



UNIVERSIDADE DA INTEGRAÇÃO INTERNACIONAL DA LUSOFONIA AFRO-BRASILEIRA
INSTITUTO DE DESENVOLVIMENTO RURAL - IDR
BACHARELADO EM AGRONOMIA

LENIN PEREIRA BARROS

DIVERSIDADE GENÉTICA EM ACESSOS DE AMENDOIM

REDENÇÃO/CE
DEZEMBRO - 2017

LENIN PEREIRA BARROS

DIVERSIDADE GENÉTICA EM ACESSOS DE AMENDOIM

Trabalho de conclusão de curso apresentada ao Curso de Graduação em Agronomia da Universidade Internacional da Integração da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB) como requisito parcial à conclusão do curso.

ORIENTADOR: Prof. D.Sc Lucas Nunes da Luz.

COORIENTADOR: Profª. DSc Patrícia do Nascimento Bordallo.

REDENÇÃO/CE
DEZEMBRO - 2017

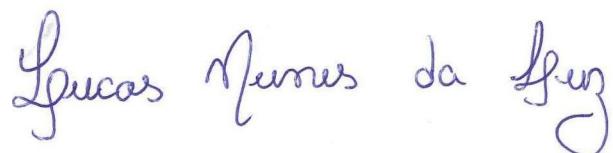
LENIN PEREIRA BARROS

DIVERSIDADE GENÉTICA EM ACESSOS DE AMENDOIM

Trabalho de conclusão de curso apresentada
ao Curso de Graduação em Agronomia da
Universidade da Integração Internacional da
Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB) como
requisito parcial à conclusão do curso.

Aprovada em: 22/12/2017.

BANCA EXAMINADORA



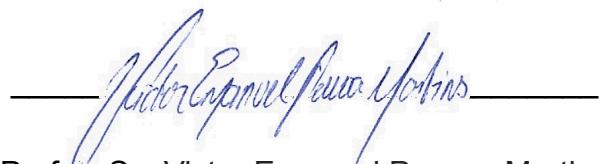
Prof. D.Sc Lucas Nunes da Luz (Orientador)

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-brasileira (UNILAB).



Prof. D.Sc Júlio César do Vale Silva

Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. D.Sc. Victor Emanuel Pessoa Martins

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-brasileira (UNILAB).

Redenção – CE
AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo apoio e manutenção financeira na Universidade, em especial a minha tia Ângela.

Ao Prof. Dr. Lucas Nunes da Luz, pela excelente orientação.

A Dr^a Patricia do Nascimento Bordallo, que me concedeu seu tempo e auxilio de pronto sempre que necessário, pelos excelentes conselhos, reflexões, críticas e sugestões recebidas.

Aos professores participantes da banca examinadora Dr. Júlio César do Vale Silva e Dr. Victor Emanoel Pessoa Martins pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Aos colegas do grupo de pesquisa, pelo auxilio na etapa realizada em campo, pela amizade e pelo tempo valioso o qual passamos juntos.

À minha companheira, Socorro Távora, que sempre me apoiou psicologicamente e por vezes contribuiu na execução de minhas atividades.

“A sabedoria é um adorno na prosperidade e
um refúgio na adversidade.”

Aristóteles.

RESUMO

O amendoim, *Arachis hypogaea* L., está entre as principais culturas agrícolas mundiais no seguimento das oleaginosas. A área plantada no Brasil no ano agrícola 2016/2017 superou os de 129 mil hectares com produção de 466,2 mil toneladas, aumento de 13% em relação à safra anterior. A região Nordeste é a segunda maior região produtora e consumidora de amendoim do Brasil, com um consumo maior que 50 mil t/ano, contudo, a produção da região é estimada em de 10,9 mil t/ano. A baixa produtividade das lavouras na região nordeste é a principal justificativa para o melhoramento, este, por sua vez, depende do uso da variabilidade genética existente dos acessos guardados nos bancos de germoplasma. Este trabalho teve como objetivo identificar genitores contrastantes e duplicatas em uma coleção de germoplasma. Foram utilizados 15 marcadores moleculares ISSR para estimar as distâncias entre os acessos avaliados. Utilizou-se o índice de Jaccard para se obter a dissimilaridade entre os acessos, com base polimorfismos amplificados por PCR. A dissimilaridade foi projetada por meio do método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Average). Do total de quinze (15) iniciadores que foram utilizados nesse trabalho, treze (13) produziram amplificação. Entre esses, dez (10) apresentaram bandas polimórficas, representando 66% do total de primers ISSR testados. Foram produzidas um total de 58 bandas, entre essas 26 foram polimórficas enquanto 32 monomórficas, representando uma taxa de 45% de polimorfismo. Obteve-se uma média de 2,6 bandas polimórficas por iniciador. Os primers UBC 841 e UBC 842 foram os mais responsivos pela diferenciação dos acessos com maior número de bandas polimórficas. O amendoim cultivado apresenta um baixo índice de polimorfismo com a utilização de marcadores moleculares, sendo necessário a utilização de uma grande quantidade de iniciadores para diferenciar de forma exitosa os acessos de coleção de germoplasma.

Palavras-chave: *Arachis hypogaea*. Variabilidade genética. Marcadores moleculares.

ABSTRACT

Peanuts, *Arachis hypogaea* L., are among the world's major agricultural crops for oilseeds. The area planted in Brazil in the agricultural year 2016/2017 exceeded those of 129 thousand hectares with production of 466.2 thousand tons, an increase of 13% over the previous harvest. The Northeast region is the second largest peanut producing and consuming region in Brazil, with a consumption of more than 50 thousand t/year, however, production in the region is estimated at 10.9 thousand t/year. The low productivity of the crops in the northeast region is the main justification for the breeding, this, in turn, depends on the use of the existing genetic variability of the accesses stored in the germplasm banks. This work aimed to identify contrasting parents and duplicates in a germplasm collection. 15 molecular markers were used to estimate the distances between the accesses evaluated. The Jaccard index was used to obtain the dissimilarity between the accessions, based on PCR amplified polymorphisms. The dissimilarity was projected using the UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Average) method. From the fifteen (15) primers that were used in this work, thirteen (13) produced amplification. Among these, ten (10) presented polymorphic bands, representing 66% of the total ISSR primers tested. A total of 58 bands were produced, of which 26 were polymorphic while 32 were monomorphic, representing a 45% polymorphism rate. An average of 2.6 polymorphic bands per primer was obtained. The primers UBC 841 and UBC 842 were the most responsive for the differentiation of the accesses with greater number of polymorphic bands. The cultivated peanut has a low polymorphism index with the use of molecular markers, requiring the use of a large number of primers to successfully differentiate germplasm collection accesses.

Key words: *Arachis hypogaea*. Genetic variability. Molecular marker.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1	A cultura do amendoim.....	16
2.2	Variabilidade genética.....	18
2.3	Melhoramento do amendoim no Brasil.....	19
2.4	Marcadores moleculares.....	20
2.5	Marcadores moleculares ISSR.....	21
3	METODOLOGIA.....	22
3.1	Localização e etapas do experimento.....	22
3.2	Delineamento experimental, tratamentos e condução do experimento.....	22
3.3	Análise de dados.....	23
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
5	CONCLUSÃO	28
6	REFERÊNCIAS.....	29
	APÊNDICE A-QUANTIFICAÇÃO E DILUIÇÃO DE AMOSTRAS DNA	36

1. INTRODUÇÃO

O amendoim, *Arachis hypogaea* L., está entre as principais culturas agrícolas mundiais no quesito produção de óleo (43.20 milhões de toneladas), ocupando a quarta posição atrás da soja (344.67 milhões de toneladas), colza (72.58 milhões de toneladas) e girassol (46.58 milhões de toneladas). Em quinto lugar tem-se o algodão (42.42 milhões de toneladas) encerrando as cinco maiores oleaginosas cultivadas no mundo (USDA 2017).

Na via oposta da baixa demanda e abrangência do consumo de óleo de amendoim no Brasil e nos países ocidentais, o consumo de grãos tem demanda crescente para o segmento de confeitoraria, indústria de *snacks*, doces e inclusive para o consumo *in natura*. Apesar do consumo do amendoim ser regular no Brasil, há a tendência de picos de consumo em épocas do ano como os meses de junho a agosto. Em especial, na região nordeste, esta é comprovada pela oscilação de preços nas centrais de distribuição (CEASA/CE, 2017).

