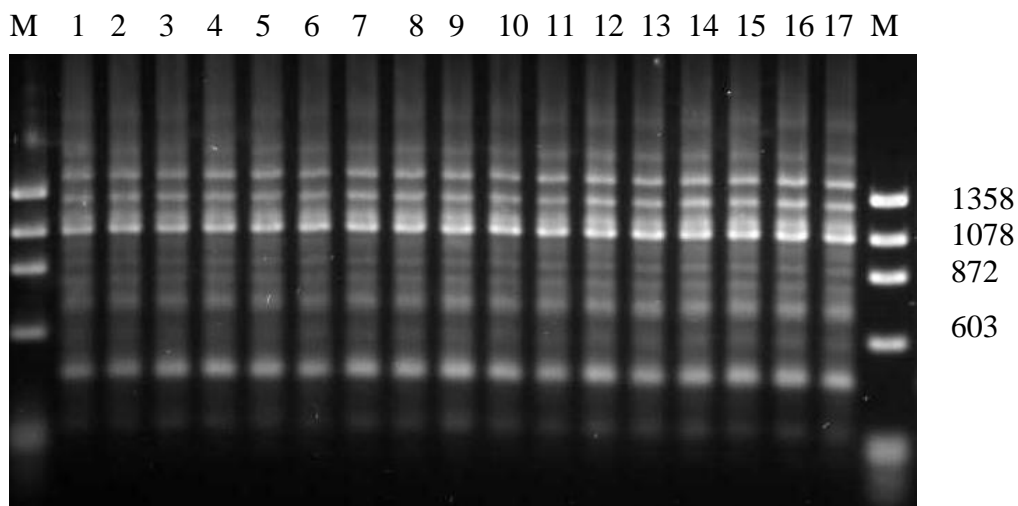
Iniciador	Nº de fragmentos amplificados	Nº de fragmentos polimórficos	Número de perfis	Nº de acessos em que foi observado polimorfismo *
OPA2	3	0	---	---
OPA3	3	0	---	---
OPA4	9	4	3	11
OPA5	3	2	3	3
OPA8	4	1	2	8
OPA13	7	0	---	---
OPA14	5	3	3	6
OPA15	3	0	---	---
OPA16	2	1	2	3
OPA17	1	0	---	---
OPA18	3	0	---	---
OPB10	3	3	2	2
OPB5	2	0	---	---
OPB6	3	0	---	---
OPB7	3	0	---	---
OPB11	1	0	---	---
OPB12	7	0	---	---
OPB13	2	0	---	---
OPB15	7	0	---	---
OPB17	3	0	---	---
OPB18	9	1	2	3
UBC23	7	5	2	3
UBC25	12	4	2	1
UBC302	10	7	3	3
UBC336	6	0	---	---
UBC346	5	2	3	2
UBC355	10	0	---	---
UBC391	5	0	---	---
UBC400	2	0	---	---
UBC776	1	0	---	---
UBC788	4	2	3	10
Total	145	35	---	---

O número de perfis de bandas identificado ficou entre dois e três para os iniciadores em que se observou polimorfismo. Para os iniciadores opa5 foram observados três perfis de bandas entre todos os acessos (Figura 5).



**Figura 5:** Perfis de bandas obtidos com o iniciador opA5 para os acessos (1) Tatu-St, (2) IAC 8112, (3) IAC Caiapó, (4) V12549, (5) Md1678, (6) V12548, (7) CV Tatuí, (8) Mf 1538, (9) IAC Runner, (10) Sapucaia Bege, (11)Mf 1560 e (12) CV Tatu. B e M correspondem ao branco e ao marcador X174, respectivamente.

Na Figura 6, é apresentado o perfil de bandas obtido com o iniciador opB15. Para este iniciador não foi observado qualquer polimorfismo, entre os 29 acessos estudados. Resultados semelhantes, utilizando marcadores tipo RAPD para acessos de amendoim foram observados por SUBRAMANIAN et al. (2000) evidenciando o baixo polimorfismo na espécie.



**Figura 6:** Perfil de bandas obtido com o iniciador opB15 para os acessos (1) 76AM, (2) Sapucaia vermelha, (3) 174AM, (4) 192AM, (5)198AM, (6) 214AM, (7) 178AM, (8) 208AM, (9) 185AM, (10) Serrinha, (11) 184AM, (12)193AM, (13) 158AM, (14) 206AM, (15) 218AM, (16) 180AM e (17) 202AM. M corresponde ao marcador X174.

Nas Figuras 7 e 8 são apresentados os dendrogramas obtidos com os coeficientes de similaridade utilizados (SM e DICE). A análise com os dois coeficientes resultou em dendrogramas com topologias similares com relação aos grupos formados. Pode-se observar a formação de dois grupos principais, sendo o primeiro (I) composto por apenas três acessos (IAC Tatu-ST, 214AM e 198AM) e um segundo (II) grupo mais abundante e que pode ser

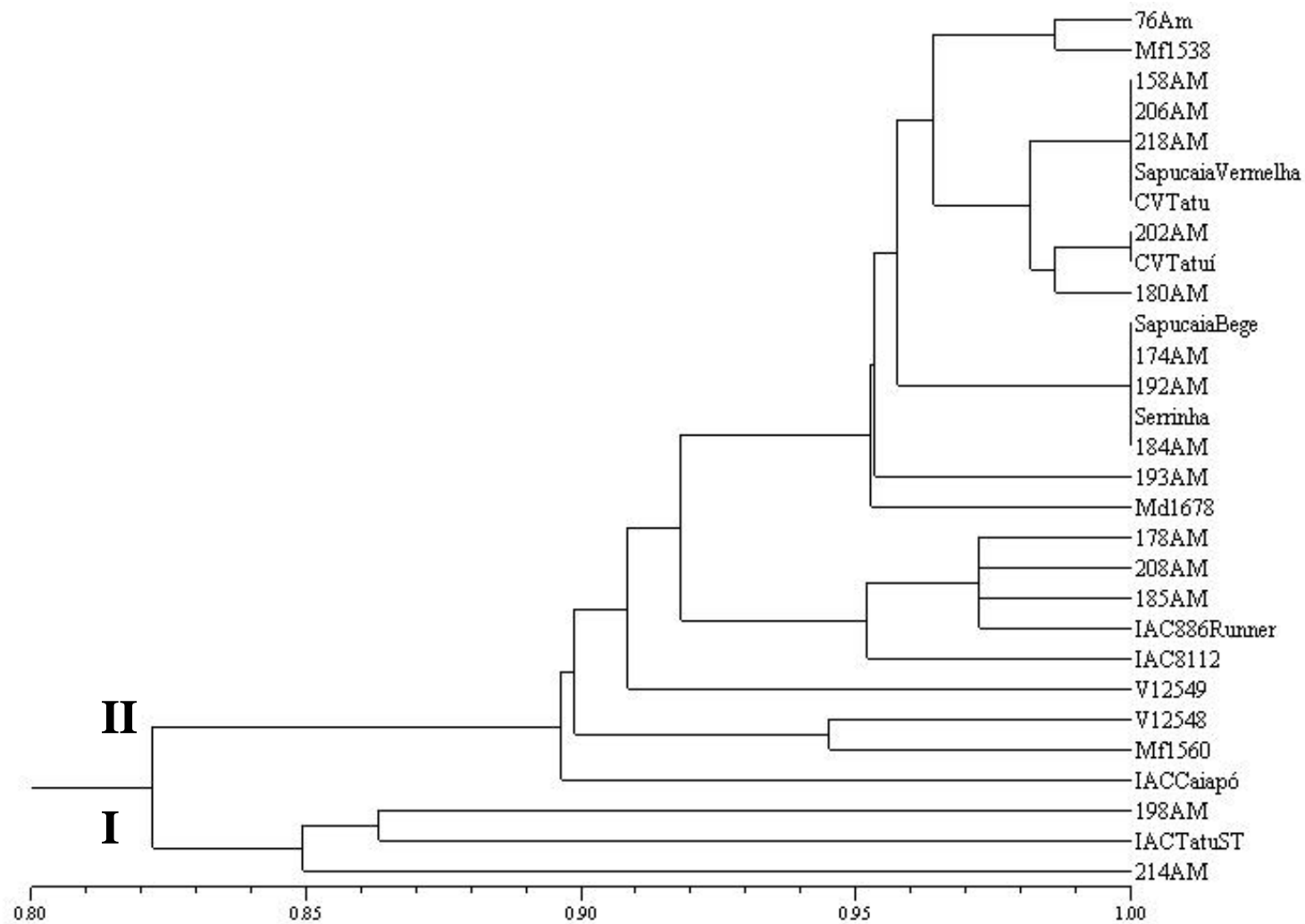
subdividido em vários subgrupos dependendo do nível de similaridade utilizado. Foi observado o mesmo agrupamento quando se analisam os acessos com os 31 iniciadores randômicos utilizados no estudo.

