

MARIA ISABEL GOMES MARTINS

Caracterização citogenética e molecular em acessos do gênero
Arachis

Recife - PE
2010

MARIA ISABEL GOMES MARTINS

Caracterização citogenética e molecular em acessos do gênero
Arachis

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia: Melhoramento Genético de Plantas, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Agronomia, área de concentração em Melhoramento Genético de Plantas.

Orientador: Dr. Reginaldo de Carvalho

Co-orientadores: Dr. Péricles de Albuquerque Melo Filho

Dr^a. Roseane Cavalcanti dos Santos

Recife – PE
2010

Ficha catalográfica
Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Central – UFRPE

Martins, Maria Isabel Gomes
Estudo citogenético e molecular de acessos do gênero
Arachis / Maria Isabel Gomes Martins. 72p.-- 2010.

Orientador : Reginaldo de Carvalho
Dissertação (Mestrado em Agronomia - Melhoramento
Genético de Plantas) – Universidade Federal Rural de Per
nambuco. Departamento de Agronomia.
Inclui anexo e bibliografia.

1. *Arachis*
 2. *Heteranthae*
 3. Citogenética molecular
 4. PCR específica
 5. Sequenciamento
- I. Carvalho, Reginaldo de
II. Título

MARIA ISABEL GOMES MARTINS

Caracterização citogenética e molecular em acessos do gênero
Arachis

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia: Melhoramento Genético de Plantas, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Agronomia, área de concentração em Melhoramento Genético de Plantas.

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: ____/____/2010.

Orientador:

Prof. Dr. Reginaldo de Carvalho
Departamento de Biologia/UFRPE

Examinadores:

Prof. Dr. Péricles Albuquerque de Melo Filho
Departamento de Agronomia/UFRPE

Prof^a. Dr^a Teresinha de Jesus Rangel Câmara
Departamento de Biologia/UFRPE

Prof^a. Dr^a Maria Betânia Melo de Oliveira
Departamento de Bioquímica/UFPE

Prof. Dr. Gerson Quirino Bastos (Suplente)
Departamento de Agronomia/UFRPE

Recife - PE
2010

DEDICATÓRIA

A minha mãe, Maria das Graças de Siqueira Gomes, pelo amor incondicional. Meu alicerce!

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), particularmente ao Programa de Melhoramento Genético de Plantas, Departamento de Agronomia, seus professores, funcionários e apoio ao curso de pós-graduação.

Ao CNPq pelo apoio financeiro concedido para o desenvolvimento deste trabalho.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) pelo apoio cedido na conclusão desse trabalho.

A meu orientador, Prof. Dr. Reginaldo de Carvalho pela confiança, incentivo, amizade e paciência sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.

Aos meus co-orientadores, Dr. Péricles de Albuquerque Melo Filho e Dra. Roseane Cavalcanti dos Santos, pelos conhecimentos partilhados, disponibilidade, amizade e profissionalismo.

Aos meus colegas de turma do mestrado, Eva Maria, Jacqueline Pereira, João de Andrade, Júlio Andrade, Manuela Granja, Maria Jaislanny, Marina, Paula Pinheiro, Romero de Lima, Rômulo Maciel, pelas lutas, vitórias e amizade construída durante esse período.

Aos amigos do Laboratório de Genética Bioquímica e Sequenciamento de DNA (Genoma), em especial a Jacqueline Pereira, Kaliny Veiga, Karin Fontes, Leonardo Gomes, Carliane Rebeca, Igor Luís, Sr. Ivaldo, Sérgio Lima, Lucas Luz, Luiza Silva, Mayara Mansur, Felipe Teles, Roberto, pela paciência, amizade construída ao longo desses anos, pelos conhecimentos partilhados e momentos de descontração.

À Cláudio Melo, pelo apoio, amizade e conhecimentos partilhados ao longo dos anos.

À Jacqueline Pereira e Karin Fontes, pela amizade consolidada, respeito, conselhos dados, conhecimentos partilhados.

À amiga, Kaliny Veiga por sua imensa paciência, amizade, dedicação e companheirismo, sua constante força de trabalho e sugestões, em todas as etapas deste trabalho.

A todos os amigos que mesmo um pouco distantes permanecem comigo de alguma forma, em especial Renata Beltrão, Janaína Carvalho, Carla Patrícia, Natália

Lacerda, Ricardo César, Danielle Sousa, obrigada pela amizade, carinho, compreensão e momentos descontraídos.

Ao Rafael Albuquerque, pela compreensão, companheirismo, carinho, afeto e cuidado.

A minha família, especialmente a minha amada mãe, pelo amor incondicional, conselhos, credibilidade, apoio, compreensão, enfim, por está comigo conquistando mais esta vitória.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram diretamente ou indiretamente para realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

	Pág.
Lista de Figuras	9
Lista de Tabelas	11
RESUMO	12
INTRODUÇÃO	13
Capítulo I - 2. Revisão Bibliográfica	17
2.1. Características Taxonômicas e Reprodutivas	17
2.2. Distribuição Geográfica	18
2.3. Importância Econômica	18
2.4. Seção <i>Heteranthes</i> Krapov. e W.C. Gregory	19
2.5. Melhoramento Genético	20
2.6. Estudos Citogenéticos em <i>Arachis</i>	21
2.6.1. Técnicas citogenéticas e sua utilização	23
2.7. Marcadores Moleculares	25
3. Referências	29
Capítulo II - Caracterização citogenética de quatro espécies de amendoim nativo	39
Resumo	39
Introdução	40
Materiais e Métodos	41
Material vegetal	41
Germinação e pré-tratamento	41
Análise convencional	41
Medição cromossômica	42
Coloração com fluorocromos	42
Hibridização <i>in situ</i>	42
Resultados e Discussão	43

