

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

JULIO CEZAR SANTOS OTTO

**Determinação do grau de homozigose de genótipos selecionados
do híbrido natural W34b (BRA 031143) da espécie *Arachis Pintoi*
Krapov. & Gregory, por meio de marcadores moleculares**

BOTUCATU – SP

2007

JULIO CEZAR SANTOS OTTO

**Determinação do grau de homozigose de genótipos selecionados
do híbrido natural W34b (BRA 031143) da espécie *Arachis Pintoï*
Krapov. & Gregory, por meio de marcadores moleculares**

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

Orientadora: Profa. Dra. CATALINA ROMERO LOPES

BOTUCATU – SP

2007

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

Otto, Julio Cezar Santos.

Determinação do grau de homozigose de genótipos selecionados do híbrido natural W34b (BRA 031143) da espécie *Arachis Pintoï* Krapoz. & Gregory, por meio de marcadores moleculares / Julio Cezar Santos Otto. – Botucatu : [s.n.], 2007.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2007.

Orientadora: Catalina Romero Lopes

Assunto CAPES: 20204000

1. Genética vegetal 2. Leguminosas - Melhoramento genético

CDD 581.15

Palavras-chave: *Arachis Pintoï*; Amendoim forrageiro; Grama amendoim; Microsatélites; Pastagens consorciadas

Aos meus pais, irmã e esposa, pelo apoio, carinho, compreensão e confiança,

Aos amigos pelo aprendizado e apoio,

A Deus, pelos amigos, pela família, por minha vida.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Catalina Romero Lopes, pela orientação, dedicação, apoio e a oportunidade oferecida.

Ao Prof. Dr. Sandremir de Carvalho, pela contribuição, dedicação e apoio.

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

A pós-graduanda Vanusa pela amizade e apoio na manutenção de casa de vegetação.

Aos amigos e funcionários do Departamento de Genética, do Departamento de Botânica e do Instituto de Biociências da UNESP – Campus de Botucatu.

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

A CAPES pelos 8 meses de bolsa concedida.

A FAPESP, pela bolsa concedida e auxílio financeiro na realização do projeto.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	IV
LISTA DE TABELAS	V
RESUMO.....	VI
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO.....	3
2.1. GÊNERO ARACHIS	4
2.2. SEÇÃO CAULORRHIZAE	7
2.3. ARACHIS PINTOI	9
2.3.1. BIOLOGIA FLORAL	9
2.3.2. CLIMA E SOLO.....	11
2.3.3. MODOS DE REPRODUÇÃO.....	12
2.3.4. CRUZABILIDADE.....	13
2.3.5. PLANTIO E MANEJO.....	14
2.4. POTENCIAL AGRONÔMICO	15
2.4.1. VALORES NUTRICIONAIS.....	17
2.4.2. FENO DE A. PINTOI.....	17
2.4.3. PRODUÇÃO ANIMAL E DE FORRAGEM.....	18
2.4.4. PERSISTÊNCIA AO PASTOREIO.....	19
2.4.5. COBERTURA VERDE	20
2.5. CULTIVARES.....	21
2.5.1. ARACHIS PINTOI ‘AMARILLO’	22
2.5.2. ARACHIS PINTOI ‘CV. AMARILLO - MG-100’	22
2.5.3. ARACHIS PINTOI ‘ALQUEIRE-1’	22
2.5.4. ARACHIS PINTOI ‘PORVENIR’	23
2.5.5. ARACHIS PINTOI ‘BELMONTE’	23
2.6. HISTÓRICO DO ACESSO BRA-031143.....	24
2.7. MARCADORES MOLECULARES	25
2.7.1. MICROSSATÉLITES.....	27
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1. MATERIAL	28
3.1.1. HISTÓRICO DO PRÉ-MELHORAMENTO	28
3.1.2. MATERIAL VEGETAL.....	30
3.1.3. COLETA E PLANTIO DO MATERIAL VEGETAL	30
3.1.4. COLETA DE SEMENTES.....	31
3.1.5. EXTRAÇÃO DO DNA.....	32
3.1.6. OLIGONUCLEOTIDEOS (“PRIMERS”) DE MICROSSATÉLITES	33
3.2. MÉTODOS	34
3.2.1. AMPLIFICAÇÃO DE DNA E ELETROFORESE	34
3.2.2. COLETA E ANÁLISE DOS DADOS	35
4. RESULTADOS.....	37
4.1. COLETA DE SEMENTES.....	40
5. DISCUSSÃO.....	46
6. CONCLUSÕES	53
7. REFERÊNCIAS	54
8. ANEXO 1 – TABELAS COM OS DADOS COMPLETOS OBTIDOS POR PLANTA EM CADA GENÓTIPO.....	63

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – A) Inflorescência axilar com uma flor aberta; B) Vista Frontal da corola; C) Flor dissecada: h = hipanto; e = estandarte; a = asa; q = quilha e f = estigma e estame. 11
- Figura 2 - Padrões de bandas gerado por três indivíduos de cada genótipo avaliado (G1, G2 e G3) pelo marcador microssatélite, a partir do loco AP175C.....37
- Figura 3 - Padrões de bandas gerado por três indivíduos de cada genótipo avaliado (G1, G2 e G3) pelo marcador microssatélite, a partir do loco AP176C.....37
- Figura 4 -Dendrograma UPGMA dos quatro diferentes genótipos avaliados do acesso BRA 041122 de *A. Pintoi*, do acesso não identificado FALM, dos acessos BRA 031828 (Cv. Belmonte), BRA 015253 (W34), BRA 015121 (V6791) da mesma espécie e do acesso BRA 032379 de *A. repens*. A distância genética foi estimada usando o programa PopGene usando o método de Nei (1978), com base em 14 locos de microssatélites, num total de 85 alelos.....44
- Figura 5 - Dendrograma UPGMA separando cada planta mais homozigota de três diferentes genótipos do acesso BRA 041122 (G1, G2, G4) do acesso não identificado FALM, todos da espécie *A. Pintoi*. A distância genética foi estimada usando o programa PopGene usando o método de Nei (1978), com base em 14 locos de microssatélites, num total de 85 alelos 45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Nomenclatura utilizada para identificação individual de cada planta nos genótipos ou acessos utilizados	32
Tabela 2 – Seqüências, temperaturas de anelamento, variações no tamanho dos alelos em pb e concentrações de $MgCl_2$ para cada um dos 25 “primers” testados	34
Tabela 3 – Resultados da avaliação de locos de microssatélites: Heterozigose observada (H_O) e esperada (H_E), número de alelos por loco e variação no tamanho dos alelos	41
Tabela 4 - Homozigose média observada de cada um cada um dos genótipos avaliados (G1, G2, G3, G4) do acesso (BRA 041122) e do genótipo FALM, de acesso não conhecido, pertencente à espécie <i>A. Pinto</i>	42
Tabela 5 – Homozigose média observada entre plantas com níveis de homozigose maior que 70%, pertencentes aos genótipos G1, G2, G4 e FALM da espécie <i>A. Pinto</i>	43
Tabela 6 - Homozigose média observada entre plantas avaliadas dos acessos BRA 015253 (W34), BRA 015121 (V6791), BRA 031828 cv. Belmonte e do acesso BRA 015253, representando a espécie <i>A. repens</i>	43
Tabela 7 – Distância genética (Nei, 1978) entre todos os genótipos e acessos.....	43

RESUMO

O *Arachis Pinto* é uma leguminosa forrageira de alta qualidade, apresentando valores de 18 a 25% de proteína bruta, 60 a 67% de digestibilidade “in vitro” da matéria seca e 60 a 72% de digestibilidade da energia bruta, além de apresentar grande aceitabilidade pelos animais. O valor nutritivo do *A. Pinto* é mais alto quando comparado com gramíneas e leguminosas tropicais. No sistema de produção animal em pasto a utilização de leguminosa forrageira deve ser valorizada pela qualidade de produção e pelo alto valor nutritivo que é oferecido à dieta e também pelo aporte de nitrogênio atmosférico incorporado aos ecossistemas das pastagens. O uso de leguminosas em pastagens, no Brasil, ainda é muito limitado, seja porque o portfólio de cultivares é pequeno, ou porque o preço da semente ou do material vegetativo é elevado. Neste trabalho foram avaliados quatro genótipos de *A. Pinto* (G1, G2, G3 e G4) oriundos de pré-seleção de um híbrido natural da espécie, utilizando o marcador molecular microsatélite visando à seleção de plantas homozigotas para, a partir delas, seguir o processo de melhoramento em cada genótipo para obtenção de linhagens puras. Foram utilizados nesta avaliação 14 locos de microsatélites dos quais, dez mostraram-se polimórficos e quatro monomórficos. O número de alelos observado variou de 1 a 11 por loco, com um total de 85 alelos e média de 8,5 por loco. A heterozigose observada variou de 0,3377 no loco AP183CV a 0,8701 no loco AP190CV com média de 0,6403. As plantas de maior homozigose foram selecionadas para dar continuidade ao processo de melhoramento e após avaliação agrônômica poderão ser lançadas como potenciais cultivares de *A. Pinto*. Considerando-se somente as plantas com homozigose superior a 70%, foi possível selecionar cinco plantas do genótipo G1 com média de 84,29%, quatro plantas do genótipo G2 com média de 76,79% e quatro plantas do genótipo G4 com média de 92,50%. O genótipo G3 apresentou média de 44,51% de homozigose, e necessita de mais algumas gerações de autofecundação. Os dados obtidos com os 14 locos de microsatélites permitiram separar e identificar cada uma das plantas com maior homozigose de cada genótipo. Os resultados indicam uma taxa de alogamia maior que o esperado para esta espécie considerada autógama, havendo a necessidade de estudos específicos sobre o sistema reprodutivo da espécie.

Palavras-chave: *Arachis Pinto*; Amendoim forrageiro; Grama amendoim; Microsatélites; Pastagens consorciadas

1. INTRODUÇÃO

A competitividade de custos da pecuária bovina nacional fundamenta-se na capacidade de colher, transformar e concentrar os nutrientes da pastagem pelos ruminantes. Cerca de 100×10^6 ha de pastos cultivados, representando 55% da área com pastagem (Ramos et al., 2002), dá suporte a grande parte do maior rebanho comercial de bovinos do mundo (207×10^6) (IBGE, 2005). A produção por animal e por hectare, pode ser comprometida pela baixa qualidade da forragem e pela produção estacional, especialmente quando em cultivos de gramíneas puras e sem a correção da fertilidade do solo (Barcellos et al., 2000).

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

O uso de leguminosas em pastagens, no Brasil, ainda é muito limitado, seja porque o portfólio de cultivares é pequeno, ou porque o preço da semente ou do material vegetativo é elevado. No sistema de produção animal em pasto, a utilização de leguminosa forrageira deve ser valorizada pela qualidade de produção e pelo alto valor nutritivo que é oferecido à dieta e também pelo aporte de nitrogênio atmosférico incorporado aos ecossistemas das pastagens (Pereira et al., 1995; Maraschin, 1997).

Nesse aspecto, a caracterização e o melhoramento do germoplasma do Gênero *Arachis*, exclusivo da América do Sul que conta, até o momento, com 81 espécies das quais 69 ocorrem no Brasil sendo 62 delas restritas ao território brasileiro, vem trazendo perspectivas interessantes (Krapovickas & Gregory, 1994; Valls & Simpson, 2005). Podemos citar como exemplo, a descoberta de novas fontes de resistência à doenças dentro de *A. hypogaea*, (o amendoim cultivado) e a ocorrência de plantas, nessa espécie, com ciclo extremamente curto, caráter de

grande utilidade para a adaptação de cultivares às áreas com maior carência de chuvas (Gregory et al., 1980). Por sua vez, a ampla disponibilidade de germoplasma de espécies perenes nesse gênero, tem dado grande realce ao potencial de várias delas para uso forrageiro e para culturas de cobertura, controladoras da erosão, hoje muito procuradas diante da crescente demanda por programas de agricultura sustentável. Do ponto de vista do potencial forrageiro, os maiores esforços estão concentrados principalmente nas espécies *A. glabrata* da Seção *Rhizomatosae* e *A. Pintoi* da Seção *Caulorrhizae* (Valls, 1992; Valle, 2001).

O uso de espécies silvestres de *Arachis* para o estabelecimento de pastagens, cobertura em culturas perenes, conservação do solo e como planta ornamental, vem sendo intensificado (Pizarro, 2001), a partir do aumento no número de acessos disponíveis nas últimas décadas, para pesquisa. Dentre as espécies com uso potencial em sistemas de cultivo e pastagem, se destaca *A. Pintoi* da Seção *Caulorrhizae*, sendo esta apontada como mais promissora. Entre os acessos da Seção *Caulorrhizae*, o acesso W34b (BRA 031143) vem se destacando devido a sua alta produção de forragem, rápida ocupação de solo e adaptação a ambientes variados.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar, utilizando o marcador molecular microssatélite, o nível de homozigose das plantas pertencentes aos genótipos selecionados de uma população do acesso BRA 041122, oriundo, do acesso BRA 031143 (W34b) da espécie *A. Pintoi*, para continuidade dos processos de melhoramento dos mesmos, visando a obtenção de genótipos com desempenho mais eficiente na formação de pastagens consorciadas com braquiárias, na formação de bancos de proteína e na produção de feno.

2. REVISÃO

A pecuária brasileira sofreu, a partir da década de 60, uma grande expansão em área e produtividade, devido ao aumento das áreas com pastagens cultivadas, para suprir as crescentes demandas por produtos de origem animal, principalmente carne e leite.

O Brasil possui 176,2 milhões de hectares de pastagens (Scot Consultoria, 2006) dos quais cerca de 100×10^6 ha são de pastos cultivados, representando 55% da área com pastagem sendo a grande maioria formada por braquiarias (Ramos et al., 2002), dá suporte a grande parte do maior rebanho comercial de bovinos do mundo com 207,1 milhões de cabeças, além de cerca de 1,13 milhões de bubalinos, 5,7 milhões de eqüínos, 15 milhões de ovinos e 10 milhões de caprinos (IBGE, 2005).

O Brasil apresentou nos últimos dez anos, avanços consideráveis em matéria de manejo de pastagens tropicais. Nesse período a planta forrageira ganhou status de cultura, em especial na atenção dada à fertilidade do solo, posição bem diferente da que lhe era concedida anteriormente (Anualpec, 2004). Tendo em conta as dimensões territoriais do Brasil, essa consciência ainda parece ser restrita, principalmente quando se observam os índices zootécnicos, os quais há décadas, permanecem inalterados no país: taxa de lotação média de 0,7 UA/ha, sendo que UA (unidade animal) equivale a 450 kg de peso vivo (Scot consultoria 2006), 55 kg de carcaça/ha/ano, 50% de natalidade, 300 kg de leite/ha/ano (Anualpec, 2004). Sabe-se, em contraste, ser possível alcançar, de maneira prática e operacional, valores bem superiores, como lotação média de 3 a 5 UA/ha, produção de carcaça em torno de 600 kg/ha/ano e produção de leite 10 mil e 12 mil kg/ha/ano (Anualpec, 2004).

Devido a isto, anualmente são perdidas cerca de 35 milhões de arrobas em função de emagrecimento na seca, mortes e escassez de alimento. Essas perdas podem alcançar cifras de até 1 bilhão de dólares por ano (Oliveira et al., 1995). Como fatores condicionantes e predisponentes deste processo, entre outros, citam-se o emprego de germoplasma não adaptado às condições edafoclimáticas, falhas

no estabelecimento desse germoplasma, falhas no controle de pragas, de doenças e de plantas invasoras (Rodrigues & Quadros 2000).

No Brasil tropical-subtropical são semeados, anualmente, cerca de 5,5 milhões de hectares de pastagens perenes, sendo maior o interesse pelas braquiárias, *Brachiaria decumbens*, *B. brizantha* e *B. humidicola* (Zimmer & Corrêa, 1993). As gramíneas cultivadas são essencialmente espécies pioneiras ou de estágios iniciais de sucessão (Tothil, 1978), podendo-se destacar: *Andropogon*, *Brachiaria*, *Cenchrus*, *Chloris*, *Cynodon*, *Hyparrhenia*, *Melinis*, *Panicum*, *Paspalum*, *Pennisetum* e *Setaria*. Do mesmo modo, as leguminosas, geralmente são pioneiras devido à sua capacidade de fixar nitrogênio e melhorar as condições de fertilidade do solo (Argel & Veiga, 1991). As leguminosas dos Gêneros *Arachis*, *Calopogonium*, *Centrosema*, *Desmodium*, *Pueraria*, *Stylosanthes*, entre outras, são algumas das encontradas nessa área.

No sistema de produção de animal em pasto a utilização de leguminosas como forrageiras deve ser valorizada pela qualidade da dieta oferecida pelas mesmas e, também pelo aporte de nitrogênio atmosférico incorporado ao ecossistema pastoril, a um baixo custo (Pereira et al., 1995; Maraschin, 1997). Nesse sentido, a utilização de leguminosas forrageiras como banco de proteínas ou em consorciação com gramíneas nas pastagens, constitui uma importante prática para a suplementação protéica dos animais, bem como para o fornecimento de nitrogênio ao solo e às plantas, por meio da fixação biológica desse elemento por bactérias do Gênero *Rhizobium* que vivem em simbiose em suas raízes.

2.1. Gênero *Arachis*

A partir da década de 80 os esforços internacionais de pesquisa em recursos genéticos foram orientados, principalmente, para os gêneros de leguminosas com potencial forrageiro, dentre os quais destacaram-se *Centrosema* e *Stylosanthes*. As espécies silvestres do Gênero *Arachis* foram avaliadas, exclusivamente, quanto ao seu potencial de participação no melhoramento genético do amendoim cultivado (*A. hypogaea*), porém, já na década de 60, vários pesquisadores da área de forrageiras haviam identificado o alto potencial de muitas

espécies silvestres desse gênero, para pastagens e para cobertura de solos nos trópicos e subtropicais (Valls, 1993). Conseqüentemente, nos últimos 40 anos, as coletas e a conservação de germoplasma desse gênero foram direcionadas para ampliar a base genética das espécies com potencial forrageiro, principalmente *A. glabrata*, da Seção *Rhizomatosae* e *A. Pintoi* da Seção *Caulorrhizae* (Valls & Pizarro, 1994), sendo que somente da espécie *A. Pintoi* há 150 acessos disponíveis (Valls, 2001).

O Gênero *Arachis* é composto por espécies diplóides com $2n=2x=20$ ou, $2x=18$, e espécies tetraplóides com $2n=4x=40$ (Fernández & Krapovickas, 1994; Lavia, 1998; Peñaloza & Valls, 1999). Pertence a família Leguminosae, subfamília Papilionoideae, tribo Aeschynomeneae e subtribo Stylosanthinae. (Krapovickas & Gregory, 1994).

De acordo com informações publicadas na literatura, as espécies do Gênero *Arachis* são autógamas, com fluxo gênico limitado a pequenas populações (Krapovickas & Gregory, 1994) mas, também há evidências de alogamia em alguns acessos da Seção *Caulorrhizae* (Oliveira & Valls, 2003) e em espécies da Seção *Rhizomatosae* (Gimenes e Moretzoshn, 2004). Com base nas suas características morfológicas, as espécies de *Arachis* não podem dispersar suas sementes em um raio acima de um ou dois metros ao ano, a partir do local de germinação. Ocupando, este gênero, uma área de aproximadamente 4000 km de extensão é evidente, que, outros mecanismos estão envolvidos na sua disseminação. A dispersão fluvial é bastante significativa, pois muitas espécies mostram-se associadas às bacias de grandes rios. A dispersão zoófila e a ação do homem fixando as espécies nos novos locais de colonização, também não pode ser descartada (Krapovickas & Gregory, 1994; Valls & Simpson, 1994).