O nível de similaridade observado entre os dois grupos principais foi de 82% com o coeficiente SM e 89% com o coeficiente DICE. MEYER et al. (2004) analisaram oito diferentes índices para cálculos de similaridade quando se utilizam dados de marcadores moleculares dominantes em milho e, concluíram que os índices Jaccard, Sorensen-Dice, Anderberg, Ochiai (índices que não levam a dupla ausência em consideração na fórmula – classe 1) e Simple Matching, Rogers & Tanimoto, Ochai II (índices que consideram a dupla ausência na fórmula- classe 2) produzem dendrogramas similares dentro de cada classe e bastante próximos entre as classes, com uma pequena variação nos valores de similaridades entre os acessos, como observado no presente trabalho. Segundo estes autores apenas o índice de similaridade de Russel & Rao, não é adequado para agrupamento com dados de marcadores dominantes, pois este produz um dendrograma dessemelhante dos demais. Resultados similares foram encontrados por DUARTE et al. (1999) quando trabalhando com dados de feijão. Os autores atribuíram estas diferenças na topologia dos dendrogramas o fato do índice de Russel & Rao considerar a co-ocorrência negativa apenas no denominador da fórmula.

Foi observado que entre os 26 acessos distribuídos no segundo grupo, 12 acessos em três subgrupos distintos apresentaram um nível de similaridade de 100%, isso mostra que estes acessos não puderam ser individualmente identificados com os iniciadores utilizados.

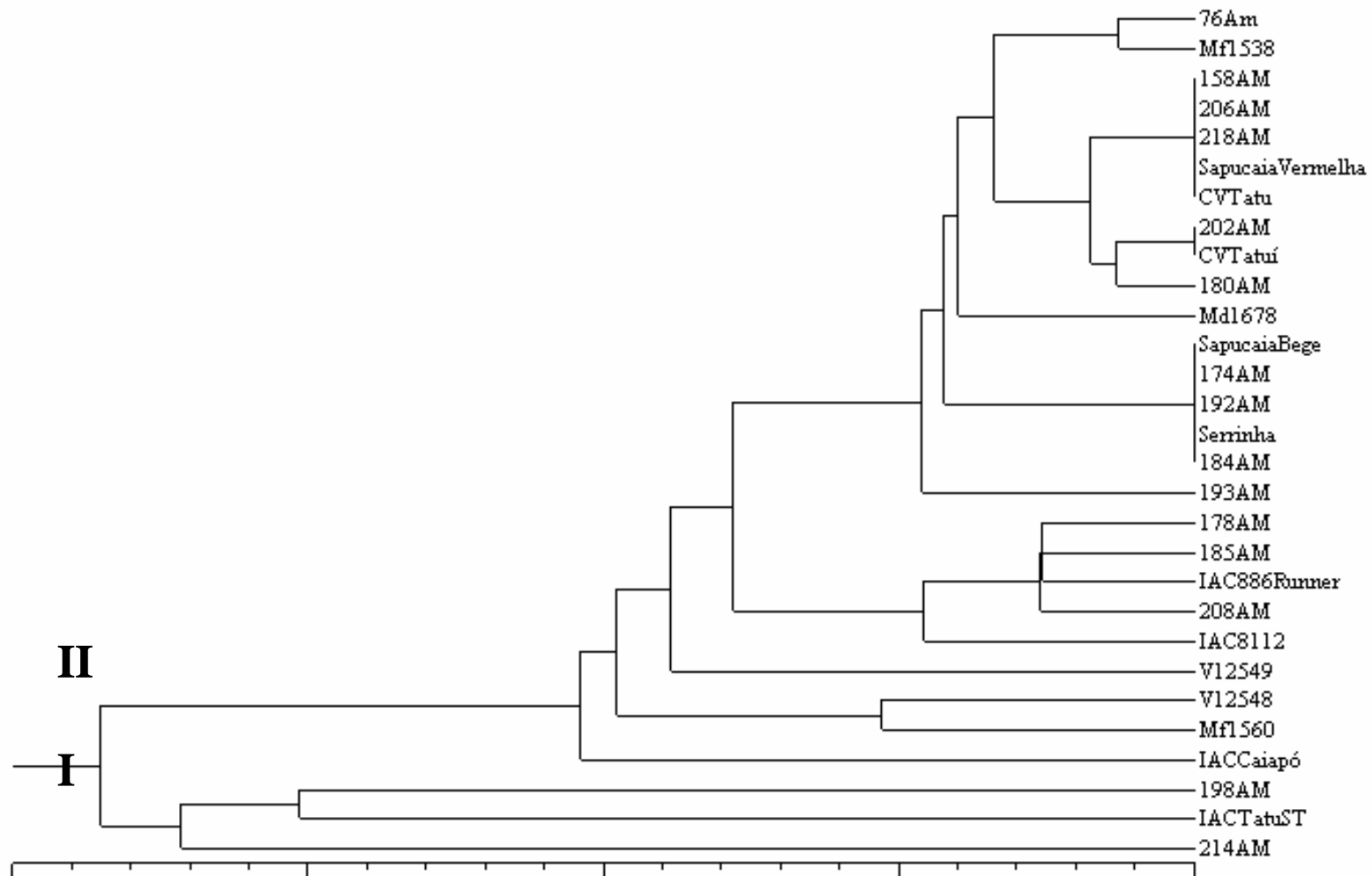
Embora o número de acessos e de iniciadores utilizados tenha sido relativamente elevado, o polimorfismo observado ainda foi muito baixo para a espécie em estudo. Os dados apresentados estão de acordo com os apresentados na literatura que mostram um polimorfismo muito baixo para a espécie *Arachis hypogaea* (HALWARD et al., 1991; SUBRAMANIAN et al., 2000).

Dos 145 fragmentos amplificados 35 foram polimórficos, entretanto as variações nos perfis de bandas, quando observadas, restringiam-se a poucos acessos, revelando um padrão monomórfico para a maioria dos acessos analisados.



**Figura 7:** Dendrograma de similaridade construído com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de similaridade Simple Match (SM), a partir da matriz binária de dados RAPD com os 12 iniciadores randômicos em que se observou polimorfismo. Mostrando os grupos formados entre os 29 acessos de amendoim.





**Figura 8:** Dendrograma de similaridade construído com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de similaridade DICE, a partir da matriz binária de dados RAPD com os 12 iniciadores randômicos em que se observou polimorfismo. Mostrando os grupos formados entre os 29 acessos de amendoim.

Com o objetivo de avaliar a utilidade de marcadores AFLPs no estabelecimento de relações taxonômicas entre espécies do gênero *Arachis* e avaliar o polimorfismo entre cultivares de *A. hypogaea*, utilizando três pares de iniciadores AFLP GIMENES et al. (2002), encontraram um total de 408 fragmentos, partindo de 9 acessos de amendoim e 19 espécies selvagens. Um total de 94 fragmentos foi encontrado nos acessos de *A. hypogaea* sendo que apenas seis (6,4%) foram polimórficos. Os autores consideraram o polimorfismo muito baixo, quando comparado ao que se encontra em outras culturas.

HE & PRAKASH (1997) em um amplo estudo de seleção de iniciadores para estudo de variabilidade genética em amendoim, utilizando iniciadores DAF (ou RAPD), SSR e AFLP, encontraram que apenas 17 dos 559 iniciadores DAF e SSR testados revelaram polimorfismo em seis acessos representantes de três subespécies. Estes autores testaram 64 combinações de iniciadores AFLP (8 correspondendo ao adaptador de *EcoRI* e 8 correspondendo ao adaptador de *MseI*) e observaram polimorfismo em 28 pares, sendo que uma média de 3,96 bandas por par de iniciador foi polimórfica. Neste mesmo estudo, HE & PRAKASH (1997), identificaram 45 iniciadores que revelaram polimorfismo em amendoim (17 DAF e 28 AFLP), entretanto a percentagem de marcadores polimórficos em relação ao número total de iniciadores testados foi baixo (3% para DAF e 43% para AFLP). Para estes autores isso suporta a noção de que *Arachis hypogaea* pode ter surgido recentemente como resultado de um evento simples de poliploidização (HALWARD et al., 1991). Estes autores ressaltam ainda que, em uma espécie evolucionariamente recente é provável que substituições simples de nucleotídeos expliquem melhor a variação em amendoim do que diferenças robustas em poucos locos.

