

VANESSA EMANUELLE DE OLIVEIRA MACIEL

**CITOGENÉTICA MOLECULAR DA VARIEDADE BRS PÉROLA
BRANCA (*Arachis hypogaea* L.) E DE SEUS GENITORES**

RECIFE

2014

VANESSA EMANUELLE DE OLIVEIRA MACIEL

**CITOGENÉTICA MOLECULAR DA VARIEDADE BRS PÉROLA
BRANCA (*Arachis hypogaea* L.) E DE SEUS GENITORES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia–Melhoramento Genético de Plantas (PPGAMGP) da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Reginaldo De Carvalho
Co-Orientadoras: Dra. Roseane Cavalcanti dos Santos
Dra. Lidiane de Lima Feitoza

RECIFE

2014

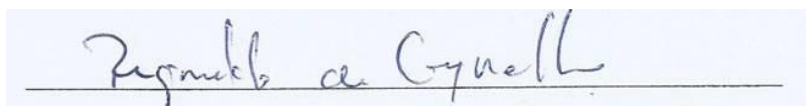
VANESSA EMANUELLE DE OLIVEIRA MACIEL

**CITOGENÉTICA MOLECULAR DA VARIEDADE BRS PÉROLA
BRANCA (*Arachis hypogaea* L.) E DE SEUS GENITORES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia–Melhoramento Genético de Plantas (PPGAMGP) da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Melhoramento Genético de Plantas.

Dissertação defendida e aprovada pela banca examinadora em: 28/07/2014.

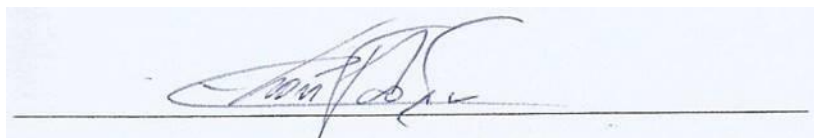
ORIENTADOR:



Dr. Reginaldo de Carvalho

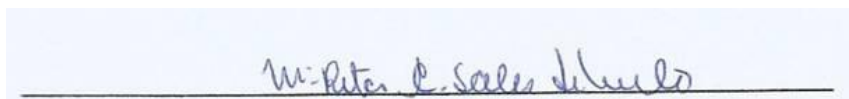
Departamento de Biologia/UFRPE

EXAMINADORES:



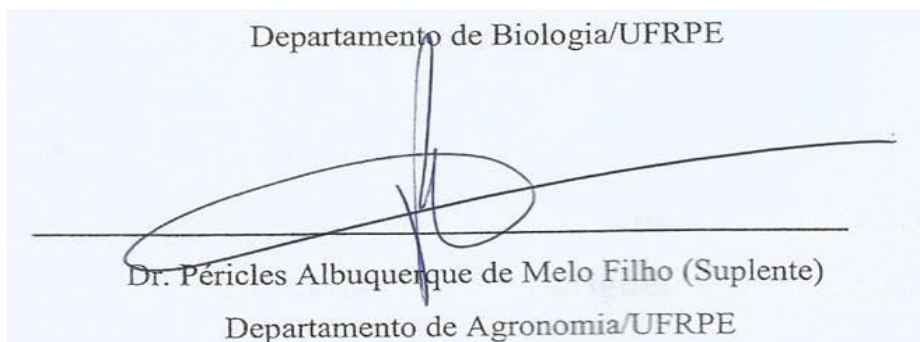
Dr. Edson Ferreira da Silva

Departamento de Biologia/UFRPE



Dra. Maria Rita Cabral Sales de Melo

Departamento de Biologia/UFRPE



Dr. Péricles Albuquerque de Melo Filho (Suplente)
Departamento de Agronomia/UFRPE

**Dedico a minha amada avó,
Maria da Glória Rodrigues (*In memoriam*).**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus por me proporcionar a conclusão de mais uma etapa em minha formação profissional.

Aos meus pais, Ivônia Rodrigues de Oliveira e Manoel José Alves Maciel e, a minha querida avó, Maria da Glória Rodrigues (*In memoriam*), que são os meus pilares, por todo incentivo e ensinamento de valores fundamentais para a minha vida.

Ao meu marido, Allan Lopes, pelo apoio, incentivo e compreensão em todos os momentos de nossa vida juntos.

A toda minha família, pelo apoio nas horas mais difíceis, em especial a minha prima-irmã Maria Clara Oliveira.

As amigas desde a graduação, Gabriela Aretakis e Vanessa Bastos, pela força, incentivo e participação em muitos momentos importantes durante o mestrado.

Aos amigos do Laboratório de Citogenética Vegetal (LCV): Emmanuely Xavier, Genialdo Ramos, Lamonier Chaves, Maria Angélica Marinho, Maria Luiza Silva, Silmar Silva e Viviane Galvão, pelo aprendizado e ajuda fundamental para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Reginaldo de Carvalho pela oportunidade de executar este projeto e por sua orientação.

A Dra. Roseane Cavalcanti dos Santos pela coorientação e ajuda cedendo as sementes da Embrapa Algodão.

A Dra. Lidiane de Lima Feitoza, pela coorientação e por sua ajuda em todos os momentos que precisei nos últimos dois anos.

A Profª. Dra. Rejane Magalhães de Mendonça Pimentel, minha “mãe-científica”, por incentivar sempre minhas escolhas profissionais e acreditar no meu potencial desde sempre.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Melhoramento Genético de Plantas e a Universidade Federal Rural de Pernambuco pela oportunidade de cursar o mestrado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa durante o mestrado.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	v
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
CAPÍTULO I	1
1. INTRODUÇÃO	2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Características botânicas de <i>Arachis hypogaea</i> L.	4
2.2. Importância econômica	5
2.3. Melhoramento do amendoim no Brasil	8
2.4. Características agronômicas das variedades	9
2.5. Citogenética do gênero <i>Arachis</i> L.	9
2.6. Importância da citogenética na caracterização de plantas cultivadas	11
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	13
CAPÍTULO II	18
RESUMO	19
ABSTRACT	20
INTRODUÇÃO	21
MATERIAL E MÉTODOS	24
<i>Material Vegetal</i>	24
<i>Pré-tratamento</i>	24
<i>Análise Convencional</i>	24
<i>Coloração CMA/DAPI e FISH</i>	25
<i>Imunocoloração</i>	25
<i>Fotodocumentação</i>	26
RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
ANEXOS	43

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Mapa indicando a distribuição das espécies da seção *Arachis* e seu centro de origem Brasileiro-Paraguaio (área hachurada). Fonte: Krapovickas & Gregory, 1994.....4

CAPÍTULO II

Figura 1 – Células mitóticas de *Arachis hypogaea* L., var. BR 1. A- Núcleo interfásico do tipo semi-reticulado; B- Padrão de condensação em prometáfase revelado por Giemsa. C- Padrão de condensação profásico revelado por Giemsa. D- Coloração com CMA/DAPI revelando as bandas ricas em AT; Inseto evidencia banda DAPI. E- FISH mostrando bandas de DNAr 5S. F- FISH mostrando bandas de DNAr 45S. G, H, I- Imunocoloração com anti-H3S10f mostrando suas marcações na região pericentromérica. J, K, L- Imunocoloração com o anticorpo H4K5ac evidenciando suas marcações terminais. M-N- Núcleo interfásico em imunocoloração revelando cromocentros em vermelho. Inseto em I mostrando marcação pericentromérica de anti-H3S10f. Barras = 10 µm..... 33

Figura 2 – Células mitóticas de *Arachis hypogaea* L., var. LViPE-06. A- Núcleo interfásico do tipo semi-reticulado; B-C- Padrão de condensação em prometáfase e metáfase, em sequência, revelado por Giemsa. D- Coloração com CMA/DAPI revelando as bandas ricas em AT. E- FISH mostrando bandas de DNAr 5S. F- FISH mostrando bandas de DNAr 45S. G, H, I- Imunocoloração com anti-H3S10f mostrando suas marcações na região pericentromérica. J, K, L- Imunocoloração com o anticorpo H4K5ac evidenciando suas marcações terminais. Barras = 10 µm.....34

Figura 3 – Células mitóticas de *Arachis hypogaea* L., var. BRS Pérola Branca (BRS-Branco). A- Núcleo interfásico do tipo semi-reticulado; B- Padrão de condensação em metáfase revelado por Giemsa. C- Coloração com CMA/DAPI revelando as bandas ricas em AT. D- FISH mostrando bandas de DNAr 5S. E- FISH evidenciando bandas de DNAr 45S. F, G, H- Imunocoloração com anti-H3S10f em núcleo interfásico mostrando que não existe marcação nessa fase. I, J, K- Imunocoloração com anti-H3S10f em metáfase revelando a marcação na região pericentromérica; Inseto evidenciando a marcação. L, M, N- Imunocoloração com o anticorpo H4K5ac em núcleo interfásico, mostrando marcação. O, P, Q- Imunocoloração com o anticorpo H4K5ac em metáfase, evidenciando suas marcações terminais. Barras = 10 µm.....35

Figura 4 – Idiograma mostrando número e posição das bandas. I- Bandas CMA⁺ (amarelo) e DAPI⁺ (azul claro) nas variedades BR 1, LViPE-06 e BRS Pérola Branca. II- DNAr 45S (vermelho) e DNAr 5S (verde escuro) em LViPE-06 e BRS Pérola Branca. III- DNAr 45S (vermelho) e DNAr 5S (verde escuro) em BR 1. IV- Padrão anti-H3S10f (azul escuro) e anti-H4K5ac (verde claro) nas três variedades.....36

RESUMO

A espécie cultivada do amendoim (*Arachis hypogaea* L.) pertence à família Fabaceae e ao gênero *Arachis*, composto por quase 100 espécies endêmicas da América do Sul. A seção *Arachis*, à qual pertence o amendoim cultivado, é composta por 31 espécies e é a que mais apresenta caracteres evolutivos recentes. O Brasil se destaca por reunir todas as seções e a maioria das espécies contidas nelas. A utilização de técnicas citogenéticas clássica e molecular nas últimas décadas tem permitido ao melhoramento o acesso à informações importantes sobre o cariótipo de espécies economicamente importantes, como é o caso do amendoim. No presente trabalho, foi caracterizado citologicamente uma variedade híbrida (BRS Pérola Branca) juntamente com seus progenitores (BR1 x LViPE-06) por meio de diversas técnicas citogenéticas visando localizar marcas cromossomo específicas e sua interação no cariótipo do híbrido. Os dados obtidos no presente estudo revelaram uma extensa semelhança cariotípica entre as variedades estudadas, que apresentaram complemento diploide com $2n = 40$ cromossomos que variaram de 1,20 a 3,14 μ m, morfologia de meta a submetacêntrica e padrão de condensação, proximal. As variedades BR1, LviPE-06 e BRS Pérola Branca apresentaram 20 bandas DAPI⁺ pericentroméricas e 6 bandas de heterocromatina (CMA⁺) adjacentes. A hibridização *in situ* com sondas de DNA ribossomal evidenciou, três pares de DNAr 45S, sempre correspondendo às bandas heterocromáticas CMA⁺. Quatro blocos de DNAr 5S foram observados na região pericentromérica de dois pares cromossômicos nos três acessos estudados. A imunocoloração com o anticorpo anti-H4K5ac foi evidenciada na eucromatina descondensada terminal dos cromossomos pro e metafásicos e na cromatina difusa dos núcleos interfásicos. A marcação com anti-H3S10f ocorreu nos pericentrômeros dos cromossomos e foi sempre ausente na intérfase. Sabe-se que informações citogenéticas são valiosas para o conhecimento dos eventos evolutivos entre grupos próximos ou distantemente relacionados, permitindo uma ampla comparação entre e intra espécies de interesse econômico. As informações obtidas com o uso dessas técnicas poderão ser úteis para estudos futuros de melhoramento do amendoim e espécies afins.

Palavras-Chave: bandeamento, FISH, imunocoloração, híbrido, amendoim.

ABSTRACT

The species cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) belongs to the Fabaceae family, genus *Arachis*, composed of nearly 100 endemic species of South America. The *Arachis* section, to which belongs the cultivated peanut, consists of 31 species that presents more recent evolutionary characters. Brazil stands out for bringing together all sections and most species. The use of cytogenetic (banding) and molecular techniques in recent decades has allowed to improve access to important information about the species karyotype. With this work aimed to characterize a hybrid variety (BRS White Pearl) and their parents (BR1 LViPE x-06) through various cytogenetic techniques aiming to find specific bands and their interaction chromosome karyotype of the hybrid. The data obtained in this study reveal a huge karyotypic similarity between the varieties presented $2n = 40$, with small chromosomes and morphology of the target and standard submetacêntrica proximal condensation. The BR1 LviPE-06 and BRS Pearl White varieties showed 20 DAPI + bands and 6 bands pericentromeric heterochromatin (CMA +) adjacent. In situ hybridization with ribosomal DNA probes showed three or four pairs of 45S rDNA, always corresponding to heterochromatic bands CMA +. Four blocks of 5S rDNA in the pericentromeric region were observed for all the studied accessions. Immunostaining with anti-H4K5ac antibody was detected as bands of metaphase chromosomes terminal euchromatin and decondensed chromatin of interphase nuclei diffuse. Labeling with anti-H3S10f occurred in pericentromeric region in the chromosomes and absent in interphase. Jobs like this help to identify small changes arising through evolutionary events and also the cytogenetic characterization of varieties of cultivated peanut that have morphological differences, mainly in grains, which could aid in peanut breeding programs.

Key-Words: Banding, FISH, immunostaining, hybrid, peanuts.