O Gênero *Arachis*, nativo da América do Sul, engloba desde plantas perenes até plantas anuais, algumas de ciclo muito curto. A Serra do Amambá, no limite do Mato Grosso do Sul e Paraguai, é considerada a área de origem do Gênero *Arachis*, por ser o centro de origem de *A. guaranítica* a espécie mais antiga do gênero e, possivelmente também da espécie cultivada *A. hypogaea*, o centro de

diversidade se estende por todo o Planalto Central brasileiro (Gregory et al., 1980; Hammons, 1994).

O gênero engloba, até o momento, oitenta espécies descritas e uma em fase de descrição num total de 79 espécies silvestres, uma espécie cultivada *A. hypogaea* e uma espécie cultígena *A. villosulicarpa* que foi parcialmente melhorada apenas pelos índios nhambiquaras. Estão amplamente distribuídas no Cerrado e em outros ambientes de vegetação aberta, tendo por limites de distribuição a Ilha de Marajó ao norte, o Uruguai e nordeste da Argentina ao sul, o nordeste brasileiro a leste, e o sopé da Cordilheira dos Andes a oeste (Silva, 1997). Todas as espécies do gênero são exclusivas da América do Sul onde só ocorrem em cinco países, sendo mais de 69 no Brasil (com cerca de 62 exclusivas), 15 na Bolívia, 15 no Paraguai, 6 na Argentina e 2 no Uruguai. As espécies descritas até o momento foram distribuídas em nove seções taxonômicas: *Arachis*, *Caulorrhizae*, *Erectoides*, *Extranervosae*, *Heteranthae*, *Procumbentes*, *Rhizomatosae*, *Triectoides* e *Triseminata* (Krapovickas & Gregory, 1994; Valls & Simpson, 2005).

A revisão taxonômica realizada por Krapovickas & Gregory (1994), considerando aspectos morfológicos, citológicos, genético-bioquímicos e observação a campo, levaram à classificação de 69 espécies, e a partir do uso destas mesmas características 11 novas espécies foram posteriormente publicadas por Valls & Simpson, (2005). Essas onze novas espécies já tiveram também seu número cromossômico publicado por Peñaloza & Valls, (1999). Além disso, o futuro encontro de novas espécies é previsível, uma vez que importantes áreas do perímetro de ocorrência de espécies do Gênero *Arachis* ainda não foram cobertas por expedições de coleta (Valls & Simpson, 1997; Valls & Simpson, 2005).

O desenvolvimento, há várias décadas, de coletas em cooperação, tem coberto áreas nos cinco países onde ocorre o gênero, estando preservados, atualmente, mais de 1600 acessos, representando todas as espécies conhecidas do mesmo, com exceção de *A. martii* Handro, bem como de híbridos intra e interseccionais. Isto possibilita, pela primeira vez, um amplo estudo citogenético, e de avaliação da variabilidade genética disponível por meio de marcadores moleculares,

fornecendo resultados importantes sobre o aspecto evolutivo e as relações entre as espécies, além de disponibilizar informações valiosas para aplicação direta desses materiais em programas de melhoramento.

A caracterização do germoplasma obtido ao longo dessas coletas vem trazendo perspectivas interessantes, como a descoberta de novas fontes de resistência a doenças, e até de plantas com ciclo extremamente curto, caráter de grande utilidade para adaptação de variedades cultivadas em áreas com maior carência de chuvas. Por sua vez, a ampla disponibilidade de germoplasma de espécies perenes tem dado grande realce ao potencial de várias delas para uso forrageiro e para culturas de cobertura, controladoras da erosão, hoje muito procuradas diante da crescente demanda por programas de agricultura sustentável (Pizarro, 2001). Na situação atual, porém, o enfoque é mais objetivo e aprofundado, tendo resultado na criação, nos Estados Unidos, da “Associação dos Produtores de Amendoim Perene”, principalmente para estudo e utilização de *A. glabrata Benth*, planta rizomatosa multiplicada somente por via vegetativa e, de programas de produção comercial de sementes de “*mani forrajero perene*”, *A. Pintoi* Krapov & Gregory na região de Yapacani, na Bolívia, (Ferguson, 1994).

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

2.2. Seção *Caulorrhizae*

A Seção *Caulorrhizae* é composta por apenas duas espécies, *A. Pintoi* Krapov. & Gregory e *A. repens* Handr. A distribuição geográfica desta secção compreende as bacias dos Rios Jequitinhonha, São Francisco e Paranã, região que cobre parte dos Estados de Goiás, Bahia e Minas Gerais, chegando até o litoral atlântico, onde foi coletado o acesso original de *A. Pintoi*, GKP 12787 (Valls & Pizarro, 1994). Há indícios de que a maior variabilidade genética, de acessos desta

secção, tanto com base em descritores morfológicos (Monçato, 1995), como moleculares (Gimenes et al., 2000) concentra-se na bacia do Rio São Francisco.

A caracterização taxonômica das espécies desta secção foi, praticamente toda ela baseada em apenas dois acessos amplamente difundidos, GKP 10538 de *A. repens* e GKP 12787 de *A. Pintoi* (Valls & Simpson, 1994). Com o enriquecimento do germoplasma disponível de *A. Pintoi*, foi possível observar uma grande variação no formato e na dimensão dos folíolos, densidade e localização dos pêlos e cerdas. Da mesma forma, uma variação paralela foi observada nas novas coletas de *A. repens*, tornando a circunscrição individualizada das espécies da secção *Caulorrhizae* bastante difícil (Valls, 1992).

O dendrograma da avaliação morfológica de 51 acessos da Secção *Caulorrhizae* mostra os acessos típicos de *A. repens* separados dos demais, seguidos por um grupo composto por formas intermediárias entre *A. Pintoi* e *A. repens* mas, semelhantes a *A. repens*, seguindo-se um grupo com formas intermediárias entre *A. Pintoi* e *A. repens* e, concluindo-se com acessos típicos de *A. Pintoi*, confirmando a separação de *A. Pintoi* e *A. repens*. (Monçato, 1995).

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

O acesso original de *A. repens* (GKP 10538) tem sido propagado vegetativamente para servir de cobertura do solo e como planta ornamental, sem

nenhuma evidência de produção de sementes, enquanto que o acesso original de *A. Pintoi* (GK 12787) tem sido propagado por mudas e/ou pequenas quantidades de sementes (Valls & Simpson, 1994).

2.3. *Arachis Pintoi*

É uma planta herbácea, perene, de trópico e subtropico úmido (Fisher & Cruz, 1994), alcançando de 20 a 60 cm de altura, de crescimento rasteiro e estolonífera. Geralmente, lança densas quantidades de estolões ramificados, que se enraízam até 1,50 m horizontalmente em todas as direções. Em condições de sombreamento ou em determinada fase do crescimento quando atinge o índice de área foliar crítico apresenta crescimento mais vertical com maior alongamento do caule e menor densidade de folhas (Lima et al., 2003). Esta busca por luminosidade se denomina plasticidade fenotípica, cujo hábito de fuga também se desenvolve em função de pastejo intensivo. Neste caso, apresenta reduções no tamanho de folhas e no espaçamento de entre-nós para maior proteção dos pontos de crescimento (Moreira, 2001), garantindo maior persistência. Apresenta raiz pivotante com profundidade de 0,3 até 1,60 metros, a qual determina a capacidade da planta de extrair água das camadas mais profundas, quando em condições menos favoráveis. As folhas são alternadas, compostas, com quatro folíolos de cor verde claro a escuro (Montenegro & Pinzón, 1997; Lima et al., 2003).

2.3.1. Biologia floral

A flor é uma papilionácea que se autopoliniza (hermafrodita), mas pode apresentar polinização cruzada por ação de diversas espécies de abelhas. A produção de flores é fortemente dependente do fotoperíodo, com 12 horas de comprimento de dia como valor mínimo crítico (Ketring, 1979), embora nem todas as espécies sejam tão fortemente sensíveis ao fotoperíodo (Simpson et al., 1994). A curva de florescimento de 14 acessos de *A. Pintoi* e *A. repens* em Planaltina, DF, mostrou que a intensidade máxima de florescimento ocorre entre novembro e dezembro e está, para alguns acessos, associada à precipitação pluviométrica e temperatura do ar (Peñaloza, 1995).

Os botões florais, em desenvolvimento, tornam-se visíveis 36 a 48 horas antes da abertura da flor e, apoiam-se no ápice de um cálice tubular denominado de hipânquio, o qual inicia um desenvolvimento acelerado cerca de 24 horas antes da antese. A flor possui corola papilionada, com uma pétala grande, o estandarte, duas pétalas menores denominadas de asas e, duas pétalas soldadas, formando a quilha, que envolve a porção apical do estilete, o estigma e os estames (**Figura 1**). Todas estas peças estão envoltas por cinco brácteas. As flores normais possuem estigma tipo plumoso ou tipo bastão, com 10 estames, destes, quatro possuem anteras biloculadas, quatro globosas e há dois estaminódios. O estigma encontra-se assentado no ápice de um longo estilete que percorre internamente todo o comprimento do hipânquio até o ovário, que situa-se na axila das brácteas da inflorescência, e contém dois a três óvulos (Simpson et al., 1994).

A morfologia do ápice do estigma de espécies anuais e perenes de *Arachis* foi estudada por Banks (1990) e por Lu et al. (1990), tendo sido encontrados pêlos unicelulares no ápice dos estigmas de algumas espécies. Estes se desenvolvem a partir das células da epiderme, subjacentes ao estilete. As espécies perenes, pouco prolíferas, apresentam estes pêlos, enquanto que a ausência de tais pêlos está associada às espécies anuais. A presença de muitos pêlos no ápice do estigma pode dificultar, ou até mesmo impedir o contato de grãos de pólen viáveis com as papilas da superfície estigmática, resultando em uma barreira física à polinização.

A fertilização ocorre 12 horas após a polinização. Após a fertilização o embrião sofre quatro a cinco divisões, e torna-se dormente. Ao mesmo tempo, um meristema intercalar é ativado na base do ovário e inicia o desenvolvimento de um “peg”, o qual é geotrópico positivo. O comprimento do “peg” depende de fatores genéticos e ambientais e, continua a crescer, até penetrar no solo, podendo sofrer engrossamento em algumas espécies, ou se tornar bastante fino em outras. Na maioria das espécies silvestres encontram-se dois segmentos de frutos e um istmo entre eles (Simpson et al., 1994). O fruto é uma vagem, classificada como cápsula, indeiscente (frutos que não se abrem espontaneamente para libertar as sementes), normalmente apresentando uma semente (Rincón et al., 1992).

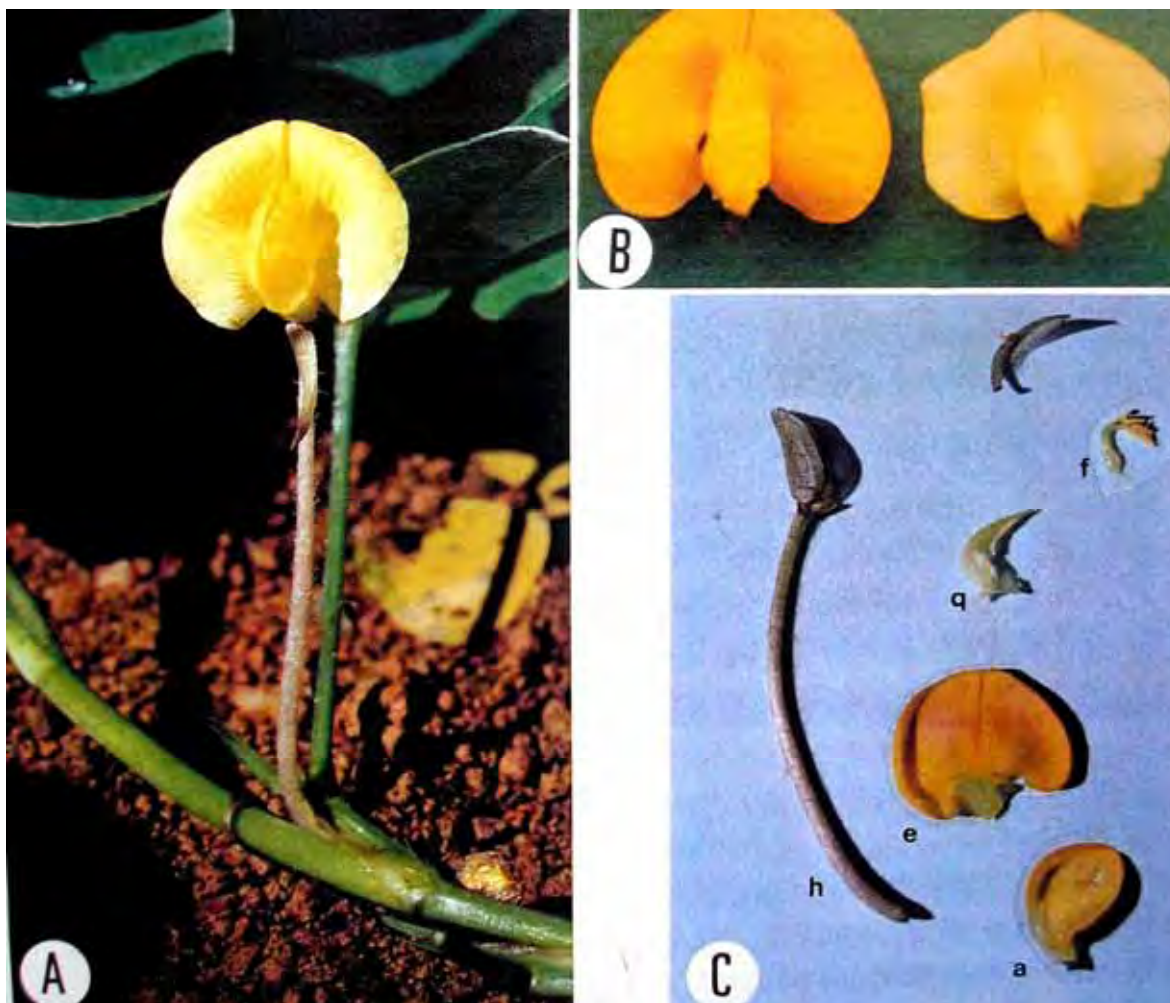


Figura 1 – A) Inflorescência axilar com uma flor aberta; B) Vista Frontal da corola; C) Flor dissecada: h = hipanto; e = estandarte; a = asa; q = quilha e f = estigma e estame. Adaptado (Monçato, 1995)

2.3.2. Clima e solo

Um clima, tropical ou subtropical, que ofereça precipitação anual superior a 1500 mm e secas inferiores a quatro meses tem condições para o estabelecimento e uso da espécie (Rincón et al., 1992). Cresce bem desde o nível do mar até 1800 m de altitude (Montenegro & Pinzón, 1997; Rincón et al., 1992). Os solos ideais são de textura franca (são solos que apresentam certo equilíbrio entre os teores de areia, silte e argila), de média fertilidade, com matéria orgânica igual ou superior a 3%, bem drenado, pH em torno de 6,0-6,5, tolerando condições de má drenagem e encharcamento temporário. Adapta-se a solos pobres em nutrientes, deficientes em

fósforo, potássio, cálcio e magnésio, ácidos (pH 5,0) e com alta toxidade de alumínio (75%), fato que tem maior influência durante o desenvolvimento inicial (Rincón et al., 1992; Simpson et al., 1994).

2.3.3. Modos de reprodução

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

A característica principal da Secção *Caulorrhizae* está na sua capacidade de enraizamento dos estolões, o que a distingue da Secção *Rhizomatosae*. Este fato permite que seja mais fácil propagar vegetativamente as plantas da Secção *Caulorrhizae* (Simpson et al., 1994). Entretanto, as duas Seções, a *Rhizomatosae*, pela espécie *A. glabrata* e *Caulorrhizae*, pela espécie *A. Pintoi* e *A. repens*) são de interesse imediato como plantas forrageiras (Simpson et al., 1994; Valls & Simpson, 1994), destacando-se a espécie *A. Pintoi* por apresentar o desenvolvimento de densas camadas de primórdios radiais (Simpson et al., 1994) o que não restringe a sua produção em escala comercial pelo, custo da implantação segundo Nascimento (2006).

Alguns estudos citológicos evidenciam um potencial para apomixia (reprodução biológica sem fertilização, meiose ou produção de gametas, com o resultado de que as sementes são geneticamente idênticas às da planta mãe) em *A. hypogaea* e, caso este evento ocorra em espécies com potencial forrageiro, a produção de linhas heterozigóticas estáveis seria favorecida (Simpson et al., 1994).

2.3.4. Cruzabilidade

As várias espécies de *Arachis* mostram um diferente potencial de recombinação. As espécies de maior interesse forrageiro *A. glabrata* e *A. Pintoi*, apresentam uma limitada oportunidade de recombinação (Simpson et al. 1994). As espécies da Seção *Rhizomatosae* não são boas produtoras de sementes. Mesmo com viabilidade de pólen alta, sua falha na obtenção de híbridos pode ser devido a outras causas além da incompatibilidade genética, como a pequena superfície estigmática e a presença de pêlos unicelulares no ápice do estigma (Lu et al., 1990).

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

Vinte híbridos, de 1420 polinizações realizadas, foram obtidos a partir de cruzamentos envolvendo cinco acessos de *A. Pintoi* e dois acessos de *A. repens*. (Oliveira & Valls, 2003). De 3797 polinizações, 269 sementes híbridas foram obtidas em cruzamentos intra e interespecíficos entre acessos da Seção *Caulorrhizae* (Carvalho, 2000). Alta viabilidade do pólen foi encontrada em todos os híbridos, mas os híbridos interespecíficos não produziram sementes. Em cruzamentos entre espécies da Seção *Caulorrhizae* com espécies das Seções *Procumbentes* e *Erectoides*, os híbridos herdaram estolhos, com capacidade de enraizamento tão boa ou superior à dos pais (Teixeira, 1999).

Os híbridos resultantes de combinações envolvendo diferentes acessos da Seção *Caulorrhizae* e acessos de outras seções do Gênero *Arachis* mostraram que alguns híbridos intraespecíficos de *A. Pintoi* produzem linhagens segregantes para

programas de melhoramento genético, enquanto que híbridos interespecíficos e interseccionais podem ser propagados vegetativamente, disponibilizando o potencial genético de duas secções (Valls et al., 2001).

2.3.5. Plantio e manejo

O plantio, em clima tropical, deve ser efetuado no início do período chuvoso (Valentim et al., 2000). No subtropical, o plantio é realizado na primavera, desde que ocorram condições de temperatura favorável e de umidade adequada no solo. As condições ambientais favoráveis de temperatura e umidade permitem a manutenção do propágulo vivo até que, pelo desenvolvimento das raízes e parte aérea, seja originado um novo indivíduo (Burton & Hanna, 1995). Uma vez escolhida a área para a instalação da pastagem realiza-se a adubação de correção e calagem, conforme a análise do solo. A espécie requer para desempenho máximo, moderadas doses de fósforo (P) e potássio (K), incorporados no momento da semeadura (Montenegro & Pinzón, 1997). A adubação de reposição deve ser realizada no segundo ano, com 50% das doses de fertilizantes utilizados no plantio (Rincón et al., 1992; Nascimento, 2004).