Avaliando a variabilidade entre 21 acessos de amendoim comercialmente cultivados na África, HERSELMAN (2003) conseguiu identificar individualmente os acessos utilizando AFLP, entretanto o nível de variabilidade encontrado foi muito baixo, pois apenas 90 marcadores foram polimórficos entre 3241 fragmentos amplificados.

Em outro estudo, a partir de 70 acessos de amendoim com diferentes características como tolerância a seca, eficiência no uso da água, período de maturação, dormência de sementes, massa de 100 sementes, conteúdo de óleo entre outras, foram analisados com 48 iniciadores randômicos por SUBRAMANIAN et al. (2000). Apenas setes destes iniciadores revelaram polimorfismo, onde 27 bandas de um total de 408 foram polimórficas. Mesmo entre os iniciadores que revelaram polimorfismo a variação nos perfis de bandas entre os acessos foi reduzida, uma vez que os dois iniciadores que mais diferenciaram os acessos mostraram variação em apenas 12 ou 13 acessos.

Mais tarde, RAINA et al. (2001) analisaram por meio de marcadores RAPD e ISSR (Inter Simple Sequence Repeat – polimorfismo da seqüência entre duas seqüências simples repetitivas) a variabilidade genética entre 13 acessos de amendoim representando cinco das seis variedades botânicas da espécie. Neste trabalho, a partir de 53 iniciadores randômicos selecionou-se 21 e a partir de 100 iniciadores SSR, selecionou-se 29 para o ensaio. Com o marcador RAPD, 220 produtos de amplificação foram observados, sendo que 94 foram polimórficas (42,7%) e para o ensaio ISSR 124 bandas foram produzidas e 67 (54,4%) mostraram-se polimórficas. Neste trabalho foi possível a identificação de cada acesso individualmente, e o agrupamento formado entre os acessos foi coerente com a classificação ao nível morfológico de variedades botânicas.

Como a maioria dos trabalhos utilizando marcadores moleculares em amendoim tem revelado pouco polimorfismo, RAINA et al. (2001) sugerem que o sucesso deste trabalho em identificar polimorfismo vis-à-vis no genoma de amendoim, ocorreu em função de três fatores, sendo: (1) - utilização de acessos de cinco variedades botânicas, uma vez que os trabalhos prévios utilizaram acessos representantes de até três variedades, o que pode ter resultado na análise de acessos com uma estreita base genética; (2) – o número de iniciadores

utilizados, maior que os estudos prévios e (3) – o uso de iniciadores altamente informativos que resultaram de um pré-estudo de seleção.

SINGH et al. (1998) revisaram os trabalhos realizados até aquele momento, tentando identificar marcadores polimórficos em amendoim e sugeriram seis razões pelas quais estes trabalhos falharam em identificar o polimorfismo, visto que é difícil de admitir que não haja polimorfismo nesta espécie, uma vez que se observa substancial variação para várias características morfológicas, que possibilitam dividi-la em duas subespécies e seis variedades botânicas. Segundo estes autores o número de acessos utilizados; a base genética do material analisado; o número de enzimas e sondas utilizadas; tipos de clones (sondas) usados e a habilidade destes em revelar polimorfismo; número de iniciadores utilizados para amplificação e identificação de seqüências polimórficas e por fim a metodologia e parâmetros utilizados para a análise da variação entre e dentro espécies, podem ser citados. Estes autores citam ainda a possibilidade dos diferentes marcadores utilizados em amendoim não detectarem polimorfismo devido a complexidade do genoma da espécie, que pode ser entendida como o pequeno comprimento dos cromossomos, locos multialélicos, a presença de muitas seqüências repetitivas e redundantes e o confinamento das seqüências funcionais em regiões pequenas.

Além disso, o baixo nível de polimorfismo ou variação no amendoim tem sido atribuído também a outras causas, sendo: (1) - barreiras ao fluxo gênico de espécies diplóides selvagens para o amendoim como consequência do evento da poliploidização, (2) - recente poliploidização de um ou poucos indivíduos de cada espécie diplóide parental, combinado com autopolinização e (3) - uso de poucas linhas e de pouco germoplasma exótico em programas de melhoramento resultando em estreita base genética (MORETZSOHN et al., 2004).

Apesar da existência de substancial diversidade entre genótipos de amendoim para várias características morfológicas, fisiológicas e agrônômicas, pouca variação tem sido detectada quando se usa proteínas ou marcadores baseados em DNA (HALWARD et al., 1991; HALWARD et al., 1992 apud HE et al., 2003; KOCHER et al., 1991; PAIK-RO et al., 1992 e STALKER et al., 1994,).

Devido ao baixo polimorfismo ao nível de DNA não se tem conseguido progresso no mapeamento genético, seleção assistida por marcadores moleculares e estudos evolucionários na cultura do amendoim quando comparado com outras culturas (HE et al., 2003). Este problema tem limitado a melhoria de cultivares de amendoim por técnicas moleculares, uma vez que os programas de melhoramento são dependentes da identificação de genótipos contrastantes, que possam viabilizar a transferência de características desejáveis.

No presente trabalho foi utilizado um elevado número de iniciadores (55 para seleção de 31), um número considerável de acessos que representaram todas as seis variedades botânicas. Embora o polimorfismo observado ainda tenha sido baixo, os resultados mostram a utilidade da técnica de RAPD em revelar polimorfismo em amendoim com observado por SUBRAMANIAN et al. (2000), RAINA et al. (2001) e DWIVEDI et al. (2001).

Pelos dendrogramas das Figuras 7 e 8 pode-se observar a formação de dois grupos principais entre os acessos analisados, sendo o primeiro (I) composto por três acessos (IAC Tatu-ST, 214AM e 198AM) e o segundo (II) grupo que se subdividi em dois subgrupos (A e B) com 26 acessos (A-76AM, Mf1538, 158AM, 206AM, 218AM, Sapucaia Vermelha, CV Tatu, 202AM, CV Tatuí, 180AM, Md1678; Sapucaia Bege, 174AM, 192AM, Serrinha, 184AM; 193AM; 178AM, 185AM, IAC 886 Runner, 208AM, IAC8112; B- V12549; V12548, Mf1560 e IAC Caiapó).

Não foi observado agrupamento em função da origem dos acessos. Os acessos do Brasil e da África distribuíram-se tanto no grupo I quanto no grupo II. Não foi observado agrupamento dos acessos também em função das subespécies.

No grupo I do dendrograma estão 11% dos acessos da variedade botânica *fastigiata* e 17% dos acessos da variedade *vulgaris*. No subgrupo A do grupo II está 50% dos acessos da variedade botânica *hypogaea*, 100% dos acessos da variedade *hirsuta*, ambas da subespécie *hypogaea*; 100% dos acessos da variedade *aequatoriana*, 89% dos acessos da variedade *fastigiata*, 83% dos acessos da variedade *vulgaris*, enquanto que no subgrupo B estão 50% dos acessos da variedade botânica *hypogaea* e 100% dos acessos da variedade *peruviana*. Esta distribuição mostra a variabilidade existente entre e dentro dos acessos das diferentes variedades botânicas, uma vez que acessos da subespécie *fastigiata* estão presentes nos dois grupos principais e os acessos da subespécie *hypogaea* estão distribuídos pelos grupos A e B do grupo II do dendrograma.