CAPÍTULO I
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. INTRODUÇÃO

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é uma leguminosa pertencente à família Fabaceae e gênero *Arachis* (L.). Este gênero é composto por cerca de 80 espécies endêmicas da América do Sul e seu centro de origem Brasileiro-Paraguaio, onde 69 espécies foram descritas por Krapovikas e Gregory (1994) e as demais por Valls e Simpson (2005), as quais foram divididas em nove seções taxonômicas, com base em caracteres morfológicos, viabilidade de cruzamentos e distribuição geográfica. A seção *Arachis*, à qual pertence o amendoim cultivado, é composta por 31 espécies (KRAPOVICKAS & GREGORY, 1994; VALLS & SIMPSON, 2005), sendo a que mais apresenta caracteres evolutivos recentes (VALLS, 2005; VALLS & SIMPSON, 2005). O Brasil possui destaque por reunir todas as seções e a maioria das espécies nela contidas.

De acordo com Seijo *et al.* (2004), *Arachis hypogaea*, o amendoim, é uma espécie tetraplóide com $2n=40$, originada de duas espécies silvestres: *Arachis duranensis* (Krapovickas & Gregory) e *A. ipaensis* (Krapovickas & Gregory). O amendoim é considerado uma espécie autógama e com uma estrutura reprodutiva que facilita a autofecundação. É a única espécie do gênero cultivada em larga escala. Seu ciclo é anual, seu porte pode ser ereto com aproximadamente 60 cm de altura ou prostrada com 30 cm. Seu fenótipo difere substancialmente das espécies silvestres da seção *Arachis* (BUROW *et al.*, 2008). Suas plantas possuem geralmente maior biomassa, maior porte, folhas e frutos. As flores são sésses, com corola alaranjada ou amarelada. Os frutos são subterrâneos com 1 a 5 sementes, podendo apresentar-se separadas por istmo. As sementes são lisas, com tegumento variando do vermelho ao preto (SILVA, 2007).

No Brasil, esta espécie vem sendo cultivada há séculos, porém entre as décadas de 70 e 80 a cultura tornou-se uma das principais economias existentes nas pequenas propriedades agrícolas do país. Nessa época, o Brasil chegou a ser um dos maiores produtores mundiais com 700.000 ha plantados e uma produção de grãos de 900.000 toneladas (FREITAS *et al.*, 2005). Nesse período, o produto era destinado principalmente ao mercado de óleo para ser utilizado na indústria oleoquímica de alimentos. Atualmente, com o auxílio do melhoramento, é uma cultura com produção em ascensão, com um representativo aumento nos últimos anos, sendo seus produtos destinados principalmente a indústria alimentícia e também ao mercado de óleo (MELO FILHO & SANTOS, 2010).

O melhoramento vegetal do amendoim obteve grandes avanços nas últimas décadas no Brasil. O Banco Ativo de Germoplasma de Amendoim localiza-se na Embrapa Algodão (Campina Grande), com 228 acessos, originários de diversos países e regiões do Brasil, especialmente da região Nordeste. A maioria dos acessos está caracterizada, incluindo avaliação agrônômica e molecular. Diferentemente, dados de caracterização citológica são mais escassos quando comparados com o conjunto de informações disponíveis por outras técnicas (SANTOS *et al.*, 1997; SILVA *et al.*, 2009). Estudos citogenéticos compreendem a descrição do número e morfologia, detecção de polimorfismos e alterações numéricas ou estruturais. São estudos de grande importância para a caracterização de espécies cultivadas, uma vez que, possibilitam ao melhorista um manejo mais adequado e mais preciso das plantas para junto com os métodos de melhoramento executar a seleção dos melhores caracteres (GUERRA, 1988).

A utilização de técnicas citogenéticas e moleculares e o avanço destas nas últimas décadas têm permitido ao melhoramento o acesso a informações importantes para um estudo mais aprofundado da origem, das alterações e melhoramento de espécies como: algodão, amendoim, arroz, feijão, mandioca, entre outras (BORÉM, 2005). Sobre o amendoim, os principais trabalhos citológicos foram realizados por Lavia (2001), Seijo *et al.* (2004), Robledo e Seijo (2008), Silva *et al.* (2010). Os dados indicam que seus cariótipos são estáveis e geralmente possuem pouca variação citológica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Características Botânicas de *Arachis hypogaea* L. – o amendoim

O amendoim é uma Leguminosae que pertence à ordem Fabales, família Fabaceae, subfamília Papilionidae, gênero *Arachis* L. e espécie *Arachis hypogaea* L., com centro de origem Sul-Americano (Brasileiro-Paraguaio) e distribuição natural de espécies selvagens no Brasil, Bolívia, Paraguai, Argentina e Uruguai (Fig. 1) (VALLS & SIMPSON, 1994; BUENO *et. al.*, 2006). O gênero possui cerca de 80 espécies endêmicas da América do Sul, das quais 69 foram descritas por Krapovikas e Gregory (1994) e as demais por Valls e Simpson (2005), sendo dividida em nove seções taxonômicas com base em caracteres morfológicos, viabilidade de cruzamentos e distribuição geográfica. A seção *Arachis*, à qual pertence o amendoim cultivado, é composta por 31 espécies (KRAPOVICKAS & GREGORY, 1994; VALLS & SIMPSON, 2005) e se destaca filogeneticamente por apresentar caracteres evolutivos recentes, tais como porte da planta e tamanho das sementes (VALLS, 2005; VALLS & SIMPSON, 2005). O Brasil, por sua vez, possui destaque por reunir todas as seções e a maioria das espécies de *Arachis*.

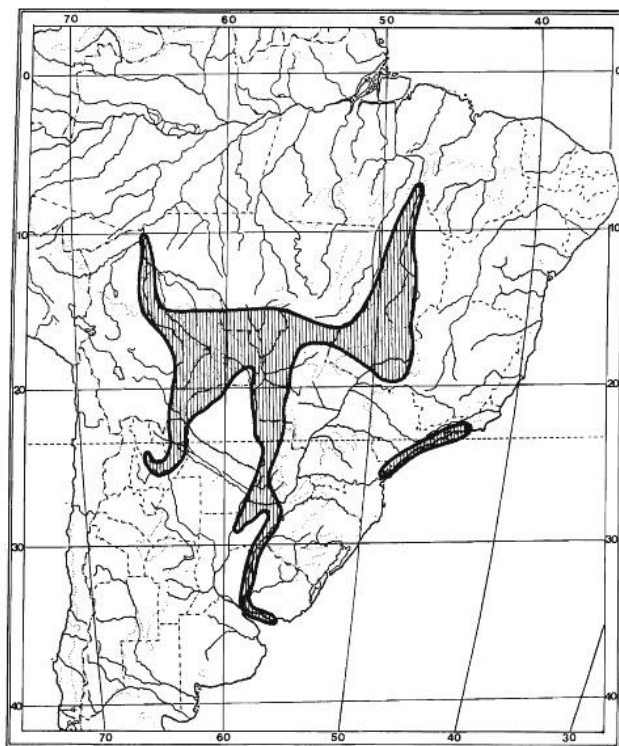


Figura 1. Mapa indicando a distribuição das espécies da seção *Arachis* e seu centro de origem Brasileiro-Paraguaio (área hachurada). Fonte: Krapovickas & Gregory, 1994.

Arachis hypogaea possui vários nomes populares em diferentes idiomas: amendoim, amendoí, jinguba, mancarra, mandobi, mandubi, entre outros, e é considerado como uma espécie autógama, com uma estrutura reprodutiva, que facilita a autofecundação, com baixa taxa de alogamia, sendo composta por oito anteras e estigma na mesma altura ou ligeiramente acima das anteras, sendo que todas as estruturas são envoltas por uma quilha. Possui ciclo anual e suas flores são sésseis, com corola alaranjada ou amarelada. A morfologia da flor de *Arachis hypogaea* L., é típica das Leguminosae, apresentando um cálice longo e tubo delgado, com corola na base e a inflorescência é resultado das mudanças nos ramos vegetativos podendo ser simples ou compostas com duas a cinco flores, sésseis, axilares, com flores amarelas. Cada flor possui 10 estames, nove desses estão unidos por um filamento, formando um tubo estaminado. O pistilo da flor é constituído pelo ovário, estilete e estigma. O ovário está situado na base do tubo do cálice e geralmente, contem de um a quatro óvulos. Os insetos são os principais agentes polinizadores, quando ocorrem esses tipos de cruzamentos (OLIVEIRA & VALLS, 2003; SANTOS *et al.*, 2005). Os frutos são subterrâneos com 1 a 5 sementes, podendo apresentar-se separadas por istmo. As sementes são lisas, com tegumento variando do vermelho ao preto (SILVA, 2007).

Uma das características botânicas mais marcantes nas espécies de *Arachis*, é a presença de ginóforo dotado de geotropismo positivo o que leva a formação dos frutos sob o solo. Atualmente, sabe-se com clareza que o tamanho do ginóforo está sob efeito genético e ambiental (SANTOS & GODOY, 1999; SANTOS *et al.*, 2005).

2.2. Importância Econômica do amendoim

O amendoim vem sendo cultivado há séculos no Brasil, mas somente entre as décadas de 70 e 80 tornou-se uma cultura expressiva no país. Nessa época, o Brasil chegou a ser um dos maiores produtores mundiais com uma produção de grãos de 900.000 toneladas e 700.000 ha plantados (FREITAS *et al.*, 2005). Nesse período, o produto era destinado principalmente ao mercado de óleo para ser utilizado na indústria oleoquímica de alimentos. Com os problemas decorrentes da presença de aflatoxina nos grãos (substância tóxica produzida pelo fungo *Aspergillus flavus*), da retração de preços do produto no mercado e da expansão da soja no Brasil, a área cultivada com amendoim teve um grande declínio, principalmente nas regiões Sul e Sudeste, o que provocou uma

mudança no fluxo desse produto que passou a ser destinado ao mercado de grãos (MELO FILHO & SANTOS, 2010).

Do ponto de vista alimentar, os grãos de amendoim possuem alto valor nutritivo e são altamente calóricos. As sementes possuem teores cerca de 48% de óleo e 33% de proteína, sendo, portanto, um alimento que pode contribuir significativamente para melhorar a dieta alimentar de populações de baixa renda, especialmente para crianças na fase escolar, tanto pelo consumo isolado como suplementado com outros produtos (FREIRE *et al.*, 2005).

A produção brasileira de amendoim tem se mantido em torno de 360.000 toneladas, sendo 87,6% deste total oriundo do estado de São Paulo e o restante, distribuído entre as regiões Sul, Centro-Oeste e Nordeste (IBGE, 2014). A região Nordeste é o segundo maior polo consumidor de amendoim no Brasil, com uma demanda regional superior a 50 mil toneladas de vagens/ano (SANTOS *et al.*, 2005). O Estado da Bahia, principal produtor regional com 80% da área cultivada no Nordeste (IBGE, 2014), é o maior pólo consumidor de amendoim, seguido de Pernambuco que, embora produza pouco para atender sua demanda, concentra o cultivo desta oleaginosa nas regiões da Zona da Mata Norte e no Vale do São Francisco, onde nesta última é conduzido sob condições irrigadas (SANTOS *et al.*, 2007).

A farinha do amendoim, geralmente utilizada no fabrico de tortas, paçocas, bolos, entre outros, é uma excelente fonte de alimento, com médias de 45% a 54% de proteína, 32% a 38% de carboidratos e quase o dobro da quantidade de aminoácidos essenciais à dieta humana, principalmente arginina, de grande importância para lactentes (FREIRE *et al.*, 2005).

Segundo Melo Filho e Santos (2010), no estado de São Paulo, há décadas os produtores da zona canavieira vêm adotando o manejo do amendoim em consórcio com a cana, nos períodos de entre-safra, conferindo vários benefícios à lavoura principal, desde a melhoria na fertilidade dos solos, controle de nematóides e agregação de renda adicional, vinda da lavoura do amendoim. Ainda de acordo com Melo Filho e Santos (2010), em Ribeirão Preto, cerca de 60.000 ha de cana tem sido utilizado em consórcio com amendoim, reduzindo o custo de renovação do canavial em aproximadamente 50%.

Dados atuais da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2014) indicam que, São Paulo é o maior produtor de amendoim primeira safra, responsável por 96,67% da produção do país na safra 2012/13. Segundo informações obtidas junto à Cooperativa

Coplana de Jaboticabal, o amendoim poderia ter sua área aumentada nesta safra, entretanto, por falta de áreas disponíveis está limitada. Mesmo assim o levantamento aponta um aumento entre 2,0 a 6,0%. Os produtores estão considerando atrativos os preços atuais, tanto internos como externamente. Grande parte do amendoim plantado (80%) é o *Ranner*, altamente produtivo, o qual tem sua produção destinada aos mercados europeus. Este amendoim está sendo vendido ao mercado interno em torno de R\$ 28,00 sc/25kg e ao mercado externo entre US\$ 1.500/1.700, considerado remunerador em função do dólar elevado. Estima-se que a produção nacional poderá ser de 304,3 a 316,7 mil toneladas.

O amendoim também pode ser utilizado como alternativa para produção de biodiesel no Nordeste. Todos os óleos vegetais considerados óleos fixos ou triglicéridicos podem ser empregados na produção de biodiesel, entretanto, dependendo da oleaginosa em questão, o rendimento em óleo e conseqüentemente, em biodiesel é variável. No caso do amendoim, a variedade com maior importância para a produção de biodiesel é a BRS Pérola Branca. Entre as culturas temporárias empregadas para essa finalidade, destaque é dado para a soja, amendoim e o girassol (PARENTE, 2003). O primeiro e o segundo são amplamente empregados na alimentação humana, o que por si só, estabeleceria competição entre mercados. O amendoim, que no passado foi excluído pela soja na alimentação humana, pode voltar à cena como grande fonte de óleo para a produção de biodiesel (PARENTE, 2003).