Na implantação, utilizando-se mudas, normalmente são usados os seguintes espaçamentos: 0,50 m entre linhas e 0,25 m entre plantas. Para maior cobertura total em menor tempo, o espaçamento entre linhas pode ser reduzido para 0,25 m (Rincón et al., 1992), ou os estolões segmentados podem ser plantados em covas de 10 cm de profundidade e 20 cm de largura, desde que sejam utilizados três estolões em cada lado da cova, ou seja, 6 propágulos por cova (Valentim et al., 2000). Uma outra opção pode ser a semeadura à lanço, seguido da passagem de um rolo compactador, com o objetivo de depositar a semente a 2 cm abaixo da superfície do solo para evitar a desidratação (Rincón et al., 1992).

A determinação da época de primeira utilização da pastagem se realiza através de observação da matéria seca disponível. Em monocultivo, nas regiões tropicais, a utilização pode ser feita a partir do sexto mês após plantio, na época chuvosa quando geralmente apresenta 100% de cobertura do solo, com intervalos de 45-60 dias de rebrote (Montenegro & Pinzón, 1997; Valentim et al., 2000; Cavali et

al., 2002). No subtropical deve ser feita na estação de crescimento primaveril seguinte ao estabelecimento, com intervalos de 40 a 55 dias de crescimento (Perez, 1999; Bruyn, 2003; Nascimento et al., 2003).

2.4. Potencial agronômico

A importância das leguminosas na agricultura, como forrageiras e como componentes em ecossistemas de pastagens nativas, depende da capacidade das mesmas em fixar N_2 (nitrogênio) atmosférico (Bogdan, 1977). O uso de leguminosas é o meio mais econômico de introduzir N_2 nas pastagens. Isto é essencial principalmente naqueles sistemas de produção animal em que os retornos econômicos não são suficientes para justificar o uso de fertilizantes (Valentim, 1985). Sendo ricas em proteína, as leguminosas podem aumentar significativamente o valor nutritivo da forragem produzida e, conseqüentemente, a produtividade animal por área. Durante o ciclo de vida ou após a morte, as leguminosas adicionam nitrogênio ao solo, por meio da decomposição de suas folhas, ramos e raízes, beneficiando as gramíneas consorciadas, o que permite a economia de milhões de toneladas de fertilizantes nitrogenados de alto custo. Em termos globais, as leguminosas adicionam mais N_2 ao solo que os fertilizantes industriais (National Academy of Sciences, 1977; Gomide, 1986).

A importância das leguminosas tropicais, nos sistemas de produção pecuários, está no seu uso em pastagens consorciadas, uma vez que as gramíneas geralmente são responsáveis pela maior parte da produção de forragem, enquanto que as leguminosas aumentam a quantidade e melhoram a qualidade da forragem produzida. O aumento da produtividade deve-se, parcialmente, aos diferentes graus de utilização dos nutrientes do solo pelas duas espécies de plantas e, também, pela fixação de nitrogênio pelas leguminosas. A qualidade da forragem aumenta por causa do nível elevado de proteína das leguminosas, enquanto que a concentração protéica nas gramíneas é mais baixa, especialmente nos intervalos de crescimento mais longos, entre períodos de pastejo (Bodgan, 1977).

Desse modo, a leguminosa forrageira torna-se um fator importante na produção animal, pois sua participação nas pastagens, além de possibilitar a redução

dos efeitos negativos da atividade pecuária sobre a qualidade do solo e da água, possibilita também a expressão do potencial genético dos animais, fato esse que reverterá em maior lucratividade para o produtor rural. Com a inclusão de leguminosas na pastagem, melhora-se a qualidade da forragem, aumenta-se o potencial produtivo e ocorre redução das necessidades de adubação química nitrogenada e da poluição do lençol freático causada pela lixiviação do excesso de nitrogênio aplicado ao solo (Cadisch et al., 1994; Thomas, 1995).

As espécies de *Arachis* revitalizaram o interesse em leguminosas tropicais devido ao seu valor como forrageira e densa cobertura do solo, sendo chamadas de “alfafa das savanas” em função de seu valor nutritivo e palatabilidade (Valle, 2001).

Praticamente todas as espécies de *Arachis* produzem forragem de boa qualidade e em razoável quantidade, quando comparadas com espécies de outros gêneros de leguminosas utilizadas comercialmente (Valls & Simpson, 1994). Espécies pertencentes às Seções *Rhizomatosae*, *Arachis*, *Erectoides*, *Procumbentes*, *Caulorrhizae* e *Triseminatae* têm sido avaliadas na Austrália há 50 anos, tendo muitas destas espécies apresentado grande potencial forrageiro, principalmente no que se refere à persistência sob pastejo (Cook et al., 1994).

Dentre as várias espécies do gênero que apresentam potencial para utilização em pastagens, visando à melhoria da qualidade da forragem ofertada, destacam-se a espécie da Seção *Caulorrhizae*, *A. Pintoi* e *A. glabrata* da Seção *Rhizomatosae* (Valls, 1992). Considera-se que a maior promessa para uso forrageiro encontra-se entre as espécies da seção *Caulorrhizae*, estas exclusivas da flora brasileira (Valls & Simpson, 1994)

A plasticidade no uso de *Arachis* como forragem, feno, silagem, uso paisagístico e como cultivo de cobertura, junto com sua capacidade de produzir sementes debaixo do solo, fazem desta forrageira uma leguminosa ideal para os trópicos latino-americanos e mundiais, tanto do ponto de vista nutricional, como social (Pizarro, 2001). Além disso *A. Pintoi* apresenta excelentes características agrônômicas, como adaptação a solos ácidos, resistência e tolerância a pestes e doenças, e prolífera produção de sementes em alguns acessos dentre eles o acesso

W34b (BRA 031143) e o acesso original BRA 013251 (Argel & Pizarro, 1992; Argel & Vilarreal, 1998).

2.4.1. Valores nutricionais

Arachis Pinto é uma leguminosa forrageira de alta qualidade (Ladeira et al., 2002), podendo ser encontrados valores de 18 a 25% de proteína bruta (PB), 60 a 67% da digestibilidade “in vitro” da matéria seca (DIVMS) e 60 a 72% de digestibilidade da energia bruta (Lascano, 1994; Argel & Pizarro, 1992; Nascimento et al., 2003; Deschamps et al., 2000;), além de apresentar grande aceitabilidade pelos animais (Lascano & Thomas, 1988; Carulla et al., 1991). O valor nutritivo do *A. Pinto* é mais alto quando comparado com gramíneas tropicais, em que os valores médios citados estão entre 6 e 12% (Ladeira et al., 2002) e outras leguminosas como estilosantes (*Stylosanthes guianensis*) com teores de PB de 12,0% a 16,3% (Paciullo et al., 2003), kudzu tropical (*Pueraria phaseoloides*), variando de 14,45 a 15,86%, macrotiloma (*Macrotyloma axillare*) com teor de PB variando de 15,10 a 15,75%, soja perene (*Glycine wightii*), valores de 15,76 a 17,16% de PB (Padua et al., 2006) sendo que somente a alfafa (*Medicago sativa* L.) com teores médios de proteína bruta entre 23,15% e 25,45% (Viana et al., 2004) se iguala a *A. Pinto*. Além disso, as espécies forrageiras do Gênero *Arachis* têm maior importância uma vez que são capazes de produzir volumes significativos de forragem verde por períodos prolongados. Estes materiais apresentam ainda uma ou mais das seguintes características: persistência sob pastejo e pisoteio, competição com gramíneas agressivas, razoável resistência a períodos de seca prolongados, a inundações, resistência a baixas temperaturas, e a doenças e pragas (Valls & Simpsom, 1994).

2.4.2. Feno de *A. Pinto*

O valor de digestibilidade da massa seca (MS) do feno de *A. Pinto* é maior que o observado em algumas leguminosas de clima tropical, sendo que somente a alfafa, que é de clima temperado apresenta digestibilidade próxima ao *Arachis* (Ladeira et al., 2002), embora seja mal adaptada aos trópicos e de maior preço. Essa digestibilidade encontra-se dentro da faixa citada por Lascano (1994) para ensaio “in vitro”, que foi de 60% a 67%. O feno de *A. Pinto* apresentou consumo e

digestibilidades dos nutrientes elevados, permitindo fornecer nutrientes em quantidades suficientes para atender o potencial de produção dos animais, recomendando-se seu uso na alimentação de ruminantes. (Ladeira et al, 2002).

2.4.3. Produção animal e de forragem

Segundo Lascano (1994), Santana et al (1998) e Barcellos et al (2000), o amendoim forrageiro pode ser usado na formação de pastagens consorciadas com braquiárias, suportando taxas e lotação de até 4 novilhos/ha com ganhos de peso de 550g/animal/dia e 500 kg/ha/ano.

Em clima tropical, consorciado com *Brachiaria brizantha*, o ganho de peso vivo por hectare variou entre 534 e 937 kg de acordo com baixa ou alta pressão de pastejo (Hernandez et al., 1995), com persistência acima de dez anos (Argel & Villarreal, 2000).

Experimentos realizados por Pereira & Santana (1990) e Pereira et al. (1996) comprovaram que o consórcio de *A. Pintoi* e *B. humidicola* teve um melhor desempenho quanto ao ganho de peso vivo dos animais que quando comparado com outras leguminosas e com adubação nitrogenada de 150 kg/ha com ganho de peso vivo diário de 510 g/cab/dia e 373 kg/ha. O consórcio de *A. Pintoi* com capim estrela roxa (*Cynodon nlemfuensis*) proporcionou um ganho significativo na produção de leite quando comparado com a pastagem formada somente pela gramínea, com ganhos na produção em torno de 14%. (Gonzalez et al; 1996).

Suínos mantidos em pastagens de *A. Pintoi* e *Cynodon dactylon* reduziram, voluntariamente, em 28% o consumo de ração comercial, suportando restrição alimentar de 35% na oferta de ração, sem perdas significativas de peso quando comparadas com os animais confinados (Both, 2003).

Filhotes de avestruzes alimentados com *A. Pintoi* tiveram a taxa de mortalidade, registrada entre os filhotes (período mais delicado da vida do avestruz) reduzida para 3,8%, índice surpreendente até mesmo para os técnicos, que esperavam algo em torno de 6%, enquanto que o, ganho de peso nesta fase de vida,

aumentou 18%. Além disso, a mudança também trouxe economia. Os custos com alimentação dos filhotes diminuíram cerca de 12%. (SEAGRI, 2007).

A produção de massa seca de *A. Pintoi* quando manejado de forma intensiva, com intervalos de rebrota entre 14 e 21 dias e altura de corte entre 5 a 10 cm, propiciou a obtenção de produtividade de matéria seca superior a 30 t/ha/ano, sem comprometer a persistência da pastagem (Wendling et al.; 1999). Segundo Valentim & Moreira (2001) diferentes acessos de *Panicum maximum* consorciados com *A. Pintoi* conduziram a um aumento de produtividade que variou de 30% e 50% quando comparado à pastagem composta apenas pela gramínea.

2.4.4. Persistência ao Pastoreio

Arachis Pintoi persiste ao pastoreio devido ao hábito de crescimento rasteiro, habilidade de enraizar nos estolhos e reserva de sementes no solo (Jones, 1993). A espécie mostrou-se bastante persistente em consorciação com *Brachiaria dictyoneura* mesmo quando submetido a taxas de lotação de até quatro novilhos/ha (Santana et al., 1998). *A. Pintoi* possui seus pontos de crescimento protegidos, permitindo que uma área foliar residual satisfatória seja mantida, mesmo quando submetido a um pastejo contínuo (Grof, 1985).

Dentre as leguminosas tropicais estudadas nos últimos anos, *A. Pintoi* é a que apresenta o maior número de atributos favoráveis relacionados com a persistência, o que é demonstrado pela sua permanência na pastagem, mesmo quando submetida a condições de manejos adversos (Fisher e Cruz 1994).

Na Costa Rica, em consorciação com capim-estrela africano, Gonzalez, et al. (1996) conseguiram obter uma proporção média de *A. Pintoi* de 37,9% nos dois anos compreendidos pelo experimento. Lascano (1994) relata dados obtidos em Carimágua, Colômbia, em pastagem de *B. humidicola* + *A. Pintoi*, com duração de quatro anos, onde a disponibilidade de *A. Pintoi* aumentou em 5 a 6 vezes do primeiro para o quarto ano, não se observando efeitos das taxas de lotação de 2, 3 e 4 cabeças/ha sobre essa disponibilidade.

Segundo Hernandez et al. (1995) *A. Pintoi* vem ocupando lugar de destaque por apresentar associações estáveis com gramíneas vigorosas C4, sob pastejo intensivo, durante períodos superiores a 10 anos, aumentando a produtividade em relação a pastagens de gramíneas puras.

2.4.5. Cobertura verde

Nas últimas décadas, alterações de práticas agrícolas têm garantido ganhos de produtividade. No entanto, as suas consequências ecológicas devem ser estudadas para minimizar danos ambientais. A utilização de cobertura viva permanente consorciada com culturas econômicas de ciclo perene tem sido estudada para identificar espécies vegetais, principalmente leguminosas, a serem inseridas em sistemas de produção em determinados períodos ou durante todo o ano. Tal prática proporciona a melhoria das características químicas, físicas e biológicas do solo. O uso de leguminosas ou gramíneas herbáceas perenes como cobertura viva, além de proteger o solo dos agentes climáticos, seqüestra C (carbono), mantém ou eleva o teor de matéria orgânica do solo, mobiliza e recicla nutrientes e favorece a atividade biológica do solo (Barradas et al., 2001; Duda et al., 2003; Castro et al., 2004; Faria et al., 2004). Estes benefícios podem melhorar a estabilidade do sistema produtivo e culminar com menores custos de produção.

Do ponto de vista da fertilidade do solo, uma das maiores contribuições do uso de leguminosas é o aumento do nitrogênio disponível no sistema, através da fixação biológica de nitrogênio atmosférico por meio da associação simbiótica com bactérias dos Gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* (Cadisch et al., 1994; Thomas, 1995).

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

cobertura viva perene de amendoim forrageiro apresentou viabilidade comparável ao cultivo em solo mobilizado (Oliveira et al. 2006b).

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

No sul de Minas Gerais, uma avaliação dos efeitos da cobertura do solo de lavoura de café em formação comprovou que a cobertura verde de *A. Pinto* nas entrelinhas, formou uma vegetação rasteira e densa impedindo o desenvolvimento de plantas daninhas, causando economia na prática de capina e maior proteção ao solo no controle da erosão. (AGROONLINE, 2007).

Em pomares de laranja, o acesso de *A. Pinto* CIAT 17434 (BRA- 013251) se comportou como uma espécie adequada para cobertura do solo, resultando em maior produção de frutos, cobertura mais rápida do solo e menor competição com o cultivo (Pérez et al., 1996). *A. Pinto* também tem sido indicado como "cobertura viva" nos plantios de mamão e maracujá (Almeida et al.; 1998).

2.5. Cultivares

A partir de acessos oriundos da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, (Cenargen, DF), o esforço de diversos pesquisadores e melhoristas nacionais e internacionais, por longos anos trabalhando na avaliação sistemática e melhoramento de *A. Pinto*, tornou possível o surgimento de algumas cultivares. Mesmo assim, a utilização bem sucedida destas poucas cultivares oficialmente comercializadas, somente tornou-se possível a partir do estabelecimento das necessárias adaptações regionais.

2.5.1. *Arachis Pinto* 'Amarillo'

Esta cultivar foi a primeira a ser lançada no mercado, na Austrália, por Cook et.al., (1990), tendo se originado a partir do primeiro acesso colhido em 1954, e mantido em canteiro experimental por Geraldo C. Pinto, na Bahia, Brasil. Algumas amostras desse material foram levadas por Antônio Krapovickas para Corrientes, Argentina, recebendo a identificação de GK 12787 e foram, posteriormente, enviadas ao Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América do Norte/USDA, Georgia, recebendo o número PI 338314. Deste local foram, conduzidas ao Centro Internacional de Agricultura Tropical, na Colômbia, identificadas como CIAT 17434, chegando a Austrália em 1987, onde receberam o número CPI 58113. No Brasil o material foi registrado sob o número BRA 013251 (Pereira et al., 1999; Paganella & Valls, 2002) e pelas numerosas avaliações a que foi submetida o acesso, a cultivar resultante foi denominado de cultivar pioneira, sendo, preponderantemente, identificado nos relatos de pesquisa por CIAT 17434.

2.5.2. *Arachis Pinto* 'Cv. Amarillo - MG-100'

A partir da importação de sementes da cultivar pioneira (CIAT 17434 ou BRA 013251), proveniente do Centro de Agricultura Tropical (CIAT), e posterior multiplicação, esta cultivar foi comercializada pelo grupo Sementes Matsuda, São Paulo (Paganella & Valls, 2002). A produção de forragem (MS) é de 5-8 ton/ha/ano com 15 a 22% de proteína bruta e 62 a 72% de digestibilidade. Atualmente, o maior volume de informações sobre o potencial forrageiro da espécie se refere a esta cultivar, largamente utilizada em ecossistemas de diversas regiões do País.

2.5.3. *Arachis Pinto* 'Alqueire-1'

Alguns acessos foram enviados pela EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia para a Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Após a introdução, poucos acessos sobreviveram, tendo sido os mesmos agrupados em um canteiro demonstrativo para aula prática, perdendo as respectivas identificações. Em 1992, foram levadas 100 plantas recém germinadas à Fazenda Alqueire, município de Rio Pardo, RS, onde foram testadas. A adaptação das plantas às severas geadas

ocorreu naturalmente em função do inverno rigoroso, mostrando alta resistência ao pastejo. A cultivar foi lançada no mercado pela UFRGS, com o apoio da EMATER e IVOMEC Gold e, atualmente, é utilizada em grande escala pelos produtores regionais, além de alguns produtores no Paraná e Santa Catarina (Perez et al., 2001). No Rio Grande do Sul representa a cultivar mais estudada até o momento, já tendo sido avaliada em diversos ecossistemas quanto a produtividade, destaca-se quando comparada a outros acessos, (Damé et al., 1998). Apresenta produção em torno de 8-10 ton/ha/ano de forragem (MS) e valor nutritivo superior às demais leguminosas forrageiras, com 23% de proteína bruta e 72% de digestibilidade (Nascimento et al., 2003).

2.5.4. *Arachis Pintoi* 'Porvenir'

A partir da linha promissora CIAT 18744 (BRA 012122) avaliada na Costa Rica, ocorreu o lançamento da cultivar 'Porvenir' pela Fazenda El Porvenir da Cooperativa Agroindustrial /Coopeagre. A produção de forragem (MS) é de 2-7 ton/ha/ano com 17-20% de proteína bruta e 67 a 71% de digestibilidade, com persistência acima de dez anos sob pastejo (Argel & Villarreal, 2000). O pastejo de terneiros Jersey, por cinco horas em banco de proteína proporcionou incrementos de 93 g/ cabeça/ dia, no ganho de peso. É também amplamente utilizada em pastagens consorciadas com gramíneas, em cobertura de plantações permanentes, em programas de conservação de solo ou como planta ornamental (Argel & Villarreal, 2000).