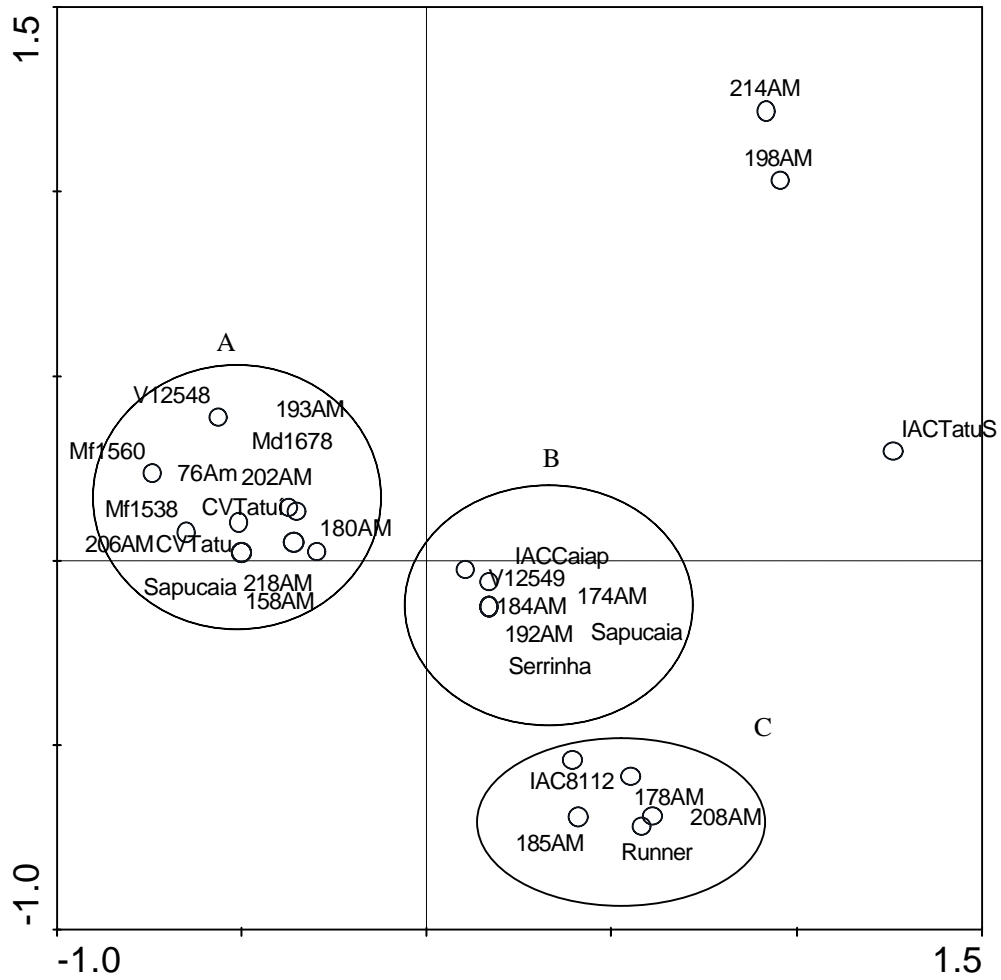
Com relação às origens dos acessos pode-se observar que os acessos brasileiros se distribuíram por todos os grupos do dendrograma mostrando uma variabilidade maior quando comparado com os acessos africanos que não possuem nenhum representante no subgrupo B do grupo II. Dos três acessos do Equador dois ficaram no subgrupo A e um no subgrupo B do grupo II.

Herselman (2003) aponta que o primeiro acesso introduzido a partir do qual se estabeleceu a cultivar Natal Common na África do Sul era do tipo Spanish, e que os acessos do grupo Valência introduzidos não se adaptaram agronomicamente, de forma que a maior parte dos acessos atualmente cultivados foi originada de cruzamentos envolvendo a cultivar Natal Common do grupo Spanish.

Resultados similares, com relação ao tipo de agrupamento, foram obtidos por HE & PRAKASH (2001). Neste trabalho os autores analisaram por meio de marcadores tipo AFLP 44 acessos de amendoim, onde testaram 28 combinações de iniciadores dos quais 15 pares revelaram polimorfismo. Observaram a formação de dois grupos principais, sendo que o primeiro agrupou os acessos das variedades *hypogaea*, *hirsuta*, *aequatoriana* e *peruviana* e no segundo os acessos das variedades *fastigiata* e *vulgaris*. Os autores citam que os dados de polimorfismo de DNA não estão de acordo com a classificação de *Arachis hypogaea* quando às duas subespécies.

Em ensaio com marcadores RAPD DWIVEDI et al. (2001) conseguiram identificar todos os acessos individualmente, entretanto os cinco grupos gerados pela análise de agrupamento apresentaram acessos que não puderam ser associados aos seus países de origem, às subespécies, às características de semente e vagens, nem com o conhecimento do pedigree.

Na Figura 10 é apresentado um diagrama de ordenação, construído com os dados da matriz binária utilizando a análise de componentes principais. Este diagrama pode ser utilizado para verificação da significância dos grupos formados pelo método de agrupamento. Esta ordenação representa a variância dos dados em um sistema de componentes principais (eixos), de forma mais simples de analisar os agrupamentos. Para este conjunto de dados 48% da variância total é explicada pelos dois primeiros componentes (componente um responsável por 26% da variação e o componente dois por 22%). Pelo diagrama pode-se observar um agrupamento bastante consistente com o já verificado pela análise de agrupamento, em que os acessos do grupo II do dendrograma se subdividiram em três sub-grupos (marcados com círculos) no diagrama. Já os acessos do grupo I ficaram distantes dos demais três sub-grupos e o acesso proveniente do Brasil separou-se dos dois acessos provenientes da África.



**Figura 9:** Análise de componentes principais de 29 acessos de amendoim, com base nos dados da matriz binária de 12 iniciadores RAPD, mostrando a ordenação dos acessos.

#### 4.4 – Avaliação da Nodulação e Fixação Biológica de Nitrogênio

Foi implantado um experimento com o objetivo de avaliar os parâmetros relacionados à nodulação e fixação biológica de nitrogênio em nove acessos de amendoim, representantes de grupos distintos com base nos resultados da análise dos marcadores RAPD.

Foi observado tanto para os dados de matéria seca da parte aérea quanto para os dados de matéria fresca da parte aérea efeito significativo dos fatores solo e acesso, não sendo observada interação entre eles. Os acessos IAC Tatu-ST, IAC 886 Runner, Sapucaia Bege, CV Tatuí e Sapucaia Vermelha apresentaram médias estatisticamente superiores aos demais acessos para os dados de matéria fresca, quando comparados pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Os acessos IAC Tatu-ST, IAC 886 Runner, Sapucaia Bege e Sapucaia Vermelha apresentaram as maiores médias para os dados de matéria seca da parte aérea, sendo superiores estatisticamente aos demais.

Os demais acessos formaram um outro grupo não sendo observada diferença significativa pelo teste Scott Knott entre eles (Tabela 10).

Com relação às amostras de terra estudadas, tanto para matéria seca quanto para matéria fresca, o solo Argissolo apresentou médias superiores estatisticamente quando comparado com o Planossolo.

**Tabela 10:** Valores médios de matéria fresca e matéria seca da parte aérea das plantas dos nove acessos utilizados no experimento de casa de vegetação.

Acessos	Matéria fresca	Matéria seca
	g.planta <sup>-1</sup>	g.planta <sup>-1</sup>
202AM	10,250 B	2,250 B
76AM	11,125 B	2,250 B
IAC Tatu-ST	13,750 A	2,750 A
IAC 886 Runner	14,000 A	3,250 A
IAC Caiapó	9,750 B	2,500 B
Sapucaia Bege	14,500 A	2,875 A
198AM	9,250 B	1,750 B
Sapucaia Vermelha	13,625 A	2,750 A
CV Tatuí	12,250 A	2,500 B
CV	21,60	24,11

Valores seguidos pela mesma letra, nas colunas não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Na Tabela 11 são apresentados os teores médios de nitrogênio na parte aérea, bem como, os dados de acúmulo de nitrogênio total na parte aérea, resultado do produto entre a massa seca da parte aérea e o teor de nitrogênio apresentado pelos acessos testados. Para essas variáveis também não foi observado efeito significativo da interação entre solo x acesso, mas os seus efeitos isolados foram significativos pelo teste F.

Com relação ao teor de nitrogênio pode-se observar que houve a formação de dois grupos de médias sendo que os acessos 202AM, 76AM, IAC Caiapó, Sapucaia Bege e CV Tatuí apresentaram médias superiores aos demais acessos. Entretanto para os valores de acúmulo total de nitrogênio na parte aérea os acessos IAC 886 Runner, IAC Caiapó, Sapucaia Bege, Sapucaia Vermelha e IAC Tatuí foram os que apresentaram médias superiores estatisticamente, quando comparado aos demais, mostrando que para os acessos IAC 886 Runner e Sapucaia Vermelha embora tenham apresentado teores de nitrogênio mais baixos, o acúmulo total foi semelhante aos outros citados como resultado de um maior acúmulo de massa seca.

**Tabela 11:** Teores médios de nitrogênio e acúmulo total de nitrogênio na parte aéreas das plantas dos nove acessos utilizados no experimento de casa de vegetação.