Agradecimentos	45
Referências	50
Capítulo III - Detecção de polimorfismo de base única (SNP) em dois acessos de amendoim (<i>A. hypogaea</i> L.)	54
Resumo	54
Introdução	55
Materiais e Métodos	57
Extração de DNA	57
Amplificação por PCR	57
Purificação das amostras	57
Sequenciamento e análise das sequências	58
Resultado e discussão	58
Referências	65
Conclusões Gerais	70
Anexos	71

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	Pág.
Figura 1. Distribuição geográfica da seção <i>Heterantheae</i> pertencente ao gênero <i>Arachis</i> , adaptado de Krapovickas e Gregory (1994).	20
Figura 2. Morfologia do cromossomo satelitado (SAT) de espécies do gênero <i>Arachis</i> , evidenciando o braço menor (1) e braço maior (2), segundo Fernandez e Krapovickas (1994).	22
 CAPÍTULO II	
Figura 1. Metáfase mitótica de espécies da seção <i>Heterantheae</i> coradas convencionalmente. a. <i>Arachis giacomettii</i> ; b. <i>A. pusilla</i> ; c. <i>A. dardani</i> ; d. <i>A. sylvestris</i> . Escala corresponde a 10 µm.	47
Figura 2. Metáfases mitóticas de espécies da seção <i>Heterantheae</i> coradas com cromomicina (CMA), DAPI e técnica de FISH. a. <i>Arachis giacomettii</i> , setas indicam par satelitados. b. <i>A. pusilla</i> , setas indicando par cromossômico heteropicnótico e cabeça de seta indicam par satelitados. c. <i>A. dardani</i> , setas indicam blocos CMA ⁺ ; d. <i>A. sylvestris</i> , setas indicam blocos CMA ⁺ . e. <i>A. pusilla</i> evidenciando blocos DAPI ⁺ . f. <i>A. pusilla</i> , setas indicam sítios de DNAr 45S e cabeças de setas sítio 5S; g. <i>Arachis giacomettii</i> , setas indicando a RON. Escala corresponde a 10 µm.	48
Figura 3. Idiograma de espécies do gênero <i>Arachis</i> evidenciando regiões ricas em GC ou AT e FISH, reveladas, respectivamente, pelos fluorocromos CMA ⁺ (■), DAPI ⁺ (●) e sonda 45S (●) e sonda 5S (●) nas espécies: a. <i>Arachis dardani</i> ; b. <i>A. sylvestris</i> ; c. <i>A. pusilla</i> e d. <i>A. giacomettii</i> . SM. Cromossomo submetacêntrico. HP. Cromossomo heteropicnótico negativo.	49

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO III	Pág.
Figura 1. Gel de agarose 1,2% exibindo os produtos da reação de amplificação dos oligonucleotídeos: 1- BR1; 2- LVIPE; A - 1M-Gm; B - 4M-Gm e C - Leg036. Sigla: M – Marcador Molecular Ladder plus 1Kb (Invitrogen).	64
Figura. 2. Mapa de restrição com modificação do sítio de corte em um dos acessos BR1 e LVIPE-06 para o oligonucleotídeo Leg199. ANO refere-se ao acesso LVIPE-06.	64

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	Pág.
Tabela 1. Descrição e distribuição dos tipos de satélites (SAT) ao longo das seções taxonômicas do gênero <i>Arachis</i> , adaptado de Fernadéz e Krapovickas (1994).	23
 CAPÍTULO II	
Tabela 1. Dados dos acessos, com respectiva fórmula cariotípica (m-metacêntrico; sm-submetacêntrico), tipo de satélite (SAT), comprimento médio do complemento cromossômico (CMC), comprimento médio do maior par cromossômico (C1) e comprimento médio do menor par cromossômico (C2).	46
 CAPÍTULO III	
Tabela 1. Painel de SNPs identificados, enzimas de restrição, sequências dos oligonucleotídeos, tamanho dos fragmentos amplificados	61
Tabela 2. Endonucleases recomendadas para geração de polimorfismos entre os parentais contrastantes de amendoim de acordo com o oligonucleotídeo utilizado.	63