2.5.5. *Arachis Pintoi* 'Belmonte'

Esta cultivar originou-se de materiais introduzidos na sede da Superintendência da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira/Ceplac, em Ilhéus, Bahia. Posteriormente, foram avaliados no Campo Agrostológico do Centro de Pesquisa do Cacau/Cepec. Foi registrado junto à EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia pela sigla Jp s/n, com o código de acesso BRA 031828 (Paganella & Valls, 2002). Pela adaptação às condições do sul da Bahia foi lançada comercialmente pela Ceplac, denominada de cv. Belmonte (Pereira et al., 1999). A

produção de forragem (MS) é de até 20 ton/ha/ano (Valentim et al., 2000), com 19% de proteína bruta e 60-70% de digestibilidade (Pereira et al., 1999).

Há experiência acumulada de pastagens de *Brachiarias* associadas com a cultivar 'Belmonte', onde vem persistindo sob pastejo contínuo há cinco anos. Pastagens consorciadas da cv. Belmonte com *Brachiaria humidicola*, por quatro anos apresentou ganho de peso vivo de 565 gramas por cabeça ao dia (g/cab/dia), superior aos 444 g/cab/dia na pastagem da gramínea em monocultivo, adubada com nitrogênio (Valentim et al., 2000). Foi a primeira cultivar lançada, exclusivamente, para propagação vegetativa (Paganella & Valls, 2002), através de mudas ou estolões bem desenvolvidos, recomendados devido à baixa produção de sementes (Pereira et al., 1999).

Além das cultivares já mencionadas, outras como Maní forrajero perenne-I e Pico Bonito oriundas do acesso BRA 013251 foram lançadas na Colômbia e Honduras, respectivamente, com sucesso, após adaptações ambientais nesses dois países. De uma maneira geral, as informações sobre o potencial de produção animal em pastagens consorciadas têm girado em torno de 180 kg/peso vivo/cabeça/ano e entre 400-600 kg/peso vivo/ha/ano (Pizarro & Rincón, 1994).

2.6. Histórico do Acesso BRA-031143

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

O acesso BRA-031143 denominado W34b não representa uma população natural de *A. Pintoi*, pois foi selecionado no CPAC / EMBRAPA, por E. A. Pizarro e M. A. Carvalho, de um canteiro experimental do acesso W34 (BRA-015253). Essa planta diferia das demais por apresentar florescimento precoce e foi intensamente

estudada por S. Carvalho (FFALM, Bandeirantes/PR), sob a orientação de C.R. Lopes – BIOGEM / UNESP Botucatu. Os autores relataram que se trata de um híbrido natural entre o acesso W 34 como genitor feminino e o acesso BRA 015121 como provável genitor masculino (Carvalho, 2000).

O híbrido natural intraespecífico W34b (BRA-031143), vem se destacando por sua alta produtividade e adaptação a ambientes variados, estudos têm demonstrado que este acesso é mais produtivo que a cultivar 'Amarillo' quanto a produção de matéria seca (Carvalho et al., 1997).

No Estado do Acre o acesso BRA-031143 de *A. Pintoi*, submetido a níveis de sombreamento de 30, 50 e 70 %, apresentou boa adaptação, produtividade e persistência, indicando o potencial de utilização desta leguminosa como cobertura do solo em sistemas agroflorestais e silvipastoris (Andrade & Valentim, 1997). Este mesmo acesso quando manejado de forma intensiva, com intervalos de rebrota entre 14 e 21 dias e altura de corte entre 5 a 10 cm, propiciou a obtenção de produtividade de matéria seca superior a 30 t/ha/ano, sem comprometer a persistência da pastagem (Wendling et al.; 1999), valor este superior às demais cultivares com produção variando entre 5 a 20 t/ha/ano (Nascimento, 2006; Nascimento et al., 2003; Argel & Villarreal, 2000; Valentim et al., 2000)

2.7. Marcadores moleculares

Marcadores genéticos são definidos como elementos capazes de diferenciar, prever e caracterizar um indivíduo e que sejam transmitidos para a descendência. Características morfológicas, fisiológicas ou moleculares podem ser usadas como marcadores genéticos (Guimarães e Moreira, 1999).

O grande impulso no uso de marcadores na Genética e no Melhoramento ocorreu com o aparecimento dos marcadores moleculares (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Os primeiros a serem desenvolvidos foram os marcadores embasados em variantes alélicas de isoenzimas, o que permitiu a ampliação do uso de marcadores de, pelo menos, uma ordem de magnitude em relação aos marcadores morfológicos (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

A primeira técnica de visualização de fragmentos de DNA foi descrita por Southern (1975), derivando na técnica conhecida por “Restriction Fragment Length Polymorphism” (RFLP), que consiste na detecção de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição do DNA entre os indivíduos analisados (Botstein et al., 1980).

Com o surgimento da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) (Mullis & Faloona, 1987), aliou-se o poder de informação gerada por marcadores moleculares e a rapidez da técnica baseada em ciclos contínuos de desnaturação e amplificação das fitas de DNA mediados pela enzima DNA polimerase em pontos específicos do genoma, determinado pelo anelamento de seqüência de nucleotídeos de tamanho pequeno, variando geralmente entre 20 a 30 bases (“primers”) específicos de seqüências complementares a esses pontos (Brondani et al., 2003).

Várias outras técnicas utilizam o princípio da técnica de PCR, tais como RAPD (Williams et al., 1990), AFLP; (Zabeau & Vos, 1993) e SSR “Simple Sequence Repeats”. O desenvolvimento de marcadores de DNA proporcionou um grande impulso para a determinação da variabilidade genética dentro e entre espécies de um mesmo gênero, determinação da conservação e ordem de genes em espécies de gêneros diferentes (sintenia) e em estudos genômicos mais elaborados, como a identificação de genes específicos (Brondani et al., 2003).

A análise de marcadores moleculares pode ser executada em qualquer estágio do ciclo de vida de um organismo e a partir de qualquer tipo de tecido, incluindo tecidos de herbários e mumificados (Oliveira et al., 2007). Muitos marcadores de DNA apresentam expressão co-dominante, permitindo que genótipos sejam determinados em qualquer esquema de melhoramento (Kumar, 1999).

Conforme discutido por Federizzi (1998), os marcadores de DNA podem ser utilizados no melhoramento de plantas, em gerações altamente segregantes, permitindo a eliminação dos genótipos indesejáveis nas primeiras gerações de seleção. Podem, também, minimizar os problemas associados aos métodos de melhoramento clássico, como enorme trabalho e tempo, principalmente, em se tratando de culturas perenes.

Todo indivíduo possui uma seqüência característica de nucleotídeos que compõe o conteúdo do seu DNA. A identificação de diferenças entre essas seqüências, por meio de marcadores moleculares, revela um padrão único, uma impressão digital genética, denominada DNA “fingerprint”, que pode ser utilizada para detectar diferenças e similaridades entre indivíduos. O DNA “fingerprint” tem sido muito utilizado para revelar a diversidade genética dos acessos de bancos de germoplasma de várias espécies vegetais, fornecendo novas ferramentas para a conservação e utilização mais eficiente dos recursos genéticos pelos melhoristas (Etienne et al., 2002).

A caracterização molecular da diversidade genética entre os genótipos fornece informações fundamentais para auxiliar os melhoristas na escolha de genitores, que poderão integrar processos de cruzamentos, visando à constituição de populações básicas no estabelecimento de processos de seleção (Oliveira et al., 2007).

2.7.1. Microssatélites

Microssatélites (SSR) são seqüências curtas de DNA (1-6 nucleotídeos) repetidas em tandem, muito abundantes e amplamente distribuídas no genoma de procariotos e eucariotos (Hamada et al., 1982; Litt & Luty, 1989; Tautz, 1989; Weber & May, 1989; Tóth et al., 2000). As variações no número de repetições (motivos) são reveladas por PCR usando iniciadores (“primers”) específicos para as regiões que franqueiam a seqüência do microssatélite. O alto conteúdo informativo dos locos microssatélites aliado à segregação codominante dos mesmos, o potencial para automatização e a necessidade de pequenas quantidades de DNA para iniciar a reação de PCR, têm feito deste tipo de seqüências os marcadores genéticos ideais para uma ampla variedade de aplicações (Goldstein & Shlötterer, 2000).

Microssatélites podem estar localizados tanto em regiões que codificam para proteínas quanto em regiões não codificantes (Tóth et al., 2000; Morgante et al., 2002). Trabalhos recentes mostraram que em plantas, seqüências microssatélites estão preferencialmente associadas a regiões codificantes do genoma, (Li et al., 2002; Morgante et al., 2002). Não são bem conhecidas a origem e a evolução dos

microssatélites, mas, aparentemente, se originam de eventos mutacionais únicos ou múltiplos, como a recombinação desigual das cromátides, duplicações durante a replicação, substituições, inserção e deleção de bases (Gupta et al., 1996; Zane et al., 2002). Os microssatélites são classificados segundo Weber (1990) em três tipos: repetições perfeitas formadas por uma única unidade repetitiva, como por exemplo, $(AT)_n$ ou $(TTA)_n$ em 90% dos casos (n representa o número de repetições); repetições imperfeitas intercaladas por diferentes nucleotídeos como exemplo $(GA)_n...GA_n$ em 7% dos casos e repetições compostas formadas por mais de uma unidade repetitiva como exemplo $(GT)_n(GA)_n$ em 3% dos casos. De acordo com Kutil e Williams (2001), microssatélites compostos são menos freqüentes que os microssatélites perfeitos porque contêm mais imperfeições e deleções e, provavelmente, representem a última fase antes da degradação.

Os marcadores SSR permitem monitorar o nível de homozigose das linhagens e acelerar o processo de obtenção das mesmas, identificando os indivíduos que apresentam maior número de locos em homozigose (Gethi et al., 2002; Padilha, 2002; Prasad et al., 2000; Senior et al., 1998; Smith et al., 1997). Uma vez identificada a heterozigosidade residual em uma linhagem, elas podem ser submetidas a um avanço na geração de autofecundação, a partir de indivíduos únicos que apresentem níveis elevados de homozigose entre os locos avaliados (Padilha et al., 2003).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Histórico do pré-melhoramento

O híbrido intraespecífico W34b (BRA 031143) da espécie *A. Pinto* selecionado no canteiro experimental do acesso W34 (BRA 015253), no campo da EMBRAPA Cerrado (CPAC), Planaltina, DF, foi multiplicado por estolhos e a população originada foi chamada hipoteticamente de geração F1. Das sementes

obtidas em Planaltina, em 1992, a partir desse híbrido, parte delas ficou armazenada na EMBRAPA/CENARGEN, Brasília, DF e o restante foi enviado a Correntina, BA e Uberlândia, MG, para teste a campo. Duas novas coletas foram efetuadas nos anos de 1994 e 1996, no canteiro da geração F1 e as sementes obtidas foram armazenadas como Planaltina safras 1994 e 1996 (Carvalho, 2000).

Como parte inicial do projeto de tese de doutorado, desenvolvido pelo hoje Dr. Sandremir de Carvalho, da Fundação Faculdade de Agronomia Luiz Meneguel (FFALM), Bandeirantes, PR, hoje denominada Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP), sob orientação da Prof^a. Dra. Catalina Romero Lopes, UNESP, Botucatu, SP, decidiu-se avaliar as diferentes coletas de sementes dos testes a campo do acesso W34b. Para tanto o Prof. Dr. Jose Francisco Montenegro Valls, curador do banco ativo de germoplasma de espécies silvestres do Gênero *Arachis*, sediado na EMBRAPA/Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), Brasília, DF, enviou à Bandeirantes, PR, sementes do acesso W34b (BRA 031143) coletadas em Correntina, BA, em Uberlândia, MG e em Planaltina, DF, nos anos de 1994 e 1996, que foram semeadas sob telado. Após a formação desse novo campo experimental foram selecionadas pelo Prof. Sandremir de Carvalho 40 plantas dentre aquelas procedentes de material de Correntina, 40 planta dentre as procedentes de Uberlândia, 31 plantas dentre as procedentes de Planaltina, safra 1994 e 40 plantas dentre as procedentes de Planaltina, mas da safra de 1996, compondo-se uma nova população de 151 plantas que passaram a ser avaliadas pelo processo de plantas individuais no Campus da FFALM/UENP, utilizando-se espaçamento de três metros entre plantas e quatro metros entre linhas (Carvalho, 2000; Carvalho & Lopes, 2005).

Uma vez que uma parte do material inicial do acesso W34b havia sofrido pelo menos cinco anos de multiplicação em diferentes ambientes, com seleção para altura da planta, vigor, densidade foliar, resistência ao consórcio com gramíneas e florescimento precoce, enquanto outras diferentes sementes passaram por outros experimentos tendo sido levadas finalmente para a Ásia e submetidos a outros procedimentos de seleção de interesse local, o curador do Banco de Germoplasma;

Prof. Dr. Valls, houve por bem considerar a, população que se originou das 151 plantas citadas, como um novo acesso, considerando-o como acesso BRA 041122.

Após dois anos de avaliações realizadas em Bandeirantes, PR, foram selecionados os quatro genótipos mais promissores oriundos do acesso BRA 041122 que foram denominadas de G1, G2, G3, G4.

3.1.2. Material vegetal

Para dar continuidade ao processo de melhoramento, foram avaliados os genótipos G1, G2, G3 e G4 citados no item anterior além de exemplares de um acesso não identificado da espécie *A. Pintoi*, incluído pelas características promissoras apresentadas denominado FALM, exemplar da cv. Belmonte também da espécie *A. Pintoi* (BRA 031828) exemplar do acesso W217 (BRA 032379) da espécie *A. repens* que junto com *A. Pintoi*, são as únicas espécies a comporem a Seção *Caulorrhizae*. Três exemplares de cada um dos acessos W34 (BRA 015253) e V6791 (BRA 015121) foram também incluídos no estudo por se tratarem, o primeiro do genitor feminino e o segundo do provável genitor masculino do híbrido intraespecífico W34b.

3.1.3. Coleta e plantio do material vegetal

Todo material vegetal aqui utilizado foi coletado em 21/11/2005 no Campus da FFALM/UENP. Estolhos das touceiras de cada planta foram selecionados e cultivados em vasos individuais, com capacidade de 6 litros de solo. Foram utilizados estolhos com 3 gemas vegetativas, sendo que, no plantio, duas foram cobertas pelo substrato e uma ficou exposta, sendo, esses vasos mantidos, nas casas de vegetação cedidas pela FAPESP, em área do Departamento de Genética, UNESP, Botucatu/SP. O substrato utilizado teve como composição, uma mistura de terra, areia e esterco bovino curtido, na proporção de 1:1:1. Obteve-se como resultado da multiplicação 13 plantas representantes do genótipo G1, 12 do genótipo G2, 13 do genótipo G3, 11 do genótipo G4 e 11 plantas do genótipo denominado de FALM, num total de 60 vasos. As plantas de cada genótipo foram numeradas ao acaso

utilizando-se a letra e o número do genótipo, seguido por um outro número, indicativo de cada planta dentro do genótipo, iniciando-se pelo 1.

O controle da irrigação foi feito utilizando-se um temporizador, programado, para 3 minutos de irrigação a cada hora, durante o dia, no período de setembro a março e de abril a agosto 2 minutos a cada hora, sem irrigações noturnas. As adubações foram efetuadas uma vez por semana por meio de fertirrigação (adubos aplicados na água da irrigação) e aplicações de inseticidas, fungicidas, acaricidas e herbicidas, quando necessário.

3.1.4. Coleta de sementes

As sementes foram coletadas retirando-se o solo com auxílio de uma pá e, em seguida, peneirando-o, tendo-se obtido 10, 4, e 3 sementes, para os genótipos G1, G4 e FALM, respectivamente. Na primeira coleta não se obteve, na ocasião, sementes dos genótipos G2 e G3.

As sementes foram secas entre jornais, à temperatura ambiente, por 10 dias sendo, em seguida, colocadas para germinar em placas de petri contendo algodão e papel filtro, umedecidas com uma solução de água destilada e do produto comercial Ethrel, na concentração de 100 mg/L. Logo após, foram cobertas com algodão e papel filtro e colocadas em câmara climatizada para germinação. Com esta metodologia conseguiu-se germinar 5 sementes do Genótipo G1, 3 do G4 e 1 do FALM. Estas plantas foram nomeadas utilizando-se a letra e o número do genótipo, seguido do símbolo (*) para indicar que se trata de planta oriunda de semente de cada genótipo, iniciando-se a numeração em 1. **(Tabela 1).**

Tabela 1– Nomenclatura utilizada para identificação individual de cada planta nos genótipos ou acessos utilizados

G1	G2	G3	G4	FALM	W34	V6791	Cv. Belmonte	A. Repens
G1-1	G2-1	G3-1	G4-1	FALM-1	W34-1	6791-1	Cv. Belmonte	A. Repens
G1-2	G2-2	G3-2	G4-2	FALM-2	W34-2	6791-2		
G1-3	G2-3	G3-3	G4-3	FALM-3	W34-3	6791-3		
G1-4	G2-4	G3-4	G4-4	FALM-4				
G1-5	G2-5	G3-5	G4-5	FALM-5				
G1-6	G2-6	G3-6	G4-6	FALM-6				
G1-7	G2-7	G3-7	G4-7	FALM-7				
G1-8	G2-8	G3-8	G4-8	FALM-8				
G1-9	G2-9	G3-9	G4-9	FALM-9				
G1-10	G2-10	G3-10	G4-10	FALM-10				
G1-11	G2-11	G3-11	G4-11	FALM-11				
G1-12	G2-12	G3-12	G4*-1	FALM*-1				
G1-13		G3-13	G4*-2					
G1*-1			G4*-3					
G1*-2								
G1*-3								
G1*-4								
G1*-5								
Total de plantas utilizadas por genótipo								
G1	G2	G3	G4	FALM	W34	V6791	Cv. Belmonte	A. Repens
18	12	13	14	12	3	3	1	1

* indica plantas oriundas de sementes

3.1.5. Extração do DNA

Para a extração do DNA genômico coletaram-se folhas novas (não totalmente expandidas), que foram maceradas em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino.

O DNA genômico total foi extraído usando o protocolo descrito por Grattapaglia & Sederoff (1994), modificado. Cerca de 250 a 300 mg de folhas maceradas foram colocadas em tubos de 1,5 mL, aos quais foram adicionados 700 µL de tampão de extração (3% CTAB, 100 mM Tris-HCl-pH 8,0, 20 mM EDTA-pH 8,0 e 1,4 M NaCl). Ao volume do tampão foi adicionado no momento de uso, 1,5% de β-mercaptoetanol, agitando-se até homogenização, seguindo-se incubação por 60 minutos a temperatura de 65°C, com agitação periódica. A seguir, adicionou-se 700 µL de CIA (clorofórmio: álcool isoamílico 24:1), seguindo-se agitação rápida dos tubos utilizando-se vortex e centrifugação a 12.000 rpm, por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL, ao qual foi adicionado 300 µL de isopropanol a -20°C. Essa mistura foi mantida em repouso, à temperatura de -20°C,

por, no mínimo, 60 minutos. Após a precipitação do DNA genômico os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante descartado virando-se rapidamente os tubos sobre papel toalha. Em seguida, os “pellets” foram lavados duas vezes com etanol 70% e uma vez com etanol absoluto, por 5 minutos, e colocados para secar à temperatura de 37°C. Os “pellets” foram ressuspensos com 100 a 300 µl de TE com RNase (10 mM Tris-HCl-pH 8,0, 1 mM EDTA-pH 8,0 e 20 µg/ml de RNase), de acordo com o tamanho do “pellet” e incubados à temperatura de 36°C, por no mínimo 3 horas. O DNA foi quantificado e armazenado à -20°C. A qualidade do DNA foi verificada em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio e a concentração estimada em espectrofotômetro.