Acessos	Teor de Nitrogênio	Acúmulo total de nitrogênio
	%	mg.planta <sup>-1</sup>
202AM	2,893625 A	60,64750 B
76AM	2,887875 A	66,15500 B
IAC TatuST	2,509625 B	68,62875 B
IAC 886 Runner	2,627125 B	85,47375 A
IAC Caiapó	3,038375 A	71,99000 A
Sapucaia Bege	2,807750 A	86,08125 A
198AM	2,674250 B	51,28375 B
Sapucaia Vermelha	2,718125 B	73,23250 A
CV Tatuí	2,975625 A	73,84125 A
CV	11,57	25,25

Valores seguidos pela mesma letra, nas colunas não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Os valores de matéria seca de parte aérea e Ntotal foram superiores estatisticamente no solo Argissolo mostrando um efeito do solo. A estratégia de usar dois solos teve por objetivo avaliar, não apenas as diferenças entre os acessos, mas também, se estas variações eram consistentes entre solos distintos. Os resultados observados permitiram uma comparação entre os acessos, uma vez que estes solos não apresentam no histórico nenhum ciclo de cultivo com a cultura do amendoim, não proporcionando o estabelecimento de grupos específicos de rizóbios selecionados por qualquer acesso.

Neste estudo foi quantificada a atividade da enzima nitrogenase pela técnica de redução de acetileno utilizando-se todo o sistema radicular das plantas. Como pode ser observado na Tabela 12, os acessos IAC Tatu-ST, IAC 886 Runner, Sapucaia Bege, Sapucaia Vermelha e CV Tatuí apresentaram as médias estatisticamente superiores aos demais acessos, mostrando que nas condições do experimento estes se associaram a estirpes nativas do solo que foram mais eficientes na redução do nitrogênio atmosférico que os acessos 202AM, 76AM, IAC Caiapó e 198AM.

**Tabela 12:** Valores médios de etileno produzido pelos nove acessos utilizados no experimento de casa de vegetação, analisados pela técnica de redução de acetileno.

Acessos	Etileno (nmol.mL <sup>-1</sup> )
202AM	10,875 B
76AM	10,375 B
IAC Tatu-ST	14,250 A
IAC 886 Runner	16,875 A
IAC Caiapó	10,875 B
Sapucaia Bege	16,500 A
198AM	7,6250 B
Sapucaia Vermelha	19,750 A
CV Tatuí	16,875 A
CV	45,66

Valores seguidos pela mesma letra, nas colunas não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Com relação aos dados de nodulação (Tabela 13), para os parâmetros avaliados de número e massa seca de nódulos foi observado efeito significativo da interação entre os fatores solo e acesso. Foi observada uma nodulação mais intensa para todos os acessos

analisados quando cultivados no solo Argissolo, o que indica que a amostra desse solo possuía no momento da coleta uma densidade de rizóbios formadores de nódulos em amendoim maior do que a amostra de Planossolo, bem como características químicas mais favoráveis ao desenvolvimento das plantas. Os acessos IAC Tatu-ST, Sapucaia Vermelha e CV Tatuí apresentaram médias estatisticamente superiores aos demais acessos estudados quanto ao número de nódulos no Argissolo, por outro lado, para o Planossolo não foi observada diferença estatística entre os acessos nas condições deste experimento, embora o acesso Sapucaia Vermelha tenha apresentado uma média numericamente superior aos demais. Para uma condição de não inoculação pode-se concluir que os acessos foram capazes de formar uma quantidade significativa de nódulos, observado pela boa nodulação no sistema radicular.

SANTOS et al. (2005) em experimento com inoculação de amendoim por diferentes estirpes de rizóbio observaram que a nodulação foi dependente do genótipo, mas influenciada também pela cobertura vegetal da área onde o solo foi coletado.

Para os dados de massa seca de nódulos foi observado comportamento semelhante ao observado para os dados de número de nódulos, o que foi caracterizado como uma interação significativa entre os fatores solo e acesso. Para o Planossolo não foi observada diferença estatística entre os acessos, já para o Argissolo os acessos IAC Tatu-ST, IAC 886 Runner, Sapucaia Bege e Sapucaia Vermelha apresentaram médias superiores aos demais acessos pelo teste utilizado.

Os dados mostram que o amendoim é uma espécie que pode estabelecer associações simbióticas com estirpes nativas de rizóbio e se beneficiar desta interação em condições de baixa disponibilidade de N no solo e que esta resposta é dependente do genótipo da planta. CASTRO et al. (1999) em experimento de condições de campo com amendoim avaliaram a competitividade da estirpe USDA 3187 frente aos rizóbios nativos do solo. Os autores citam que como o amendoim é uma espécie considerada promíscua, a propriedade chave para a inoculação de estirpes deve ser a habilidade de competir com os rizóbios nativos do solo. Neste ensaio não foi observada diferença significativa entre os tratamentos, inoculado e não inoculado, evidenciando a baixa competitividade da estirpe inoculada no experimento.



**Tabela 13:** Valores médios de número de nódulos e massa seca de nódulos dos nove acessos de amendoim utilizados no experimento de casa de vegetação.

Acesso	Número de nódulos		Massa seca de nódulos (mg.planta <sup>-1</sup> )	
	Argissolo	Planossolo	Argissolo	Planossolo
202AM	182,00 B	50,75 A	109,50 B	30,50 A
76AM	144,00 B	80,00 A	90,00 B	50,75 A
IAC Tatu-ST	303,50 A	68,50 A	174,75 A	49,25 A
IAC 886 Runner	192,00 B	39,50 A	143,25 A	45,50 A
IAC Caiapó	165,00 B	52,00 A	120,50 B	44,25 A
Sapucaia Bege	199,25 B	95,00 A	195,50 A	71,75 A
198AM	123,75 B	59,50 A	78,00 B	23,75 A
Sapucaia Vermelha	242,75 A	117,00 A	156,75 A	78,50 A
CV Tatuí	307,00 A	81,50 A	197,00 A	44,75 A
CV	36,39		33,84	

Valores seguidos pela mesma letra, nas colunas não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Com o objetivo de avaliar o comportamento do sistema radicular de cada acesso nas condições deste experimento, onde se trabalhou com dois solos de características químicas distintas, foi realizada a pesagem das raízes após coleta dos nódulos e secagem em estufa para determinação da massa seca total do sistema radicular (Tabela 14). Para estes dados não foi observada interação entre os fatores solo e acesso e foi observado comportamento semelhante para os acessos, tanto para massa seca das raízes quanto para massa seca total do sistema radicular. Observou-se que o acesso 198AM apresentou média estatisticamente inferior ao acesso IAC Tatu-ST, e os demais acessos apresentaram médias estatisticamente iguais. O acesso 198AM apresentou médias inferiores para os dados de matéria seca da parte aérea, acúmulo de nitrogênio e massa seca de raízes, o que indica que houve uma limitação quanto ao suprimento de nitrogênio para o desenvolvimento das plantas deste acesso, talvez esse acesso apresente uma restrição à nodulação, em termos quantitativos ou qualitativos, promovendo associação com grupos de rizóbios menos eficientes. Isso pode resultar em um padrão de nodulação distinto dos demais acessos, o que pode vir a direcionar uma futura seleção de estirpes inoculantes específicas.

**Tabela 14:** Valores médios de massa seca de raiz e massa seca total do sistema radicular dos nove acessos de amendoim utilizados no experimento de casa de vegetação.

Acessos	Massa seca de raiz	Massa seca total do sistema radicular
	g.planta <sup>-1</sup>	g.planta <sup>-1</sup>
202AM	0,875 AB	0,875 AB
76AM	1,000 AB	1,000 AB
IAC Tatu-ST	1,250 A	1,375 A
IAC 886 Runner	0,875 AB	0,875 AB
IAC Caiapó	0,875 AB	0,875 AB
Sapucaia Bege	1,000 AB	1,125 AB
198AM	0,625 B	0,750 B
Sapucaia Vermelha	1,000 AB	1,125 AB
CV Tatuí	1,000 AB	1,125 AB
CV	32,22	36,21

Valores seguidos pela mesma letra, nas colunas não diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

CHEN et al. (2003) avaliando a compatibilidade de diferentes acessos de amendoim com diferentes estirpes de rizóbio nativos da China, mostraram que os acessos diferiram na capacidade de nodular e acumular matéria seca com as diferentes estirpes e, citam uma baixa correlação entre o número de nódulos e produção de matéria seca, indicando que nem sempre alto número de nódulos está associado com alta produção.