RESUMO

O gênero *Arachis* tem sido alvo de diversos estudos devido à sua importância na alimentação humana e animal e por suas sementes serem reconhecidas como fonte de proteína e óleo de origem vegetal, além do seu uso como plantas ornamentais. Os programas de melhoramento genético de *Arachis* têm por objetivo principal a introdução de novas variedades e aumento da variabilidade genética via cruzamentos e seleção para obtenção de caracteres agrônômicos importantes. Técnicas citogenéticas como coloração convencional, bandeamento cromossômico com fluorocromos e FISH foram empregadas para analisar quatro espécies da seção *Heteranthes*: *Arachis pusilla*, *A. giacomettii*, *A. dardani* e *A. sylvestris*. Todas as espécies apresentaram número cromossômico diplóide $2n=20$, *A. pusilla* e *A. dardani* apresentaram fórmula cariotípica $18m+2sm$ e satélite tipo 2, enquanto que *A. giacomettii* e *A. sylvestris* possuem $16m+4sm$ e satélite tipo 10. A coloração com fluorocromos CMA e DAPI revelou em *A. pusilla* um grande número de blocos ricos em Guanina e Citosina, localizados em oito pares cromossômicos na posição pericentromérica. Blocos DAPI⁺ foram observados na região proximal na maioria dos cromossomos dos acessos analisados dessa espécie após a técnica de FISH. *Arachis dardani* apresentou dois grandes blocos subterminais CMA⁺. *A. giacomettii* e *A. dardani* apresentaram apenas dois blocos CMA⁺, na região terminal do par cromossômico satelitado. A técnica de Hibridização *in situ* evidenciou em *A. giacomettii* dois sinais de hibridização na região terminal de um par cromossômico e em *A. pusilla* quatro sítios de DNAr 45S em dois pares cromossômicos e dois sítios de DNAr 5S adjacentes. Já em *A. giacomettii* foram visualizados dois sinais de hibridização na região terminal de um par cromossômico, coincidindo com os blocos CMA⁺, não sendo visualizados, porém sítios DNAr 5S. Para a técnica de molecular foram utilizados 35 oligonucleotídeos iniciadores, provenientes de bibliotecas de expressão de leguminosas, estes foram aplicados em duas linhagens contrastantes de amendoim, acessos 'BR1' e 'LVIPE-06', comumente utilizados na formação de populações segregantes, com o objetivo de obter um painel de endonucleases recomendadas para gerar marcas polimórficas úteis ao melhoramento genético de amendoim ou para fins de mapeamento genético. Do total de oligonucleotídeos iniciadores, três geraram polimorfismos diretamente da PCR entre os acessos investigados. Dos amplicons monomórficos, dez foram purificados, sequenciados e alinhados para a identificação dos SNPs candidatos a geração dos mapas de restrição e conversão em marcas moleculares.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Arachis* pertence à família *Fabaceae*, subfamília *Papilionoideae*, tribo *Aeschynomeneae* e subtribo *Stylosanthinae*, sendo originário da América do Sul, principalmente no Brasil (Estado do Mato Grosso do Sul) e no Paraguai (GREGORY et al., 1980). Este gênero está organizado em nove seções taxonômicas (*Arachis*, *Caulorrhizae*, *Extranervosae*, *Erectoides*, *Heteranthae*, *Procumbentes*, *Rhizomatosae*, *Triectoides* e *Triseminatae*). De acordo com Valls e Simpson (2005), mais de 60 espécies ocorrem no Brasil, destas 48 endêmicas do território brasileiro. O amendoim comercial (*Arachis hypogaea* L.) é amplamente cultivado nas regiões tropicais e subtropicais principalmente nos países com clima semi-árido (SINGH e SINGH, 1992). Apresentando grande influência na alimentação humana por suas sementes serem reconhecidas como fontes de proteína e óleo de origem vegetal, o amendoim é classificado a sexta oleaginosa mais cultivada no mundo, superada apenas pela soja, dendê, algodão, coco e colza (FAO, 2008). As espécies das demais seções do gênero *Arachis*, entre elas as da seção *Heteranthae*, são de grande importância na alimentação animal, como plantas forrageiras servindo de fonte de proteínas ou ainda sendo utilizadas como plantas ornamentais.

Dados citogenéticos associados com análises morfológicas têm auxiliado na caracterização de espécies do gênero *Arachis*. Esses estudos têm proporcionado melhor entendimento quanto à potencialidade dos recursos genéticos principalmente em relação às espécies silvestres. Além disso, essas espécies vêm sendo introduzidas nos programas de melhoramento por serem importantes fontes de genes úteis (SIMPSON, 2001), característica essa que parece estar presente nas espécies da seção *Heteranthae*.

Husted (1933, 1936) foi o primeiro a estudar o número e a morfologia dos cromossomos das espécies do gênero. A maioria dos representantes deste gênero são diplóides apresentando número cromossômico $2n=2x=20$, com exceção das espécies *A. decora*, *A. palustris*, *A. porphyralyx* e *A. praecox* que possuem $2n=2x=18$ (PEÑALOZA e VALLS, 1997; LAVIA, 1998; PEÑALOZA et al., 2001). Apenas as espécies *A. glabrata*, *A. hypogaea*, *A. monticola*, *A. nitida* e *A. pseudovillosa* são tetraplóides com $2n=4x=40$ (KRAPOVICKAS e RIGONI,

1957; GREGORY et al., 1973; FERNADEZ e KRAPOVICKAS, 1994; PEÑALOZA et al., 2001). O estudo cariotípico detalhado, muitas vezes, proporciona marcadores citológicos que quando relacionados a determinados aspectos agronômicos poderão ser úteis na caracterização de espécies e variedades agronômicas, bem como na condução de experimentos visando a geração de progênies férteis.

Os programas de melhoramento genético de *Arachis* têm por objetivo principal a introdução de novas variedades e aumento da variabilidade genética via cruzamentos, para obtenção de caracteres agronômicos importantes (SANTOS et al., 2005). Nesse contexto, além da análise cariotípica, os marcadores moleculares também podem ser utilizados para a caracterização e análise da diversidade genética. Marcadores moleculares são abundantes nos genomas das plantas comportando-se como ferramentas rápidas e eficazes para o estudo dos diferentes genomas, uma vez que detectam polimorfismos diretamente ao nível do DNA, não sofrendo influência ambiental e nem dependendo do estágio de desenvolvimento da planta (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Dentre as diversas classes de marcadores destaca-se o SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*) ou polimorfismo de base única o qual representa uma fonte abundante de variação genética mesmo entre alelos de um mesmo gene. Esse marcador baseia-se na análise de seqüências de DNA e na detecção de substituições de base, bem como de pequenos eventos de inserções ou deleções (Indels) surgidos ao longo de uma cadeia de DNA durante a replicação. Dentro da seqüência de DNA codificada, um SNP pode modificar a codificação protéica como conseqüência da alteração da seqüência dos aminoácidos (SHEN et al., 2005). Devido à alta frequência de ocorrência nos genomas, os SNPs são uma rica fonte de variabilidade que podem ser utilizados para construção de mapas genéticos (ALVES, 2008). O presente trabalho realizou a caracterização citogenética de quatro espécies da seção *Heteranthae*, pelo uso da técnica convencional e de fluorescência e, molecular da espécie *Arachis hypogaea* (acessos 'BR1' e 'LVIPE-06'), pelo uso da técnica de SNPs, todas as espécies pertencentes à seção *Arachis*. Com esta ação, pretendeu-se ampliar a base de conhecimento genético sobre o gênero através dos dados citogenéticos e moleculares, como a apresentação de um painel de