3.1.6. Oligonucleotídeos (“primers”) de microssatélites

Vinte e cinco pares de “primers” foram testados e otimizados quanto à temperatura de anelamento e concentração de MgCl₂, sendo, dezoito pares desenvolvidos a partir da espécie *A. Pintoi* da Seção *Caulorrhizae* (AP22, AP23, AP31, AP32, AP38, AP46, AP40, AP152C, AP161CV, AP166CV, AP172, AP175C, AP176C, AP183CV, AP187, AP188, AP190CV, AP192CV, AP196), descritos por Palmieri et al. (2002 e 2004) e seis desenvolvidos a partir da espécie *A. hypogaea* da Seção *Arachis* (AH3, AH11, AH30, AH6-125, AH126 E AH282), descritos por Gimenes et al. (2007) como mostra a **Tabela 2**.

Tabela 2 – Sequências, temperaturas de anelamento, variações no tamanho dos alelos em pb e concentrações de MgCl₂ para cada um dos 25 “primers” testados

"Primers" que amplificaram e foram avaliados					
Pares de "Primer"	"Primer forward" (5' - 3')	"Primer reverse" (5' - 3')	Variação no tamanho dos alelos em pb	Temp. de anelamento	Conc. MgCl ₂
AH126	CCCTGCCACTCTCACTCACT	CGTACAAGTCAGGGGGTGAC	188-215	60°C	1,5
AP32	GATCATGCTCATCATCAACACC	ATAGGGAGAAGGCAGGGAGA	149	52°C	1,8
AP38	GCGAACAAAGGAGGAAGAGA	GCGAACAAAGGAGGAAGAGA	154	54°C	2
AP40	CTGTTTGATCGCCGCTATG	GTCAAGTGCTTCCTCCGATG	164-200	56°C	2
AP152C	AGAGGATGCAGCGGAGTAGA	CTGGCCAATTCCTATGATCG	255-304	52°C	2
AP161CV	ACCGTCCTCTTCCTCTCCTC	CCCTCTCCAAATGGACACAT	154-240	55°C	2
AP166CV	CGGCAGTCAACGAAGCTAT	TCGCCAAAGGTTAGATTGC	165-235	52°C	2
AP175C	CCCAATAGGCTAATCAGAAGG	GCCTTATTTGCGACTGAGG	178-192	52°C	2
AP176C	CCAACACAGGGCTTACCAAG	TCACCGATCCCACCTTTCC	205-212	52°C	2
AP183CV	CATCGTGTGGAGACGAAGGT	GAACCAACAGAGAGCGGATG	185-255	56°C	2
AP188	GCGGAAGACGTGATGTTTT	GAAGAGAGCAGCCGAAGA	141	52°C	2
AP190CV	CTGTTTGATCGCCGCTATG	GTCAAGTGCTTCCTCCGATG	168-198	55°C	2
AP192CV	TTCGTCCAGCTGAAAGTGCT	GTGAATGAATCTGCGCCTCT	111-124	55°C	2
AP196	CGCAAGCTCCTTCTTTCTTG	GCGACGTAAGAAGCTCCAAC	197	54°C	2
Pares de "Primers" que não amplificaram					
AH30	TGCTCTTCTTTTCTTTTCAC	AACGGCCAAAAGTGAATTA			
AP22	ACTGCACGTCTCTCTCCTC	TGCATCTTCACCAGCCTACA			
AP23	TGCTCCCAACTGCTACCAA	TGAGCAAGAAGAACGAACGA			
AP46	GAATCACCGATCCCATTT	CCATGATTTTCATTGCGAAAC			
AP172	TGCATCTTCACCAGCCTACA	ACTGCACGTCTCTCTCCTC			
AP187	TTCGTATCGTCGTCGTTT	GTGGTGATGATGACGCAGAA			
Pares "Primers" que amplificaram com muitas bandas					
AP31	GGGGATATCGAGATGACGAG	TACCAGAATCACCACCACCA		52°C	2
AH6-125	TCGTGTTCCCGATTGCC	GCTTTGAACATGAACATGCC		60°C	2
AH282	GCAACACACACACATTTCA	GGCTCCAATCCCAACACTA		45°C	1,5
AH3	TCGGAGAACCAAGCACACATC	TTGCGCTCTTTCTCACACTC		50°C	1,5
AH11	AAATAATGGCATACTTGTGAACAATC	TTCCACCAAGGCAAGACTATG		55°C	2,5

3.2. Métodos

3.2.1. Amplificação de DNA e Eletroforese

Composição da reação em cadeia da polimerase (PCR): 10 ng de DNA genômico, 0,6U de Taq DNA polimerase (Fermentas), 1× PCR buffer (200 mM Tris pH 8,4, 500 mM KCl), 1,5-2,0 mM MgCl₂, 200 μM de cada dNTP e 0,3 μM de cada “primer”, em um volume final de 10 μl. As amplificações foram efetuadas em

termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc., Watertown, MA, USA). As condições da PCR foram as seguintes: 96 °C por 5', seguidos de 32 ciclos de 96 °C por 30" para desnaturação e de temperatura de anelamento específica para cada oligonucleotídeo (variando de 52 °C a 60 °C) por 45" seguindo-se uma extensão por 1' a 72 °C, e uma extensão final de 10' à 72 °C.

Na PCR foram adicionados 5 µl de solução desnaturante (95% (v/v) de formamida, 10 mmol de EDTA, 0,1% (p/v) azul de bromofenol e 0,1% (p/v) xileno cyanol), seguido de tratamento térmico a 95°C por 10'. Uma alíquota de 1,5 µl da reação amplificada foi aplicada no gel. A eletroforese foi conduzida em gel de poli(acrilamida) desnaturante a 5% (acrilamida/bisacrilamida 29:1, 7M uréia), em placa de seqüenciamento vertical de 38 x 50 cm, com tampão 1X TBE, à potência de 95 W, primeiro efetuando-se o aquecimento da placa até aproximadamente 50°C, seguindo-se corrida eletroforética por um período que variou de 1 h 30' até 2 h 30', de acordo com o tamanho do fragmento amplificado. A coloração do gel foi realizada utilizando-se nitrato de prata, segundo o protocolo proposto por Creste et al. (2001).

3.2.2. Coleta e análise dos dados

Os tamanhos dos fragmentos em pares de base foram estimados comparando-se com DNA padrão de peso molecular 10 pb Ladder (Invitrogen). Bandas de mesma mobilidade foram consideradas idênticas. O programa PopGene Versão 1.31(Yeh et al., 1999) foi usado para estimar a partir das frequências alélicas os seguintes Índices de Diversidade Genética: Heterozigose Observada (H_O), Heterozigose Esperada (H_E), estimadas pelo método proposto por (Nei, 1973), Distância Genética (Nei, 1978) e Número de Alelos por Loco.

A Heterozigose Observada (H_O) para cada loco foi obtida pela razão entre o número total de heterozigotos e o número de indivíduos. Para se obter a Heterozigose Média Observada, as proporções obtidas para cada loco foram somadas e divididas pelo número total de locos polimórficos.

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

em que:

H_o = Heterozigose Observada;

P_{ii} = frequência dos genótipos homozigotos.

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

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

em que:

H_E = estimativa de Heterozigose Esperada

P_i = a frequência do alelo i no loco.

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

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

Um dendrograma foi obtido usando o método das Médias Aritméticas Não Ponderadas para Agrupamento aos Pares, (*Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages* – UPGMA) com base na matriz de distâncias genéticas de Nei, (1978).

4. RESULTADOS

Os resultados obtidos na eletroforese em gel de poliacrilamida mostraram que dos 25 locos analisados, dez amplificaram microssatélites polimórficos, a saber: AH126, AP40, AP152C, AP161CV, AP166CV, AP175C, AP176C, AP183CV, AP190CV, AP192CV; quatro amplificaram microssatélites monomórficos na amostra testada, sendo eles: AP32, AP38, AP188, AP196; seis AH30, AP22, AP23, AP46C, AP172C e AP187C não amplificaram o DNA nas amostras testadas e cinco AH3, AH11, AH6-125, AH282 e AP31, apesar de amplificar o DNA, não mostraram um padrão de bandas de microssatélites adequado que pudesse ser analisado com segurança. Os Padrões de bandas gerados pelos locos AP175C e AP176C podem ser vistos nas **Figuras 2 e 3**.

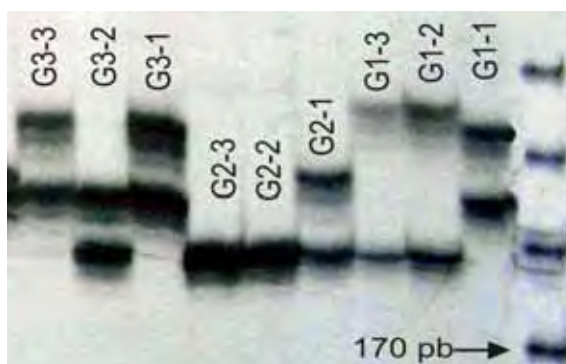


Figura 2 - Padrões de bandas gerado por três indivíduos de cada genótipo avaliado (G1, G2 e G3) pelo marcador microssatélite, a partir do loco AP175C

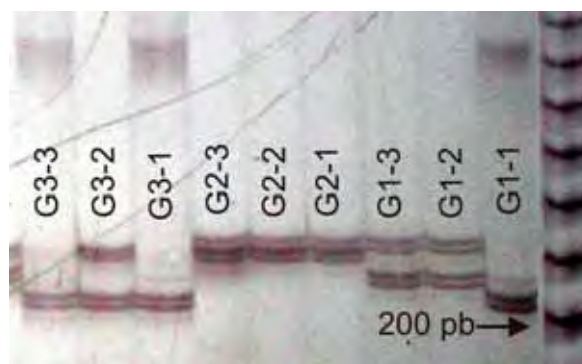


Figura 3 - Padrões de bandas gerado por três indivíduos de cada genótipo avaliado (G1, G2 e G3) pelo marcador microssatélite, a partir do loco AP176C

O número de alelos observados variou de 1 a 11, com um total de 89 alelos, considerando-se todos os locos. Considerando-se somente os microssatélites polimórficos foram observados 85 alelos com média de 8,5 alelos por loco. O tamanho dos alelos variou de 111 pb para o microssatélite do loco AP192CV a 304 pb para o microssatélite do loco AP152C e, a heterozigose observada para o conjunto de todos os genótipos e acessos estudados variou de 0,3377 para o microssatélite do loco AP183CV ate 0,8701 para o microssatélite do loco AP190CV, com média de 0,6403 (**Tabela 3**).

O genótipo G1 apresentou quatro níveis diferentes de homozigose distribuídos da seguinte forma: nove plantas com 42,86%, duas plantas com 50%, uma planta com 71,43% e uma planta com 78,57%, tendo média geral de 48,90% de homozigose, (**Tabela 4**). As plantas do mesmo genótipo, oriundas de sementes apresentaram cinco diferentes níveis de homozigose distribuídos da seguinte forma: uma planta com 42,86%, uma planta com 57,14%, uma planta com 78,57%, uma planta com 92,86% e uma planta com 100% de homozigose, com média geral de 74,29% (**Tabela 4**). Considerando-se apenas as plantas com homozigose de 70% ou mais foi observada, uma média de 84,29% (**Tabela 5**).

O genótipo G2 apresentou seis níveis diferentes de homozigose, distribuídos da seguinte forma: uma planta com 50%, seis plantas com 57,14%, uma planta com 64,29%, duas plantas com 71,43%, uma planta com 78,57% e uma com 85,71%. A média geral alcançada para as 12 plantas foi de 63,69% de homozigose (**Tabela 4**). Considerando-se as plantas com homozigose de 70% ou mais foi observado, uma média de 76,79% (**Tabela 5**).

O genótipo G3 apresentou dois diferentes níveis de homozigose distribuídos da seguinte forma: dez plantas com 42,86% e três plantas com 50% de homozigose. Dos três genótipos considerados, o G3 alcançou a menor grau de homozigose geral, com média de 44,51% (**Tabela 4**).

O genótipo G4 apresentou cinco níveis diferentes de homozigose distribuídos da seguinte forma: uma planta com 42,86%, três plantas com 50%, quatro plantas com 57,14%, uma planta com 71,43% e duas plantas com 92,86%, tendo média geral de 61,69% de homozigose, (**Tabela 4**). As plantas do mesmo genótipo oriundas de sementes apresentaram três diferentes níveis de homozigose distribuídos da seguinte forma: uma planta com 61,54%, uma planta com 92,86% e uma planta com 100% de homozigose, com média geral de 84,80% (**Tabela 4**). Considerando-se apenas as plantas com homozigose de 70% ou mais foi observada média de 94,64% (**Tabela 5**).

O acesso FALM apresentou seis níveis diferentes de homozigose distribuídos da seguinte forma: uma planta com 28,57%, quatro plantas com 35,71%,

duas plantas com 42,86%, uma planta com 50%, duas plantas com 57,14%, uma planta com 64,29%, tendo média geral de 44,16% de homozigose. A planta do mesmo genótipo oriunda de semente apresentou 92,31% de homozigose (**Tabela 4**).

As três plantas avaliadas do acesso W34 (BRA 015253), genitor feminino do acesso W34 b (BRA 031143) híbrido natural intraespecífico do qual se originaram os genótipos G1, G2, G3 e G4, se mostraram altamente heterozigotas nesta avaliação, tendo média de homozigose de apenas 30,95%, sendo duas plantas com 28,57% e uma planta com 35,71% de homozigose (**Tabela 6**).

As três plantas avaliadas do acesso V6791 (BRA 015121), provável genitor masculino do acesso W34 b (BRA 031143) híbrido natural intraespecífico do qual se originaram os genótipos G1, G2, G3 e G4, também se mostraram heterozigotas com apenas 41,39% de homozigose média observada, sendo uma planta com 28,57%, uma planta com 38,46% e uma planta com 51,14% (**Tabela 6**).

A cultivar Belmonte (BRA 031828) incluída neste estudo apresentou média de homozigose observada de 42,86% e o acesso de *A. repens* W217 (BRA 032379) apresentou 64,29% de homozigose observada (**Tabela 6**).

A distância genética observada entre o acesso W34 (BRA 015253) e os genótipos G1, G2, G3, G4, foram as seguintes 0,0778, 0,2045, 0,2073, e 0,1410 respectivamente e a distância genética observada entre o acesso V6791 (BRA 015121) e os genótipos G1, G2, G3, G4, foram respectivamente 0,2161, 0,2039, 0,2961 e 0,3293 (**Tabela 7**).

A distância genética entre o genótipo FALM com todos os demais genótipos e acessos de *A. Pinto*, incluídos neste estudo variou de 0,1829 com o genótipo G1 até 0,4638 no genótipo G3 (**Tabela 7**). Comparando o acesso da espécie *A. repens* com os outros acessos e genótipos de *A. Pinto*, observa-se uma distância genética que variou de 0,3915 para com a cv. Belmonte (BRA 031828) a 0,6888 para com o acesso FALM (**Tabela 7**).

Os dendrogramas que mostram as relações genéticas entre os genótipos e acessos de *A. Pinto* e *A. repens* estão representados nas **Figuras 4 e 5**. A análise da **Figura 4** discrimina todos os quatro, genótipos selecionados do acesso BRA

041122 e demais acessos da espécie *A. Pintoi*, além do acesso BRA 032379 da espécie *A. repens*, dando origem a 5 grupos principais. O primeiro grupo aproxima os acessos W34 (BRA 015253), V6791(BRA 015121), cv. Belmonte (BRA 031828) e os genótipos em seleção G1, G2 e G4, formando 2 subgrupos 1a e 1b. O subgrupo 1a reuniu, como os mais próximos, o acesso W34 e o genótipo G1 e, em seguida com o genótipo G4 e G4*, O subgrupo 1b agrupou a cultivar Belmonte com o acesso V6791 e, em seguida com o genótipo G2, O grupo 2 separou o genótipo G3 dos demais genótipos que foram incluídos no grupo 1, o grupo dois separou o genótipo G3 dos demais genótipos que foram incluídos no grupo 1, o grupo três aproximou os acessos FALM, FALM* e G1*. O grupo quatro faz a ligação entre o grupo dois e três e o grupo cinco separa a espécie *A. repens* dos demais acessos de *A. Pintoi*.

Os dados obtidos com os 14 locos de microssatélites permitiram separar e identificar cada uma das plantas com maior grau homozigose de cada genótipo e, podem ser utilizados para identificar cada uma dessas plantas (**Figura 5**).

4.1. Coleta de sementes

Dezoito meses após o plantio de cada indivíduo, separadamente, de cada um dos diferentes genótipos, foram coletadas sementes dos vasos individuais, com o seguinte resultado: 321 sementes foram coletadas nos 13 vasos individuais do G1, 295 sementes foram obtidas nos 12 vasos individuais do G2, 30 sementes foram coletadas nos 13 vasos do G3, 190 sementes foram obtidas nos 11 vasos individuais do G4 e 124 sementes foram obtidas nos 11 vasos do genótipo FALM.