O amendoim vem sendo utilizado na Zona da Mata de Pernambuco, que abrange cerca de 12 mil Km² de cana cultivada, cuja lavoura tem sido mantida em regime de monocultivo pelos produtores há quase cinco séculos (FUNDAJ, 2010). Nos últimos anos, ações governamentais têm estimulado o cultivo de outras lavouras na área canavieira, entre elas, a do amendoim, como forma de garantir a subsistência de grande parte dos agricultores que habitam a região e principalmente agregar renda ao agronegócio familiar. Nesse aspecto, áreas destinadas à renovação do canavial seriam passíveis de serem cultivadas com esta oleaginosa, o que contribuiria para melhorar as condições físico-químicas do solo intermitentemente explorado pela cana (FUNDAJ, 2010).

2.3. Melhoramento do amendoim no Brasil

No melhoramento vegetal, três recursos básicos devem ser explorados para a obtenção de maior variabilidade genética (FARIAS, 1996). O primeiro é o conhecimento das diferenças hereditárias entre os genótipos da espécie cultivada, o segundo, faz referência às diferenças que podem ser criadas artificialmente pelo uso de mutações e o terceiro são as diferenças que ocorrem entre as espécies selvagens e as espécies cultivadas (FARIAS, 1996).

No Brasil, há um Banco Ativo de Germoplasma de Amendoim localizado na Embrapa Algodão (Campina Grande, PB). Este banco possui 228 acessos, oriundos de diversos países e regiões do Brasil, especialmente da região Nordeste e tem o objetivo de enriquecer, caracterizar, multiplicar, documentar e divulgar os acessos de germoplasma de amendoim (*Arachis hypogaea*). A maioria dos acessos está caracterizada, incluindo avaliação agrônômica (SANTOS *et al.*, 1997).

Nos últimos anos, a perda do poder germinativo das sementes foi constatada em mais de 70% dos acessos (SUASSUNA *et al.*, 2005), comprometendo tanto a conservação quanto o intercâmbio de acessos de amendoim. A regeneração dos acessos do banco com sementes inviáveis se faz necessária, uma vez que o baixo poder germinativo prejudica a avaliação dos acessos e a variabilidade. A impossibilidade de avaliar a maioria dos acessos do BAG, devido ao baixo poder germinativo das sementes, também restringe em muito a variabilidade disponível para ser explorada pelo programa de melhoramento. Há demandas pela introdução de cultivares mais produtivas, resistentes às doenças e com características tecnológicas que atendam à indústria de alimentos e ao mercado externo (GODOY *et al.*, 1999 e GODOY 2001).

A caracterização dos acessos do BAG Amendoim é fundamental para identificar genótipos adaptados à região Nordeste, que foram utilizados no programa de melhoramento, resultando no lançamento das cultivares BR-1, BRS 151L-7 e BRS Havana (SANTOS *et al.*, 2005; ALVES *et al.*, 2006). Segundo a Embrapa (2014), a expectativa é que a caracterização agrônômica e tecnológica dos acessos recuperados e das novas introduções, além de restaurar a conservação e intercâmbio, permita identificar genótipos com potencial para serem utilizados pelo Programa de Melhoramento de Amendoim, atendendo as novas demandas da cadeia produtiva do amendoim no Brasil. Uma nova coleção será incorporada ao BAG Amendoim com acessos que estão sendo mantidos e caracterizados pela Embrapa Clima Temperado (EMBRAPA, 2014).

2.4. Características agronômicas das variedades de amendoim da região Nordeste

Todas as cultivares de amendoim desenvolvidas pela Embrapa Algodão, são recomendadas para manejo na região Nordeste do Brasil. Entre elas, três são de porte ereto, com ciclo entre 85 e 90 dias e destinadas para os mercados de consumo *in natura* ou confeitaria, representadas pelas cultivares BR 1, BR 151 L7 e BRS Havana (SANTOS *et al.*, 2005). A mais recente cultivar desenvolvida pela empresa, em 2010, é a BRS Pérola Branca, uma rasteira precoce destinada ao mercado de óleo. A cultivar BR 1 (*A. hypogaea* subsp. *fastigiata*) é precoce e a linhagem LViPE- 06 (*A. hypogaea* subsp. *hypogaea*) é tardia, e o cruzamento entre estas revelam descendentes de elevada variabilidade genética para vários descritores agronômicos de interesse para o melhoramento (ALVES, 2013).

As cultivares de amendoim que tem porte ereto, possuem elevada tolerância a condições de estresse hídrico, configurado pelos constantes verânicos que ocorrem, especialmente nas regiões agreste e sertão nordestinos (NOGUEIRA & SANTOS, 2000; SANTOS *et al.*, 2005). A cultivar BR1 tem sementes com película vermelha, arredondadas, tamanho médio e teor de óleo bruto nas sementes 45%. A linhagem LViPE-06 tem película bege, sementes de tamanho extragrande arredondadas e teor de óleo na faixa de 51%. Já a BRS Pérola Branca, possui sementes grandes, arredondadas com película branca e teor de óleo entre 50 e 52%, sendo especialmente desenvolvida para atender os mercados de óleo comestível ou combustível. A *top line* LViPE-06 e a cultivar BRS Pérola Branca são indicadas ao mercado de óleos por serem os materiais mais produtivos com médias de 3,04 t ha⁻¹ de vagens e 2,13 t ha⁻¹ de sementes, correspondendo a uma elevação na ordem de 6,5 e 9%, respectivamente, sobre a média geral dos genótipos rasteiros. No entanto, o rendimento em sementes foi maior na BRS Pérola Branca (71%), embora a produtividade de óleo dos dois genótipos tenha se situado em 1,1 t ha⁻¹ (SANTOS *et al.*, 2012).

2.5. Citogenética do gênero *Arachis* L.

As primeiras análises citogenéticas convencionais no gênero *Arachis* foram realizadas por Husted (1933, 1936), que determinou $2n=2x=20$ (diplóide) para espécies selvagens e $2n=4x=40$ (tetraplóide) para a espécie cultivada *Arachis hypogaea*. Com base nessas análises, um conjunto de critérios foi proposto e desenvolvido para

enquadrar os grupos genômicos presentes no gênero *Arachis*. Este autor observou a forte simetria do cariótipo classificando os cromossomos de metacêntricos a levemente submetacêntricos e a presença de constrições secundárias formando satélites.

A espécie cultivada do amendoim, *Arachis hypogaea* L., cuja configuração citológica é (AABB; $2n=4x=40$), tem sua possível origem pela domesticação da espécie tetraploide *A. monticola* (AABB) e esta, pelo cruzamento entre duas espécies silvestres da seção *Arachis*, uma de genoma “A” (com o par de cromossomos “A”), e outra de genoma “B” (sem o par de cromossomos “A”) (GREGORY & GREGORY 1976, 1979). *Arachis monticola* e *A. hypogaea* são as únicas espécies tetraplóides da seção *Arachis* e formam híbridos férteis quando cruzados entre si. Com base em evidências citogenéticas, aliadas ou não a dados moleculares e de cruzamentos interespecíficos, a hipótese mais aceita é de que *A. duranensis* teria sido a doadora do genoma “A” (FERNANDES & KRAPOVICKAS, 1994; SINGH, 1986) e *A. ipaensis*, do genoma “B” (SEIJO *et al.*, 2007). De acordo com Seijo *et al.* (2007), em um estudo de GISH (Hibridização Genômica *in situ*), o DNA genômico de *A. duranensis* hibridiza preferencialmente os 20 cromossomos de *A. hypogaea*, todos com bandas de heterocromatina (genoma A), enquanto que o DNA genômico de *A. ipaensis* hibridiza preferencialmente os 20 cromossomos restantes, todos sem bandas heterocromáticas (genoma B). Este resultado é congruente com as características do cariótipo das espécies diplóides, *A. duranensis* com bandas centroméricas em todos os cromossomos e *A. ipaensis* sem elas.

Estudos citogenéticos de Fernández e Krapovickas (1994), Lavia (1998) e Peñaloza e Valls (2005) identificaram três genomas distintos para o gênero *Arachis*. O primeiro, genoma “A”, assim chamado por apresentar um par cromossômico (par A) com coloração diferenciada e tamanho reduzido quando comparado aos demais. Este é o genoma da maioria das espécies diploides do gênero. As espécies que não apresentam o par A, são consideradas genoma “B”, como exemplo temos *A. ipaensis* e *A. magna*. A espécie *A. glandulifera* representa o genoma “D”, que tem como característica seis pares de cromossomos acrocêntricos, diferindo dos outros tipos de genoma (MILLA *et al.*, 2005; SEIJO *et al.*, 2004).

O emprego de diversas técnicas de citogenética tem possibilitado a caracterização cromossômica do gênero *Arachis*. Seijo *et al.* (2004), realizaram estudos com técnicas de bandeamento em diversas espécies de *Arachis* incluindo *A. hypogaea* afim de

identificar regiões ricas em GC (CMA) e AT (DAPI) e FISH constatando que metade do cariótipo possui bandas DAPI⁺, para o amendoim cultivado e que as espécies silvestres são ricas em CMA⁺, com destaque para *A. pusilla*, que possui estas bandas em todos os cromossomos. Trabalhos como os de Silva *et al.* (2010) e Martins (2010), corroboram com o de Seijo *et al.* (2004), confirmando a estabilidade do cariótipo. Por outro lado, estudos com técnicas mais recentes como a imunocoloração ainda são escassos e tem sido realizado no amendoim no presente trabalho e de forma inédita. Dados de imunocoloração com uso de proteínas modificadas tem sido de especial importância na caracterização citológica porque permite prever regiões potencialmente ativas ou silenciadas, como no caso de alguns radicais de histonas acetiladas (H4K5ac) ou metiladas (H3K4), ou ainda pelas histonas metiladas H3K9me2, respectivamente revisado por Houben *et al.* (2006). Este tipo de estudo em conjunto com as demais técnicas em citogenética molecular permite a associação da atividade das proteínas e sua interação com o DNA, fornecendo um panorama da estruturação genômica, numa visão citológica, da espécie em questão.

2.6. Importância da Citogenética na caracterização de plantas cultivadas

O melhoramento genético de plantas pode ser definido como a arte e ciência que visa à modificação genética das plantas para torná-las úteis ao homem, animais e ambiente (BORÉM, 2012). No entanto, a arte de melhorar depende da observação de características fenotípicas desejáveis em cada indivíduo e, para tanto, se faz necessária a utilização de várias áreas de conhecimento como a botânica, genética, fisiologia, estatística, entre outras. Dependendo do objetivo do programa de melhoramento, outras ciências como a citogenética e as ciências do solo são fundamentais (BORÉM, 2013).

A citogenética compreende todo e qualquer estudo relativo ao cromossomo isolado ou em conjunto, condensado ou distendido, no que diz respeito à morfologia, organização, função e replicação, bem como na sua variação e evolução (GUERRA, 1988). Estes estudos compreendem a descrição do número e morfologia cromossômica através de coloração convencional, técnicas de bandeamento e citogenética molecular envolvendo mapeamento gênico e são de grande importância para a caracterização de espécies cultivadas, uma vez que, possibilitam ao melhorista um manejo mais adequado e mais preciso das plantas para junto com os métodos de melhoramento executar a seleção dos melhores caracteres.

Para os programas de melhoramento genético de plantas, a citogenética torna-se fundamental, uma vez que esta auxilia o melhorista na seleção de materiais adequados e no monitoramento de possíveis alterações cromossômicas sejam elas numéricas e/ou estruturais, na análise de híbridos e seus progenitores ou descendentes, na realização de estudos relacionados à transferência de genes entre espécies nativas e cultivadas, na análise das origens e reconstruções de poliploides, entre outros (GUERRA, 2004).

Com o desenvolvimento da citogenética molecular, técnicas como a FISH (Hibridização Fluorescente *in situ*), GISH (Hibridização Genômica *in situ*) e Imunocoloração passaram a ser amplamente utilizadas, por permitirem a identificação de alterações cromossômicas e possibilitarem o monitoramento da transferência de genes de interesse intra e interespecífico (SYBENGA, 1998). Estas técnicas permitem um estudo mais aprofundado do cariótipo da espécie possibilitando uma melhor compreensão do mesmo para aplicar técnicas de melhoramento.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, M.I.R., REZENDE, D.R., RIOS, D.E.M., ANTONIOSI FILHO, N.R., MELO FILHO, P.A., FREIRE, R.M.M.; SANTOS, R.C. Caracterização da composição de ácidos graxos e triacilglicerídeos de óleos de. Anais, **I Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel, Brasília, DF**. v.1, pp.324–328. 2006.

ALVES, G.M.R. **Variabilidade genótipica de amendoim submetido ao estresse hídrico baseada em descritores bioquímicos**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande-PB. 41p. 2013.

BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa, Editora UFV. 969p. 2005.

BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de plantas**. 6ª edição. Viçosa: Editora UFV, 523p. 2013.

BUENO, L.C. de S.; MENDES, A.N.G.; CARVALHO, S.P. **Melhoramento genético de plantas: princípios e procedimentos**. 2ª.edição. Lavras: UFLA, 319p. 2006.