digestão para geração de polimorfismo, bem como contribuir para a conservação dos recursos genéticos, principalmente de espécies nativas, e para interação com melhoristas, gerentes de bancos genéticos, fomentando um projeto interdisciplinar. Adicionalmente, realizaram-se experimentos com hibridização *in situ* apenas nas espécies de *Heterantheae*.

Capítulo I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Características Taxonômicas e Reprodutivas

Segundo Cronquist (1988), o gênero *Arachis* pertence à ordem Fabales, família Fabaceae, subfamília *Papilionoideae*, tribo *Aeschynomeneae* e subtribo *Stylosanthinae*.

O gênero *Arachis* está dividido em nove seções taxonômicas *Arachis*, *Caulorrhizae*, *Extranervosae*, *Erectoides*, *Heteranthae*, *Procumbentes*, *Rhizomatosae*, *Trierectoides* e *Triseminatae* organizadas de acordo, principalmente, com aspectos morfológicos, reprodutivos, filogenéticos e com o número e a morfologia cromossômica de suas espécies (FERNÁNDEZ e KRAPOVICKAS, 1994; VALLS e SIMPSON, 1997).

O gênero *Arachis* possui cerca de 80 espécies sendo *Arachis hypogaea* L. uma espécie cultivada, pertencente à seção *Arachis* que compreende duas subespécies: *hypogaea* e *fastigiata*. Por sua vez, a subespécie *hypogaea* possui duas variedades botânicas *hypogaea* e *hirsuta*, enquanto as variedades *fastigiata*, *peruviana*, *aequatoriana* e *vulgaris* pertencem à subespécie *fastigiata* (KRAPOVICKAS e GREGORY, 1994).

As espécies do gênero compreendem espécies anuais ou perenes de hábito de crescimento rasteiro, ereto, arbustivo, ou ainda rizomatoso ou estolonífero. O sistema radicular é pivotante, com ramificações. As folhas são quadrifolioladas ou raramente trifolioladas, com estípulas parcialmente soldadas ao pecíolo. As flores são sésseis, com corola amarela ou alaranjada e os frutos são subterrâneos, contêm de um a cinco sementes, podendo apresentar-se separado por um istmo. As sementes são lisas, com tegumento rosado pálido (espécies silvestres) ou podem variar do vermelho ao preto principalmente nas espécies cultivadas (JOLY, 1979; KRAPOVICKAS e GREGORY, 1994).

A morfologia da flor é típica das leguminosas, 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. Suas flores são hermafroditas, apresentam uma corola papilionada, com um estandarte (pétala grande), duas pétalas menores, conhecidas como asas, e envoltas por uma quilha (pétala modificada), envolvendo a porção apical do estilete, o estigma e os estames (SANTOS e GODOY, 1999). Isto permite que a planta seja autógama (autopolinização), podendo ter cruzamentos naturais (alogamia), porém em pequena escala. Os insetos são os principais agentes polinizadores, quando ocorrem esses tipos de cruzamentos (OLIVEIRA e VALLS, 2003; SANTOS et al., 2005).

Espécies de *Arachis* têm como característica a presença de ginóforo (peg) dotado de geotropismo positivo o que leva a formação dos frutos sob o solo. O tamanho do “peg” está sob efeito genético e ambiental (SANTOS e GODOY, 1999; SANTOS et al., 2005).

2.2. Distribuição Geográfica

O gênero *Arachis* L. é originário da América do Sul, principalmente do Brasil (Estado do Mato Grosso do Sul) e do Paraguai (GREGORY et al., 1980). As espécies ocorrem naturalmente no Brasil, Paraguai, Bolívia, Argentina e Uruguai (VALLS e SIMPSON, 1994). De acordo com Valls e Simpson (2005), mais de 60 espécies ocorrem no Brasil, destas, 48 são exclusivas do território brasileiro. Acredita-se que a Serra do Amambáí, limite do Mato Grosso do Sul com o Paraguai constitui-se no centro de origem do gênero *Arachis*, visto que nessa região encontra-se *A. guaranítica*, provavelmente a espécie mais primitiva do gênero. Diversas coleções de germoplasma de amendoins silvestres e cultivados foram analisadas, confirmando definitivamente a América do Sul como seu centro de origem (WYNNE e HAIWARD, 1989; HAMMONS, 1994; VALLS e SIMPSON, 2005).

2.3. Importância Econômica

O amendoim comercial (*Arachis hypogaea* L.) é amplamente cultivado nas regiões tropicais e subtropicais principalmente nos países com clima semi-árido (SINGH e SINGH, 1992). Constitui-se na sexta oleaginosa mais cultivada

no mundo, sendo superada apenas pela soja, dendê, algodão, coco e colza (FAO 2008). O amendoim possui em torno de 45-50% de óleos essenciais contendo ácidos graxos insaturados (ácidos oléicos e linoléicos). Os grãos também são ricos em proteínas de ótima qualidade, em torno de 20-25%, vitaminas do complexo B, além de carboidratos, fibras, vitamina E, ácido fólico e minerais como cálcio, fósforo, magnésio, zinco, ferro e potássio (GODOY et al., 1999; CONAB, 2008).