Tabela 3 – Resultados da avaliação de locos de microssatélites: Heterozigose observada (H_O) e esperada (H_E), número de alelos por loco e variação no tamanho dos alelos

Loco	H_O	H_E^*	Nº de alelos por loco	Variação no tamanho dos alelos em pb
AH126	0,7532	0,7079	6	188-215
AP32	0	0	1	149
AP38	0	0	1	154
AP40	0,8312	0,8359	10	164-198
AP152C	0,6883	0,7904	11	255-304
AP161CV	0,7368	0,8036	9	154-240
AP166CV	0,6267	0,8753	10	160-270
AP175C	0,6883	0,7152	8	168-205
AP176C	0,4416	0,702	6	205-238
AP183CV	0,3377	0,6738	8	185-280
AP188	0	0	1	141
AP190CV	0,8701	0,8302	9	165-198
AP192CV	0,4286	0,5526	8	111-140
AP196	0	0	1	197
Total**			85	111- 304
Média**	0,6403	0,7487	8,50	

* Heterozigose esperada de Nei (Nei, 1973)

** Baseado somente nos locos polimórficos

Tabela 4 - Homozigose média observada de cada um dos genótipos avaliados (G1, G2, G3, G4) do acesso (BRA 041122) e do genótipo FALM, de acesso não conhecido, pertencente à espécie *A. Pintoi*

Genótipo	Homozigose média de cada planta	Genótipo	Homozigose média de cada planta	Genótipo	Homozigose média de cada planta	Genótipo	Homozigose média de cada planta	Genótipo	Homozigose média de cada planta
G1-1	42,86	G2-1	57,14	G3-1	50,00	G4-1	92,86	FALM-1	64,29
G1-2	42,86	G2-2	57,14	G3-2	42,86	G4-2	57,14	FALM-2	42,86
G1-3	42,86	G2-3	57,14	G3-3	42,86	G4-3	57,14	FALM-3	28,57
G1-4	42,86	G2-4	57,14	G3-4	42,86	G4-4	71,43	FALM-4	57,14
G1-5	78,57	G2-5	50,00	G3-5	42,86	G4-5	50,00	FALM-5	42,86
G1-6	42,86	G2-6	57,14	G3-6	42,86	G4-6	92,86	FALM-6	35,71
G1-7	42,86	G2-7	71,43	G3-7	42,86	G4-7	57,14	FALM-7	35,71
G1-8	50,00	G2-8	64,29	G3-8	42,86	G4-8	57,14	FALM-8	57,14
G1-9	42,86	G2-9	78,57	G3-9	42,86	G4-9	42,86	FALM-9	50,00
G1-10	42,86	G2-10	71,43	G3-10	42,86	G4-10	50,00	FALM-10	35,71
G1-11	42,86	G2-11	85,71	G3-11	42,86	G4-11	50,00	FALM-11	35,71
G1-12	50,00	G2-12	57,14	G3-12	50,00				
G1-13	71,43			G3-13	50,00				
Média	48,90	Média	63,69	Média	44,51	Média	61,69	Média	44,16

G1*-1	100,00			G4*-1	61,54	FALM*-1	92,31
G1*-2	92,86			G4*-2	92,86		
G1*-3	42,86			G4*-3	100,00		
G1*-4	57,14						
G1*-5	78,57						
Média	74,29			Média	84,80		

* Plantas oriundas de sementes de cada genótipo

Tabela 5 – Homozigose média observada entre plantas com níveis de homozigose maior que 70%, pertencentes aos genótipos G1, G2, G4 e FALM da espécie *A. Pinto*

Genótipo	Homozigose média de cada planta	Genótipo	Homozigose média de cada planta	Genótipo	Homozigose média de cada planta	Genótipo	Homozigose média de cada planta
G1-5	78,57	G2-7	71,43	G4-1	92,9	FALM*-1	92,31
G1-13	71,43	G2-9	78,57	G4-6	92,9		
G1*-1	100,00	G2-10	71,43	G4*-2	92,9		
G1*-2	92,86	G2-11	85,71	G4*-3	100,0		
G1*-5	78,57						
Média	84,29	Média	76,79	Média	94,64		

* Plantas oriundas de sementes de cada genótipo

Tabela 6 - Homozigose média observada entre plantas avaliadas dos acessos BRA 015253 (W34), BRA 015121 (V6791), BRA 031828 cv. Belmonte e do acesso BRA 015253, representando a espécie *A. repens*

Acesso	Homozigose média de cada planta	Acesso	Homozigose média de cada planta
W34-1	28,57	V6791-1	38,46
W34-2	35,71	V6791-2	28,57
W34-3	28,57	V6791-3	57,14
Média	30,95	Média	41,39
cv. Belmonte	42,86	<i>A. repens</i>	64,29

Tabela 7 – Distância genética (Nei, 1978) entre todos os genótipos e acessos

	W34	V6791	BEL	RF	G1	G2	G3	G4	Falm
W34	****								
V6791	0.1593	****							
BEL	0.2745	0.1855	****						
RF	0.4853	0.4391	0.3915	****					
G1	0.0778	0.2161	0.3932	0.6080	****				
G2	0.2045	0.2039	0.1996	0.5901	0.1886	****			
G3	0.2073	0.2961	0.4977	0.6361	0.2922	0.4753	****		
G4	0.1410	0.3293	0.4294	0.6100	0.1091	0.1885	0.4748	****	
Falm	0.2668	0.3043	0.3274	0.6888	0.1829	0.3270	0.4638	0.3254	****

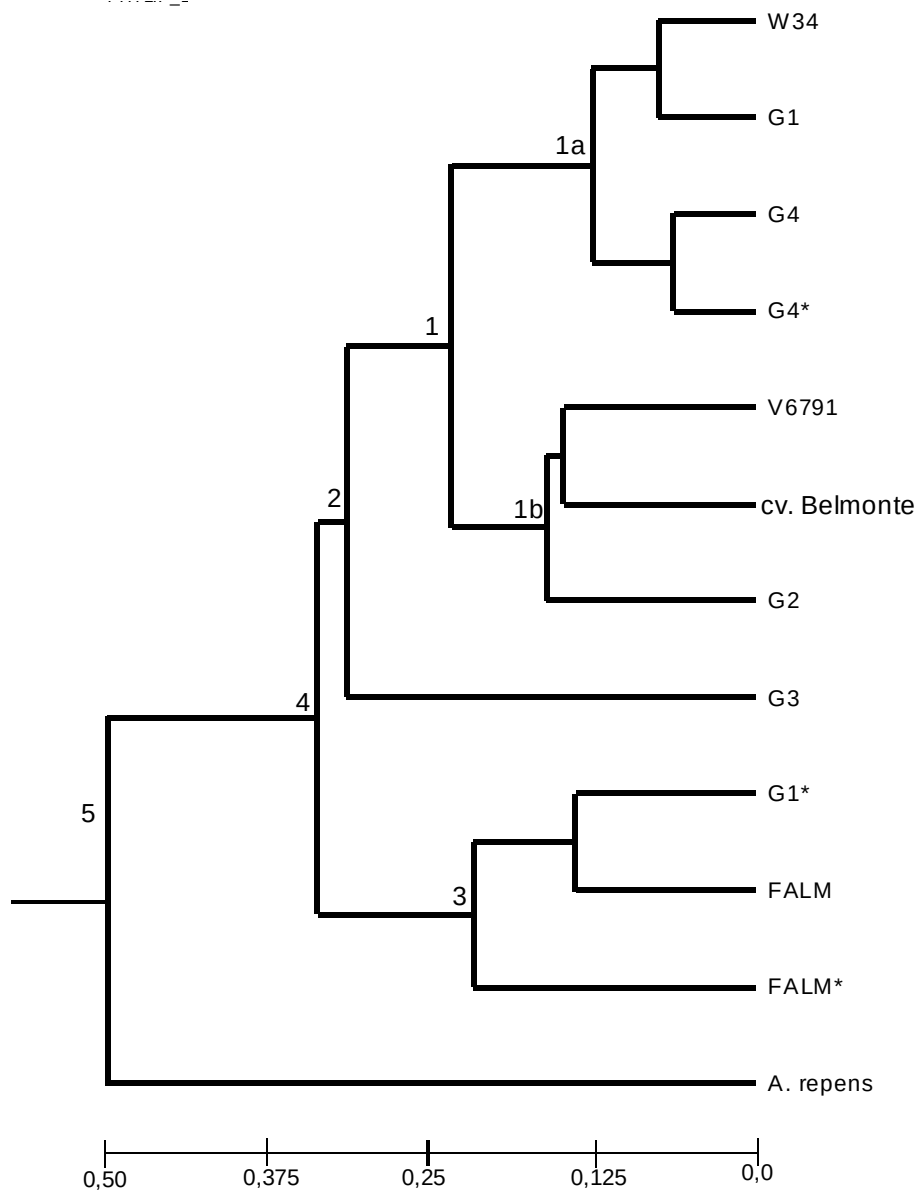


Figura 4 -Dendrograma UPGMA dos quatro diferentes genótipos avaliados do acesso BRA 041122 de *A. Pintoi*, do acesso não identificado FALM, dos acessos BRA 031828 (Cv. Belmonte), BRA 015253 (W34), BRA 015121 (V6791) da mesma espécie e do acesso BRA 032379 de *A. repens*. A distância genética foi estimada usando o programa PopGene usando o método de Nei (1978), com base em 14 locos de microssatélites, num total de 85 alelos

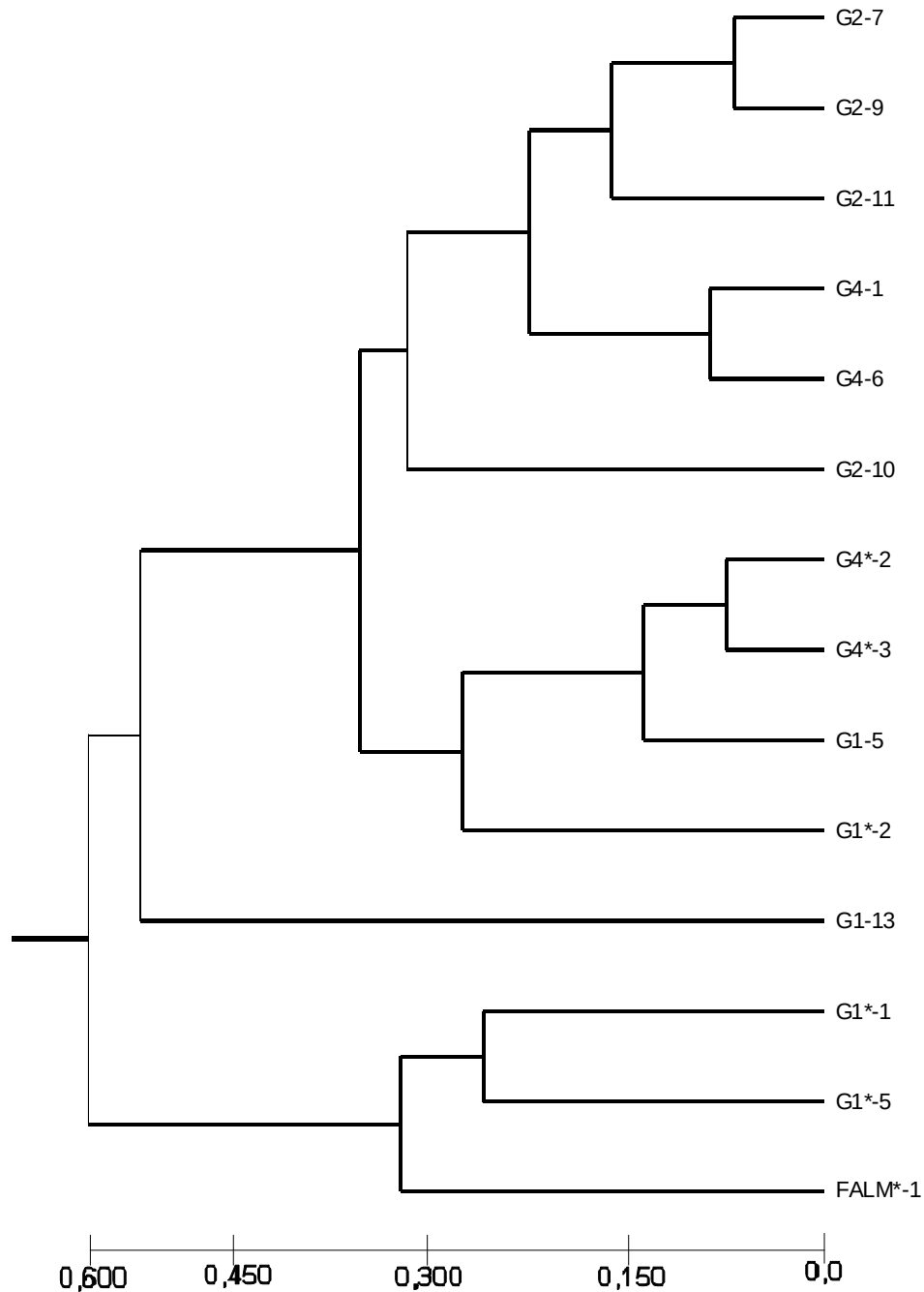


Figura 5 - Dendrograma UPGMA separando cada planta mais homozigota de três diferentes genótipos do acesso BRA 041122 (G1, G2, G4) do acesso não identificado FALM, todos da espécie *A. Pintoi*. A distância genética foi estimada usando o programa PopGene usando o método de Nei (1978), com base em 14 locos de microssatélites, num total de 85 alelos

5. DISCUSSÃO

O número de alelos observado nas espécies consideradas foi alto levando-se em consideração o número de amostras avaliadas e o número de microssatélites, num gênero no qual a espécie cultivada *A. hypogaea*, é de base genética extremamente estreita. Talvez por se tratar de uma espécie anfidiplóide (espécie ou indivíduo obtido por autoduplicação dos cromossomos de um híbrido F1 interespecífico e que contém dois genomas) e de autogamia preferencial. No entanto, o Gênero *Arachis*, na Seção *Rhizomatosae*, inclui a espécie *A. glabrata*, uma anfidiplóide que quando avaliada por microssatélites revelou uma heterozigose observada muito alta e ampla base genética para uma espécie considerada autógama, erroneamente, devido ao fato da espécie cultivada ser preferencialmente autógama pelas características da flor, (Gimenes e Moretzoshn, 2004).

Com exceção dos quatro microssatélites monomórficos, os demais variaram de seis alelos por loco (AH126 e AP176C) até 11 alelos por loco em um único loco (AP152C), com dois locos apresentando dez alelos (AP40 e AP166CV), dois com nove (AP161CV e AP190CV) e três com oito (AP175C, AP183CV e AP192CV). A média da heterozigose observada foi de 0,6403, variando de 0,3377 no loco AP183CV a 0,8701 no loco AP190CV. A média de heterozigose observada foi maior que a observada por Palmieri et al., (2002, 2004), o que pode ser justificado pela maioria das amostras utilizadas no presente trabalho serem de origem híbrida, ainda que intraespecífica. O número total de alelos observado foi menor que o observado por Palmieri et al., (2002, 2004) o devido ao maior numero de acessos utilizados por esses autores, 23 acessos de *A. Pintoi* e 10 acessos de *A. repens*.

Neste estudo somente o loco AH126 é do tipo imperfeito (Gimenes et al., 2007), sendo que o restante é do tipo perfeito (Palmieri et al., 2002, 2004).

A grande maioria dos locos de microssatélites é flanqueada por regiões altamente conservadas (Zane et al., 2002) e, podem ser facilmente transferíveis entre espécies relacionadas. De 14 locos microssatélites desenvolvidos para três diferentes seções e espécies de *Arachis*, a saber, *A. glabrata*, *A. hypogaea* e *A. Pintoi* das Seções *Rhizomatosae*, *Arachis* e *Caulorrhizae* respectivamente, 11 foram

polimórficos e apresentaram transferabilidade entre 76 acessos de 34 espécies representantes das 9 seções do Gênero *Arachis* (Hoshino et al., 2006; Bravo et al., 2006), caso também ocorrido neste trabalho com o loco AH126, desenvolvido a partir da espécie *A. hypogaea* da Seção *Arachis*.

O alto polimorfismo observado pelos marcadores microssatélites nos acessos de *A. Pintoi* avaliados, também foi encontrado em varias espécies de leguminosas tais como soja (Akkaya et al., 1992), feijão (Yu et al., 1999; Li et al., 2001), ervilha (Burstin et al., 2001), alfafa (Diwan et al., 1997) e, em outros acessos de *A. Pintoi* (Palmieri et al., 2002, 2004).

Os graus de homozigose observados nos genótipos em seleção (G1, G2, G3 e G4) e no acesso FALM, todos da espécie *A. Pintoi*, variaram de 44,16% no acesso FALM a 63,69% no genótipo G2. Considerando-se somente as plantas oriundas de sementes dos genótipos G1, G4 e do acesso FALM temos uma variação média de 74,29% para o genótipo G4 até 92,31% no acesso FALM. Esta homozigose observada, maior nas plantas oriundas de sementes pode ser explicada, visto que a espécie é tida como preferencialmente autógama e conseqüentemente grande parte dessas sementes são produzidas por autofecundação.

Considerando-se apenas as plantas com homozigose de 70% ou mais do genótipo G1, sendo elas G1-5, G1-13, G1*-1, G1*-2 e G1*-5, foi observada média de 84,29% sendo as plantas mais homozigotas as G1*1 e G1*2 com respectivamente 100% e 90% de homozigose. Estas plantas devem ser selecionadas para continuar o processo de melhoramento e, após avaliação agrônômica, comprovada a produtividade, viabilizar o lançamento do genótipo como cultivar e utilização das mesmas, sem grandes riscos de variações nas gerações subseqüentes.

Este genótipo G1 tem seu melhoramento voltado para a formação de bancos de proteína nos quais as principais características apresentadas pelas plantas são rápido crescimento, alta produção de matéria seca por individuo, alta densidade de matéria verde, estolhos bem lignificados, poucos problemas com pragas e doenças, alta produção de sementes e uma rápida recuperação após

pastejo. (Carvalho et al., 1998; Carvalho, 2000; Carvalho et al., 2001; Carvalho e Lopes, 2005).

Considerando-se as plantas com homozigose de 70% ou mais, do genótipo G2, sendo elas G2-7, G2-9, G2-10, G2-11 foi observada média de 76,79%. Deve-se utilizar estas plantas para prosseguir com o processo de melhoramento e aumento da homozigose. Este genótipo G2 está sendo melhorado para produção de feno no qual as principais características apresentadas pelas plantas são: altura média de 46 cm ou mais, produção de 8 ton/ha de matéria seca, estolhos com pouca lignina (ocos na parte aérea) apresentando crescimento procumbente o que facilitaria o corte com alta produção de sementes. (Carvalho et al., 1998; Carvalho, 2000; Carvalho et al., 2001; Carvalho e Lopes, 2005).

O genótipo G3 alcançou o menor grau de homozigose geral, com média de 44,51%. Este genótipo necessita ainda de algumas gerações de autofecundação para aumentar o grau de homozigose, para posterior utilização, pois podem nas gerações subseqüentes, surgir plantas que não correspondam as características do genótipo. Este genótipo tem seu melhoramento voltado à formação de pastagens consorciadas com gramíneas, principalmente com braquiárias, uma vez que ele se mantém indefinidamente junto com as mesmas, apresenta tolerância ao pastejo e crescimento prostrado, com os caules comportando-se como estolões, originando novas plantas vegetativamente. Além disso possui crescimento vigoroso mesmo estando sombreado, estolhos grossos e lignificados e de crescimento rente ao solo, o que contribui para a resistência ao pastejo. (Carvalho et al., 1998; Carvalho, 2000; Carvalho et al., 2001; Carvalho e Lopes, 2005).

Considerando apenas as plantas com homozigose de 70% ou mais do genótipo G4, sendo elas G4-1, G4-6, G4*-2, G4*-3 foi observada média de 92,50%. Dos genótipos avaliados este é o mais homozigoto e, pode após avaliação agrônômica, ser prontamente utilizado sem riscos de segregações que não correspondam às características do genótipo.

O genótipo G4, também oriundo do acesso W34b, (BRA 031143) híbrido natural intraespecífico, foi avaliado agronomicamente junto com os três genótipos

anteriores (G1, G2, G3) e, apresentou desempenho intermediário entre os genótipos G1 e G3 nas condições de avaliação agronômicas feitas por Carvalho, (2000). Pode, em certas condições, se mostrar até superior aos demais, sendo este o motivo de ter sido incluído neste estudo. Após novas avaliações agronômicas será determinada a melhor indicação de uso para este genótipo.