A área plantada no Brasil no ano agrícola 2016/2017 superou os de 129 mil hectares com produção de 466,2 mil toneladas, aumento de 13% em relação à safra anterior. A produtividade média nacional é de 3.606kg/ha. A região Nordeste, segunda região produtora do país, fica aquém desse patamar com produtividade média de 1.202 kg/ha (CONAB, 2017).

A baixa produtividade das lavouras na região nordeste é a principal justificativa para o melhoramento. De outro modo, acrescenta-se que até presente momento se tem cinco cultivares de amendoim registradas para a região, contudo, com adaptação mediana se levada em consideração as vastas regiões com possibilidade de cultivo. Por vezes, tais cultivares são dependentes de um sistema de cultivo mais tecnificado que nem sempre está à disposição da agricultura familiar e/ou dos agricultores que desejam praticar manejo agroecológico nos seus sistemas agrícolas.

Em termos de renda, não obstante a baixa produtividade atual da região nordeste, nota-se que a cultura é extremamente rentável se comparada a culturas tradicionais como milho e feijão tendo vista que a saca de 25kg de amendoim em casca é vendida R\$ 109,56 na Ceagesp/SP (CEAGESP, 2017) e chega 120,00 no Ceasa/PE (CEASAPE, 2017). Não há registro de preços recentes de amendoim no Ceasa/CE. Acredita-se que tal fato se deva a questão do cultivo de amendoim no Ceará está centralizado na região do cariri cearense, sendo sua pequena oferta absorvida de modo local.

O melhoramento genético depende em sua totalidade da magnitude da variabilidade genética existente nas populações (NEITZKE, 2010). Bancos ou coleções de germoplasma são uma fonte de acesso ao patrimônio genético e a variabilidade genética existente na

espécie. Estes por sua vez devem ser caracterizados pois são a base do desenvolvimento de novas cultivares, já que para tal atividade é necessário conhecer bem a variabilidade genética disponível para que assim possa realizar os procedimentos cabíveis para identificar acessos promissores para o melhoramento (BURATTO, 2016).

Para que seja possível conhecer as divergências existentes entre os diferentes acessos de uma espécie, que não sejam estas apenas através de estimativas de características morfológicas, é necessário a utilização de tecnologias capazes de acessar o polimorfismo do DNA, como o uso de marcadores moleculares.

Os marcadores moleculares são ferramentas capazes de revelar diferenças a nível de genoma. Essa tecnologia tem a capacidade de identificar os genes ou regiões próximas a genes envolvidos nas principais características agronômicas, sendo capaz de identificá-las ainda em populações segregantes reduzindo-se assim o tempo de seleção. Nesse tocante, existem diversos marcadores moleculares e seu uso depende do objetivo e do objeto de estudo. A utilização do método adequado é etapa essencial no melhoramento de plantas e no estudo genético.

A identificação a nível molecular auxilia na gestão de bancos de germoplasma, já que contribui para a identificação de duplicatas que causam dispêndios financeiros, físicos e humanos desnecessários que poderiam ser destinados a conservação de outros acessos (MARIM et al, 2010). Outra alternativa interessante derivada do uso de marcadores é a regularização de uma cultivar após seu desenvolvimento, sendo de fundamental importância quando pretende-se proteger a mesma. Convencionalmente, utiliza-se de descritores morfológicos para identificá-la, porém, com a utilização de marcadores moleculares é possível a obtenção do *fingerprinting* do material (GUIMARÃES, 2009).

Um tipo de marcador eficaz e de baixo custo é o ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*). Estes marcadores vêm sendo empregados em programas de melhoramento para a diferenciação rápida entre acessos de mesma espécie, devido ao elevado grau de polimorfismo, reproduzibilidade e baixo custo (SANTANA et al., 2011), além de não necessitar de conhecimento prévio do genoma (GONZALEZ et al., 2000). São excelentes ferramentas para a gestão de bancos de germoplasma e para mensuração da variabilidade de acessos ou populações (SANTOS et al., 2013).

Neste trabalho, buscou-se estimar a diversidade genética em 59 acessos de amendoim banco de germoplasma da Unilab via marcadores ISSR.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A cultura do amendoim.

O gênero *Arachis* é pertencente à família *Fabaceae*, caracterizado por ser uma leguminosa dicotiledônea cujos ginóforos, estruturas responsáveis por ligar a planta ao eixo floral, possui geocarpia obrigatória, fazendo as sementes completarem seu desenvolvimento no solo. (SANTOS, 1993).

O amendoim cultivado está presente em mais de 80 países das Américas, Ásia e África (MORETZSOHN et al., 2004). A espécie *A. hypogaea* é classificada conforme a ausência ou a presença de flores no eixo principal em duas subespécies, *hypogaea* e *fastigiata*. Outra padronização adotada para o amendoim é classificação agronômica via caracteres vegetativos e reprodutivos. Tem-se três grupos agronômicos a saber: Valência, Spanish e Virgínia (GODOY et al, 1999). No Brasil os grupos mais expressivos em plantios comerciais são o Valência com 60% da produção e o Virgínia, o grupo Spanish é o menos expressivo. (GODOY et al, 2003; PEZZOPANE, 2009).

Seu consumo pode ser realizado *in natura* ou passar por processos de industrialização sendo transformado em pasta e farinha para consumo com outras fontes alimentícias (DUARTE, 2008). Por ser rico em proteína faz parte da composição alimentar de países em desenvolvimento. Na China, 60% do amendoim produzido é utilizada para extração de óleo (ZHANG et al., 2012).

No ranking mundial de produção de oleaginosas o amendoim ocupa a quarta posição. A produção em milhões de toneladas do ano de 2017 para as principais oleaginosas são: soja 344.67; colza 72.58; girassol 46.58; amendoim 43.20; algodão 42.42 (USDA 2017).

Apesar de ser uma cultura originária da América do Sul, o amendoim tem como seu principal produtor a China, contemplando o primeiro lugar no ranking em termos de produtividade e rentabilidade. Já o Brasil ocupa o 17º lugar (FAOSTAT, 2012). Apesar desta colocação o Brasil, de modo geral, tem índices produtivos próximos aos chineses, mesmo com pouca área destinada à produção. O cultivo do amendoim no Brasil é concentrado principalmente região Centro-Sul do país, correspondendo a 98,8% da produção nacional (CONAB, 2017).

Com uma área de 129,3 mil hectares no intervalo 2016-2017 a produção brasileira foi de 466,2 mil toneladas, um aumento de quase 13% em relação à safra anterior. Com uma produtividade de 3.606kg/ha (CONAB 2017). A região Nordeste fica aquém desse patamar, com produtividade de 1.202 kg/ha (CONAB, 2017) com uma safra anualmente.

De acordo com dados da Embrapa (2014), o Nordeste é a segunda maior região consumidora de amendoim do Brasil, com um consumo maior que 50 mil t/ano. Quando esses dados são confrontados com a produção local de 10,9 mil t/ano (CONAB, 2017). É perceptível a existência de demanda insatisfeita, já que todo o restante é importado de outras regiões. Uma forma simples de se checar tal demanda é observando os dados de entrada de produto no sistema online disponibilizados pela CEASA. Em consulta rápida ao sistema para os CEASA do Pernambuco e Ceará nota-se que o produto que entra nos respectivos estados é proveniente do estado de São Paulo.

Ainda segundo dados da Embrapa em 2013 pagava-se R\$ 2,30 pelo quilograma do amendoim *in natura* aos pequenos produtores da região Nordeste, sendo que nos pontos comerciais próximos, o amendoim “torrado e salgado sem pele” era vendido por R\$ 18,76.

A partir dos dados supracitados é possível deduzir que o produtor está sendo mal remunerado pela sua produção, principalmente devido à falta de técnica para beneficiamento do grão. Inserir a cultura do amendoim na região do Maciço de Baturité passa também pelo estímulo à construção de uma cadeia produtiva que qualifique os produtores.

O amendoim é uma cultura que pode ser produzida em climas semiáridos e áridos, como é o caso das principais regiões produtoras do mundo, África e Ásia (GODOY et al. 2004). Para região Nordeste variedades de ciclo curto já demonstraram ser adaptadas e produtivas (SANTOS et al. 1999; NOGUEIRA e SANTOS, 2000).

Em estudos comparativos realizados por Santos et al. (2010) com 13 cultivares de amendoim no Semiárido Nordestino, os cultivares de porte ereto demonstraram maior adaptabilidade.