O impacto econômico da cultura do amendoim deve-se, principalmente, à grande diversidade de formas de consumo indireto como óleo comestível, doces, pastas ou para consumo in natura na forma de sementes cruas ou cozidas, podendo também gerar subprodutos industriais, como torta ou farelo utilizado na alimentação animal (FÁVERO, 2004).

As espécies das demais seções do gênero *Arachis*, entre elas as da seção *Heterantheae*, são de grande importância na alimentação animal, como plantas forrageiras servindo de fonte de proteínas ou ainda sendo utilizadas como plantas ornamentais. Da seção *Caulorrhizae*, destaca-se a espécie *A. pintoii*, utilizada na cobertura de solos na construção de jardins, para o controle da erosão, recuperação de solos degradados e controle de ervas daninhas (OTERO, 1941; KERRIDGE E HANDY, 1994).

2.4. Seção *Heterantheae* Krapov. e W.C. Gregory

A seção *Heteranthea* é composta por seis espécies (*Arachis dardani*, *A. giacomettii*, *A. interrupta*, *A. pusilla*, *A. seridoensis* e *A. sylvestris*), todas contêm o número cromossômico $2n=20$. As plantas são herbáceas, endêmicas do Brasil, ocorrendo na região Nordeste e nos Estados de Goiás e Minas Gerais (KRAPOVICKAS e GREGORY, 1994; VALLS, 1996), [Fig.1]. São anuais e de ciclo reprodutivo curto. Apresentam raízes axonomorfas com ramificações delgadas, eixo central ereto, folhas quadrifolioladas, flores dimórficas e pequenas distribuídas em todo o ramo lateral, com corola amarela ou alaranjada. Os frutos são subterrâneos, segmentados por istmos e pouco profundos (uniseminados) (KRAPOVICKAS e GREGORY, 1994). A maioria das espécies possui potencial para uso forrageiro (PEÑALOZA, 2004).



Fig. 1. Distribuição geográfica da seção *Heteranthea* adaptado de Krapovickas e Gregory (1994).

2.5. Melhoramento Genético

A caracterização genética de diferentes acessos em coleções de germoplasmas constitui-se em importante fonte de dados para melhoristas e conservacionistas, uma vez que permite um melhor gerenciamento do “*pool*” gênico, bem como uma seleção mais eficiente dos recursos genéticos, facilitando a detecção da real variabilidade genética para fins de melhoramento convencional ou com fins biotecnológicos, bem como de conservação (BENKO-ISEPPON, 2001).

O programa de melhoramento genético de *Arachis* visa à introdução de novas variedades ou a criação de variabilidade via cruzamento e seleção a partir de caracteres agronômicos importantes, que levem ao melhor desempenho da planta tanto no aspecto produtivo como nutricional. Entre os caracteres principais, destacam-se produtividade, precocidade, hábito de crescimento e resistência ou tolerância a fatores bióticos e abióticos (SANTOS et al., 2005). As espécies silvestres e as variedades botânicas do gênero *Arachis* vêm sendo introduzidas em programas de melhoramento do amendoim, por representarem importante fonte de genes úteis para processos

de introgressão, ampliando a base genética do amendoim cultivado (SIMPSON, 2001).

A diversidade genética intra-específica é essencial nos programas de melhoramento, sendo útil na caracterização individual dos acessos e cultivares, além de servir de guia na escolha de programas de cruzamento (LOARCE et al., 1996). Espécies silvestres ou nativas podem possuir características importantes a serem incorporadas em espécies cultivadas. Na prática, o melhoramento das espécies de *Arachis*, por exemplo, ainda é limitado devido, principalmente, a diferenças no nível de ploidia entre espécies nativas e cultivadas (FERNANDÉZ e KRAPOVICKAS, 1994; LAVIA, 1998).

2.6. Estudos Citogenéticos em *Arachis*

A utilização de técnicas citogenéticas, convencional e de bandeamento cromossômico, em espécies vegetais tem fornecido informações importantes ao melhoramento genético de alguns grupos de plantas através da localização física de marcadores cromossômicos (RAINA e MUKAI, 1999, a, b).

O número e a morfologia dos cromossomos em espécies do gênero *Arachis* foram inicialmente estudados por Husted (1933, 1936), o qual determinou o número $2n=2x=20$ para espécies diplóides de *Arachis* e para o amendoim cultivado, *Arachis hypogaea*, $2n=4x=40$, considerado um tetraplóide de origem natural. Este mesmo autor observou que o complemento cromossômico apresentou forte simetria, com exceção de dois pares que puderam ser diferenciados. O primeiro par por apresentar uma constrição secundária, simbolizado pela sigla "SAT" (satelitado). O outro par apresentou-se acentuadamente menos corado em pró-metáfase, além de possuir um tamanho bem menor que os demais, sendo descrito como "par A". Nos cromossomos satelitados, um dos braços está dividido formando um pequeno segmento proximal e outro distal (satélite) em relação ao centrômero (Fig. 2). Segundo Fernández e Krapovickas (1994), existem parâmetros fundamentais para a caracterização citogenética das diferentes espécies do gênero *Arachis*, como a presença ou ausência dos cromossomos do tipo "A", os diferentes tipos de satélites (Tab.1), além da seção a qual a espécie está inserida.