No genótipo FALM foi observada média geral de 44,16% de homozigose, em um conjunto de 11 plantas, sendo que apenas uma planta (FALM*-1) oriunda de semente apresentou 92,31% de homozigose. Para este genótipo recomenda-se mais algumas gerações de autofecundação para que se aumente a homozigose das demais plantas antes de serem utilizadas, evitando-se riscos de grandes variações nas próximas gerações.

O genótipo FALM é um acesso não identificado de *A. Pintoi* e que não foi avaliado por Carvalho (2000), mas que em observações posteriores feitas pelo autor, demonstrou crescimento vigoroso mesmo em regiões sombreadas além de ser mais produtivo que os quatro genótipos avaliados. Este é o principal motivo deste genótipo ter sido incluído para avaliações, no presente estudo.

A homozigose observada no acesso W34 (BRA 015253), genitor feminino do acesso W34b (BRA 031143), foi baixa (30,95%), o mesmo tendo sido observado no acesso V6791 (BRA 015121), provável genitor masculino do W34b (Carvalho, 2000), que apresenta homozigose média de 41,39%.

Há duas possíveis explicações para o alto grau de heterozigose nestes dois acessos, considerando-se que são acessos de plantas tidas como preferencialmente autógamas. Na primeira explicação poder-se-ia dizer que as plantas já estavam altamente heterozigotas no seu local de coleta e, que assim permaneceram por potencial ocorrência de apomixia, uma vez que em estudos citológicos foi evidenciado apomixia em *A. hypogaea* (Simpson et al., 1994). Caso este evento ocorra em espécies com potencial forrageiro, pode explicar o porquê dessas plantas se manterem altamente heterozigotas.

A segunda explicação, a mais provável, sugere que houve fecundações cruzadas, pois as plantas permaneceram, sob telado, por 7 anos, próximas de

diversos acessos de *A. Pintoi* na Fundação Faculdade de Agronomia “Luiz Meneghel”, Bandeirantes PR, local onde se iniciou o processo de melhoramento. A literatura cita que tais plantas são preferencialmente autógamas (Krapovickas & Gregory, 1994), e devido a essa informação, normalmente são mantidas sem grande proteção. Entretanto, segundo Ketring, (1979) e Simpson et al., (1994) já se observou entre elas a ocorrência de polinização cruzada por diversas espécies de abelhas. Estudos de Oliveira e Valls (2003) demonstraram evidências de alogamia em alguns acessos da Secção *Caulorrhizae*.

Os resultados aqui apresentados indicam a necessidade de estudos específicos no sistema de reprodução da espécie *A. Pintoi* e, de cuidados ao manter muitos acessos desta espécie num mesmo local, indicando a possibilidade de que a porcentagem de fecundação cruzada, neste caso, seja maior do que o esperado para esta espécie, dita preferencialmente autógama. Em espécies autógamas é esperada pouca diferenciação genética entre indivíduos de uma mesma população, sendo que a maior parte da variabilidade genética encontra-se entre populações (Jain, 1976; Loveless & Hamrick, 1984; Linhart & Grant, 1996)

A cultivar Belmonte (BRA 031828), incluída neste estudo, apresentou homozigose observada de 42,86%. Esta cultivar tem como característica a baixa produção de sementes e sua multiplicação e plantio se dá exclusivamente por reprodução vegetativa. A alta heterozigose encontrada pode ser devido ao acesso ter se originado de um provável cruzamento natural entre outros acessos de *A. Pintoi* e ser um híbrido intraespecífico (Comunicação pessoal Valls, 2007), fato que já foi descrito por Teixeira, (1999) e Carvalho, (2000) e que, pelo fato de não produzir sementes permanece nessa condição. De fato é encontrada variabilidade quanto à produção de sementes entre os acessos de *A. Pintoi* (Carvalho, 1996), que oscilam de zero a sete t/ha (Pizarro, 2001).

O fato dos acessos W34 e V6791 se agruparem com os genótipos G1, G2 e G4 era esperado, uma vez que esses acessos W34 e V6791 são considerados os prováveis genitores do genótipo original W34b, do qual, foram selecionados os genótipos citados (Carvalho, 2000). O agrupamento de G4 e G4* era esperado, pois o G4* é composto de plantas oriundas de sementes do genótipo G4 e, todos se

originaram do cruzamento do W34. O subgrupo 1b confirma a participação do acesso V6791 na origem desses genótipos, juntamente com o W34, originando o W34b (BRA 031143).

A separação do grupo 2 confirma a suspeita de que o genótipo G3 coletado como possível segregação do W34b é, na realidade um híbrido entre o acesso W34 e acesso desconhecido de *A. Pintoi*. É preciso esclarecer que independente da origem do G3, tem se confirmado seu ótimo desempenho em consorciação com as gramas estrela e seda respectivamente *Cynodon plectostachius* e *Cynodon dactylon*.

O agrupamento dos genótipos FALM e FALM* era esperado, pois o acesso FALM não tem a mesma origem dos outros genótipos. Porém o agrupamento com o genótipo G1*, composto por plantas oriundas de sementes coletadas do genótipo G1, sugere que houve fecundação cruzada entre os genótipos G1 e FALM. Isso pode ter acontecido, uma vez que ambos estavam próximos no campo (distância de 4 a 5 metros aproximadamente) e, que o G1* pode ser outro híbrido intraespecífico natural da espécie *A. Pintoi* entre o acesso FALM como genitor masculino e G1 como genitor feminino. Este resultado sugere, neste caso, taxas de fecundação cruzada maior do que seria esperado para essas espécies tidas como autógamias.

A separação da *A. repens* dos demais acessos de *A. Pintoi* era esperada, pois resultados semelhantes foram obtidos nos estudos com marcadores morfológicos (Monçato, 1995), com RAPD (Gimenes et al., 2000), com AFLP (Barata et al, 2001) e com microssatélites (Palmieri, 2003).

Ficou evidenciado pelos dados obtidos que nos genótipos G1, G2, G3 e G4 há plantas com diferentes graus de homozigose e conseqüentemente de heterozigose e isso se deve a autofecundações e fecundações ocorridas no canteiro matriz como era esperado, já que as plantas são oriundas de um canteiro que teve início com uma única planta, porém híbrida.

Entre os genótipos avaliados neste estudo, observou-se a ocorrência de locos em heterozigose, o que também é desejado, uma vez que um certo grau de

heterozigose é necessário para manter a variabilidade genética e a capacidade de resposta a mudanças ou estresses ambientais, garantindo um ótimo desempenho para a futura cultivar.

Os dados moleculares estão de acordo com os resultados obtidos na coleta de sementes de cada genótipo. Os genótipos G1, G2 e G4, dos quais foram obtidas 321, 295 e 190 sementes respectivamente, apresentaram as plantas com maior grau de homozigose, pois a maior eficiência reprodutiva (mostrada pela maior produção de sementes) acelerou o aumento da homozigose.

O genótipo G3 apresentou a menor homozigose, entre os genótipos, no processo de melhoramento produzindo apenas 30 sementes o que pode explicar o motivo deste genótipo estar com o nível de homozigose ainda baixo. Todas as sementes coletadas serão germinadas individualmente e utilizadas para produção de uma nova geração de genótipos, visando aumentar a homozigose alcançada pelas mesmas.

6. CONCLUSÕES

Foi detectada grande variabilidade genética na espécie *A. Pintoi*, o que possibilita cruzamentos futuros entre os genótipos selecionados buscando a obtenção de outros genótipos superiores.

Os Genótipos G1, G2 e G4 já possuem plantas com alto grau de homozigose e, após a confirmação da produtividade dos mesmos a campo, poderão ser lançados como novas cultivares de *A. Pintoi*.

O genótipo G3 e o acesso FALM ainda necessitam de algumas gerações de autofecundação, para aumentar a homozigose e, posteriormente desenvolver uma nova cultivar de *A. Pintoi*.

Os resultados obtidos indicaram que as plantas oriundas de sementes do genótipo G1, formaram-se por cruzamentos entre esse genótipo e o acesso FALM e que, portanto são híbridas, necessitando de avaliação posterior para possível utilização no melhoramento ou lançamento como futura cultivar.

De modo geral, os acessos avaliados apresentaram grau de heterozigose observados maior do que o esperado para espécies tidas como preferencialmente autógamas.

7. REFERÊNCIAS

AGROONLINE (Artigo de autoria: Julio César Freitas Santos – Pesquisador - EMBRAPA). **Cobertura verde na lavoura cafeeira**. Disponível em <http://www.agronline.com.br/artigos/artigo.php?id=344>. Acesso em 24/08/2007.

AKKAYA M.S.; BHAGWAT A. A.; CREGRAN P.B. **Length polymorphism of simple sequence repeat DNA in soybean**. *Genetics* 1992, v.132, p. 1131-1139.

ALMEIDA, D.L. de; SUDO, A.; EIRA, P.A. da; RIBEIRO, R. de L.D.; CARVALHO, S.R. de; FRANCO, A.A.; TEIXEIRA, M.G.; DE-POLLI, H.; RUMJANEK, N.G.; FEIDEN, A.; AQUINO, A.M. de; STEPHAN, M.P.; SILVA, E.M. R. da; ABOUD, A.C. de S.; GUERRA, J.G.M.; LEAL, M.A. de A.; LIGNON, G.B.; PEREIRA, J.A.R.; BORJA, G.E.M.; RICCI, M. dos S.F.; SOUZA, E.R. de **Sistema integrado de produção agroecológica**. Seropédica: EMBRAPA *Agrobiologia*, nov. 1998. 14p. (EMBRAPA-CNPAB. Documentos, 70).

ANDRADE, C. M. S.; VALENTIM, J. F. **Adaptação, produtividade e persistência de *Arachis pinto* submetido a diferentes níveis de sombreamento, no Acre**. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 34, 1997, Juiz de Fora. Anais... Juiz de Fora:SBZ, 1997. p.341-343.

ANUÁRIO BRASILEIRO DA AGROPECUÁRIA - ANUALPEC. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2004. p. 46-47.

ARGEL, P.J., VEIGA, J.B. **Manejo de la competencia entre forrajeras y malezas en el establecimiento y recuperación de las pasturas**. In: LASCANO, C.E.; SPAIN, J.M. (Eds). *Establecimiento y renovación de pasturas: conceptos, experiencias y enfoque de la investigación*. Memorias...Cali, Colombia: CIAT, 1991. p.237-256.

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

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

ARGEL, P.J.; VILLARREAL, M.M. **Cultivar porvenir – Nuevo Maní forrajero Perenne (*Arachis pinto* Krapov y Greg nom. nud. CIAT 18744)**: Leguminosa herbácea para alimentación animal el mejoramiento y conservación del suelo el embellecimiento del paisaje. 2000. Disponível em: <http://www.ciat.cgiar.org/tropileche/documentos/articulos/articulos.pdf/mani.pdf/ARACHIS_3.pdf>. Acesso em 28/08/2007.

BANKS, D. J. **Hand-tripped flowers promote seed production in *Arachis lignosa*, a wild peanut**. *Peanut Science*, v. 17, p. 22-24, 1990.

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

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

BARRADAS CAA; FREIRE LR; ALMEIDA DL; DE-POLLI H. 2001. **Comportamento de alguns adubos verdes de inverno na Região Serrana Fluminense**. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília 36: 1461-1468.

BOGDAN, A. V. **Tropical pasture and fodder plants**. Londres, Inglaterra: Longman Group, 1977. 475 p. (Tropical Agriculture Series).

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

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

BRAVO, Juliana Pereira, HOSHINO, Andrea Akemi, ANGELICI, Carla Maria Lara C.D. *et al.* **Transferability and use of microsatellite markers for the genetic analysis of the germplasm of some *Arachis* section species of the genus *Arachis***. *Genet. Mol. Biol.* [online]. 2006, vol. 29, no. 3 [cited 2007-10-01], pp. 516-524. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-47572006000300021&lng=en&nrm=iso>. ISSN 1415-4757.

BRONDANI, C.; BRONDANI, R. P. V.; RANGEL, N. P. H.; **Utilização de marcadores moleculares em programas de ampliação da base genética de espécies cultivadas**: Santo Antônio de Goiás : Embrapa Arroz e Feijão, 36 p. (Documentos / Embrapa Arroz e Feijão, ISSN 1678-9644 ; 155), 2003. Disponível em http://www.cnpaf.embrapa.br/publicacao/seriedocumentos/doc_155.pdf. Acesso em 24/10/2007.

BRUYN, T.F.L. **Estabelecimento do amendoim forrageiro (*Arachis pintoi*) cv. Amarillo em associação com milho (*Zea mays*)**. Pelotas, 2003. 56 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Agronomia "Eliseu Maciel", Universidade Federal de Pelotas.

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

BURTON, G.W.; HANNA, W.W. Bermudagrass. In: BARNES, R.F. (Ed.) **Forage**. 5. ed. Ames: Iowa State University Press, 1995. p.421-430.

CADISCH, G.; SCHUNKE, R.M.; GILLER, K.E. **Nitrogen cycling in a pure grass pasture and a grass-legume mixture on a red Latossol in Brazil**. *Tropical Grassland*, v.28, n.1, p.43-52, 1994.

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

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

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

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

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

CARVALHO, S.; MONÇATO, L. ; MONTEIRO, J. P. ; VALLS, J. F. M. ; LOPES, C. R. . **Evaluation of segregating generations of an *Arachis pintoi* hybrid accession, using morphological and molecular markers**. In: Plant and Animal Genome IX, 2001, San Diego, CA. Final Abstracts Guide for Plant and Animal Genome IX, 2001. v. IX. p. 138-138.

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

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

CAVALI, J.; VALENTIM, J.F.; GOMES, S.E.S. **Produção de matéria seca de amendoim forrageiro sob diferentes alturas e intervalos de corte**. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 39., 2002, Recife, **Anais...** Recife: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2002. CD-ROM.

COOK, B. G.; WILLIAMS, R. J.; WILSON, G. P. M.; **Register of australian plant cultivars**. B. Legumes. 21. *Arachis* (a) *Arachis pintoi* Krap. & Greg. nom. nud. (Pinto peanut) cv. Amarillo. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, Melbourne, v. 30, p. 445-446, 1990.

COOK, B. G.; JONES, R. M. & WILLIAMS, R. J. **Regional experience with forage *Arachis* in Australia**. In.:KERRIDGE, P. C.; HARDY, B. (eds.). *Biology and Agronomy of Forage Arachis*. Cali: CIAT, 1994. Chapter 14. p. 158-168.

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

DAMÉ, P.R.V.; REIS, J.C.L.; SIEWERDT, L. et al. **Produção e qualidade da forragem de acessos de *Arachis pintoi* em condições de clima temperado no litoral sul do Rio Grande do Sul.** *Agropecuária Clima Temperado*, Pelotas, v.1, n.2, p. 235-243, 1998.

DESCHAMPS, FRANCISCO CARLOS; TCACENCO, FERNANDO ADAMI. **Parâmetros nutricionais de forrageiras nativas e exóticas no Vale do Itajaí, Santa Catarina.** *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v. 35, n. 2, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2000000200024&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 22 Ago 2007.

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

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

ESPINDOLA, José Antonio Azevedo, GUERRA, José Guilherme Marinho, PERIN, Adriano et al. **Bananeiras consorciadas com leguminosas herbáceas perenes utilizadas como coberturas vivas.** *Pesq. agropec. bras.*, Mar. 2006, vol.41, no.3, p.415-420. ISSN 0100-204X. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2006000300007&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 24 agosto 2007.

ETIENNE, H.; ANTHONY, F.; DUSSERT, S.; FERNANDEZ D.; LASHERMES P.; BERTRAND, B. **Biotechnological applications for the improvement of coffee (*Coffea arabica* L.).** In *Vitro Cellular Developmental Biology - Plant*, Charlotte, v. 38, p.129-138, 2002.

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

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

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

FERGUSON, J. E. **Seed biology and systems for *Arachis pintoi*.** In: KERRIDGE, P. C.; HARDY, B. (eds.). *Biology and Agronomy of Forage Arachis*. Cali, Colômbia: CIAT, 1994. Capítulo 11. p. 122-133.

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

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p

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

GETHI, J. G.; LABATE, J. A.; LAMKEY, K. R.; SMITH, M. E.; KRESOVICH, S. SSR variation in important U. S. maize inbred lines. **Crop Science**, Madison, v. 42, n. 4, p. 952-957, 2002.

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

GIMENES, M. A. & MORETZSOHN, M.C. **Avanços na caracterização molecular e mapeamento genético em *Arachis*.** In IV Encontro Latino Americano de Especialistas em *Arachis*, 2004, Brasília - DF. Palestra Documentos/EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 0102-0110; 127, 2004, p. 20-23. Disponível em www.cenargen.embrapa.br/publica/trabalhos/doc127.pdf. Acesso em 25/08/2007.

GIMENES, M. A., et al. **Characterization and transferability of microsatellite markers of the cultivated peanut (*Arachis hypogaea*).** In: *BMC Plant Biology* V. 7; 2007. Disponível em <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1829157>.

GOLDSTEIN, D.B., SCHLÖTTERER, C. **Microsatellites. Evolution and applications.** New York: Oxford

University Press, Inc., 2000. 352p.

GOMIDE, D. N. **Leguminosas: espécie disponíveis, fixação de nitrogênio e problemas fisiológicos para o manejo da consorciação.** In: *Congresso Brasileiro de Pastagens*, 86 e Simpósio sobre Manejo de Pastagem, 8., Anais...Piracicaba, SP. PEIXOTO, A. M.; MOURA, J.C. de; Faria, V. P. de. (eds.). FAEALQ., 1986. P. 389-411.

GONZALES, M. S.; NEURKVAN, L. M.; ROMERO, F. et al. **Produccion de leche en pasturas de estrella africana (*Cynodon nlemfluensis*) solo y asociado con *Arachis pintoi* o *Desmodium ovalifolium*.** *Pasturas tropicales*, v. 18, n. 1, p. 2-12. 1996.

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

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

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

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

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

GUPTA PK, BALYAN HS, SHARMA PC AND RAMESH B. (1996) **Microsatellites in plants: A new class of molecular markers.** *Current Science* 70:45-54.

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

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

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

HOSHINO, Andrea Akemi, BRAVO, Juliana Pereira, ANGELICI, Carla M.L.C.D. et al. **Heterologous microsatellite primer pairs informative for the whole genus *Arachis*.** *Genet. Mol. Biol.* [online]. 2006, vol. 29, no. 4 [cited 2007-10-01], pp. 665-675. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-47572006000400016&lng=en&nrm=iso>. ISSN 1415-4757.

IBGE, **Produção da Pecuária Municipal**, v.33, p. 3-9, 2005. Disponível em: <http://200.255.94.70/home/estatistica/economia/ppm/2005/ppm2005.pdf>. Acesso em 02/11/2007

JAIN, S.K. **The evolution of inbreeding in plants.** *Annu. Rev. Ecol. Syst.* v.7, p.469-495, 1976.

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

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

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

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

Kutil B.L.; Williams C.G. **Triplet-repeat microsatellites shared among hard and soft pines.** *Journal of Heredity* 92:327-32, 2001.

LADEIRA, M.M.; RODRIGUEZ, N. M.; BORGES, I.; GONÇALVES, L. C.; SALIBA, E. O. S.; BRITO, S. C.; SÁ, L. A. P. **Avaliação de feno de *Arachis pintoi* utilizando o ensaio de digestibilidade in vivo.** *Revista*

Brasileira de Zootecnia, v. 31, p. 2350-2356, 2002.