A produtividade do amendoim em regiões semiáridas é altamente variável em relação a distribuição e volume da lâmina de água aplicada, com a utilização de lâminas de 300 a 700 mm obteve-se produtividades de 970 kg.ha até 3235kg.ha do grão em casca para o amendoim CV. BR1. (SILVA, 1998). Além de possuir variabilidade genética para resistência ao estresse hídrico passível de ser incorporada em programas de melhoramento, o amendoim tem outras características que podem auxiliar na soberania alimentar, como a habilidade de responder positivamente ao consórcio com outras culturas.

Há uma maior produtividade do sorgo quando plantado em sistema consorciado com o amendoim (ALTIERI, 2012). O amendoim quando aliado às tecnologias voltadas para o beneficiamento pós-colheita, pode contribuir com a renda, bem-estar social e econômico. (CARVALHO, 2016).

Para que seja possível produzir a nível satisfatório nas regiões em que se encontram as famílias que podem se beneficiar do cultivo desta cultura, é necessário além de avanços tecnológicos difundidos localmente, também se desenvolvam cultivares mais adaptadas ao ambiente. Principalmente para regiões com características tão específicas como a região Nordeste, que é contemplada em grande parte pelo clima semiárido (PEREIRA, 2007).

2.2 Variabilidade genética.

Existem divergências sobre o local específico do surgimento do amendoim cultivado. Sabe-se hoje que ele surgiu na América do Sul. Entre os possíveis centros de origem estão o norte da Argentina, sul da Bolívia, Peru e o Brasil, especificamente na região Centro-Oeste. Acredita-se que podem existir mais de um centro ocorrendo ao mesmo tempo, fato evidenciado devido à variedade de amendoim encontrada na bacia do rio Xingu, com material genético distinto da variedade cultivada (FREITAS, 2003).

Sabe-se que o amendoim é uma alopóliploide, ou seja, é resultante de cruzamento entre espécies distintas, o que resultou em um híbrido estéril, que com material genético duplicado por mutação natural restabeleceu sua fertilidade. O homem entra selecionando estes mutantes por possuírem características de interesse na época, favorecendo a disseminação dessa nova espécie (FREITAS, 2003).

Por ser cleistogâmico, o amendoim realiza autofecundação, produzindo sementes com material genético idêntico ao seu, exceto caso de cruzamentos artificiais, polinização, mutações e deleções gênicas. Essa característica não é interessante quando se pensa em variabilidade genética, já que se buscam plantas com material genético divergente para obter progêniens com características novas, sendo assim possível desenvolver cultivares superiores (SANTOS *et al.*, 2005). Para seleção de plantas superiores é necessário que exista variabilidade genética, já que a seleção não cria variabilidade, ela atua na existente. Uma parte importante do melhoramento de plantas é o processo de criação de variabilidade.

Os principais meios a qual se atribui novas variações genéticas são: a mutação; transferência horizontal; duplicação; recombinação. No entanto, são processos que ocorrem naturalmente em decorrência das mais diversas interações genótipo-ambiente e são completamente aleatórios. E por tanto, busca-se disponibilizar variabilidade genética adicional cruzando genitores divergentes, para que seja possível obter como resultado desses cruzamentos acessos que possuem características novas, através do embaralhamento de sequências de DNA por recombinação (COSTA *et al.*, 2012).

Após obtenção há a realização de cruzamento artificial entre genitores contrastantes, obtém-se uma progênie segregante e posteriormente realiza-se a autofecundação dessas progênies em conjunto ou em separado a depender do método de melhoramento a ser utilizado (BOREM, 2013).

2.3. Melhoramento do amendoim no Brasil.

Por ser um dos possíveis centro de origem do amendoim, é possível encontrar no Brasil uma ampla variabilidade de cultivares, potencializado pelo melhoramento genético. Devido ao clima diverso, as cultivares lançadas nacionalmente tendem a ter maior especificidade para alguns ambientes, se adaptando melhor em determinadas regiões.

Atualmente existem 32 cultivares de *A. hypogaea* no Registro Nacional de Cultivares, lançadas principalmente pelo Instituto Agronômico de Campinas (IAC) e a Embrapa. (MAPA, 2017).

A cultivar Runner IAC 886 é a mais utilizada em São Paulo, (EMBRAPA, 2014) principal estado produtor do Brasil (CONAB, 2017). A IAC 886 possui uma elevada produtividade, com um ciclo produtivo médio de 130 dias, para a região de São Paulo. Por possuir o hábito rasteiro sua colheita é mecanizada. Esta cultivar Descende da multilinha Florunner, de origem americana. (GODOY et al., 2003).

Apesar da IAC 886 ser um cultivar produtiva na região Sudeste, cultivares de porte rasteiro quando comparadas as de porte ereto, não apresentam boa produtividade na região semiárida. (SANTOS, 2010).

Para a região Nordeste É recomendado a utilização das cultivares BR 1, BRS 151 L-7 e BRS Havana (GOMES, 2007). Estas cultivares, tem tolerância a déficit hídrico, possuem porte ereto, ciclo inferior a 90 dias e atendem o mercado de grãos, na forma *in natura* e para indústria. A produtividade em regime irrigado pode chegar 4.500 kg/ha (EMBRAPA, 2012). Em sequeiro a produtividade média é de 3.106kg/ha para vagens e 2.068kg/ha para sementes. (GOMES, 2007).

O trabalho de melhoramento tem como um de seus fundamentais objetivos a identificação e seleção de genótipos que possuam estabilidade produtiva e capacidade adaptativa em uma boa amplitude de ambientes. Mas para selecionar genótipos superiores é necessário criar variabilidade.

Para tal o melhoramento vem lançando mão de várias técnicas para caracterizar e descrever morfológica e molecularmente os genótipos, a fim de se obter os parentais ideais para criação de variabilidade. Entre as tecnologias utilizadas para assistir o melhoramento do amendoim, está o uso de marcadores moleculares.

2.4. Marcadores moleculares.

Atualmente, as principais técnicas de melhoramento advêm da biotecnologia, utilizando do conhecimento das moléculas de DNA, através do qual foi possível desenvolver o primeiro (OGM) em 1983 (BESPALHOK et al, 1999).

A biologia molecular é uma área de ponta na biotecnologia. Utilizando marcadores moleculares para sequenciar e isolar características de interesse, bem como diferenciar as mais diversas espécies e variedades de cultivares, buscando caracterizar a nível molecular o germoplasma disponível (ALMEIDA et al., 2009).

No melhoramento genético tem-se cada vez mais buscado a seleção de plantas assistidas por marcadores moleculares, mirando uma maior eficiência em ganhos genéticos. São desenvolvidos marcadores ligados a genes de interesse e tais marcadores permitem realizar seleção de características em populações segregantes no início do melhoramento, reduzindo a necessidade de sucessivos experimentos de campo, o que reduz o tempo de desenvolvimento de novas cultivares e aumentam os ganhos genéticos (BOREM, 2013; REGITANO, 2001).

Outra vantagem da utilização de marcadores moleculares está no estudo genômico, já que com o auxílio dessa tecnologia é possível diferenciar, com elevado grau de confiabilidade, as convergências ou divergências genéticas até entre acessos de uma mesma espécie. Isso permite atinar para duplicatas em bancos de germoplasma e para seleção de genitores contrastantes para formação de progênies com alta grau de variabilidade (BOREM, 2013).

Um exemplo de um estudo que se utiliza desta técnica é o realizado por Borges (2007) que com 29 acessos de amendoim e 31 *primers* demonstraram que 12 acessos possuem 100% de similaridade, ou seja, são duplicatas no banco de germoplasma.

Os principais marcadores moleculares são: marcadores isoenzimáticos, utilizados para designar formas moleculares múltiplas de enzimas que ocorrem em um mesmo organismo e em membros da mesma espécie; marcadores RFPL (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) apresentam polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição, utilizada para identificar pedaços de DNA segmentados por uma enzima de restrição; marcadores baseados em PCR(*polymeraze chain reaction*)-primers específicos são marcadores que se baseiam na multiplicação de sítios específicos de DNA através da PCR e mostram ausência ou presença desses sítios nas amostras; marcadores RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) ampliam segmentos de DNA sem a necessidade de conhecimento prévio da sequência a ser amplificada; marcadores do tipo STS

(*Sequence-Tagged Sites*) definem sítios marcadores por sequências do material genético; marcadores do tipo SCAR(*Sequence Characterized Amplified Regions*) são marcadores amplificados com uso de primers específicos, desenvolvidos a partir de áreas já mapeadas; marcadores microssatélites SSR (*simple sequence repeat*) se utilizam de segmentos de DNA com material repetitivo para flanquear determinados segmentos de DNA; o marcador tipo ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) se anela a sequências de bases nitrogenadas que ficam entre os segmentos de DNA com bases repetitivas. (BOREM, 2013).