Até a década de 90, era considerado que todas as espécies analisadas possuíam $2n=2x=20$ ou $2n=4x=40$ cromossomos. Diplóides representam a maioria das espécies do gênero, contudo oito espécies, entre elas, *Arachis palustris* (seção *Arachis*), apresentam $2n=2x=18$ e apenas *A. hypogaea* e *A. monticola* (seção *Arachis*), assim como *A. glabrata* e *A. pseudovillosa* (seção *Rhizomatosae*) são tetraplóides ($2n=4x=40$) (LAVIA, 1998; PEÑALOZA e VALLS, 2005). Todas as espécies do gênero estudadas até hoje apresentam um par de cromossomos “SAT”, exceto a espécie *A. valida* (seção *Arachis*) que apresenta dois pares satelitados (FERNANDÉZ e KRAPOVICKAS, 1994).

Três genomas diferentes foram então, descritos para o gênero devido a esses estudos citogenéticos. O genoma “A”, apresenta um par cromossômico com coloração diferenciada e de tamanho reduzido em relação aos demais. Este genoma é representado pela maioria das espécies diplóides. Na ausência desse par cromossômico, as espécies são consideradas genoma “B”, sendo representadas por poucas espécies anuais, como por exemplo, *A. ipaënsis* e *A. magna*. O genoma “D” é representado pela espécie *A. glandulifera*, com seis pares de cromossomos do tipo acrocêntrico, ou seja, com os braços bastante contrastantes em relação ao tamanho. (MILLA et al., 2005; SEIJO et al., 2004). Assim, *A. hypogaea* é considerado um alotetraplóide com $2n=4x=40$ e genoma AABB. De acordo com estudos citogenéticos e taxonômicos o amendoim cultivado é, provavelmente, produto de um processo de domesticação a partir da espécie silvestre, *A. monticola* ($2n=4x=40$) que possui o genoma “AABB”, e que, por sua vez, surgiu a partir do cruzamento entre duas espécies diplóides silvestres com $2n=2x=20$ da seção *Arachis*, uma com genoma “AA” e outra com genoma “BB” (KRAPOVICKAS e GREGORY, 1994; SINGH, 1994).

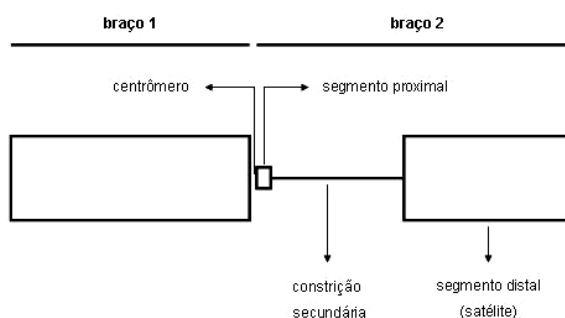


Fig. 2. Morfologia do cromossomo satelitado (SAT) de espécies do gênero *Arachis*, evidenciando o braço menor (1) e braço maior (2), segundo Fernández e Krapovickas (1994).


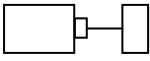
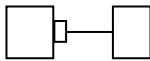
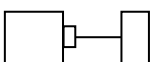
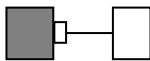
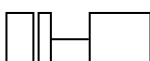

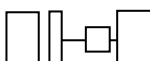
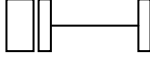
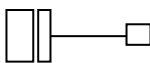

Tipo de Satélite	Cromossomo	Descrição dos tipos de satélites	Seções
1		Menor que o braço 1 e maior que o segmento proximal	<i>Extranervosae</i>
2		Menor que o braço 1 e muito maior que o segmento proximal (0,2 µm)	<i>Caulorrhizae;</i> <i>Heteranthae (A. pusilla e dardani);</i> <i>Erectoides;</i> <i>Extranervosae;</i> <i>Trierectoides.</i>
3		Aproximadamente igual ao tamanho do braço 1 e o segmento proximal mede 0,2 µm	<i>Erectoides; Extranervosa;</i> <i>Arachis; Caulorrhizae;</i> <i>Rhizomatosae.</i>
3		Satélite menor que o braço 1	<i>Erectoides; Extranervosa;</i> <i>Arachis; Caulorrhizae;</i> <i>Rhizomatosae.</i>
4		Semelhante ao tipo três, contudo o braço 1 apresenta heteropicnose negativa em prometáfase e metáfase	<i>Erectoides</i>
5		Aproximadamente do tamanho do braço 1 mais o segmento proximal, sendo que este último é menor.	<i>Arachis</i>
6		Maior que o braço 1, sendo este maior que o segmento proximal	<i>Arachis</i>
7		Satélite duplo, sendo estes do tamanho do braço 1 mais o segmento proximal.	<i>Arachis</i>
8		Possui metade do tamanho do braço 1. Segmento proximal menor que braço 1.	<i>Arachis</i>
9		Satélite puntiforme, igual ou menor que o segmento proximal. Braço 1 maior que o segmento proximal.	<i>Arachis, Procumbentes</i>
10		Satélite puntiforme, menor que o SAT tipo 9. Braço 1 tem tamanho semelhante ao segmento proximal.	<i>Heteranthae (A. giacomettii e A. sylvetris)</i>

Tabela 1. Descrição e distribuição dos tipos de satélites (SAT) ao longo das seções taxonômicas do gênero *Arachis*, adaptado de Fernadéz e Krapovickas (1994).