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

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

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

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

LI, Y.C., KOROL, A.B., FAHIMA, T., BEILES, A., NEVO, E. **Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review.** *Mol. Ecol.*, v.11, p.2453-65, 2002.

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

LINHART, Y.B. & GRANT, M.C. **Evolutionary significance of local genetic differentiation in plants.** *Annu. Rev. Ecol. Syst.* v.27, p.237-277, 1996.

LITT, M., LUTY, J.A. (1989) a hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a inucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 44, p.397 - 401

LOVELESS, M.D. & HAMRICK, J.L. **Ecological determinants of genetic structure in plant populations.** *Ann. Rev. Ecol. Syst.* v.15, p.65-95, 1984.

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

MARASCHIN, G.E. **Oportunidade do uso de leguminosas em sistemas intensivos de produção animal a pasto.** In: A. M. PEIXOTO; J. C. de MOURA e V. P. de FARIA In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 14., 1997 Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ. 1997.p.139-160.

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

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

MOREIRA, L.M. Aspectos fisiológicos e ambientais importantes para o manejo de forrageiras. 2001. Disponível em: <<http://www.sbz.org.br/scripts/comunidades/msgcontent.asp?ID=145&GroupID=49>>. Acesso em 05 jun. 2001.

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

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 55, p. 335-350, 1987.

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

NASCIMENTO, I.S. **Adubação e utilização do amendoim forrageiro (*Arachis pintoi* Krapovickas & Gregory) cv. Alqueire-1.** Pelotas, 2004. 75f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Agronomia "Eliseu Maciel", Universidade Federal de Pelotas.

NASCIMENTO, I. S.; **Cultivo do amendoim forrageiro**, *R. Bras. Agrociência*, Pelotas, v. 12, n. 4, p. 387-393, out-dez, 2006.

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

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceeding National Academy Science**, v. 70, n. 12, p. 3321-3323, 1973.

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

OLIVEIRA, A.C.B.; CAIXETA, E.T.; ZAMBOLIM, E.M.; ZAMBOLIM, L.; SAKIYAMA, N.S.; **Aplicação técnica de marcadores moleculares no melhoramento de plantas.** Campinas: Instituto Agronômico, 17p. (Documentos IAC, 81, ISSN: 1809 – 7693), 2007. Disponível em: http://www.iac.sp.gov.br/BTonline/Documentos_IAC_81.pdf . Acesso em 24/10/2007

OLIVEIRA, I.P., CASTRO, F.G.F., KLUTHCOUSKI, J. **Sistema barreira – uma opção de renovação de pastagens degradadas.** In: SEMANA DE ZOOTECNIA, 11, 1995, Ciclo de Palestras de Atualização em forragicultura e pastagens, 1., 1995. Anais... S.I.: UFRRJ.

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

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

OLIVEIRA NG; DE-POLLI H; ALMEIDA DL; GUERRA JGM. **Plantio direto de alface adubada com cama de aviário sobre coberturas vivas de grama e amendoim forrageiro.** *Hortic. Bras.*, Jan./Mar. 2006a, vol.24, no.1, p.112-117. ISSN 0102-0536. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-05362006000100023&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 24 Aug 2007

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

PACIULLO, D. S. C.; AROEIRA L. J. M.; ALVIM M. J.; CARVALHO M. M.; **Características produtivas e qualitativas de pastagem de braquiária em monocultivo e consorciada com estilosantes.** *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v. 38, n. 3, 2003 . Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2003000300012&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 19 Nov 2007

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

PADILHA, L.; GUIMARÃES, C.T.; PAIVA E. **Avaliação da pureza genética em sementes de milho utilizando marcadores microsatélites:** Sete Lagoas, MG: Embrapa Milho e Sorgo, 65p. (Circular Técnica, 30, ISSN 1518-4269), 2003. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/publica/circul30.pdf>. Acesso em 20/10/2007.

PADUA, F.T.; ALMEIDA J.C.C.; SILVA T. O.; ROCHA N.S.; NEPOMUCENO D.D.; **Dry matter production and chemical composition of three tropical forage legume hay in two cultivate systems.** *Cienc. Rural*, Santa Maria, v. 36, n. 4, 2006 . Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782006000400032&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 19 Nov 2007.

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

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

PALMIERI, D.A. **Estudos moleculares de espécies de interesse agrônomo da Seção Caulorrhizae, Gênero Arachis.** 2003. 80 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, Genética), Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP

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

PEÑALOZA, A.P.S., VALLS, J.F.M. **Número cromossômico de novas espécies de Arachis(leguminosae).** In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA A AMÉRICA LATINA E

CARIBE, 2. 1999, Brasília. *Anais...* Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia. 1999. CD ROM. (Resumo nº 177).

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

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

PEREIRA, J.M.; MORENO, R.M.A.; CANTARUTTI, R.B. et al. **Crescimento e produtividade estacional de germoplasma forrageiro**. In: CEPLA/CEPEC (ed.) *Informe de Pesquisa -1987/1990*. Ilhéus: CEPLAC, 1995, p. 307-309.

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

PEREIRA, J.M.; RESENDE, C.P.; SANTANA, J.R. **Amendoim forrageiro cv. Belmonte (*Arachis pintoi* Krapov & Gregory): Uma nova opção de leguminosa forrageira**. CEPLAC. 1999. Disponível em: <http://www.ceplac.gov.br/radar/amendoim%20forrageiro.htm> Acesso em 01 out. 2003.

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

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

PEREZ, N. B.; NABINGER, C.; MARASCHIN, G. E. **Desenvolvimento, lançamento e adoção de uma cultivar de amendoim forrageiro – *Arachis pintoi*, Krapovickas & Gregory – para o sul do Brasil**. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA A AMÉRICA LATINA E CARIBE, 3, 2001, Londrina, PR. *Anais...* Londrina: IAPAR, 2001. p. 90-93.

PIZARRO, E. A.; VALLS, J. F. M.; CARVALHO, M. A.; CHARCHAR, M. J. D. ***Arachis* spp.: Introduction and evaluation of new accessions in seasonally flooded land in the Brazilian Cerrado**. In.: *INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS*, 17, 1993, Palmerston North. *Proceedings...* Palmerston North, New Zealand, 1993. p. 2146-2148.

PIZARRO, E.A.; RINCÓN, A. **Regional experience with forage *Arachis* in South America**. In: KERRIDGE, P.C.; HARDY, B. (Eds.) *Biology and agronomy of forage Arachis*. Cali: CIAT, 1994. p.144 - 157.

PIZARRO, E. A. **Progressos en la inserción de especies forrajeras de *Arachis* en la matriz agrícola latinoamericana y mundial**. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA A AMÉRICA LATINA E CARIBE, 3., 2001, Londrina, PR. *Anais...* Londrina: IAPAR, 2001. p. 94-97.

PRASAD, M.; VARSHNEY, R. K.; ROY, J. K.; BALYA, H. S.; GUPTA, P. K. **The use of microsatellites for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat**. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 100, n. 3/4, p. 584-592, 2000.

PURCINO, H. M. A. ; VIANA, M.C.M. ; FREIRE, F.M. ; Mcêdo, G.A.R. ; MARIEL, I.E. ; MENDES, I. . **Avaliação da cobertura do solo com *Arachis pintoi*, como fonte de nitrogênio para produção de milho**. In: *41 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia*, 2004, Campo Grande. *Anais da Sociedade Brasileira de Zootecnia*. Campo Grande : SBZ, 2004. v. 41. p. 1-4.

RAMOS, A. K. B.; PIZARRO, E. A.; CARVALHO, M. A; VALLS, J. F. M e RODRIGUES, R. 2002. **Adaptabilidade e estabilidade de genótipos de *Paspalum* spp. para produção de forragem no cerrado**. In: *Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia*, 39 *Anais. Forragicultura*. UFRPE-Pernambuco-Pe. SBZ, 2002.

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

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

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

Scot Consultoria. Áreas de pastagens versus a agricultura. p2, 2006. Disponível em: http://www.arteeideias.com/site/download/pastagens_x_agricultura.pdf. Acesso em 03/11/2007.

SEAGRI (Secretaria da Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária, Ba). **Amendoim para o avestruz**. Disponível em <http://www.seagri.ba.gov.br/noticias.asp?qact=view&exibir=clipping¬id=4930>. Acesso em 24/08/2007.

SENIOR, M. L.; MURPHY, J. P.; GOODMAN, M. M.; STUBER, C. W. **Utility of SSRs for determining genetic similarities and relationships in maize using an agarose gel system**. *Crop Science*, Madison, v. 38, n. 4, p. 1088-1098, 1998.

SMITH, J. S. C.; CHIN, E. C. L.; SHU, H.; SMITH, O. S.; WALL, S. J.; SENIOR, M. L.; MITCHEL, S. E.; KRESOVICH, S.; ZIEGLE, J. **An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (Zea mays L.): comparisons with data from RFLPs and pedigree**. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 95, n. 1/2, p. 163-173, 1997.

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

SOUTHERN, E. M. **Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis**. *Journal of Molecular Biology*, London, v. 98, n. 3, p. 503-517, Nov. 1975.

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

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

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

THOMAS, R.J. Role of legumes in providing N for sustainable tropical pasture legumes. *Plant and Soil*, v.174, n.1-2, p.103-118, 1995.

TÓTH, G., GÁSPARI, Z., JURKA, J. **Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis**. *Genome Res*, v.10, p.967-81, 2000.

TOTHIL, J.C. **Comparative aspects of the ecology of pastures**. In: WILSON, J.R. (Ed.). *plant relations in pastures*. Brisbane: CSIRO, 1978. P.385-402.

VALENTIM, J. F. & MOREIRA P. **Produtividade de forragem de gramíneas e leguminosas em pastagens puras e consorciadas no Acre**. In: *Boletim de Pesquisa*, número 33, 2001 EMBRAPA Acre, 36p. Disponível em www.cpaafac.embrapa.br/pdf/bp33.pdf. Acesso em 24/08/2007

VALENTIM, J. F. **Yield, quality botanical composition and persistence of tropical grasses, a legume and grass-legumes associations as affected by fertilizer nitrogen**. 1985. 127 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade da Flórida, Gainesville, Flórida, EUA.

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

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

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

- VALLS, J.F.M., PIZARRO, E.A. 1994. **Collection of wild *Arachis***. In: Kerridge, P.C., Hardy, B. Biology and agronomy of Forage *Arachis*. Cali, CIAT, 1994, chapter 2, p 19-27.
- VALLS, J.F.M., SIMPSON, C.E. 1994. **Taxonomy, natural distribution, and attributes of *Arachis***. In: Kerridge, P.C., Hardy, B. Biology and Agronomy of Forage *Arachis*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia, p. 1-18.
- VALLS, J.F.M.; SIMPSON, C.E. **Novas espécies de *Arachis* (Leguminosae)**. In: VEIGA, R.F.A; BOVI, M.L.A; BETTI, J.A.; QUEIROZ-VOLTAN, R.B. (Eds.). SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS, 1., 1997, Campinas. *Programas e Resumos...* Campinas: IAC/EMBRAPA-Cenargen, 1997. p.27.
- VALLS, J.F.M. **Variability in the genus *Arachis* and potential forage uses**. In: Springer, T.L., VanCoppennolle, B., Watanabe, I., VanHove, C., Second, G., Huang, N., McCouch, S.R. 1993. Genetic diversity and phylogeny analysis of *Azolla* based on DNA amplification by arbitrary primers. *Genome*, 36: 686-693.
- VALLS, J. F.; CASTRO, C. M.; OLIVEIRA, M. A. P.; TEIXEIRA, C. C. **Increase of genetic variability of forage *Arachis* by intra and interespecific hybridization**. IN: *International Grassland Congress*, 19, 2001, Piracicaba. *Proceedings...* Piracicaba, Brazil, 2001. p. 496-497.
- VALLS, J. F. M. Situação atual da coleta e utilização de germoplasma de espécies silvestres de *Arachis* In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA A AMÉRICA LATINA E CARIBE, 3, 2001, Londrina, PR. *Anais...* Londrina: IAPAR, 2001. p. 105-108.
- VALLS, J.F.M. & SIMPSON. 2005. **New species of *Arachis* (leguminosae) from Brazil, Paraguay and Bolivia**. *Bonplandia* 14(-2): 35-65. ISSN: 0524-0476.
- VIANA, M.C.M.; PURCINO H.M.A.; KONZEN E. A.; BOTREL M.A.; GIANASI L.; MASCARENHAS M. H. T.; FREIRE F. M.; Performance of alfalfa cultivars in the Cerrado ecosystem of Minas Gerais State, Brazil. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 39, n. 3, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2004000300013&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 19 Nov 2007.
- WEBER, J. L.; MAY, P. E. **Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the Polymerase Chain Reaction**. *American Journal of Human Genetics*, Chicago, v. 44, n. 3, p. 388-396, Mar. 1989.
- WEBER J.L. (1990) **Informativeness of human (dC-dA)n (dG-dT)n polymorphisms**. *Genomics* 7:524-30.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. **DNA polymorphisms amplified by arbitrary oligos are useful as genetic markers**. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v.18, p.6531-6535, 1990.
- WENDLING, I. J. ; CARNEIRO, J. C. ; VALENTIM, J. F. ; CARNEIRO, J. C. . Efeito da altura e frequência de corte na produção de matéria seca de *Arachis pinto* (BRA-031143) nas condições edafoclimáticas do Acre. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 1999, Porto Alegre. REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA. Viçosa : SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 1999. v. 36. p. 53.
- YEH F.C.; YANG R.C.; BOILEY T.; YE Z.H.; MAO J.X. (1999) **popgene, the user-friendly shareware for population genetic analysis**. *Molecular Biology and Biotechnology Center*, University of Alberta, Canada.
- Yu K; Park S.J. and Poysa V. (1999) **Abundance and variation of microsatellite DNA sequences in beans (*Phaseolus* and *Vigna*)**. *Genome* 42:27-34.
- ZANE, L., BARGELLONI, L., PATERNELLO, T. **Strategies for microsatellite isolation: a review**. *Mol. Ecol.*, v.11, p. 1-16, 2002.
- ZABEAU, M.; VOS, P. **Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting**. Paris: European Patent Office, 1993. (European Patent Application n. 92402629.7; Publication n. EP 0534858 A1).
- ZIMMER, A. H.; CORRÊA, E. S. **A pecuária nacional: uma pecuária a pasto?** In: ENCONTRO SOBRE RECUPERAÇÃO DE PASTAGENS, 1., 1993, Nova Odessa. *Anais...* Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, 1993. p. 1-25.

Tabela 2 - Homozigose média observada nas plantas com maior grau de homozigose do genótipo G1, onde 0=heterozigoto, 100 = homozigoto e * plantas oriundas de sementes do genótipo avaliado

Primer	Homozignose média de cada planta analisada									
Genótipo	AP196	AP192	AP190	AP188	AP183	AP176	AP175	AP166	AP161	AP152
G1-5	100	100	100	100	100	100	100	100	0	100
G1-13	100	0	0	100	100	100	100	100	100	0
G1*-1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
G1*-2	100	0	100	100	100	100	100	100	100	100
G1*-5	100	100	0	100	100	100	0	100	100	100
	Média									
	78,57	71,43	100,00	92,86	78,57	84,29				

Tabela 3 - Homozigose média observada por planta individual do genótipo G2, onde 0 = heterozigoto e 100 = homozigoto

"Primer"		Homozigose média de cada planta analisada														
Genótipo		AP126	AP32	AP38	AP40	AP152	AP161	AP166	AP175	AP176	AP183	AP188	AP190	AP192	AP196	
G2-1	100	100	100	100	0	0	0	0	0	100	100	100	0	100	100	57,14
G2-2	0	100	100	0	0	0	0	0	100	100	100	100	0	100	100	57,14
G2-3	0	100	100	0	0	0	0	0	100	100	100	100	0	100	100	57,14
G2-4	0	100	100	0	0	0	0	100	100	0	100	100	0	100	100	57,14
G2-5	0	100	100	0	0	0	0	100	0	0	100	100	0	100	100	50,00
G2-6	0	100	100	0	0	0	0	100	100	100	100	100	0	100	100	57,14
G2-7	100	100	100	0	0	0	0	100	100	100	100	100	0	100	100	71,43
G2-8	100	100	100	0	100	100	100	0	0	100	100	100	0	0	100	64,29
G2-9	100	100	100	100	0	100	100	100	100	100	100	100	0	0	100	78,57
G2-10	100	100	100	100	100	100	100	0	0	100	100	100	0	0	100	71,43
G2-11	100	100	100	100	100	100	100	100	0	100	100	100	100	0	100	85,71
G2-12	0	100	100	0	0	0	0	0	100	100	100	100	0	100	100	57,14
Média																63,69

Tabela 8 - Homozigose média observada por planta individual do acesso FALM, onde 0=heterozigoto, 100 = homozigoto, * plantas oriundas de sementes do genótipo avaliado e (XX) dados perdidos

“Primer”		AP126	AP32	AP38	AP40	AP152	AP161	AP166	AP175	AP176	AP183	AP188	AP190	AP192	AP196	Homozigose média de cada planta analisada
Genótipo																
FALM-1	0	100	100		0	0	100	100	100	0	100	100	0	100	100	64,29
FALM-2	0	100	100	0	0	0	100	0	0	100	0	100	0	0	100	42,86
FALM-3	0	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	100	28,57
FALM-4	100	100	100	0	100	0	0	100	0	0	0	100	0	100	100	57,14
FALM-5	0	100	100	0	0	0	0	0	0	100	100	100	0	0	100	42,86
FALM-6	0	100	100	0	0	0	0	0	0	100	0	100	0	0	100	35,71
FALM-7	0	100	100	0	0	0	0	0	0	100	0	100	0	0	100	35,71
FALM-8	0	100	100	0	100	100	100	100	0	0	0	100	0	100	100	57,14
FALM-9	0	100	100	0	0	0	100	0	100	100	0	100	0	0	100	50,00
FALM-10	0	100	100	0	0	0	0	0	0	100	0	100	0	0	100	35,71
FALM-11	0	100	100	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	100	35,71
Média																44,16
FALM*-1	0	100	100	100	100	100	100	XX	100	100	100	100	100	100	100	92,31

Tabela 9 - Homozigose média observada nos acessos W34, V6791, cv. Belmonte e A. repens, onde 0=heterozigoto, 100 = homozigoto, e (XX) dados perdidos

Primer		AH126	AP32	AP38	AP40	AP152	AP161	AP166	AP175	AP176	AP183	AP188	AP190	AP192	AP196	Homozigose média de cada planta analisada
Genótipo																
W34-1	0	100	100		0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	100	28,57
W34-2	0	100	100	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	100	35,71
W34-3	0	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	100	28,57
Média																30,95
6791-1	0	100	100	0	0	0	0	XX	0	100	0	100	0	0	100	38,46
6791-2	0	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	100	28,57
6791-3	100	100	100	0	0	0	100	100	0	100	0	100	0	0	100	57,14
Média																41,39
Cv. Belmonte	0	100	100	0	0	0	0	0	100	0	100	100	0	0	100	42,86
A. repens	0	100	100	100	100	0	100	100	0	0	0	100	100	100	100	64,29