2.5. Marcadores moleculares ISSR.

O genoma dos seres eucariotos é altamente repetitivo, com grandes segmentos não codantes (LITT & LUTY, 1989). Dentro de uma espécie ou variedade, essas sequências repetitivas podem ser idênticas entre seres distintos, ou totalmente diferentes, por mais que estes tenham semelhanças morfológicas (BOREM, 2013).

Os marcadores ISSR constituem uma das classes mais polimórficas de marcadores disponíveis. Em um trabalho realizado por KUMAR(2016) foram testados 95 primers UBC para *E. ferox* onde se obteve uma média de 82,6% de polimorfismo, variando de 50 a 100% . Estes marcadores utilizam-se dos espaços entre duas regiões microssatélites invertidas para delimitar a área de amplificação do DNA. (BOREM, 2013).

A vantagem da utilização de marcadores ISSR sobre as demais técnicas de marcadores moleculares é que estes possuem uma boa taxa de reprodutibilidade, além de serem relativamente acessíveis economicamente. Em pinhão Manso (*Jatropha curcas L.*) obteve-se uma taxa média de reprodutibilidade de 83% utilizando primer ISSR em diferentes termocicladores. (MENDES, et al, 2012).

Devido ao fato de se utilizar de espaços flanqueados por microssatélites, um primer desenvolvido para uma espécie pode ser utilizado em outra, já que os microssatélites estão presentes em todas as espécies de seres eucariotos. Sendo assim, é possível fazer seleção comparativa, utilizando *primers* descritos em outros estudos. (BOREM, 2013).

Marcadores tipo ISSR são capazes de identificar a variabilidade genética mesmo que essa seja intraespecífica. (LORENZI *et al*, 2014).

Esses marcadores se utilizam da reação PCR em qual o segmento de DNA em qual o primer se anela é ampliado em escala geométrica, não sendo necessário muito material genético para iniciar a reação. Como resultado é obtida uma matriz binária, de ausência ou presença de um segmento de DNA entre os acessos. (MILACH, 1998).

3 METODOLOGIA

3.1 Localização e etapas do experimento

O trabalho foi realizado em duas etapas, campo e laboratório. A etapa de campo foi realizada na Fazenda experimental da UNILAB (Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-brasileira), que fica situada a 17 Km do Campus da Liberdade, localizando-se no município de Redenção-CE, distrito de Barra Nova, na localidade de Piroás, a uma latitude de 04°14'53" S, longitude de 38°45'10" W, com uma altitude de 340 m, o sítio possui 33 hectares e é utilizada para atividades de ensino, pesquisa e extensão da UNILAB.

A região do maciço de Baturité possui uma pluviosidade média de 600mm anuais, com evaporação próximo a 2000 mm anuais (INMET, 2017). Na região do Sítio de Piroás a média da precipitação dos anos de 2014 e 2015 que foram anos de escassez hídrica na região semiárida, é superior aos 1000 mm anuais, bem acima da média da região (UNILAB, 2016).

A etapa laboratorial foi realizada na sede da Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) Agroindústria Tropical, laboratório de Biologia Molecular, localizada na Rua Dra. Sara Mesquita, 2270 - Pici, Fortaleza - CE, 60020-181.

3.2 Delineamento experimental, tratamentos e condução do experimento.

No Sítio Piroás foram cultivados 59 acessos intraespecíficos de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) oriundos do banco de germoplasma da UFC cedidos a Unilab. Desses 39 estão sendo utilizados neste trabalho (tabela 1).

Tabela 1: Acessos, dados de procedência e alguns descritores fenotípicos.

Acessos	Procedência	Grupo Botânico	Cor da semente
EAC 2	Ceará	Valencia	-
EAC 4	CCA/UFC	Valencia	-
EAC 8	Índia	Valencia	-
EAC 20	CCA/UFC	Valencia	-
EAC 26	Índia	Valencia	-
EAC 28	CCA/UFC	Valencia	-
EAC 32	EPACE	Valencia	-
EAC 33	EPACE	Spanish	-
EAC 34	EPACE	Spanish	-
EAC 35	EPACE	Valencia	-
EAC 38	EPACE	Spanish	-
EAC 41	Estados Unidos	Spanish	-
EAC 49	CCA/UFC	Valencia	-
EAC 50	Senegal	Spanish	-

EAC 57	Nigéria	Virgínia	-
EAC 59	Índia	Valencia	-
EAC 61	Estados Unidos	Virgínia	-
EAC 62	Índia	Virgínia	-
EAC 70	CCA/UFC	Virgínia	-
EAC 73	CCA/UFC	Valencia	-
EAC 77	EPACE	Virgínia	-
EAC 107	Bahia	Virgínia	Vermelho
EAC 111	Senegal	Virgínia	Rósea
EAC 112	Bahia	Virgínia	Creme
EAC 114	Senegal	Spanish	Creme
EAC 115	São Paulo	Valência	Vermelha
EAC 116	Argentina	Spanish	Rósea
EAC 117	Campina Grande	Valencia	Vermelha
EAC 118	África	Spanish	Creme
EAC 120	África	Spanish	Creme
EAC 121	África	Spanish	Creme
EAC 122	África	Virgínia	Rósea
EAC 124	IAC (SP)	Virgínia	Creme
EAC 125	Argentina	Valencia	Vermelha
EAC 128	CNPA (PB)	Virgínia	Rósea
EAC 130	IAPAR (PR)	Valencia	Roxo
EAC 135	Espanha	Spanish	Creme
EAC 137	Espanha	Spanish	Creme
EAC 138	Espanha	Spanish	Rósea

Os acessos aqui cultivados foram utilizados para descrição morfoagronômicas em outros trabalhos. Vinte dias após o plantio, foram colhidas 6 folhas de cada acesso, em duplicata, totalizando 12 folhas por acesso. Foram escolhidas folhas jovens ou parte do meristema apical, pois está parte possui uma menor quantidade de compostos fenólicos, a presença de tais compostos interfere no anelamento dos primers na realização da PCR.

As amostras foliares coletadas foram imediatamente submetidas a um resfriamento e posterior congelamento, para que não entrassem no processo de degradação por ação das DNases. As amostras coletadas foram identificadas, embrulhadas em papel alumínio e acondicionadas em gelo para conservar as amostras durante o translado para o laboratório de biologia molecular da EMBRAPA, onde as amostras foram armazenadas a -20°C.

Em laboratório foi realizada a extração de DNA baseado no método de Doyle & Doyle (1987), resumidamente descrito a seguir: Inicialmente, as folhas foram congeladas utilizando nitrogênio líquido e maceradas em cadinho com auxílio do pistilo até que se obteve um pó

fino; Em seguida, o pó foi depositado em um tubo de 2 mL onde se adicionou 700 μ l de tampão de extração (CTAB 2%: 1% de PVP; EDTA 0,5M; NaCl 5M; TRIS-HCL 1M, pH= 8; 2-mercaptoetanol 2%) pré aquecido; Logo após os tubos foram agitados em vórtex e incubados em banho maria a 65°C por 1 hora, agitados a cada 10 minutos para homogeneizar a solução. Após este período as amostras foram resfriadas a temperatura ambiente e adicionou-se 1 volume de Clorofórmio-álcool Isoamílico (24:1) e os tubos foram gentilmente invertidos por 10 minutos para obtenção de uma emulsão. Após essa etapa, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos para separar a fase sólida da fase aquosa, pipetou-se a fase aquosa superior e a depositou em um tubo de 1,5 mL; Adicionou-se 0,6 volume de isopropanol gelado que foi misturando através da inversão do tubo até o DNA precipitar; A amostra foi centrifugada a 12.000 rpm por 20 minutos, o DNA precipitado formou um pellet no fundo do tubo; Descartou-se cuidadosamente o sobrenadante e adicionou-se 300 μ l etanol 70% ao tubo, este foi centrifugado por 3 minutos a 12.000 rpm e descartou-se novamente o sobrenadante, secou-se a amostra em temperatura ambiente e a mesma foi ressuspensa (eluída) em água ultra pura.