Para os dados do presente experimento foi observada uma correlação elevada, acima de 70%, entre os dados de acúmulo total de nitrogênio e as determinações de matérias seca e fresca da parte aérea, número e massa seca de nódulos (Tabela 15) ao contrário do observado para os dados de teor de nitrogênio, onde os valores de correlação são baixos entre os mesmos conjuntos de valores. Mostrando que a determinação do acúmulo total de nitrogênio que considera a massa seca da planta está mais relacionada às determinações de nodulação e crescimento vegetal do que simplesmente os teores de nitrogênio. Foram observados também valores elevados de correlação entre as determinações relacionadas a nodulação (número e massa de nódulos) com as determinações de matéria seca e matéria fresca da parte aérea e com o acúmulo total de nitrogênio na parte aérea da planta.

**Tabela 15:** Correlação observada entre os parâmetros analisados no experimento com os nove acessos de amendoim.

Variáveis	TN	ANPA	MSPA	MFPA	NN	MSN	ARA	MSR	MSRN
TN	1,000	---	---	---	---	---	---	---	---
ANPA	0,418	1,000	---	---	---	---	---	---	---
MSPA	0,114	0,942	1,000	---	---	---	---	---	---
MFPA	0,103	0,909	0,960	1,000	---	---	---	---	---
NN	0,126	0,710	0,735	0,796	1,000	---	---	---	---
MSN	0,188	0,838	0,848	0,880	0,887	1,000	---	---	---
ARA	0,199	0,798	0,818	0,849	0,783	0,872	1,000	---	---
MSR	-0,142	0,468	0,579	0,599	0,339	0,417	0,394	1,000	---
MSRN	-0,096	0,577	0,680	0,704	0,468	0,560	0,515	0,987	1,000

TN - Teor de nitrogênio; ANPA - Acúmulo de nitrogênio na parte aérea; MSPA - Matéria seca da parte aérea; MFPA - Matéria Fresca da parte aérea; NN - Número de nódulos; MSN - Massa seca dos nódulos; ARA - Análise de redução de acetileno; MSR - Matéria seca das raízes; MSRN - Matéria seca total das raízes.

Pelas avaliações deste experimento os acessos IAC Tatu-ST, IAC 886 Runner, Sapucaia Vermelha, Sapucaia Bege e CV Tatuí mostraram um rendimento superior aos demais acessos testados. Entretanto, estes acessos ficaram dispostos pelo ensaio RAPD em grupos distintos, mostrando que a definição de acessos mais eficientes na fixação não está necessariamente relacionada à sua posição ou relacionamento genético. CHEN et al. (2004) observaram em estudo de compatibilidade entre rizóbios e acessos de amendoim que os genótipos AFLP das estirpes não explicaram o comportamento simbiótico e sugeriram que para obter máxima eficiência na fixação combinações compatíveis entre as estirpes e cultivares devem ser selecionadas.

## 5 – CONCLUSÕES

A técnica de RAPD foi capaz de revelar o polimorfismo entre os acessos de amendoim;

Foi observada, pelo dendrograma de similaridade, a separação de dois grupos com 89% de similaridade sendo possível à diferenciação entre os acessos analisados;

Não foi observado agrupamento nem em função da origem dos acessos nem em função das subespécies;

Foi observada variabilidade tanto entre, quanto dentro dos acessos das diferentes variedades botânicas;

Os acessos apresentaram diferenças quanto à nodulação e à fixação de nitrogênio atmosférico, sendo que os acessos IAC Tatu-ST, IAC 886 Runner, Sapucaia Vermelha, Sapucaia Bege e CV Tatuí apresentaram maior desenvolvimento vegetal analisando-se as características observadas e,

Os dados mostram que o amendoim é uma espécie que pode se associar às estirpes nativas de rizóbio do solo e se beneficiar desta interação.

## 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALWI, N.; WYNNE, J.C.; RAWLINGS, J.O.; SCHNEEWEIS, T.J.; ELKAN, G.E.. Symbiotic relationship between Bradyrhizobium strains and peanut. **Crop Science**, v29, p50-54, 1989.
- ARAÚJO, E.S.; SOUZA, S.R.; FERNANDES, M.S. Características morfológicas e moleculares e acúmulo de proteína em grãos de variedades de arroz do Maranhão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 38, p1281-1288, 2003.
- BELTRÃO, N.E. Agricultura Familiar. [http://www21.sede.embrapa.br/noticias/artigos/2001.2004-12-07.2553547188/mostra\\_artigo](http://www21.sede.embrapa.br/noticias/artigos/2001.2004-12-07.2553547188/mostra_artigo). Última modificação: 07/12/2004 02:50 PM. Acessado em 26/09/2005.
- BROCKWELL, J.; HERRIDGE, D.F.; MORFTHORPE, L.J.; ROUGHLEY. Numerical effects of Rhizobium population on legume symbiosis. In: Beck, D.P.; Materon, L. (Eds.). **Nitrogen fixation Legumes in Mediterranean Agriculture**. Martinus, Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 1998.p
- BUSSELL, J.D.; WAYCOTT, M.; CHAPPILL, J.A. Arbitrarily amplified DNA markers as characters for phylogenetic inference. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, 7, p3–26, 2005.
- CAETANO-ANÓLES, G.; BASSAM, B.J.; GRESSHOFF, P.M. High resolution DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. **Biotechnology**, 9, p553-557, 1991.
- CAI, Q.; LU, S.; CHINNAPPA, C.C. Analysis of karyotypes and Giemsa C-banding patterns in eight species of *Arachis*. **Genome**. v29, 187-194. 1987.
- CASTRO, S.; PERMIGIANI, M.; VINOCUR, M.; FABRA, A. Nodulation in peanut (*Arachis hypogaea* L.) roots in the presence of native and inoculated rhizobia strains. **Applied Soil Ecology**. v13, p39-49. 1999.
- CHEN, Q.; ZHANG, X.; TEREFWORK, Z.; KAIJALAINEN, S.; LI, D.; LINDSTRÖM, K. Diversity and compatibility of peanut (*Arachis hypogaea* L.) bradyrhizobia and their host plants. **Plant and Soil** . v255, p605–617. 2003.
- CROCHEMORE, M.L.; MOLINARI, H.B.C.; VIEIRA, L.G.E. Genetic diversity in Passion fruit (*Passiflora* spp.) evaluated by RAPF markers. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 46, p521-527, 2003.
- DIAS, L.A.S.; MARITA, J.; CRUZ, C.D.; BARROS, E.G.; SALOMÃO, T.M.F. Genetic distance and its association with heterosis in Cacao. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 46, p339-347, 2003.
- DICE, L.R. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*, v26, p297-302. 1945.

DUARTE, M.C.; SANTOS, J.B.; MELO, L.C. Comparison of similarity coefficients based on RAPD markers in the common bean. **Genetics and Molecular Biology**, 22, p427-432, 1999.

DWIVEDI, S.L.; GURTU, S.; CHANDRA, S.; YUEJIN, W.; NIGAM, S.N. Assessment of genetic diversity among selected groundnut germplasm: 1- RAPD analysis. **Plant Breeding**, v.120, p.345-359, 2001.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. *Manual de métodos de análise de solos*. 2. ed. Centro Nacional de Pesquisa do Solo. Rio de Janeiro, 1997.

FAO (2004) [<http://faostat.fao/faostat/collection?subset=agriculture>].

FÁVERO, A. P. **Cruzabilidade entre espécies silvestres de *Arachis* visando à introgressão de genes de resistência a doenças no amendoim cultivado**. 2004. 165p. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz., Esalq-USP. Piracicaba.

FERGUSON, M.E.; BUROW, M.D.; SHULZE, S.R.; BRAMEL, P.J.; PATERSON, A.H.; KRESOVICH, S.; MITCHELL, S. Microsatellite identification and characterization in peanut (*A. hypogaea* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v108, p1064-1070, 2004.

FERGUSON, M.E.; BRAMEL, P.J. CHANDRA, S. Gene diversity among botanical varieties in peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Crop Science**, 44, p 1847-1854. 2004.

FERNÁNDES, A.; KRAPOVICKAS, A. Cromosomas y evolución em *Arachis* (Leguminosae). **Bonplandia**, v8, p187-220, 1994.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª Ed. Brasília: Embrapa-Cenargem, 1998.220p. (Embrapa-Cenargem Documento 20).