BUROW, M.D.;SELVARAJ, M. G.; UPADHYAYA, H.; OZIAS-AKINS, P.; GUO, B., BERTIOLI; J. D.; BERTIOLI, S. C. M. L.; MORETZSOHN. M. C.; GUIMARÃES, P. M. Genomics of peanut, a major source of oil and protein. **Peanut Genomics**.p.1-20, 2008.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Levantamento sistemático da Produção agrícola. Disponível em http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_05_08_10_11_00_boletim_graos_mai_2014.pdf. Acesso em: 18/06/2014.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa agropecuária. Disponível em: <http://plataformarg.cenargen.embrapa.br/rede-vegetal/projetos-componentes/pc3bancos-ativos-de-germoplasma-de-especies-leguminosas-oleaginosas-e-fibrosas/planos-de-acao/pa2-banco-ativo-de-germoplasma-de-amendoim>, html. Acesso em: 18/06/2014.

FARIAS, R. H. **Classificação de germoplasma de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) na base dos componentes principais**. Tese de graduação. Areia: Universidade Federal da Paraíba. 60p. 1996.

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

FREIRE, R.M.M.; NARAIN, N.; SANTOS, R.C. aspectos nutricionais de amendoim e seus derivados. In: Santos, R.c. (Ed.). O agronegócio do amendoim no Brasil. Campina Grande. Embrapa algodão. p. 389–420. 2005.

FREITAS, S.M.; GODOY, I.J.; VIEIRA, R.D. Aspectos comparativos da produção e comercialização de amendoim nos países do Mercosul. **Informações Econômicas**, v. 25, n. 1, p. 49-55, 1995.

FUNDAJ – Fundação Joaquim Nabuco de Pesquisas Sociais. Disponível em: www.fundaj.gov.br/. Acesso em 12/03/2014.

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

GODOY, I.J. **Problemas e perspectivas do melhoramento genético do amendoim no Brasil**. In: Simpósio de Recursos Genéticos para a América Latina e Caribe, 3., Londrina, 2001. **Anais...** Londrina: IAPAR, p. 43-46. 2001.

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

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

GUERRA, M. **Introdução a citogenética geral**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara, 142p, 1988.

GUERRA, M. **Hibridização in situ**. In: Marcelo Guerra. (Org.). FISH - Conceitos e Aplicações na Citogenética. Ribeirão Preto: SBG, v. , p. 01-32, 2004.

HOUBEN, P.H.; DER VAN WEIJDEN, T.; SIJBRANDIJ, J.; GROL, R.P.; WINKENS, R.A. Reasons for ordering spinal x-ray investigations: how they influence general practitioners' management. **Can Fam Physician**. Oct;52(10):1266-7. PubMed PMID: 17279187; PubMed Central PMCID: PMC1783593. 2006.

HUSTED, L. 1936. Cytological studies of the peanut *Arachis*, II. Chromosome number, morphology, and behavior, and their application to the problem of the origin of the cultivated forms. **Cytologia**, v.7, p.396-423.

HUSTED, L.1933. Cytological studies of the peanut *Arachis*, I. Chromosome number and morphology, **Cytologia**. v.5, p.109-117.

IBGE. Instituto Brasileira de Geografia e Estatística. Produção agrícola. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201306comentarios.pdf. Acesso em: 18/06/2014.

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

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.

LAVIA, G.I. Chromosomal characterization of germplasm of wild species of *Arachis* L. belonging to sections Trierectoides, Erectoides and Procumbentes. **Caryologia**. Vol. 54, no. 2: 115-119, 2001.

MARTINS, M.I.G. **Caracterização citogenética e molecular em acessos do gênero *Arachis***. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife. 75p. 2010.

MILLA, S.R.; ISLEIB, T.G.; STALKER, H.T. Taxonomic relationships among *Arachis* sect. *Arachis* species as revealed by AFLP markers. **Genome**. v. 48, n. 1, p. 1-11. 2005.

MELO FILHO, P.A. & SANTOS, R.C. **A Cultura do Amendoim no Nordeste: Situação atual e perspectivas**. Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica, Recife, v. 7, p.192-208, 2010.

NOGUEIRA, R.J.M.C. & SANTOS, R.C. **Alterações fisiológicas no amendoim submetido ao estresse hídrico**. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental 4:41–45. 2000.

PARENTE, E.J.S. **Biodiesel: uma aventura tecnológica num país engraçado**. Fortaleza. Tecbio. 2003.

PEÑALOZA, A.P.S. & VALLS, J.F.M. Chromosome number and satellited chromosome morphology of eleven species of *Arachis* (Leguminosae). **Bonplandia**. Corrientes, Argentina. v.14, n. 1-4, p. 65-72. 2005.

ROBLEDO, G. & SEIJO, G. Characterization of the *Arachis* (Leguminosae) D genome using fluorescence in situ hybridization (FISH) chromosome markers and total genome DNA hybridization. **Genetics and Molecular Biology**. 31, 3, 717-724. 2008.

SANTOS, R.C.; MOREIRA, J.A.N.; ALMEIDA, R.P.; RIBEIRO, G.P.; ANDRADE, G.P.; PROCÓPIO, C.D.; SILVA, A.M.D. **Caracterização e avaliação de germoplasma exótico e cultivares de *Arachis hypogaea* L.** Campina Grande: EMBRAPA Algodão, 20p. 1997.

SANTOS, R. C.; GODOY, I. J.; FAVERO, A. P. Melhoramento do amendoim. In: SANTOS, R.C. (Ed.). **O agronegócio do amendoim no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão; Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica. p.123-190, 2005.

- SANTOS, R.C., MELO FILHO, P.A.; GOMES, L.R. **Produção de amendoim sob diferentes fontes de adubação na Zona da Mata de Pernambuco**. Campina Grande. Embrapa (Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 85). 2007.
- SANTOS, R.C.; FREIRE, R.M.M.; LIMA, L.M.; ZAGONEL, G.F.; COSTA, B.J. Produtividade de grãos e óleo de genótipos de amendoim para o mercado oleoquímico. **Revista Ciência Agronômica**. 43(1):72-77. 2012.
- SEIJO, J.G.; LAVIA, G.I.; FERNANDEZ, A.; KRAPOVICKAS, A.; DUCASSE, D.; MOSCONE, E.A. Physical Mapping of the 5s and 18s-25s rRNA genes by FISH as evidence that *Arachis duranensis* and *A. ipaensis* are the wild diploid progenitors of *A. hypogaea* (Leguminosae). **American Journal of Botany**. 91(9): 1294-1303, 2004.
- SEIJO, G.; LAVIA, G.I.; FERNÁNDEZ, A.; KRAPOVICKAS, A.; DUCASSE, D.A.; BERTIOLI, D.J.; MOSCONE, E.A. Genomic relationships between the cultivated peanut (*Arachis hypogaea*, Leguminosae) and its close relatives revealed by double GISH. **American Journal of Botany**. 94(12): 1963–1971. 2007.
- SILVA, S.C. **Caracterização citogenética, molecular e morfológica de acessos do gênero *Arachis* com ênfase na seção *Hetherantheae***. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife. 99 p. 2007.
- SILVA, S.C.; MARTINS, M.I.G.; SANTOS, R.C.; PEÑALOZA, A.P.S.; MELO FILHO, P.A.; BENKO-ISEPPON, A.M.; VALLS, J.F.M.; CARVALHO, R. Karyological features and banding patterns in *Arachis* species belonging to the *Heterantheae* section. **Plant Systematic Evolution**. 285:201–207. 2010.
- SINGH, A.K. Utilization of wild relatives in genetic improvement of *Arachis hypogaea* L. Part 8. Synthetic amphidiploids and their importance in interespecific breeding. **Theoretical and Applied Genetics**, 72, p433-439, 1986.
- SUASSUNA, T.M.F.; CASTRO, J.P.; FURTADO, C.M.; RIBEIRO, C.S.N.; SANTOS, T.S.; SANTOS, J.W.; CARVALHO, J.M.F.C. Regeneração e multiplicação de plantas de amendoim *in vitro* a partir de sementes inviáveis. In: **III Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas**, 2005, Gramado. Anais III CBMP, 2005.
- SYBENGA, J. Forty years of cytogenetics in plant breeding: a personal view. In: LELLEY, T. (Ed). **Current topics in plant cytogenetics related to plant improvement**. Tullen, Áustria : Universitätsverlag. P.22-32, 1998.

VALLS, J.F.M.; SIMPSON, C.E. Taxonomy, natural distribution, and attributes of *Arachis*. In: KERRIDGE, P.C. & HARDY, B. (eds.). **Biology and Agronomy of Forage Arachis**. Cali, CIAT. C.1, p. 1-18. 1994.

VALLS, J.F.M.; SIMPSON, C.E. New species of *Arachis* L. (Leguminosae) from Brazil, Paraguay and Bolivia. **Bonplandia**, v.14, p.35-64, 2005.

VALLS, J.F.M. Recursos genéticos de *Arachis*: avanços no conhecimento botânico e a situação atual de conservação e uso. **Agrociência**. vol. IX. n. 1 e n. 2, p.123-132, 2005.

CAPÍTULO II

CARACTERIZAÇÃO CITOMOLECULAR DA VARIEDADE BRS PÉROLA BRANCA DE *Arachis hypogaea* L. (O AMENDOIM CULTIVADO) E DE SEUS GENITORES

CARACTERIZAÇÃO CITOMOLECULAR DA VARIEDADE BRS PÉROLA BRANCA DE *Arachis hypogaea* L. (O AMENDOIM CULTIVADO) E DE SEUS GENITORES

Vanessa Emanuelle de Oliveira Maciel¹, Lidiane de Lima Feitoza¹, Roseane Cavalcanti dos Santos² e Reginaldo de Carvalho¹.

¹Laboratório de Citogenética Vegetal, Departamento de Biologia, Programa de Pós-graduação em Agronomia-Melhoramento Genético de Plantas - UFRPE, Recife, PE, Brasil;

²Empresa Nacional de Pesquisa do Algodão, EMBRAPA, Campina Grande, PB, Brasil;

RESUMO

A espécie cultivada do amendoim (*Arachis hypogaea* L.) pertence à família Fabaceae, gênero *Arachis*, composto por quase 100 espécies endêmicas da América do Sul. É uma das oleaginosas mais cultivadas no mundo, com grãos ricos em proteínas e vitaminas do complexo B, além de carboidratos, fibras, vitamina E, ácido fólico e um conjunto de minerais. A utilização de técnicas citogenéticas (bandeamento) e moleculares nas últimas décadas tem permitido o acesso a informações importantes sobre o cariótipo da espécie. Com isto, este trabalho objetivou caracterizar três variedades do amendoim cultivado (BRS Pérola Branca, BR1 e LViPE-06), sendo um híbrido e seus genitores, por meio de diversas técnicas citogenéticas visando localizar marcas cromossomo específicos e sua interação no cariótipo do híbrido. Os resultados do presente estudo revelam uma enorme semelhança cariotípica entre as variedades estudadas apresentando $2n=40$, com cromossomos pequenos, morfologia de meta a submetacêntrica e padrão de condensação proximal. As três variedades apresentaram 20 bandas DAPI⁺ pericentroméricas e 6 bandas de heterocromatina (CMA⁺) adjacentes. A hibridização *in situ* com sondas de DNA ribossomal evidenciou, três ou quatro pares de DNAr 45S, sempre correspondendo às bandas heterocromáticas CMA⁺. Quatro blocos de DNAr 5S na região pericentromérica foram observados para todas as variedades. A imunocoloração com o anticorpo anti-H4K5ac foi evidenciada na eucromatina descondensada terminal dos cromossomos metafásicos e na cromatina difusa dos núcleos interfásicos. A marcação com anti-H3S10f ocorreu nos pericentrômeros dos cromossomos e ausente na intérfase. Trabalhos como este contribuem para identificar as pequenas modificações surgidas por eventos evolutivos e também a caracterização

citogenética de variedades do amendoim cultivado que possuem diferenças morfológicas, principalmente nos grãos, podendo auxiliar em programas de melhoramento do amendoim.

PALAVRAS-CHAVE: bandeamento, FISH, histonas, híbrido, amendoim.

ABSTRACT

The species cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) belongs to the Fabaceae family, genus *Arachis*, composed of nearly 100 endemic species of South America.'s One of the most cultivated oilseeds in the world, with grains rich in protein and B vitamins, besides carbohydrates, fiber, vitamin E, folic acid, and a set of minerals. The use of cytogenetic (banding) and molecular techniques in recent decades has allowed access to important information about the species karyotype. With this, this study aimed to characterize three varieties of cultivated peanut (BRS Pearl White, BR1 and LViPE-06), being a hybrid and its parents, through various cytogenetic techniques aimed locate specific bands and their interaction on chromosome karyotype of the hybrid. The results of this study reveal a huge karyotypic similarity between the varieties presented $2n = 40$ with small chromosomes, morphology goal submetacêntrica and standard proximal condensation. The three varieties showed 20 DAPI + bands and 6 bands pericentromeric heterochromatin (CMA +) adjacent. In situ hybridization with ribosomal DNA probes showed three or four pairs of 45S rDNA, always corresponding to heterochromatic bands CMA +. Four blocks in pericentromeric 5S rDNA region were observed for all varieties. Immunostaining with anti-H4K5ac antibody was detected in the terminal metaphase chromosomes decondensed euchromatin and diffuse chromatin of interphase nuclei. Labeling with anti-H3S10f pericentrômeros occurred in the chromosomes and absent in interphase. Works such as this help to identify small changes arising through evolutionary events and also cytogenetic characterization of varieties of cultivated peanut that have morphological differences, mainly in grains, which could aid in peanut breeding programs.

KEY-WORDS: Banding, FISH, histones, hybrid, peanuts.