As amostras de DNA extraídas foram quantificadas no NanoDropTM 2000/c Spectrophotometers by Thermo Fisher Scientific. A partir da quantificação foi realizada a diluição das amostras para uma concentração padrão de 10 nanogramas (ng) por microlitro (ul) (Apêndice A), descartou-se amostras que apresentaram contaminação as quais poderiam interferir na reação de PCR.

Após a diluição do DNA foram utilizados 10 marcadores moleculares tipo ISSR (Tabela 2) desenvolvidos pela *University of British Columbia* (UBC) para amplificar através da PCR fragmentos de DNA.

A PCR foi conduzida seguindo a metodologia utilizado por Santos (2013), com as devidas adaptações. Para cada reação de PCR utilizou-se 12,5 μ l de *Gotaq Green Master Mix* (Promega) na concentração final de 1X; 1 μ l de primer na concentração final de 0,4 M; 2 μ l de DNA na concentração de 10ng/ μ l; 9,5 μ l de água ultrapura totalizando um volume final de 25 μ l por reação.

As reações foram realizadas utilizando-se o termociclador c/ gradiente (mod. veriti 96-well). A reação se seguiu com uma desnaturação inicial a 94 °C por 4 min, seguido por 35 ciclos com de 1 min de desnaturação a 94 °C, 1 min de anelamento com temperatura variável de acordo com o primer utilizado e 1 min de extensão a 72 °C e por último um ciclo de extensão final a 72 °C por 7 min. A reação de PCR foi realizada inicialmente com 96 amostras de DNA, devido a não amplificação de algumas amostras, fez-se necessário o descarte das

mesmas, ficando com um total de 59 amostras.

Tabela 2. Primers, temperatura de anelamento e sequência das bases nitrogenadas

Primers	Temperatura de anelamento °C	Sequência das bases nitrogenadas
808	48,8	<i>AGA GAG AGA GAG AGA GC</i>
822	47	<i>TCT CTC TCT CTC TCT CA</i>
834	49,2	<i>AGA GAG AGA GAG AGA GYT</i>
884	46,1	<i>HBH AGA GAG AGA GAG AG</i>
842	48,8	<i>GAG AGA GAG AGA GAG AYG</i>
812	45,7	<i>GAG AGA GAG AGA GAG AA</i>
813	45,7	<i>CTC TCT CTC TCT CTC TT</i>
841	49,2	<i>GAG AGA GAG AGA GAG AYC</i>
880	47,9	<i>GGA GAG GAG AGG AGA</i>
807	47	<i>AGA GAG AGA GAG AGA GT</i>

Bases degeneradas: Y= C, T; R= A, G; H= A, C, T; B= C, G, T.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O resultado da PCR foi analisado através da eletroforese em gel de Agarose 1,2% em um volume de 400 mL de tampão TBE 1X e 40µl de Brometo de Etídio na concentração de 10mg/mL. A agarose foi diluída em tampão TBE 1X e aquecida até próximo a temperatura de ebulição. Diluída a agarose a solução foi resfriada a 50°C e adicionou-se o brometo de etídio. Em seguida, o gel foi posto para polimerizar em cuba com os pentes (Figura 1).



Figura 1: Imagem, gel de agarose polimerizado.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Com o gel polimerizado, os pentes foram retirados e o gel colocado em uma cuba de eletroforese horizontal ligada a uma fonte de energia. As amostras amplificadas no termociclador foram depositadas nos espaços deixados após a remoção do pente com o auxílio de uma pipeta. Nas extremidades de cada pente, foi adicionado um marcador de peso específico conhecido de 1 Kb (Ladder da Promega). A eletroforese ocorreu em cerca de 120 minutos a uma voltagem de 140 Wtts e uma amperagem de 200A.

O resultado foi observado utilizando o fotodocumentador L PIX CHEMI, onde através da quimiluminescência pode-se observar o resultado da amplificação. Os fragmentos de DNA que foram amplificados formando bandas ao longo do gel (Figura 2).

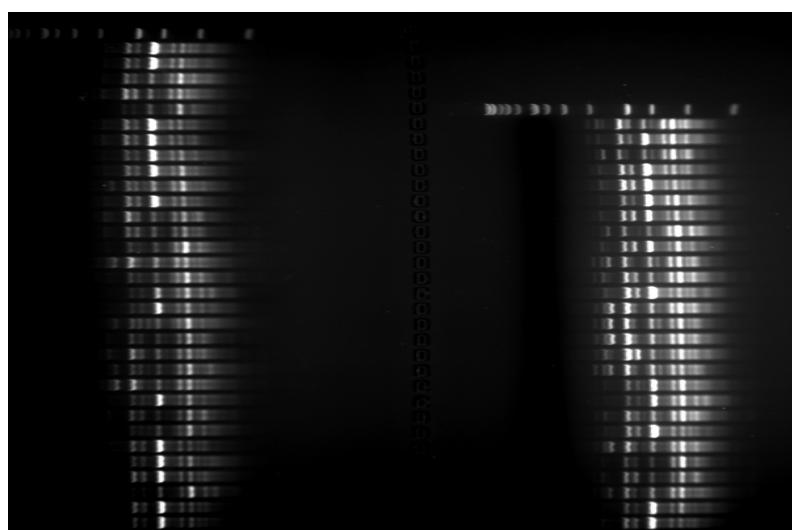


Figura 2. Resultado da amplificação com o primer UBC 841 fotodocumentado em

transluminador.

3.3 Análise de dados.

Os fragmentos de ISSR amplificados foram tratados como dominantes (SOUSA, 2008), os resultados da amplificação foram transformados em informação binária, onde foi atribuído (0) para ausência de banda e (1) para presença, procedimento realizado para todos os acessos com todas as bandas nítidas do gel. Posteriormente foi realizado uma reanálise dos dados obtidos, descartando-se bandas que não se apresentaram nítidas ou falharam em algum dos acessos avaliados. Com o intuito de garantir a reproduzibilidade do trabalho.

Para a obtenção da dissimilaridade genética entre os 59 acessos foi utilizado o complemento de similaridade do índice de Jaccard, com base nas bandas polimórficas geradas por PCR com a utilização de marcadores ISSR. As dissimilaridades genéticas foram utilizadas para obtenção de um dendograma representativo da divergência genética entre os acessos. O dendograma foi gerado através do método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Average). Foi estimando o coeficiente de correlação cofenética (CCC) para verificar o ajustamento entre matriz residual e a matriz de distâncias.

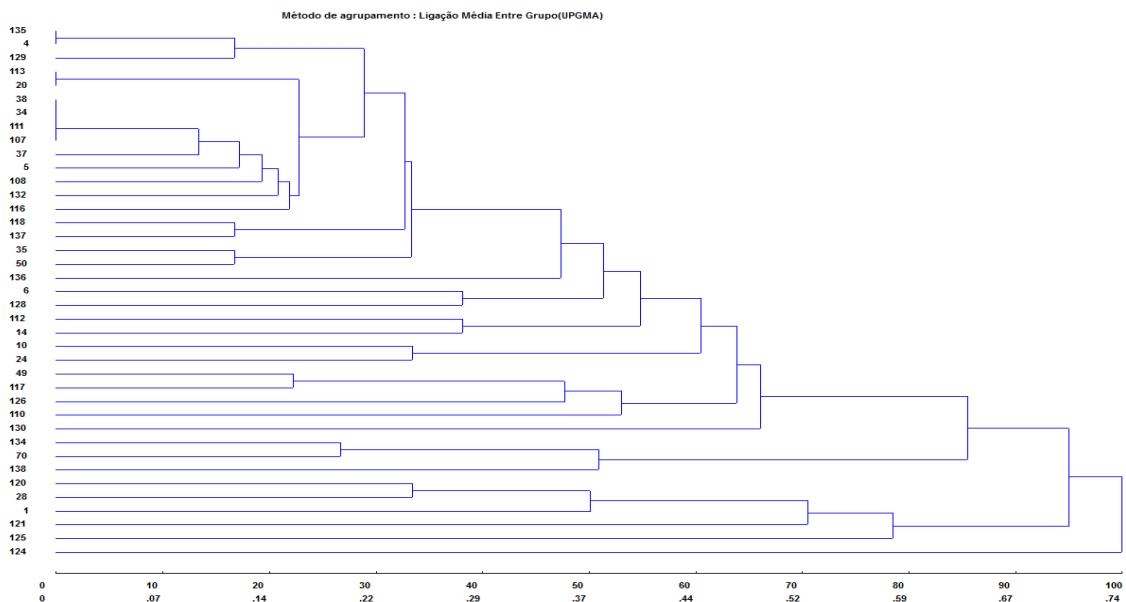
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.