GIMENES, M.A.; LOPES, C.R.; VALLS, J.F.M. Genetic relationships among *Arachis* based on AFLP. **Genetics and Molecular Biology**, v25, p349-353, 2002.

GIMENES, M.A.; LOPES, C.R.; GALGARO, M.L.; VALLS, J.F.M.; KOCHERT, G. Genetic variation and phylogenetic relationships based on RAPD analysis in section *Caulorrhizae*, genus *Arachis* (Leguminosae). **Euphytica**, 116, p187-195, 2000.

GODOY, J.I. A qualidade do amendoim: o que também precisa ser dito. [Http://www.correpar.com.br/amend\\_cenario2.htm](http://www.correpar.com.br/amend_cenario2.htm). Acessado em 26/09/2005.

GODOY, I.J.; SAVY FILHO, A.; TANGO, J.S.; UNGARO, M.R.G.; MARIOTTO, P.R. Programa integrado de pesquisa – oleaginosa. Campinas: IAC, 1985. 33p.

GODOY, I.J.; MORAES, S.A.; ZANOTTO, M.D.; SANTOS, R.C. Melhoramento do amendoim. In. Boren, A. (ed). **Melhoramento de espécies cultivadas**, Viçosa, UFV, 1999. p. 51-94.

GREGORY, W.C.; KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, M.P. Structure, variation, evolution, and classification in *Arachis*. In: Summerfield, R.J.; Bunting, A.H.; Kew. (Ed.). **Advances in Legumes Science.**; England: Royal Botanical Gardens, 1980. p469-481.

GREGORY, W.C.; GREGORY, M.P. Exotic germ plasm os *Arachis* L. interespecific hybrids. **Journal of Heredity**, v70, p185-193, 1979.

GREGORY, W.C.; GREGORY, M.P. Groundnut. In: Simmonds, N. W.(Ed.). **Evolution of crop plants**. London, Logman Group, 1976, p151-154.

GRODZICKER, T.; WILLIAMS, J.; SHARP, P.; SAMBROOK, J. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of ade-novirus. **Cold Spring Harbor Symposium Quantitative Biology**, 39, p439-446, 1974.

HALWARD, T.M.; STALKER, H.T.; LARUE, E.A.; KOCHERT, G. Genetic variation detectable with molecular markers among unadapted germplasm resources of cultivated peanut and related wild species. **Genome**, 34, p1013–1020, 1991.

HALWARD, T.M.; STALKER, H.T.; LARUE, E.A.; KOCHERT, G. Use of single primer DNA amplification in genetic studies of peanut. **Plant Molecular Biology**, 18, p315-325, 1992.

HARDY, R. W. H.; BURNS, R. C.; HOLSTEN, R. D. Applications of the acetylene assay for measurement of nitrogen fixation. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 5, p. 47-81, 1973.

HE, G.; MENG, R.; NEWMAN, M.; GAO, G.; PITTMAN, R.N.; PRAKASH, C.S. Microsatellites as DNA markes in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). **BMG Plant Biology**, v3:3, 2003.

HE, G.; MENG, R.; GAO, H.; GOU, B.; GAO, G.; NEWMAN, M.; PITTMAN, R.N.; PRAKASH, C.S. Simple sequence repeat markers for botanical varieties of cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Euphytica**, v142, p131-136, 2005.

HE, G.; PRAKASH, C. Evaluation of genetic relationship among botanical varieties of cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) using AFLP markers. **Genetics Resources and Crop Evolution**, 48, p347-352, 2001.

HE, G.; PRAKASH, C.S. Identification of polymorphic DNA markers in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Euphytica**, 97, p143-149, 1997.

HERSELMAN, L. Genetic variation among Southern Áfrican cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L) genotypes as revealed by AFLP analysis. **Euphytica**, v133, p319-327, 2003.

HERRIDGE, D.F.; DANSO, S.K.A. Enhancing crop legume N<sub>2</sub> fixation through selection and breeding. **Plant and Soil**, v.174, p51-82, 1995.

HOLBOOK, C.C.; STALKER, H.T. Peanut Breeding and genetic Resources. **Plant Breeding Reviews**, 22, p297-355, 2002.

HOPKINS, M.S., CASA A.M., WANG, T., MITCHELL, S.E., DEAN, R., KOCHERT, G.D., KRESOVICH, S. Discovery and characterization of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in peanut. **Crop Science**, v39, p1243-1247, 1999.

HOSHINO, A.A.; PALMIERI, D.A.; BRAVO, J.P.; BARATA, T.E.; LOPES, C.R.; GIMENES, M.A. Marcador microssatélite na conservação de germoplasma vegetal. **Biociência**, v. 29, p146-150, 2002.

HUANG, H.Q. The effect of *Rhizobium* inoculation on Tianfu peanut. **J. Sichuan Agric. Uni**, v5, 191-195, 1987.

HUANG, H.Q. Selection and Application of *Rhizobium leguminosarum* *bv. viciae* and *Rhizobium* sp. (*Arachis*) strains. **J. Sichuan Agric. Uni.**, v6, p287-290, 1988.

HUANG, H.Q.; HE, F. R.; CHEN, Z.H. Study on the Biological. **J. Sichuan Agric. Uni**. v8, p188-193, 1990.

HUME, D.J.; BLAIR, D.H. Effect of number of *Bradyrhizobium japonicum* applied in commercial inoculants on soybean seed yield in Ontario. **Canadian Journal of Microbiology**, v38, p588-593, 1992.

IBGE: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?z=t&o=22&i=P>. Acessado em 26/09/2005.

JUNGHANS, D.T.; ALFENAS, A.C.; BROMMOSCHENKEL, S.H.; ODA, S.; MELLO, E.J.; GRATTAPAGLIA, D. Resistance to rust (*Puccinia psidii* Winter) in *Eucalyptus*: mode of inheritance and mapping of a major gene with RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, 108, p175-180, 2003.

MARTIN, C.; JULIANO, A. NEWBURY, H.J.; LU, B-R.; JACKSON, M.T.; FORD-LLOYD, B.V. The use of RAPD markers to facilitate the identification of *Oryza* species within a germplasm collection. **Genetic Resources and Crop Evolution**, 44, p175-183, 1997.

KERRIDGE, P.C.; B. HARDY. Biology and Agronomy of Forage *Arachis*. CIAT, Cali. 1994.

KOCKERT, G.; HALARD, T.; BRANCH, W.D.; SIMPSON, C.E. RFLP variability in peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars and wild species. **Theoretical and Applied Genetics**, 81, p565-570, 1991.

KOCKER, G.; STALKER, H.T.; GIMENES, M.; GALGARO, L.; LOPES, C.R.; MOORE, K. RFLP and cytogenetic evidence on the origin and evolution of allotetraploid domesticated peanut, *Arachis hypogaea* L. (Leguminosae). **American Journal of Botany.**, 83, p1282-1291, 1996.

KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, W.C. Taxonomia del genero *Arachis* (Leguminosae). **Bonplandia**. p1-186. 1994



KRISHNA, G.K.; ZHANG, J.; BUROW, M.; PITTMAN, R.N.; DELIKOSTADINOV, S.G.; LU, Y.; PUPPALA, N. Genetic diversity analysis in Valencia peanut (*Arachis hypogaea* L) using microsatellite markers. **Cellular & Molecular Biology Letters**, 9, p685-697, 2004.

LI, J.; XU, L.M.; FAN, H.; LI, L.; GE, C.; YANG, S. S. Genetic diversity among Chinese peanut rhizobia by REP-PCR analysis. **Acta Microbiol. Sin.** 39, p296-304, 1999.

LOPES, R.; LOPES, M.T.G.; FIGUEIRA, A.V.O.; CAMARGO, L.E.A.; FUNGARO, M. H. P.; CARNEIRO, M.S; VIEIRA, M .L.C. . Marcadores moleculares dominantes (RAPD E AFLP). **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, Brasília**, V. 29, P. 64-68, 2003.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. Avaliação do estado nutricional das plantas. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1989. 201 p.

MARTIN, P.S. **Amendoim uma planta da história no futuro brasileiro**. São Paulo. Ícone,. 68 p. 1985.

MEYER, A.S.; GARCIA, A.A.F.; SOUZA, A.P.; SOUZA Jr, C.L. Comparison of similarity coefficients used for cluster analysis with dominant markers im maize (*Zea mays* L.). **Genetics and Molecular Biology**, 27, p83-91, 2004.