INTRODUÇÃO

Arachis é um dos gêneros de leguminosas mais importantes do mundo e compreende 80 espécies endêmicas da América do Sul tendo como espécie de maior importância, *Arachis hypogaea* (L.), o amendoim cultivado, que tornou-se uma cultura importante para o país devido ao seu alto teor de proteína e óleo (SILVA *et al.*, 2010; MARI *et al.*, 2013). O gênero foi dividido em nove seções taxonômicas e a seção *Arachis*, à qual pertence o amendoim cultivado, é composta por 31 espécies que apresentam os caracteres evolutivos mais recentes, tais como o fruto desenvolvido, que são de grande importância para a obtenção de novas variedades (KRAPOVICKAS e GREGORY, 1994; VALLS, 2005; VALLS e SIMPSON, 2005).

Arachis hypogaea é considerada uma espécie autógama, com uma estrutura reprodutiva, que facilita a autofecundação e uma baixa frequência de alogamia (BORÉM, 2013). As cultivares de amendoim de porte ereto, possuem elevada tolerância a condições de estresse hídrico (NOGUEIRA e SANTOS, 2000; SANTOS *et al.*, 2005). A cultivar BR 1 tem sementes com película vermelha, arredondadas, tamanho médio e teor de óleo bruto nas sementes 45%. A linhagem LViPE-06 tem película bege, sementes de tamanho extragrande arredondadas e teor de óleo na faixa de 51%. A BRS Pérola Branca, é um híbrido gerado por meio de cruzamento entre a precoce BR 1 e a *top line* LViPE-06 e possui sementes grandes, arredondadas com película branca e teor de óleo 52%. A *top line* LViPE-06 e a cultivar BRS Pérola Branca são indicadas ao mercado de óleos (SANTOS *et al.*, 2012).

As primeiras análises citogenéticas no gênero *Arachis* foram realizadas por Husted (1933, 1936), que determinou $2n = 2x = 20$ (diplóide) para espécies selvagens e $2n = 4x = 40$ (tetraplóide) para a espécie cultivada *Arachis hypogaea*. A espécie cultivada do amendoim, *Arachis hypogaea* L., cuja configuração citológica é (AABB;

$2n = 4x = 40$), tem sua possível origem pela domesticação da espécie tetraploide *A. monticola* (AABB) e esta, pelo cruzamento entre duas espécies silvestres da seção *Arachis*, uma de genoma “A” (com o par de cromossomos “A”), e outra de genoma “B” (sem o par de cromossomos “A”) (GREGORY e GREGORY 1976, 1979). *Arachis monticola* e *A. hypogaea* são as únicas espécies tetraplóides da seção *Arachis* e formam híbridos férteis quando cruzados entre si. Atualmente, a hipótese mais aceita é a de que *A. duranensis* teria sido a doadora do genoma “A” (FERNANDES e KRAPOVICKAS, 1994) e *A. ipaensis*, do genoma “B” (SEIJO *et al.*, 2007).

A utilização de técnicas citogenéticas e o avanço destas nas últimas décadas têm permitido ao melhoramento genético de plantas o acesso a informações importantes para um estudo mais aprofundado da origem, das alterações cromossômicas e melhoramento de espécies como: algodão, amendoim, arroz, feijão, mandioca, entre outras (BORÉM, 2013). Dentre as técnicas citogenéticas mais utilizadas estão a marcação com fluorocromos CMA e DAPI e a FISH (Fluorescent *in situ* Hybridização). Mais recentemente, surgiu a imunocoloração de histonas, que em associação com as demais técnicas permite entender melhor a estrutura da cromatina (HOUBEN *et al.*, 2006). A técnica de bandeamento fluorescente utiliza dois fluorocromos: o DAPI (4,6 diamidino-2-fenilindol) que cora fortemente as regiões do genoma ricas em AT (Adenina-Timina), e o CMA₃ (cromomicina A₃), que marca regiões ricas em GC (Guanina-Citosina), revelando assim a composição da cromatina (SUMNER, 2003; SILVA e GUERRA, 2010). A FISH utiliza sondas de DNA ribossomais 5S e 45S e permite a localização exata desses e outro genes em vários organismos (GUERRA, 2004) tanto em células metafásicas como nos núcleos interfásicos (ANSARI *et al.* 1999), possibilitando assim a comparação de regiões genômicas homólogas e identificando cromossomos específicos (HERRERA, 2007).

A técnica de imunocoloração em associação a coloração convencional com Giemsa, bandeamento com fluorocromos CMA/DAPI e mesmo com a FISH, entre outras, proporciona uma melhor compreensão da estrutura da cromatina e seu papel na organização dos genomas. Em alguns trabalhos, os autores utilizam anticorpos contra histonas modificadas típicas da eu- e heterocromatina que mostram diferenças na composição e tipos de organização da cromatina em cromossomos de plantas (HOUBEN *et al.*, 2003; DHAR *et al.*, 2009; SCHÜBELER, 2009; FEITOZA e GUERRA 2011a, MARQUES *et al.*, 2011). As histonas são proteínas estruturais abundantes nos núcleos dos eucariotos e apresentam caudas N-terminais que estão sujeitas a uma série de modificações pós-síntese incluindo acetilação, fosforilação e metilação (KOUZARIDES, 2007; LAW e JACOBSEN, 2010) que fornecem marcas epigenéticas importantes em estudos citológicos e moleculares da cromatina. Dependendo do resíduo ou aminoácido modificado, as histonas podem desempenhar funções diversas nas células, como por exemplo, coesão entre cromátides, condensação cromossômica, reparo do DNA e expressão/silenciamento gênico através de alterações na estrutura da cromatina e em suas propriedades funcionais (NISHIOKA *et al.*, 2002).

Diante do exposto e levando em consideração a importância econômica do amendoim cultivado e a escassez de estudos mais aprofundados do seu cariótipo, este trabalho objetivou entender melhor a composição e estruturação da cromatina de três variedades de amendoim cultivado utilizadas na região Nordeste do Brasil através das técnicas de coloração convencional, bandeamento duplo com os fluorocromos CMA/DAPI, Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH) e com a mais recente técnica em citogenética, a imunocoloração de proteínas histonas.

MATERIAL E MÉTODOS

A. Material vegetal

Foram utilizadas sementes de três variedades de *A. hypogaea*: BR 1, *top line* LViPE-06 e da cultivar BRS Pérola Branca (o híbrido) cedidas pela Embrapa Algodão – Campina Grande – PB. Todas essas cultivares foram desenvolvidas pela Embrapa Algodão especialmente para o cultivo na região Nordeste. O material vegetal foi coletado e processado no Laboratório de Citogenética Vegetal da Universidade Federal Rural de Pernambuco (LCV - UFRPE).

B. Pré-tratamento

Pontas de raízes jovens foram tratadas com solução de 8-hidroxiquinoleína (8HQ) a 2 mM por 4,5 horas a 18°C, fixadas em Carnoy (etanol: ácido acético/ 3:1v/v) e estocadas em freezer a -20°C até a posterior utilização. Para a coloração convencional as raízes estocadas foram lavadas e hidrolisadas em HCl 5N, por 20 min. Para o bandeamento CMA/DAPI e FISH, após as lavagens, as raízes foram digeridas em solução enzimática (celulase 2%/ pectinase20%) por 20 minutos a 37°C. Para a imunocoloração de histonas modificadas, as raízes foram fixadas por 45 min à temperatura ambiente em paraformaldeído 4% diluído em PBS e posteriormente, digeridas em solução enzimática (celulase 2%/ pectinase20%) por 30 minutos a 37°C.

C. Análise convencional

As raízes foram maceradas em ácido acético 45% e posteriormente coradas com Giemsa a 3%, durante 10 min., para definição do cariótipo e caracterização cromossômica seguindo a metodologia de Guerra (1983) com pequenas modificações.

D. Coloração CMA/DAPI e FISH

Para a identificação das regiões ricas em AT e GC, após a confecção das lâminas, estas foram envelhecidas por 3 dias e posteriormente coradas com 8µL de CMA3 (cromomicina A - 0,5 mg/ml) por 60 min. Em seguida foram contracoradas com 8µL de DAPI (2µg/ml) por 30 minutos e montadas com 10µL de meio de montagem (GUERRA e SOUZA, 2002).

Para a detecção de sítios de DNAr 45S e 5S, as lâminas selecionadas foram pré-tratadas com RNase e pepsina, fixadas em formaldeído e desidratadas em série alcoólica. A mistura de hibridização contendo 50% de formamida, 10% de sulfato de dextran, 2 x SSC e 2-5 ng/µl de sonda marcada foi desnaturada previamente por 10 min a 75° C. As lâminas foram desnaturadas por 5 min a 75° C. A hibridização foi realizada em câmara úmida a 37° C por um dia e posteriormente as lâminas foram analisadas. (PEDROSA-HARAND *et al.* 2002).

E. Imunocoloração

Para a imunocoloração, seguiu-se o protocolo de Manzanero *et al.*, (2000). As raízes foram esmagadas em tampão PBS, a lamínula retirada em nitrogênio líquido e posteriormente incubadas no bloqueador BSA 3%. Em seguida, foram adicionados 15 µl de anticorpo primário anti-H4K5ac ou anti-H3S10f diluídos 1:300 (rabbit polyclonal IgG – Upstate Biotechnology, USA). Posteriormente, o anticorpo primário foi detectado usando 15 µl do anticorpo secundário goat anti-rabbit IgG conjugado com FITC (Sigma), diluído 1:60. As preparações foram montadas em DAPI (2 µg/mL):Vectashield e analisadas imediatamente.

F. Fotodocumentação

Os resultados foram fotografados em microscópio de epifluorescência Leica DM2500 equipado com câmera digital Leica DFC345Fx. As medições cromossômicas

foram realizadas no software MicroMeasure3. As imagens foram processadas no Adobe Photoshop CS5 (Adobe Systems Incorporated) com alteração de brilho e contraste, apenas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As três variedades de *A. hypogaea* estudadas (BR1, LViPE-06 e BRS Pérola Branca) apresentaram genoma tetraplóide com $2n = 4x = 40$ cromossomos. No geral, as características citológicas foram bastante similares, com cromossomos apresentando morfologia variando de metacêntricos a submetacêntricos e fórmula cariotípica (19m+1sm), confirmando resultados de Husted (1933, 1936). O tamanho foi considerado de pequeno a médio, com valores variando entre 1,20 a 2,93 μ m para LViPE-06, 1,45 a 3,14 μ m para BR1 e 1,39 a 3,03 μ m para o híbrido “BRS Pérola Branca” (Figs. 1b-c, 2b-c e 3b). Semelhanças de tamanho cromossômico juntamente com a morfologia e o tipo de núcleos também têm sido encontradas em outras variedade de *A. hypogaea* (SEIJO *et al.*, 2004; 2009) e outras espécies como *A. gregoryi*, *A. linearifolia* e *A. schininii*, pertencentes à secção *Arachis* (PEÑALOZA e VALLS, 2005). Nos três cariótipos foi evidenciado também um par de cromossomos mais fracamente corado, conhecido como “par A”, que ocorre no genoma de muitas espécies de *Arachis*, incluindo aquela doadora do genoma A para a formação de *A. hypogaea* (FERNÁNDEZ e KRAPOVICKAS, 1994) (Figs. 1b, 2b, 3c). Os núcleos interfásicos foram do tipo semi-reticulado com base na classificação de Guerra (1985), com presença de cromocentros bem distintos da cromatina difusa do restante do núcleo, sendo esta última praticamente não corada, ou apenas fracamente, pela coloração Giemsa e CMA/DAPI (Figs. 1a, 2a e 3a). Adicionalmente, as variedades de *Arachis hypogaea* apresentaram satélites do tipo 5, corroborando os dados de Inéz e Fernández

(2004). A seção *Arachis* é bem caracterizada pela presença de satélites do tipo 3A, 3B, 5, 6, 7, 8 e 9 (SILVA *et al.*, 2010) e a principal característica desse tipo de satélite encontrado no amendoim é sua ampla distensão, especialmente em prometáfase, além da formação de satélites relativamente grandes.

Na coloração com os fluorocromos CMA e DAPI, foram observadas bandas DAPI⁺ na região pericentromérica de 10 pares de cromossomos, sendo seis delas adjacentes aos blocos de CMA⁺ em 3 pares cromossômicos (Figs. 1d, 2d e 3c). A presença de bandas heterocromáticas DAPI⁺ apenas na metade do complemento cromossômico de *A. hypogaea* sugere uma separação espacial de genomas distintos (genoma A e B) e demonstra claramente sua origem híbrida, corroborando dados prévios (LAVIA e SEIJO, 2005; SEIJO *et al.*, 2004; ROBLEDO e SEIJO, 2009). Além do mais, a presença de apenas um cromossômico heteropcnótico (diferencialmente corado), conhecido como “par A”, também reforça a ideia da formação híbrida com origem nos genomas do tipo A (*A. duranensis*) e B (*A. ipaensis*). Bandas heterocromáticas DAPI⁺ centroméricas, mas em todos os cromossomos, também estão presentes noutras espécies diploides que apresentam genoma A, como é o caso de *A. correntina*, *A. duranensis* e *A. villosa* (SEIJO *et al.*, 2004) e em *Arachis glandulifera*, *A. hoehnei* e *A. gregoryi* (ROBLEDO e SEIJO, 2008; CUSTÓDIO *et al.*, 2013), além de outras nove espécies de *Arachis* que apresentam genoma A (ROBLEDO e SEIJO, 2009). Está presente também na espécie *Arachis pusilla* da secção Heterantheae (SILVA *et al.*, 2010) e em todas as variedades de *A. hypogaea* relatadas (SEIJO *et al.*, 2004; 2007; ROBLEDO *et al.*, 2008; ROBLEDO e SEIJO 2008; 2009; 2010;). Dessa forma, bandas DAPI⁺ centroméricas tem sido um bom marcador citológico no gênero *Arachis*, uma vez que uma boa parte das suas espécies geralmente tem todos, ou quase todos, os cromossomos do complemento com bandas pericentroméricas (espécie com

genoma A) ou sem bandas (espécie do genoma B) (RAINA e MUKAI, 1999; SEIJO *et al.*, 2004). Entretanto, uma exceção é *A. batizocoi*, que apresenta um único par sem bandas heterocromáticas (SEIJO *et al.*, 2004).