Do total de quinze (15) iniciadores da UBC que foram utilizados nesse trabalho, treze (13) produziram amplificação (UBC 808, UBC 809, UBC 812, UBC 842, UBC 835, UBC 884, UBC 813, UBC 807, UBC 880, UBC 834, UBC 861, UBC 822, UBC 841). Entre esses, dez (10) apresentaram bandas polimórficas, representando 66% do total de primers ISSR testados.

Foram produzidas um total de 58 bandas, entre essas 26 foram polimórficas enquanto 32 não, representando uma taxa de 45% de polimorfismo. Obteve-se uma média de 2,6 bandas polimórficas por iniciador. Os primers UBC 841 e UBC 842 foram os mais responsivos pela diferenciação dos acessos com maior número de bandas polimórficas. Resultado condizente com o de SANTOS (2013), no qual o primer 842 também teve maior representatividade na diferenciação dos acessos.

Os primers que apresentaram maior taxa de polimorfismo possuem sequências de base nitrogenada GA e ATT, corroborando com o trabalho de FERGUSON (2004) que demonstrou em SSR que a presença dessas sequências em iniciadores resulta em maiores taxas de polimorfismo em amendoim.

Em outros trabalhos como o de BORGES (2007) utilizando marcadores RAPD para análise da variabilidade genética entre acessos de amendoim com 31 iniciadores, obteve-se 12(39%) primers polimórficos. Fazendo um comparativo não estatístico é possível deduzir que nesse estudo os primers ISSR demonstraram-se mais polimórficos.



mesmo com a utilização de diferentes tipos de iniciadores. (BORGES, 2007; LANHAM, 1994; LACKS, 1993). Em contraponto REN (2014) utilizando cento e quarenta e seis marcadores (146) SSR para avaliar a diversidade genética de cento e noventa e seis (196) cultivares de amendoim plantados em diferentes regiões da China, conseguiu associar a distribuição geográfica dos acessos com a formação dos agrupamentos, mesmo com uma estreita base genética. No entanto essa diferenciação só possível devido ao grande número de bandas polimórficas geradas, em um total de 440.

Os resultados desse trabalho estão de acordo com os de (REN, 2014; MORETZSOHN et al., 2004, 2005;) que relatam baixo polimorfismo molecular de *Arachis hypogaea L.* mesmo com a utilização de marcadores com maior índice de polimorfismo.

Os marcadores ISSR em outras culturas como o umbu-cajazeira e o biribazeiro, apresentaram respectivamente 80% e 81,3% bandas polimórficas (SANTANA, 2011; LORENZONI, 2014). Não sendo por tanto os primers utilizados responsáveis pela baixa taxa de bandas polimórficas.

A baixa diferenciação entre os acessos pode estar ligada ao surgimento da espécie. O amendoim cultivado é uma espécie relativamente recente. Devido seu modo de reprodução e por ser tetraploide quando a maioria das espécies silvestres são diploides, dificultando o fluxo gênico entre espécies.

As atividades de melhoramento se utilizam pouco do cruzamento interespecífico do gênero *Arachis*, o que deve estar relacionado a barreira biológica e a presença de características desfavoráveis nas espécies silvestres. (MORETZSOHN et al, 2004; LEAL-BERTIOLI, 2009). Características estas que influenciam a diversidade genética acessível no amendoim cultivado.

Apesar da presença de acessos com 100% de similaridade, 31 (79,5%) dos 39 acessos estudados apresentaram algum nível dissimilaridade, com a formação de diversos grupos. O grupo A (imagem 4) agrupou a maioria dos acessos do grupo botânico Spanish, apesar de entre as duplicatas existirem acessos dos 3 grupos botânicos: Spanish, Virginia e Valência.

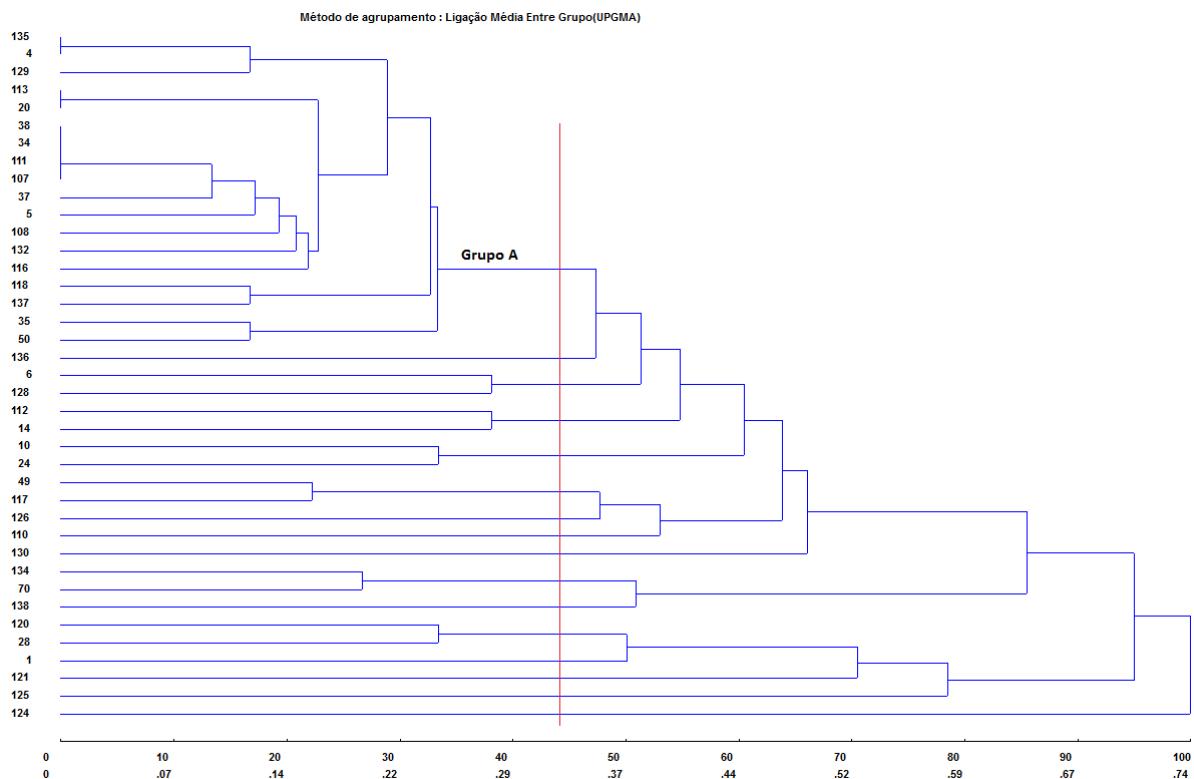


Imagen 4. Corte A do dendograma de dissimilaridade, Grupo A.

No demais cortes do dendograma não houve separação dos acessos de acordo com o grupo botânico, mas houve predominância do Virginia e Valência.

A agregação do grupo A pode significar que os primers utilizados amplificaram regiões que estão ligadas as características que distinguem o grupo Spanish dos demais, no entanto, não foi capaz de agregar todos os acessos desse grupo botânico, sendo necessário a utilização de um número maior de iniciadores para verificar essa afirmativa.

Sem levar em consideração o grupo botânico, os acessos podem ser divididos em quatro (4) grupos, (Imagen 5). Dessa forma facilitando a escolha de genitores para posterior cruzamento.