2.6.1. Técnicas citogenéticas e sua utilização

Diferentes espécies importantes economicamente já tiveram seu cariótipo estudado citogeneticamente, incluindo seu número cromossômico, tamanho, morfologia, comportamento meiótico e conteúdo de DNA (Husted,

1936; STUESSY, 1990). O número cromossômico é o parâmetro citogenético mais utilizado do qual se dispõe de um maior número de informações (STUESSY, 1990). A técnica mais simples e mais utilizada é a coloração convencional que utiliza o Giemsa, Feulgen, hematoxilina, carmim e a orceína acética. Estes corantes coram todo o complemento cromossômico servindo para comparar o número cromossômico dentro e entre espécies, reconhecer a morfologia cromossômica, determinar o nível de ploidia, etc. Melo (2009) detectou variação no tamanho, número cromossômico e no nível de ploidia em espécies do gênero *Solanum* pelo uso da coloração convencional. Igualmente, Melo (2002) observou variação no número cromossômico em espécies de *Passiflora* de $2n=12-72$ confirmando a presença de poliplóides e do número básico $x=6$ para o gênero.

Embora a técnica convencional seja importante ferramenta no estudo dos cariótipos, a introdução de técnicas de coloração diferencial ou de bandeamento tem permitido uma caracterização cariotípica mais detalhada, principalmente nos casos de espécies com cariótipos desfavoráveis. Alguns corantes possuem propriedades fluorescentes apresentando especificidade a determinadas seqüências de base nos ácidos nucléicos. Podem ser encontrados fluorocromos com afinidade pelas bases adenina e timina (AT), como é o caso do DAPI e Hoechst 33258. Já entre os que coram as regiões ricas em guanina e citosina (GC), destacam-se o CMA_3 e a mitramicina. O DAPI e o CMA_3 são os mais empregados no estudo de cromossomos de plantas (SUMNER, 2003; KIM et al., 2002).

Análises com os fluorocromos DAPI e CMA_3 foram realizadas em espécies de *Citrus* por Carvalho et al. (2005). Essas espécies foram caracterizadas e diferenciadas através da quantidade de heterocromatina CG ou AT positiva e a heterozigosidade cromossômica observada pelo padrão de bandas. Tais informações forneceram uma melhor caracterização cromossômica, ampliando a base de conhecimento genético a ser empregados em estudos citotaxonômicos e de melhoramento genético de *Citrus*. No gênero *Solanum* a distribuição da heterocromatina constitutiva foi analisada com esses fluorocromos base-específicos em nove espécies, além de oito cultivares de *Solanum lycopersicon*. A maior fração de heterocromatina estava associada à região organizadora de nucléolos (RON), ocorrendo pequenas variações no

número e na localização destas bandas (BRASILEIRO-VIDAL, et al., 2009). Outra técnica citogenética que utiliza corantes fluorescentes é a hibridização *in situ* (FISH – Fluorescent *in situ* hybridization). Esta técnica possibilita detectar seqüências específicas de ácidos nucleicos DNA ou RNA diretamente sobre os cromossomos, organelas ou em tecidos provenientes de cortes anatômicos (LEITCH et al. 1994). Devido a sua alta sensibilidade e especificidade, o uso de FISH tem sido útil para uma visualização precisa dos sítios de DNA ribossomais, seqüências de telômeros, centrômeros, detecção de translocações, trissomias, fusões cromossômicas, etc.

O nível de ploidia das espécies do gênero *Passiflora*, bem como as relações filogenéticas foram estudados mediante a utilização de sondas de DNAr 45S e 5S. O número e a localização dos sítios de DNAr 45S foram representativos para inferir que o número diplóide $2n=12$ representa o provável genoma ancestral do gênero e que as demais espécies apresentam números diplóides (MELO e GUERRA, 2003). A análise citogenética realizada em diversas espécies de *Citrus* demonstrou que a maioria das espécies estudadas são híbridos interespecíficos com pelo menos um par cromossômico heteromórfico em seus cariótipos. Por outro lado, a espécie *C. medica*, foi considerada uma das prováveis espécies ancestrais do gênero por apresentar homomorfismo cromossômico em todo seu cariótipo (CARVALHO et al., 2005). Os dados obtidos pelos autores auxiliaram também na discussão sobre questões filogenéticas do grupo. A caracterização cariotípica em duas espécies do gênero *Cestrus* (Solanaceae) revelou divergências quanto ao número e posição dos sítios de DNAr entre as espécies *Cestrum amictum* e *Cestrum intermedium* (FREGONEZI et al. 2006).

2.7. Marcadores Moleculares

Os marcadores moleculares são bastante utilizados em estudos genéticos, uma vez que não sofrem influências ambientais, independem do estado de desenvolvimento do organismo e do tecido analisado, revelando diretamente os polimorfismos de seqüências de DNA (OLIVEIRA et al., 2007).

Diferentes tipos de marcadores são utilizados em programas de melhoramento de plantas, diferenciando-se entre si quanto ao custo de

aplicação, facilidade de uso e consistência dos resultados (BORÉM e CAIXETA, 2006). Dentre os marcadores moleculares amplamente utilizados em estudos genéticos de plantas, pode-se destacar o RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), SSR (*Simple Sequence Repeat*), ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), SCARs (*Sequence Characterized Amplified Regions*), e SNPs (*Single Nucleotides Polymorphisms*), isoenzimas entre outros (WILLIAMS et al., 1990; CAETANO-ANOLLÉS et al., 1991; MICHELMORE, 1993; PARAN; ZABEAU, 1993; KANAZIN et al., 1996; HOWARD et al., 1999; ZÁRATER et al., 2005).

O marcador RAPD conhecido como randômico ou arbitrário é um marcador baseado em reação de PCR não necessitando o conhecimento prévio do genoma. Este marcador possui característica de marcador dominante e baixo custo (FERREIRA e GRATTAPLAGIA, 1998).