Na Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH), as três variedades apresentaram seis sítios de DNAr 45S (Fig. 1f, 2f e 3e) e dois pares de DNAr 5S (Fig. 1e, 2e e 3d), sendo um par de 5S no genoma A (que apresenta o “par A” e bandas DAPI⁺ centroméricas) e outro par no genoma B, ambos os sítios localizados na região mais proximal. Na secção *Arachis*, o número de DNAr 45S variou de dois em *A. gregory* para oito sítios em *A. glandulifera*, enquanto o número de DNAr 5S foi mais conservado e variou de dois na maioria das espécies analisadas para quatro em *A. hoehnei* (CUSTÓDIO *et al.*, 2013). Além do mais, um trabalho anterior mostrou valores diferentes do observado no presente trabalho para os dois loci em uma variedade de *A. hypogaea*, sendo cinco sítios de DNAr 45S e apenas dois sítios de DNAr 5S, (SEIJO *et al.*, 2004). Detecção de genes de RNAr por hibridização *in situ* fluorescente (FISH) mostra ser uma ferramenta útil em estudos de organização do genoma da planta, homeologias cromossômicas, citotaxonomia e evolução (JIANG e GILL, 1994; MOSCONE *et al.*, 1999.; LIM *et al.*, 2000.; NAKAMURA *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2012; FONSÊCA *et al.*, 2013; 2014). No estudo dos cromossomos de *Arachis* como um todo, a técnica de FISH tem demonstrado que o número de loci de DNAr ribossomal é variável, como observado por Raina e Mukai (1999), Robledo e Seijo (2008; 2009) e no presente trabalho, que similar às marcas DAPI⁺ centroméricas, também pode ser um bom marcador para reconstrução e entendimento dos processos evolutivos do grupo *Arachis*.

No cariótipo de *A. hypogaea*, uma das características citológicas mais curiosas e que chama à atenção é a presença de um par cromossômico menor (vindo do genoma

A), que apesar de conter uma banda heterocromática proximal, mostra um baixo nível de condensação da cromatina (Figs. 1d, 2e, 3d). Com o intuito de caracterizar a cromatina desse par, nós utilizamos o anticorpo contra a histona H4 acetilada na lisina 5 (anti-H4K5ac), uma marca universal da eucromatina descompactada e por isso associada à expressão e atividade gênica (BRAUNSTEIN *et al.*, 1996; BROWNELL *et al.*, 1996; SHAHBAZIAN e GRUNSTEIN, 2007), fornecendo dessa forma um panorama da estrutura e compactação da cromatina e permitindo um comparativo com os demais cromossomos do complemento. Os resultados mostraram que o anticorpo anti-H4K5ac marcou fortemente nas regiões terminais descondensadas de todos os cromossomos das três variedades (Fig. 1j-l, 2j-l e 3o-q), não marcando a cromatina proximal de condensação precoce e nem as bandas heterocromáticas CMA⁺ e DAPI⁺ próximas ao centrômero, que constituem uma pequena fração dessa cromatina proximal. Uma exceção foi o “par A”, que foi diferencialmente marcado com H4K5ac e apresentou hiperacetilação ao longo de todo o comprimento cromossômico. Nos núcleos interfásicos, apenas a cromatina difusa, que corresponde às regiões terminais completamente descondensadas, foi marcada (Figs. 1n e 3n).

O padrão de marcação da H4K5ac observado no híbrido e nos progenitores de *A. hypogaea* foi similar ao observado em outras plantas com cromossomos e genomas pequenos como *Silene* (VYSKOT *et al.*, 1999), *Costus* e *Eleutherine bulbosa* (FEITOZA e GUERRA, 2011), *Phaseolus vulgaris* (FONSÊCA *et al.*, 2013). Nessas espécies, a hiperacetilação ocorreu exclusivamente nas regiões cromossômicas distais de replicação muito inicial e que correspondem à típica eucromatina descondensada, que em plantas com cromossomos e genomas pequenos, é aparentemente bem delimitada das outras frações da cromatina. Aparentemente, a hiperacetilação diferencial nesses três tipos de cromatina (eucromatina descondensada terminal,

euromatina condensada proximal e heterocromatina), sugere que a hiperacetilação esteja sempre associada a regiões potencialmente transcriptíveis (HANSEY *et al.*, 2010; RATNAKUMAR *et al.*, 2011; MILLER e GRANT, 2013). Em *Arabidopsis* (FRANSZ *et al.*, 2002; PROBST, 2004), *Silene* (VYSKOT *et al.*, 1999) e tomate (WANG *et al.*, 2006), os segmentos cromossômicos menos condensados e hiperacetilados representam regiões ricas em sequências gênicas transcripcionalmente competentes. Além do mais, no tomate, cujo genoma é bastante estudado, as regiões terminais de replicação precoce que corresponde à euromatina terminal são mais ricas em genes e hiperacetilada (WANG *et al.*, 2006; dados de um dos autores). No genoma das três variedades de *A. hypogaea*, além das regiões terminais fortemente marcadas, foi observada uma acetilação intensa e diferencial no par A. Uma vez que a H4K5ac é uma marca universal e exclusiva de regiões descompactadas e de replicação precoce, sendo por isso associada às regiões transcripcionalmente ativas, nós sugerimos que o genomas das espécies aqui analisadas apresentam intensa atividade transcripcional nas regiões cromossômicas terminais dos cromossomos vindos dos genomas A e B, e especialmente no par A, vindo do genoma A.

Na utilização do anticorpo anti-H3S10f, uma marca associada à condensação cromossômica na mitose de plantas, a marcação se deu fortemente na região pericentromérica de todos os cromossomos das variedades analisadas em mitose (Figs. 1g-i, 2g-i, 3f-k). No geral, a marcação iniciou na prófase e intensificou-se na metáfase. Tanto na anáfase, quanto na telófase e nos núcleos interfásicos o brilho reduziu drasticamente e estes não foram marcados (Fig. 3h). A forte associação temporal entre o surgimento de H3S10f e a condensação cromossômica tem levado à suposição de que a fosforilação da histona H3 teria um papel importante na condensação cromossômica (HENDZEL *et al.*, 1997; WEI *et al.*, 1998), embora hajam também evidências em

contrário (MANZANERO *et al.*, 2002). No presente trabalho, apesar do “par A” das três variedades apresentarem condensação tardia quando comparado ao tempo de condensação dos demais cromossomos do complemento, não foram observadas diferenças no tempo de início de fosforilação entre os cromossomos A e B, tão pouco entre o “par A” e os demais cromossomos. Similarmente, em *E. bulbosa*, as extensas regiões precocemente condensadas do par I não foram nem precocemente fosforiladas nem mais extensamente fosforiladas que os braços curtos e de condensação tardia dos cromossomos pequenos. Isso reforçou a hipótese de que fosforilação de H3S10 pode não ter uma relação causal com a condensação mitótica (FEITOZA e GUERRA, 2011).

CONCLUSÃO

Os dados observados no presente trabalho sugerem que algumas características citológicas, pelo menos aquelas perceptíveis pelas técnicas aqui empregadas como o número de sítios de DNAr, heterocromatina e padrão de histonas, foram bastante uniformes nas três variedades estudadas.

Ao contrário, os dados citomoleculares obtidos com a FISH indicaram uma forte discrepância quando comparado com acessos de outros estudos em *A. hypogaea*, que apresentaram dois sítios de DNAr 5S e cinco sítios de DNAr 45S, diferente dos valores aqui obtidos de quatro e seis sítios, respectivamente, demonstrando a aparente perda da homogeneidade, reconhecida em *Arachis*, de ambas famílias de DNA ribossomal.

Aparentemente, o padrão de bandas de heterocromatina CMA⁺ e DAPI⁺ foi mais estável e homogêneo quando comparados com os trabalhos prévios.

As marcas epigenéticas anti-H4K5ac e anti-H3S10f foram estudadas de maneira inédita e pareceu guardar os mesmos padrões estudados antes em outras espécies de plantas. Uma vez que o padrão de marcação da H4K5ac guarda uma estreita relação

com regiões descompactadas e provavelmente mais ricas em genes, acredita-se que o uso dessa marca de histona associada com outros marcadores citológicos possa auxiliar em estudos futuros de mapeamento de genes importantes nas variedades de amendoim, ou outras plantas, de interesse econômico.

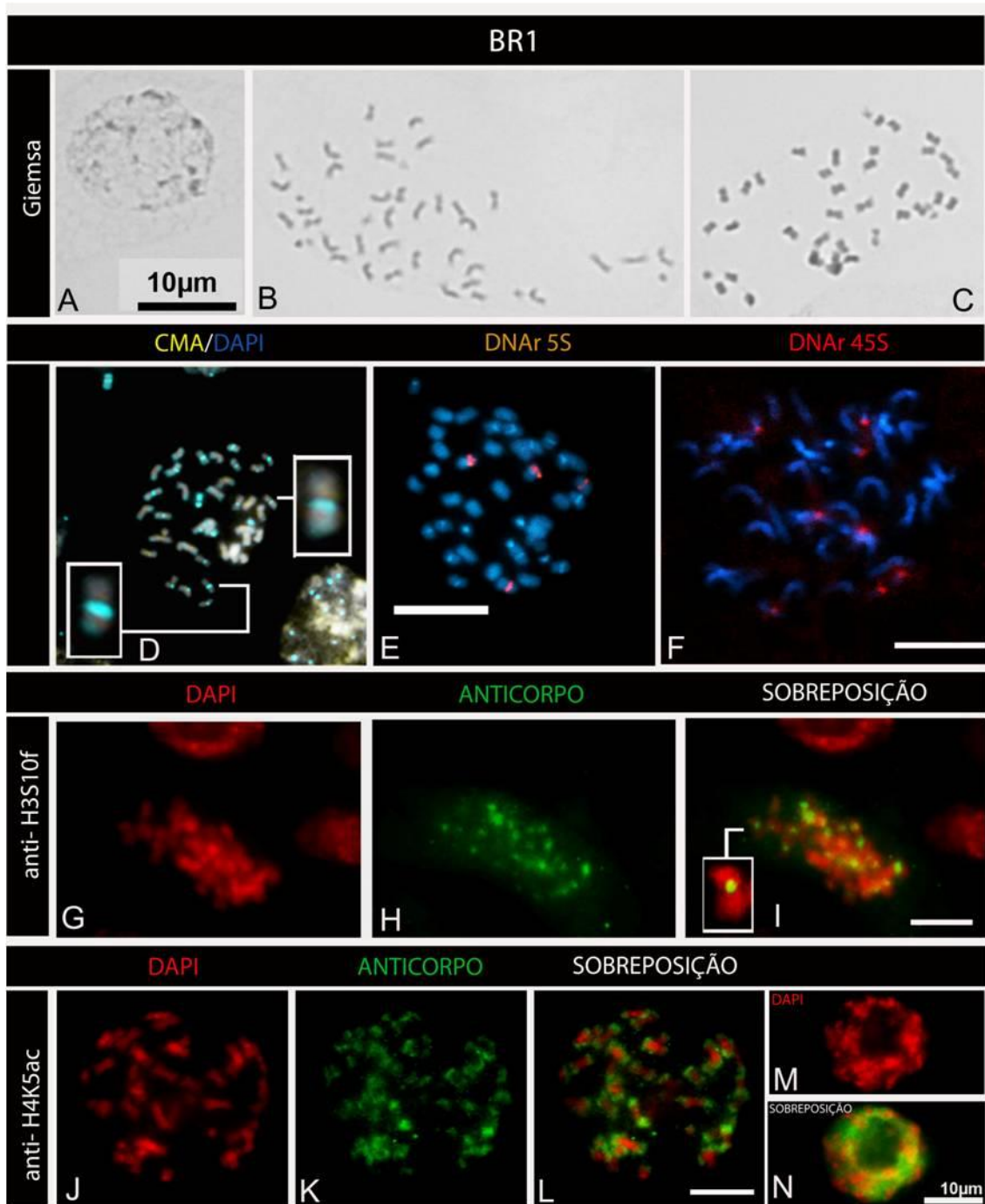


Figura 1 – Células mitóticas de *Arachis hypogaea* L., var. BR 1. A- Núcleo interfásico do tipo semi-reticulado; B- Padrão de condensação em prometáfase revelado por Giemsa. C- Padrão de condensação profásico revelado por Giemsa. D- Coloração com CMA/DAPI revelando as bandas ricas em AT; Inseto evidencia banda DAPI. E- FISH mostrando bandas de DNAr 5S. F- FISH mostrando bandas de DNAr 45S. G, H, I- Imunocoloração com anti-H3S10f mostrando suas marcações na região pericentromérica. J, K, L- Imunocoloração com o anticorpo H4K5ac evidenciando suas marcações terminais. M-N- Núcleo interfásico em imunocoloração revelando cromocentros em vermelho. Inseto em I mostrando marcação pericentromérica de anti-H3S10f. Barras = 10 μ m.