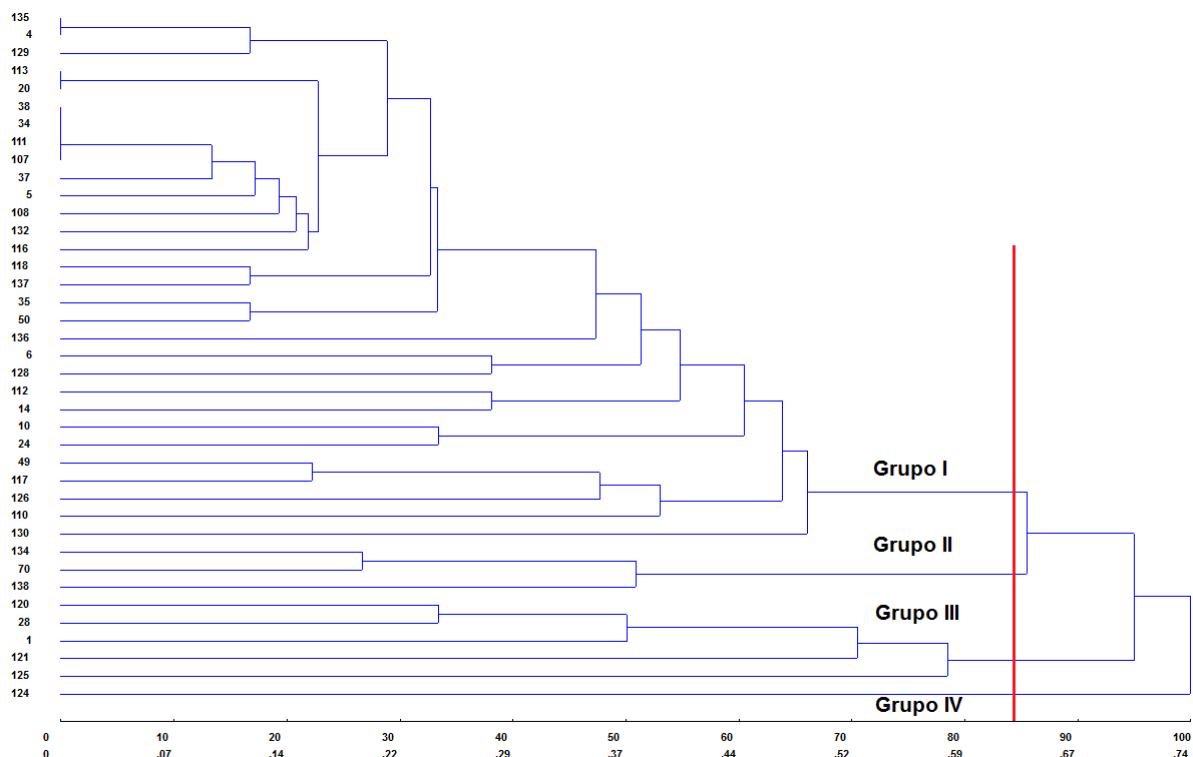


Imagen 5. Corte B do dendograma de dissimilaridade, Grupos I, II, III e IV.

Os quatro grupos formados foram divididos da seguinte forma: Grupo I sendo o mais representativo com trinta (30) acessos; Grupo II com três (3) acessos; Grupo III com cinco (5) acessos; Grupos IV contando com um (1) acesso.

Com base nos resultados obtidos é possível a seleção de genitores contrastantes, levando em consideração a dissimilaridade representada no dendograma e o grupo botânico. Sugere-se a utilização dos acessos 135 e 124 pertencentes aos grupos Spanish e Virginia, respectivamente, para realização de posterior cruzamento a fim de obter uma progênie com alta variabilidade genética.

5 CONCLUSÃO

Os acessos apresentados neste trabalho apresentaram um baixo índice de polimorfismo com a utilização de marcadores moleculares aqui testados, sendo necessário a utilização de uma quantidade maior de iniciadores para diferenciar de forma exitosa os acessos da coleção de germoplasma.

Os acessos 135 e 124 pertencentes aos grupos Spanish e Virginia, respectivamente, são os mais indicados para cruzamentos com a finalidade de se obter variabilidade genética.

De outro modo, acredita-se que a informação de natureza fenotípica possa contribuir com o estudo da divergência genética, se somadas ao fenótipo molecular das bandas aqui descrita aumentando a certeza no discernimento dos acessos avaliados.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, C. M. A. de et al. Caracterização molecular de cultivares de cana-de-açúcar utilizando marcadores ISSR. 2009. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 33, Edição Especial, p. 1771-1776, 2009.

ALTIERI, M. A. Agroecologia, agricultura camponesa e soberania alimentar. **Revista Nera**, Presidente Prudente, v.13, n.16, p. 22-32, 2010.

BESPALHOK, F. J. C.; GUERRA, E. P.; OLIVEIRA, R. Introdução ao melhoramento de plantas. **Melhoramento de plantas**. Disponível em www.bespas.agrarias.ufpr.br. Acesso em 20 de novembro de 2017.

BORÉM, A. Melhoramento de plantas. 6^a Ed. Viçosa: **Ufv- Univ. Fed.**, 2013.

BORGES, W. L.; XAVIER, G. R; RUMJANEK, N. G. Variabilidade genética entre acessos de amendoim. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 8, p. 1151-1157, 2007.

BURATTO, J. S.; DOS SANTOS NETO, J.; MODA-CIRINO, V. Desempenho agronômico e dissimilaridade genética entre acessos de amendoim por variáveis multicategóricas. **Scientia Agraria Paranaensis**, Paraná, v. 15, n. 3, p. 324-331, 2016.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Brasília, 2017. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_06_09_09_00_00_boletim_graos_junho_2016_-final.pdf>. Acesso em: 25 jun. 2017.

CEASACE. **Pesquisa: confira os preços dos itens juninos nos mercados cearenses**.

Diponível em:

<<http://www.ceasa-ce.com.br/index.php/noticias/43765-pesquisa-confira-os-precos-dos-itens-juninos-nos-mercados-cearenses>>. Acesso em 03 de dez. 2017.

CEAGESP. **Amendoim: CEASAS**. Disponível em:

<<https://www.noticiasagricolas.com.br/cotacoes/amendoim/amendoim-ceasas>>. Acesso em 03 de dez. 2017.

CEASAPE. **Cereais e diversos.** Disponível em:

<<http://www.ceasape.org.br/cotacao/cereais-e-diversos>>. Acesso em: 03 de desembro de 2017.

CARVALHO, D. M. de *et al.* O beneficiamento do amendoim em Ribeirópolis: do trabalho artesanal a aplicação de tecnologia social. **Revista GeoNordeste**, São Cristóvão, n. 1, p. 108-131, 2016.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Amendoim, 1º e 2º safra. Série histórica.** Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/detalhe.php?c=18583&t=2#this>>. Acesso em 22 novembro. 2017.

COSTA, A. M.; SPEHAR, C. R.; SERENO, J. R. B. **Conservação de recursos genéticos no Brasil.** Brasília: Embrapa Cerrados-Livros científicos (ALICE), 2012. 628 p.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L.; HORTORIUM, L.H.B. **Isolation of plant DNA from fresh tissue.** Focus, v.12, n.1, p.13-15, 1987.

DUARTE, A. Amendoim: a noz subterrânea.Cultivo em Aljezur. **Al-Rihana**, Aljezur, v.4. p.1-9, 2008.

EMBRAPA. Agência de Informação Embrapa. **Sistema de Produção de Amendoim.** Disponível

em:<https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistemasdeproducaolf6_1ga1ceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&p_r_p_-76293187_sistemaProducaoId=3803&p_r_p_-996514994_topicoId=3445> . Acesso em: 27 nov. 2017.

EMBRAPA. **Agência de Informação Embrapa 2012.** Disponível em:

<<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/1463533/embrapa-indica-cultivares-de-amendoim-para-o-nordeste>> acesso em: 5 de dezembro de 2017.

EMBRAPA. **Agência de Informação Embrapa 2014.** Disponível em:

<https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistemasdeproducaolf6_1ga1ceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&p_r_p_-76293187_sistemaProducaoId=3803&p_r_p_-996514994_topicId=3448> . acesso em: 5 de dezembro de 2017.

FAOSTAT - ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A ALIMENTAÇÃO E A

AGRICULTURA. **Dirección de Estadística.** Disponível em:

<<http://www.fao.org/faostat/en/#home>>. Acesso em: 25 de junho de 2017.

FERGUSON, M. E. et al. Microsatellite identification and characterization in peanut (*A. hypogaea* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 108, n. 6, p. 1064-1070, 2004.

FREITAS, F. O.; PEÑALOZA, A. D. P. S.; Valls, J. F. M. O amendoim contador de história. Brasília: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Documentos**. 2003.

GONZÁLEZ, A.; COULSON, M.; BRETELL, R. Development of DNA markers (ISSRs) in mango. **Acta Hort.** Austrália, v. 575, 2002.

GODOY, I. J. et al. **Produtividade, estabilidade e adaptabilidade de cultivares de amendoim em três níveis de controle de doenças foliares.** Pesq. agropec. bras., Brasília, v.34, n.7, p.1183-1191, 1999. INEMET. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/>>. Acesso em: 25 de junho de 2017.

GODOY, I.J. et al. Melhoramento do Amendoim. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas.** 2.ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa,2004. p.51-102.