MORETZSOHN, M.C.; HOPKINS, M.S.; MITCHELL, S.E.; KRESOVICH, S.; VALLS, J.F.M.; FERREIRA, M.E. Genetic diversity of peanut (*Arahis hypogaea* L.) and its wild relatives based on the analysis of hypervariable regions of the genome. **BMC Plant Biology**. p4-11, 2004

MULLIS, K., FALONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods Enzimology**, 55, p335-350, 1987.

NORRIS, D.O.; T'MANNETJE, L. The symbiotic specialization of African *Trifolium* spp. in relation to their taxonomy and their agronomic use. **East African Agriculture and Forest Journal**, 29, p214-235, 1964.

PEÑALOSA, A.P.S.; VALLS, J.F.M. Número de cromossômico em novas espécies de *Arachis* (Leguminosae). In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA A AMÉRICA LATINA E CARIBE – SIRGEALC, 2., **Anais**. CD-ROM. Ed. Mariante, A.S.; Bustamente, P. 1999.

PRINE, G.M.; DUNAVIN, L.S.; MOORE, J.E.; ROUSH, R.D. Florigraze rhizoma peanut. A perennial forage legume. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Circular S-275, 1981.

RAINA, S.N.; RANI, V.; KOJIMA, T.; OGIHARA, Y.; SINGH, K.P.; DEVARUMANTH, R.M. RAPD and ISSR fingerprints as useful genetic markers for analysis genetic diversity, varietal identification, and phylogenetic relationships in peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars and wild species. **Genome**, v44, p763-772, 2001.

RANGEL, J. Comentários. [http://www.correpar.com.br/amend\\_cenario2.htm](http://www.correpar.com.br/amend_cenario2.htm). Acessado em 26/09/2005.

ROCHA, R.B.; ABAD, J.I.M.; PIRES, I.E.; ARAÚJO, E.F. Fingerprint and genetic diversity analysis of Eucalyptus spp. Genotypes using RAPD and SSR markers. **Scientia Florestalis**, 62, p24-31, 2002.

SANTOS, C.E.R.S.; STAMFORD, N.P.; FREITAS, A.D.S.; VIEIRA, I.M.M.B.; SOUTO, S.M.; NEVES, M.C.P., RUMJANEK, N.G. Efetividade de rizóbios isolados de solos da região Nordeste do Brasil na fixação do N<sub>2</sub> em amendoim (*Arachis hypogaea* L.). **Acta Scientiarum**, v27, n2, p301-307, 2005.

SANTOS, C.E.R.S. **Diversidade, faixa hospedeira e eficiência de fixação biológica de N<sub>2</sub> de rizóbio nativo da região Nordeste do Brasil, em amendoim (*Arachis hypogaea*)**. 2001. 178p. Tese de doutorado – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. 2001.

SANTOS, R.C.; GODOY, I.J. Hibridação em amendoim. In. BOREN, A.(Ed.). **Hibridação artificial de plantas**, Viçosa, UFV, 1999.p 83-100.

SANTOS, R.C.; MELLO FILHO, P.A.; FÁTIMA, S. DE; MORAES, J.S. Fenologia de genótipos de amendoim dos tipos botânicos Valência e Virginia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v32, n 6, p607-612. 1997.

SINGLETON, P.; THIES, J.; BOHLOOL, B. B. Useful models to predict response to legume inoculation. In: MULONGO, Y.K.; GUEYE, M.; SPENCER, S. (Ed.). **Biological Nitrogen Fixation and Sustainability of Tropical Agriculture**. New York. John Wiley & Sons, Inc., 1992.

SINGH, A.K. Utilization of wild relatives in genetic improvement of *Arachis hypogaea* L. Part 8. Synthetic amphidiploids and their importance in interespecific breeding. **Theoretical and Applied Genetics**, 72, p433-439, 1986.

SINGH, A.K.; SMARTT, J. The genome donors of the groundnut/peanut (*Arachis hypogaea* L.) revised. **Genetics Resources and Crop Evolution**, 45, p113-118, 1998.

SINGH, A.K.; SMARTT, J.; SIMPSON, C.E.; RAINA, S.N. Genetic variation vis-à-vis molecular polymorphism in groundnut, *Arachis hypogaea* L. **Genetics Resources and Crop Evolution**, 45, p119-126, 1998.

SINGH, A. K.; SIMPSON, C.E. Biosystematics and genetic resources. In: SMARTT, J. (Ed.). **The groundnut crop**. London. Chapman & Hall, 1994. p. 96-137.

SINGH, U.; SINGH, B. Tropical grain legumes as important human foods. **Economical Botany**, 46,p310-321, 1992.

SMARTT, J.; GREGORY, W.C.; GREGORY, M.P. The genomes of *Arachis hypogaea* L. I. Cytogenetic studies of putative genome donors. **Euphytica**, 27, p665-675, 1978.

STALKER, H.T. A new species in section *Arachis* with D genome. **American Journal of Botany**, 78, p630-637, 1991.

STUTEVANT, A.H. The linear arrangement of six sex-linked factors in *Drosophila*, as shown by their mode of association. **Journal of Experimental Zoology**, 14, p43-59, 1913.

THIES, J.E.; BOHLOOL, B.B.; SINGLETON, P.W. Subgroups of de *Cawpea miscellany*: symbiotic specificity within *Bradyrhizobium* spp. for *Vigna unguiculata*, *Phaseolus lunatus*, *Arachis hypogaea* and *Macroptilum atropurpureum*. **Applied Environmental Microbiology**, v.57, n.5, p.1540-1545, 1991.

TRIPLETT, E.W. The molecular genetics of nodulation competitiveness in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. **Mol. Plant Microbe Interact**, 3, p199-206,1990.

URTZ, B.E.; ELKAN, G.H. Genetic diversity among *Bradyrhizobium* isolates that effectively nodulate peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Canadian Journal of Microbiology**, 42, p. 1121-1130, 1996.

VALLS, J.F.M.; SIMPSON, C.E. Novas espécies de *Arachis* (Leguminosae). In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE RECURSOS GENÉTICOS, 1.1997. **Anais**. Campinas, p. 27, 1997.

VALLS, J.F.M.; RAMANATHA RAO, V.; SIMPSON, C.E.; KRAPOVICRAS, A. Corrent status of collection and conservation of South American groundnut germoplasm with emphasis on wild species of *Arachis*. P. 15-35. In: J.P. MOSS (Ed), Proc. Intern. **WORKSHOP ON CYTOGENETICS OF ARACHIS**.1983. Int. Crops Res. Inst. Semi-Arid Tropics, Pantacheru, A.P. India.

VAN ROSSUM, D.; SCXHUURMANS, F.P.; GILLIS, M.; MUOTCHA, A.; VAN VERSEVELD, H.W.; STOUTHAMER, A.H.; BOOGERD, F.C. Genetic and phenetic analysis of *Bradyrhizobium* strains nodulating peanut (*Arachis hypogaea* L.) roots. **Applied and Environmental Microbiology**, n°4, 61, p1599-1609, 1995.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, 23, 4407-4414, 1995.

XAVIER, G.R.; MARTINS, L.M.V.; RUMJANEK, N.G.; FREIRE FILHO, F.R. Variabilidade genética em acessos de caupi analisada por meio de marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n.4, p353-359, 2005.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, 18, p7213-7218, 1990.

WELL, J.L. Informativeness of human (dC-dA)<sub>n</sub> (dG-DT)<sub>n</sub> polymorphism. **Genomics**, 7, p524-530, 1990.

WILLIAMS, J.G.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, L.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, 18, p6531-6535, 1990.

YANG, K.J.; XIE, F.L.; ZOU, J.; ZHOU, Q.; ZHOU, J.C. Polyphasic characteristics of bradyrhizobia isolated from nodules of peanut (*Arachis hypogaea*) in China. **Soil Biology and Biochemistry**, 37, p141-153, 2005.

ZHANG, X.P.; NICK, G.; KAIJALAINEN, S.; TEREFEWORK, Z.; PAULIN, L.; TIGHE, S.W.; GRAHAM, P.H.; LINDSTRÖM, K. Phylogeny and diversity of *Bradyrhizobium* strains isolated from the root nodules of peanut (*Arachis hypogaea* L.) in Sichuan, China. **Syst. Appl. Microbiol**, 22, p378–386, 1999.

ZILLI, J.E. **Caracterização e seleção de estirpes de rizóbio para a inoculação de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) em áreas de Cerrado**. 2001. 112p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.