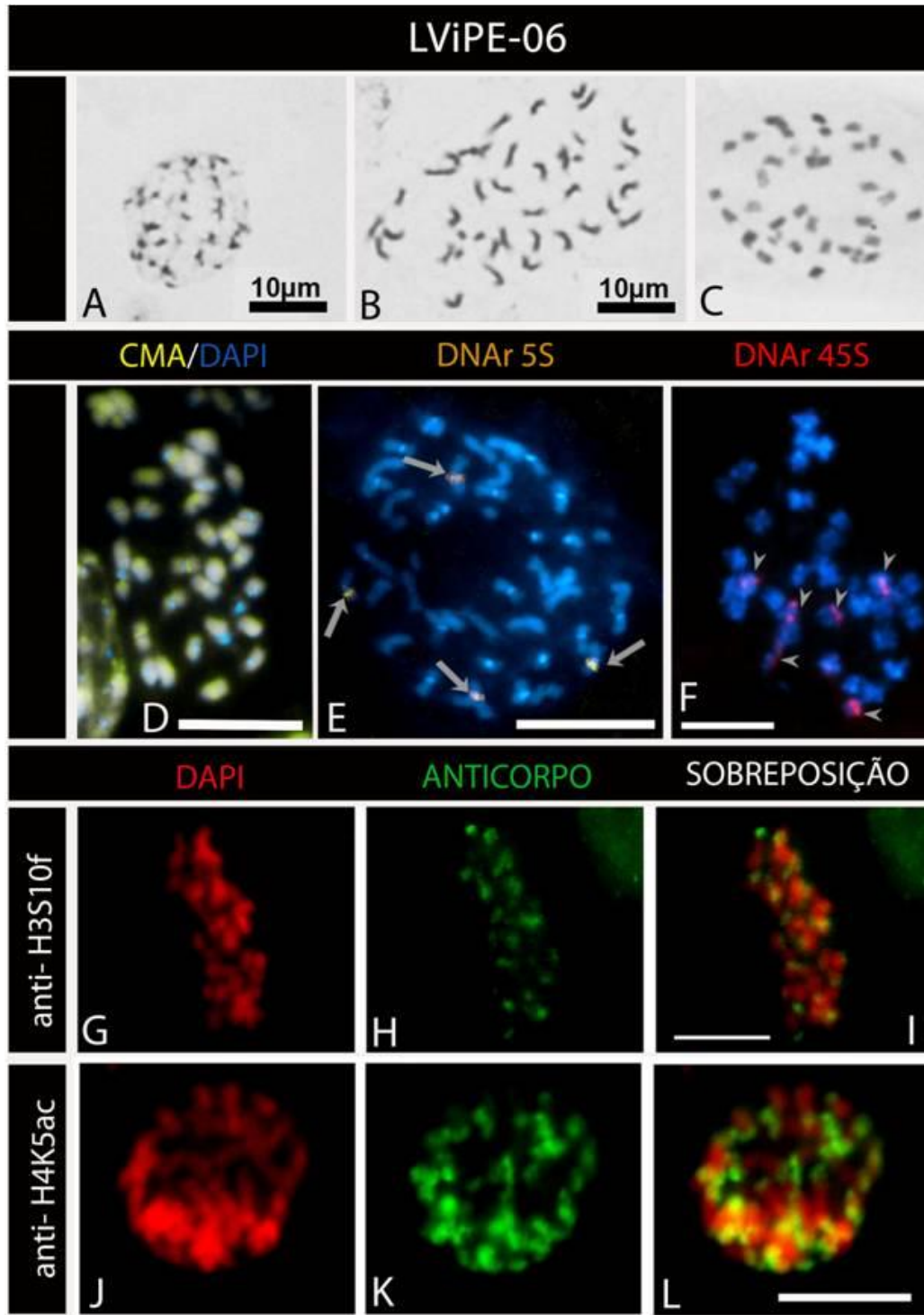


Figura 2 – Células mitóticas de *Arachis hypogaea* L., var. LviPE-06. A- Núcleo interfásico do tipo semi-reticulado; B-C- Padrão de condensação em prometáfase e metáfase, em sequência, revelado por Giemsa. D- Coloração com CMA/DAPI revelando as bandas ricas em AT. E- FISH mostrando bandas de DNAr 5S. F- FISH mostrando bandas de DNAr 45S. G, H, I- Imunocoloração com anti-H3S10f mostrando suas marcações na região pericentromérica. J, K, L- Imunocoloração com o anticorpo H4K5ac evidenciando suas marcações terminais. Barras = 10 µm.

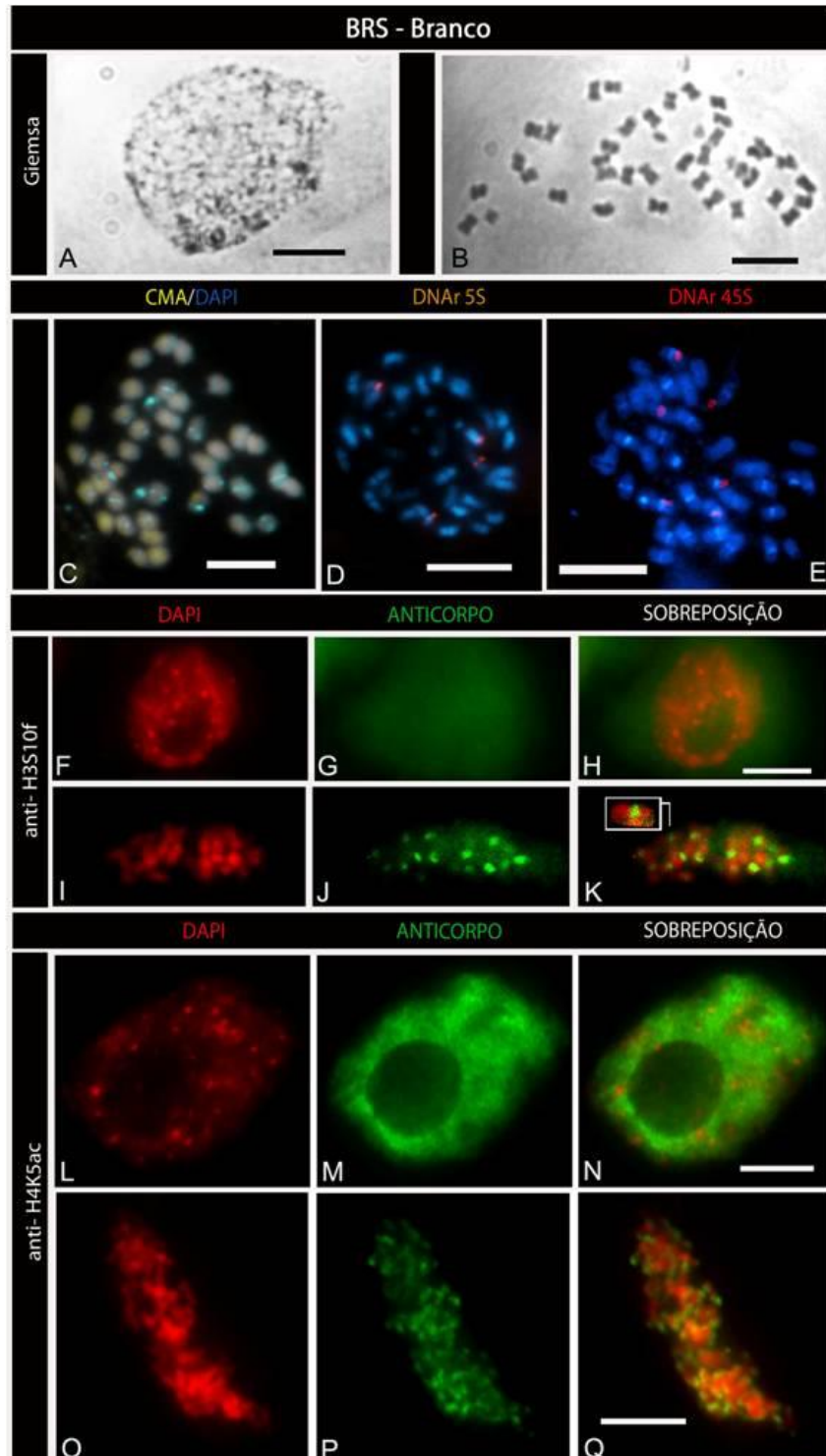


Figura 3 – Células mitóticas de *Arachis hypogaea* L., var. BRS Pérola Branca (BRS-Branco). A- Núcleo interfásico do tipo semi-reticulado; B- Padrão de condensação em metáfase revelado por Giemsa. C- Coloração com CMA/DAPI revelando as bandas ricas em AT. D- FISH mostrando bandas de DNAr 5S. E- FISH evidenciando bandas de DNAr 45S. F, G, H- Imunocoloração com anti-H3S10f em núcleo interfásico mostrando que não existe marcação nessa fase. I, J, K- Imunocoloração com anti-H3S10f em metáfase revelando a marcação na região pericentromérica; Inseto evidenciando a marcação. L, M, N- Imunocoloração com o anticorpo H4K5ac em núcleo interfásico, mostrando marcação. O, P, Q- Imunocoloração com o anticorpo H4K5ac em metáfase, evidenciando suas marcações terminais. Barras = 10 μ m.

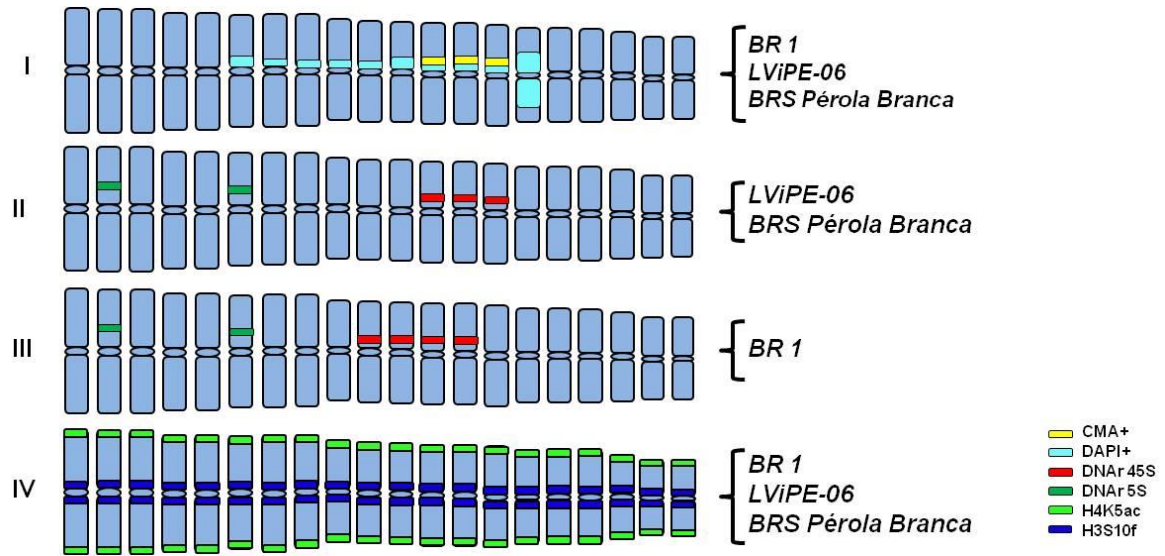


Figura 4 – Idiograma mostrando número e posição das bandas. I- Bandas CMA⁺ (amarelo) e DAPI⁺ (azul claro) nas variedades BR 1, LViPE-06 e BRS Pérola Branca. II- DNAr 45S (vermelho) e DNAr 5S (verde escuro) em LViPE-06 e BRS Pérola Branca. III- DNAr 45S (vermelho) e DNAr 5S (verde escuro) em BR 1. IV- Padrão anti-H3S10f (azul escuro) e anti-H4K5ac (verde claro) nas três variedades.

AGRADECIMENTOS

A primeira autora agradece à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANSARI, K.; MARTIN, S.; FARKASOVSKY, M.; EHBRECHT, I.M.; KUNTZEL, H. Phospholipase C binds to the receptor-like GPR1 protein and controls pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem** 274(42). 1999.
- BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de plantas**. 6ª edição. Viçosa: Editora UFV, 523p. 2013.
- BRAUNSTEIN M, SOBEL RE, ALLIS CD, TURNER BM, BROACH JR. Efficient transcriptional silencing in *Saccharomyces cerevisiae* requires a heterochromatin histone acetylation pattern. **Mol Cell Biol** .16(8):4349-56. 1996.
- BROWNELL, JE; ZHOU, T; RANALLI, R; KOBAYASHI, DG; EDMONDSON, SY; ROTH; ALLIS, CD. Tetrahymena histone acetyltransferase A: A homolog to yeast Gen5p linking histone acetylation to gene activation. **Cell**. 84: 843-851. 1996.
- CUSTÓDIO A.R.; SEIJO, G.; VALLS, F.M. Characterization of Brazilian accessions of wild *Arachis* species of section *Arachis* (Fabaceae) using heterochromatin detection and fluorescence in *situ* hybridization (FISH). **Genetics and Molecular Biology**, 36, 3, 364-370. 2013.
- DHAR MK, FUCHS J, HOUBEN A. Distribution of Eu- and Heterochromatin in *Plantago ovata*. **Cytogenetic and Genome Research**. n. 125, p. 235-240. doi: 10.1159/000230007. 2009.
- FEITOZA, L.; GUERRA, M. Different types of plant chromatin associated with modified histones H3 and H4 and methylated DNA. **Genetica**. doi: 10.1007/s10709-011-9550-8. 2011.
- FERNÁNDES, A.; KRAPOVICKAS, A. Cromosomas y evolución em *Arachis* (Leguminosae). **Bonplandia**, v8, p187-220, 1994.
- FONSÊCA, A.; RICHARD, M.M.S, GEFFROY, V.; PEDROSA-HARAND, A. Epigenetic Analyses and the Distribution of Repetitive DNA and Resistance Genes Reveal the Complexity of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae) Heterochromatin. **Cytogenet Genome Res**. p. 1-11. DOI: 10.1159/000360572. 2014.