GODOY, I. J. et al. Cultivares IAC de amendoim. **O Agronômico**, v. 55, n. 1, p. 26-29, 2003.

GOMES, L. R. et al. Adaptabilidade e estabilidade fenotípica de genótipos de amendoim de porte ereto. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.42, n.7, p.985-989, 2007.

GUIMARÃES, C. T. et al. Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético. **Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2009.

KUMAR, H. et al. Avaliação comparativa baseada em marcador RAPD e ISSR da diversidade genética entre os germoplasmas indianos de euryale ferox: uma planta de alimentos aquáticos. **Bioquímica aplicada e biotecnologia** , v. 180, n. 7, p. 1345-1360, 2016.

LACKS, G. D.; STALKER, H. T. Isozyme analyses of Arachis species and interspecific hybrids. **Peanut Science**, v. 20, n. 2, p. 76-81, 1993.

LANHAM, P. G. et al. Seed storage protein variation in Arachis species. **Genome**, v. 37, n. 3, p. 487-496, 1994.

LEAL-BERTIOLI, S.C.M. et al. Identification of candidate genome regions controlling disease resistance in Arachis. **BMC Plant Biology**, v. 9, n. 1, p. 112, 2009.

LORENZONI, R. M. et al. Utilização de marcadores ISSR na avaliação da divergência genética entre acessos de biribazeiro. **Rev. Bras. Frutic**, v. 36, edição especial, p. 251-257, 2014.

LITT, M.; LUTY, J. A. Um microsatélito hipervariável revelado pela amplificação in vitro de uma repetição de dinucleótidos no gene da actina do músculo cardíaco. **American journal of human genetics** , v. 44, n. 3, p. 397, 1989.

MARIM, B. G. et al. Variabilidade genética e importância relativa de caracteres em acessos de germoplasma de tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 10, p. 1283-1290, 2010.

MILACH S. C. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: S.C.K. Milach, 1998. 140 p.

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

MORETZSOHN, M. C. et al. A microsatellite-based, gene-rich linkage map for the AA

genome of *Arachis* (Fabaceae). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 111, n. 6, p. 1060-1071, 2005.

MENDES. R.F.M.; GOMES. S.O.; LIMA. P. S. C. Reprodutibilidade de marcadores ISSR em pinhão manso. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 5.; CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 8., 2012, Salvador. Biodiesel, inovação e desenvolvimento regional: **anais**, trabalhos científicos. Lavras: UFLA, 2012. p. 365-366.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Registro Nacional de Cultivares**. Disponível em:

<http://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/cultivares_registradas.php> acessado em 4 de dezembro de 2017.

NEITZKE, R. S. *et al.* Dissimilaridade genética entre acessos de pimenta com potencial ornamental. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n. 4, p. 47-53, 2010.

NOGUEIRA, R.J. M.C.; SANTOS, R.C. Alterações fisiológicas no amendoim submetido ao estresse hídrico. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.4, n.1, p.41-45, 2000.

PEREIRA JÚNIOR, J. S. **Nova delimitação do semi-árido brasileiro**. 2007.

PEZZOPANE, JRM. Amendoim. **Embrapa Pecuária Sudeste-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2009.

REGITANO, L.C. A. Introdução à análise de marcadores moleculares. In: REGITANO, L.C. A. **Biologia molecular aplicada à produção animal**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p.25-39.

REN, X. *et al.* Genetic diversity and population structure of the major peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars grown in China by SSR markers. **PloS one**, v. 9, n. 2, p. e88091, 2014.

ROHLF, F. J. Adaptive hierarchical clustering schemes. **Systematic Biology**, v. 19, n. 1, p. 58-82, 1970.

SOUZA, G. A. de et al. Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em populações brasileiras de Zabrotes subfasciatus. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 7, p. 843-849, 2008.

SANTANA, I. B. B. et al. Variabilidade genética entre acessos de umbu-cajazeira mediante análise de marcadores ISSR. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal-SP, v. 33, n. 3, p. 868-876, 2011.

SANTOS, R. C. et al. Variabilidade de progênies F2 de amendoim geradas por meio de seleção de genitores ISSR-divergentes. **Revista Ciência Agronômica**. v. 44, n. 3, p. 578-586, 2013.

SANTOS, R. C. dos et al. **Fenologia, reprodução e crescimento de genótipos de amendoim no nordeste brasileiro**. Embrapa; Centro Nacional de Pesquisa do Algodão. Campina Grande- Paraíba, n. 16, p. 1-8, 1993.

SANTOS, R. F. **Desenvolvimento de ferramentas genéticas e genômicas para introgessão de genes silvestres no amendoim cultivado**. 2010. 44p. Dissertação (mestrado em agronomia). Faculdade de agronomia e medicina veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

SANTOS, R. C. Utilização de recursos genéticos e melhoramento de *Arachis hypogaea* l. no Nordeste brasileiro. Disponível em:

< <http://www.cptsa.embrapa.br/catalogo/livrorg/amendoim.pdf> >. Acesso em: 03 de dezembro de 2017.

SILVA, L. C. et al. Efeito do manejo da irrigação na qualidade da produção e na produtividade do amendoim cv. BR1. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 2, n. 2, p. 175-178, 1998.

SANTOS, R. C. et al. Produtividade de linhagens avançadas de amendoim em condições de sequeiro no Nordeste brasileiro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, n. 06, p. 589-593, 2010.

SANTOS, R. C.; FREIRE, R. M. M.; LIMA, L. M. O agronegócio do amendoim no Brasil. 2^a Ed. **Campina Grande: Embrapa Algodão**, 2005. 585 p.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Oilseeds: world markets and trade**. Disponível em:

<<http://usda.mannlib.cornell.edu/usda/current/oilseed-trade/oilseed-trade-11-09-2017.pdf>>.

Acesso em: 04 de dezembro de 2017.

UNIVERSIDADE DA INTEGRAÇÃO INTERNACIONAL DA LUSOFONIA

AFRO-BRASILEIRA- UNILAB. Disponível em:

<<http://www.unilab.edu.br/noticias/2016/01/11/fazenda-da-unilab-divulga-dados-de-pluviosidade-e-evaporacao/>>. Acesso em: 25 de junho de 2017.

ZHANG, J. et al. De novo assembly and characterisation of the transcriptome during seed development, and generation of genic-SSR markers in peanut (*Arachis hypogaea* L.). **BMC genomics**, v. 13, n. 1, p. 90, 2012.

APÊNDICE A – QUANTIFICAÇÃO E DILUIÇÃO DE AMOSTRAS DE DNA.

Identificação da Amostra	Concentração DNA (ng/ul)	Concentração solução de trabalho	Vol. final do estoque da sol. Trabalho (100 ul)	Volume de DNA original	Volume água
001	585,8	10	100	1,7	98,3
37	761,9	10	100	1,3	98,7
126	338,7	10	100	3,0	97,0
125	414,3	10	100	2,4	97,6
113	529,2	10	100	1,9	98,1
121	682,8	10	100	1,5	98,5
20	309,6	10	100	3,2	96,8
110	1132,2	10	100	0,9	99,1
111	499,2	10	100	2,0	98,0
116	483,9	10	100	2,1	97,9
120	463,3	10	100	2,2	97,8
49	603,5	10	100	1,7	98,3
124	586,5	10	100	1,7	98,3
24	786,1	10	100	1,3	98,7
112	1003,1	10	100	1,0	99,0
138	549,7	10	100	1,8	98,2
118	774,6	10	100	1,3	98,7
35	473,9	10	100	2,1	97,9
28	475,2	10	100	2,1	97,9
38	450,2	10	100	2,2	97,8
134	759,9	10	100	1,3	98,7
14	473,1	10	100	2,1	97,9
130	463,3	10	100	2,2	97,8
108	490,2	10	100	2,0	98,0
135	976,6	10	100	1,0	99,0
117	311,2	10	100	3,2	96,8
137	492,4	10	100	2,0	98,0
005	374	10	100	2,7	97,3

006	601,8	10	100	1,7	98,3
136	548,5	10	100	1,8	98,2
129	741	10	100	1,3	98,7
70	588,7	10	100	1,7	98,3
128	394,3	10	100	2,5	97,5
34	765,6	10	100	1,3	98,7
107	574,1	10	100	1,7	98,3
004	468,1	10	100	2,1	97,9
122	575,7	10	100	1,7	98,3
50	219,2	10	100	4,6	95,4
10	439	10	100	2,3	97,7