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

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

GUERRA, M. O uso do corante Giemsa na citologia vegetal. Comparação entre a coloração simples e o bandeamento. **Cienc. Cultura**. 19-193p. 1983.

GUERRA, M. Estrutura e diversificação dos núcleos interfásicos em plantas. In: I Colóquio de Citogenética e Evolução de Plantas, 1.1985. **Anais...** Ribeirão Preto: SBG, p. 137-153. 1985.

GUERRA, M.; SOUZA, M.J. **Como Observar Cromossomos: um guia de técnica em citogenética vegetal, animal e humana**. São Paulo, Funpec, 131p. 2002.

GUERRA, M. **Hibridização in situ**. In: Marcelo Guerra. (Org.). FISH - Conceitos e Aplicações na Citogenética. Ribeirão Preto: SBG, v. , p. 01-32, 2004.

HUSTED, L. 1936. Cytological studies of the peanut *Arachis*, II. Chromosome number, morphology, and behavior, and their application to the problem of the origin of the cultivated forms. **Cytologia**, v.7, p.396-423.

HUSTED, L.1933. Cytological studies of the peanut *Arachis*, I. Chromosome number and morphology, **Cytologia**. v.5, p.109-117.

HENDZEL MJ, WEI Y, MANCINI MA, VAN HOOSER A, RANALLI T, BRINKLEY BR, BAZETT-JONES DP, ALLIS CD. Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. **Chromosoma**, n. 106, p. 348-360.doi: 10.1007/s004120050256. 1997.

HERRERA, F. Genetic fuzzy systems: taxonomy, current research trends and prospects. **Evol. Intel.** 1:27–46. 2007.

HOUBEN A, DEMIDO VD, GERNAND D, MEISTER A, LEACH CR, SCHUBERT I. Methylation of histone H3 in euchromatin of plant chromosomes depends on basic nuclear DNA content. *The Plant Journal*, v. 33, p. 967-973. doi: 10.1046/j.1365-313X.2003.01681. 2003.

HOUBEN, P.H.; DER VAN WEIJDEN, T.; SIJBRANDIJ, J.; GROU, R.P.; WINKENS, R.A. Reasons for ordering spinal x-ray investigations: how they influence general practitioners' management. **Can Fam Physician**. Oct;52(10):1266-7. PubMed PMID: 17279187;PubMed Central PMCID: PMC1783593. 2006.

- INÉZ, L.G.; FERNÁNDEZ, A. **Karyotypic studies in *Arachis hypogaea* L. varieties.** v. 57, n°. 4. 353-359p. 2004.
- JIANG, J.; GILL, BS. New 18S-26S ribosomal RNA gene loci: Chromosomal landmarks for the evolution of polyploidy wheats. **Chromosoma**. 103:179-185. 1994.
- KOUZARIDES, T. Chromatin modifications and their function. **Cell, Cambridge**, v. 128, n. 4, p. 693-705. 2007.
- KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, W. C. Taxonomia del género *Arachis* (Leguminosae). **Bonplandia**, v.8, p.1-186, 1994.
- LAW, J.A.; JACOBSEN, S.E. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. **Nat Rev Genet**. 11(3):204-20. 2010.
- LIM, K.Y.; MATYASEK, R.; LICHTENSTEIN, C.P.; LEITCH, A.R. Molecular cytogenetic analyses and phylogenetic studies in the *Nicotiana* section *Tomentosae*. **Chromosoma** 109:245-258. 2000.
- MANZANERO, S.; ARANA, P.; PUERTAS, M.J.; HOUBEN, A. The chromosomal distribution of phosphorylated histone H3 differs between plants and animals at meiosis. **Chromosoma**. 109: 308–317p. 2000.
- MARI, A.G; SANTOS, R.F.; SECCO, D.; CABRAL, A.C.; JÚNIOR, A.M.; FRIGO, E.P. Amendoim (*Arachis hypogaea*) – uma cultura energética. **Cascavel**, v.6, n.3, p.122-134, 2013.
- MARQUES, A.; FUCHS, J.M.A.L.; HECKMANN, S.; GUERRA, M.; HOUBEN, A. Characterization of Eu- and heterochromatin of citrus with a focus on the condensation behavior of 45S rDNA chromatin. **Cytogenetic and Genome Research**, n.134, p. 72-82. doi: 10.1159/000323971. 2011.
- MOSCONE, E.A.; KLEIN, F.; LAMBROU, M.; FUCHS, J.; SCHWEIZER, D. Quantitative karyotyping and dual-color FISH mapping of 5S and 18S-26S rDNA probes in the cultivated *Phaseolus* species (Leguminosae). **Genome**. 42:1224-1233. 1999.
- NAKAMURA, R.; KITAMURA, S.; INOUE, M.; OHMIDO, N.; FUKUI, K. Karyotype analysis of *Nicotiana kawakamii* Y. Ohashi using DAPI banding and rDNA FISH. **Theor Appl Genet**. 102:810-814. 2001.
- NOGUEIRA, R.J.M.C.; SANTOS, R.C. **Alterações fisiológicas no amendoim submetido ao estresse hídrico.** Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental 4:41–45. 2000.

PEDROSA-HARAND, A.; SANDAL, N.; STOUGAARD, J.; SCHWEIZER, D.; BACHMAIR, A. Chromosomal Map of the Model Legume *Lotus japonicus*. **Genetics**. 161: 1661–1672. 2002.

PEÑALOZA, A.P.S. e VALLS, J.F.M. Chromosome number and satellited chromosome morphology of eleven species of *Arachis* (Leguminosae). **Bonplandia**. Corrientes, Argentina. v.14, n. 1-4, p. 65-72. 2005.

PROBST AV, Fagard M, Proux F, Mourrain P, Boutet S, Earley K, Lawrence RJ, Pikaard CS, Murfett J, Furner I, Vaucheret H, Scheid OM. Arabidopsis Histone Deacetylase *HDA6* Is Required for Maintenance of Transcriptional Gene Silencing and Determines Nuclear Organization of rDNA Repeats. **The Plant Cell**. 16(4): 1021-1034. 2004.

RAINA, S.N.; MUKAI, Y. Detection of a variable number of 18S-5.8S-26S and 5S ribosomal DNA loci by fluorescent *in situ* hybridization in diploid and tetraploid *Arachis* species. **Genome**. 42:52-59. 1999.

RATNAKUMAR P., VADEZ V. Groundnut (*Arachis hypogaea*) genotypes tolerant to intermittent drought maintain a high harvest index and have small leaf canopy under stress. **Functional Plant Biology** 38, 1016–1023. 2011.

ROBLEDO, G.; SEIJO, G. Characterization of the *Arachis* (Leguminosae) D genome using fluorescence in situ hybridization (FISH) chromosome markers and total genome DNA hybridization. **Genetics and Molecular Biology**. 31, 3, 717-724. 2008.

ROBLEDO, G.; LAVIA, G.I.; SEIJO, G. Species relations among wild *Arachis* species with the A genome as revealed by FISH mapping of rDNA loci and heterochromatin detection. **Theor Appl Genet**. 118:1295-1307. 2009.

ROBLEDO, G.; SEIJO, G. Species relationships among the wild B genome of *Arachis* species (section *Arachis*) based on FISH mapping of rDNA loci and heterochromatin detection: A new proposal for genome arrangement. **Theor Appl Genet**. 121:1033-1046. 2010.

SANTOS, R. C.; GODOY, I. J.; FAVERO, A. P. Melhoramento do amendoim. In: SANTOS, R.C. (Ed.). **O agronegócio do amendoim no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão; Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica. p.123-190, 2005.

- SANTOS, R.C.; FREIRE, R.M.M.; LIMA, L.M.; ZAGONEL, G.F.; COSTA, B.J. Produtividade de grãos e óleo de genótipos de amendoim para o mercado oleoquímico. **Revista Ciência Agronômica**. 43(1):72-77. 2012.
- SEIJO, J.G.; LAVIA, G.I.; FERNANDEZ, A.; KRAPOVICKAS, A.; DUCASSE, D.; MOSCONE, E.A. Physical Mapping of the 5s and 18s-25s rRNA genes by FISH as evidence that *Arachis duranensis* and *A. ipaensis* are the wild diploid progenitors of *A. hypogaea* (Leguminosae). **American Journal of Botany**. 91(9): 1294-1303, 2004.
- SEIJO, G.; LAVIA, G.I.; FERNÁNDEZ, A.; KRAPOVICKAS, A.; DUCASSE, D.A.; BERTIOLI, D.J.; MOSCONE, E.A. Genomic relationships between the cultivated peanut (*Arachis hypogaea*, Leguminosae) and its close relatives revealed by double GISH. **American Journal of Botany**. 94(12): 1963–1971. 2007.
- SHAHBAZIAN MD e GRUNSTEIN M. Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. **Annu Rev Biochem**. 2007;76:75-100. 2007.
- SILVA, A. E. B.; GUERRA, M. The meaning of DAPI bands observed after C-banding and FISH procedures. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 85, p. 115-125. 2010.
- SUMNER, A. T. Chromosomes: Organization and Function. **Blackwell**, Publishing Limited, 304 p. 2003.
- VALLS, J.F.M.; SIMPSON, C.E. New species of *Arachis* L. (Leguminosae) from Brazil, Paraguay and Bolivia. **Bonplandia**, v.14, p.35-64, 2005.
- VALLS, J. F. M. Recursos genéticos de *Arachis*: avanços no conhecimento botânico e a situação atual de conservação e uso. **Agrociência**. v. IX. n. 1 e n. 2, 123-132p., 2005.
- VYSKOT, B.; SIROKY, J.; HLADILOVA, R.; BELYAEV, N. D.; TURNER, B. M. Euchromatic domains in plant chromosomes as revealed by H4 histone acetylation and early DNA replication. **Genome**. 42, p.343–350, 1999.
- WANG J, SONG L, GROVER D, AZRAK S, BATZER MA, LIANG P. dbRIP: A highly integrated database of retrotransposon insertion polymorphisms in humans. **Hum Mutat**. 27: 323–329p. 2006.
- WEI Y, MIZZEN CA, COOK RG, GOROVSKY MA, ALLIS CD. Phosphorylation of histone H3 at serine 10 is correlated with chromosome condensation during mitosis and meiosis in *Tetrahymena*. Proceedings of the National Academy of Sciences. USA, v. 95, p. 7480-7484. 1998.

ANEXOS

Regras da revista: *Comparative Cytogenetics*



Title: The title should be in a sentence case (only scientific, geographic or person names should be with a first capital letter, i.e. *Elater ferrugineus* L., Germany, etc.), and should include an accurate, clear and concise description of the reported work, avoiding abbreviations. Please, provide the names of higher taxa (e.g. class, order, family) in the title of your paper. The higher taxa within the title should be separated with commas and not with a semicolon, e.g.: (Coleoptera, Elateridae, Elaterini).

Authors and Affiliations: Provide the complete names of all authors, and their addresses for correspondence, including e.g., institutional affiliation (e.g. university, institute), location (street, boulevard), city, state/province (if applicable), and country. One of the authors should be designated as the corresponding author. It is the corresponding author's responsibility to ensure that the author list, and the individual contributions to the study are accurate and complete. If the article has been submitted on behalf of a consortium, all consortium members and their affiliations should be listed after the **Acknowledgements** section.

Abstract and Keywords: Please have your abstract and keywords ready for input into the submission module.

Body Text: All papers should be in grammatically correct English. Non-native English speaking authors are required to have their manuscripts checked by a native English speaker prior to submission. Use either British/Commonwealth or American English provided that the language is consistent within the paper. A manuscript must be written with precision, clarity, and economy, whenever appropriate in active voice and first person. Avoid the use of parenthetical comments and italics or bold for emphasis. This journal discourages the use of quotation marks except for direct quotations, words defined by the author, and words used in unusual contexts. Short quotations should be embedded in the text and enclosed in double quotation marks (""). Long quotations should be on a separate line, italicized, but without quotation marks. Single quotation marks are to be used only for a quotation that occurs within another quotation.

Spacing, Fonts, and Page Numbering: Single-space all material (text, quotations, figure legends, tables, references, etc.). Separate paragraphs with a blank line. Use a 12-point font (preferably Times New Roman or Arial). The journal printing area is 13 cm x 20 cm.

Capitals: First capital letters should be used only in the beginning of a sentence, in proper names and in headings and subheadings, as well as to indicate tables, graphs and figure/s within the text. Software programmes should be written with capital letters (e.g., ANOVA, MANOVA, PAUP).

Italicization/Underlining: Scientific names of species and genera, long direct quotations and symbols for variables and constants (except for Greek letters), such as p, F, U, T, N, r, but not for SD (standard deviation), SE (standard error), DF (degrees of freedom) and NS (non significant) should be italicized. These symbols in illustrations and equations should be in italics to match the text. Italics should **not** be used for emphasis, and not in abbreviations such as e.g., i.e., et al., etc., cf. Underlining of any text is not acceptable.

All **scientific names** of the generic and specific rank are given in italics. If mentioned first, they should be followed by the author's name (authors' names) and year of publication. Taxonomic conclusions must be consistent with the **International Codes of Zoological/Botanical Nomenclature**. The groups of sibling species must be named according to binominal nomenclature, e.g. *Chironomus plumosus* group or *Ch. plumosus* group, not "*plumosus*" group".

Abbreviations: Abbreviations should be followed by '.' (full stop or period; for instance: i.e., e.g., cf., etc.). Note that you shouldn't add a full stop at the end of abbreviated words if the last letter of the abbreviation is the same as the last letter of the full word. For example, you should abbreviate „Eds”, „Dr”, „Mr” without full stop at the end. All measures, for instance mm, cm, m, s, L, should be written without full stop.