Através da técnica de RFLP podem-se detectar as variações em nível de nucleotídeos devido à mutação, deleção, inversão e inserção, podendo-se detectar polimorfismos se ocorrem em um sítio de corte específico das enzimas de restrição (LANDER et al., 1987). Tem como vantagem uma ampla distribuição no genoma, possibilitando uma ampla cobertura, com isso proporciona a construção de densos mapas genéticos de ligação, além de ser co-dominante (NODARI et al., 1993).

O marcador AFLP tem como característica a capacidade de revelar simultaneamente muitas regiões diferentes distribuídas aleatoriamente ao longo do genoma (MUELLER e WOLFENBARGER, 1999). A análise do AFLP é baseada na amplificação seletiva via PCR de um subconjunto de fragmentos genômicos, produtos de digestão enzimática com enzima de corte raro e de corte freqüente. Com isso, tem-se uma grande vantagem de gerar um alto número de fragmentos simultâneos, aumentando a detecção da variabilidade genética, auxiliando no estudo de diversidade genética (LOH et al., 2000).

Os ISSR têm como base os marcadores microssatélites ou SSR que são pequenas sequências de DNA de um a seis nucleotídeos repetidas em *tandem* e baseiam-se em reações de PCR, onde amplificam as regiões entre os microssatélites (GUPTA e VARSHNEY, 2000). Essas sequências são muito variáveis e de grande quantidade no genoma. Os microssatélites são co-

dominantes e revelam, com elevada segurança, o nível de polimorfismo. Contudo, tem que haver um conhecimento prévio do genoma (LIU e WENDEL, 2001). Em contrapartida, os marcadores ISSR são dominantes, não é necessário o conhecimento prévio do genoma, é menos específico quando comparado ao microssatélite e são reproduzíveis com a vantagem de gerar grandes quantidades de bandas, sendo abundantes ao longo do genoma (GUPTA et al., 1994).

O marcador SNP é baseado no polimorfismo de base única e tem sido considerado um marcador de grande potencial (HAYASHI, 2004). Esse marcador é baseado na detecção de erros de pareamentos entre bases ou em deleções ou inserções ao longo do DNA durante o processo de replicação. GUPTA et al. (2001) relataram a frequência de cerca de 1 SNP a cada 100-300 pb no genoma de plantas. Os SNPs são o tipo mais frequente na variação no genoma de muitos organismos (BROOKES, 1999). Na maioria, o polimorfismo de base única é mais frequente nas regiões não codificantes do genoma. Dentro da sequência de DNA codificada, um SNP pode modificar a codificação protéica devido à alteração na sequência dos aminoácidos (SHEN et al., 2005). Entretanto, para uma variação ser considerada um SNP, ela precisa ocorrer em no mínimo, 1% dos indivíduos da população. Existem dois tipos de substituição de base resultando em SNPs: a transição, que é o tipo mais comum e ocorre quando a substituição se dá entre purinas (A, G) ou entre pirimidinas (C, T), a transversão, que ocorre entre purinas e pirimidinas (A, C ou G, T). A transição constitui dois terços de todos os SNPs e dois de cada três SNPs envolve a substituição de citosina (C) por timina (T) (SMITH, 2002).

O SNP apresenta vantagens sobre outros tipos de marcadores devido a abundância de polimorfismos entre alelos de um determinado gene. Devido à alta frequência de ocorrência nos genomas, os SNPs são uma rica fonte de variabilidade que podem ser utilizados para construção de mapas genéticos (ALVES, 2008). Em plantas de milho, Bhatramakki et al. (2000) revelaram a ocorrência de um polimorfismo a cada 70 pares de bases em média, com 60% do tipo transição e 40% do tipo transversão. Uma Indels a cada 160pb também foram observados. Em humanos, por exemplo, a ocorrência média é de um a cada 1000 nucleotídeos (PENNISI, 1998; COLLINS et al., 1999). Melloto e Kelly (2001) estudaram o polimorfismo nas sequências de DNA de população

segregantes de feijão para diferenciar alelos de um gene de resistência a antracnose conferida pelo gene COK-4. Os SNPs encontrados foram bastante eficientes e co-segregaram com o fenótipo resistente e mostraram-se ligados a três alelos diferentes no loco.

3. REFERÊNCIAS

ALVES, D. M. T. **Uso de marcadores SNPs em *Arachis* para mapeamento de genes candidatos e análise de sintenia genômica.** 2008. 81 p. Dissertação (Mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia), Universidade Católica de Brasília, Brasília.

BENKO-ISEPPON, A. M. Estudos moleculares e citogenéticos no caupi e em espécies relacionadas: Avanços e perspectivas. **EMBRAPA Documentos 56.** p.327-332, 2001.

BHATTRAMAKKI, D., J. DONG, K. CHHABRA e G. E. HART, An integrated SSR and RFLP linkage map of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. **Genome**, v.43, p.988–1002, 2000.

BOREM, A.; CAIXETA, E. **Marcadores Moleculares.** Viçosa, UFV. 2006. 374p.

BRASILEIRO-VIDAL, A. C.; OLIVEIRA, M. B. M ; CARVALHEIRA, G. ; GUERRA, M. Different chromatin fractions of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and related species. **Micron**, v. 40, p. 851-859, 2009.

BROOKES, A. J. The essence of SNPs. **Gene**, v. 243, n.2, p. 177-186, 1999.

CAETANO-ANOLLÉS, G.; BASSAM, B. J.; GRESSHOFF, P. M. DNA amplification fingerprinting: a strategy for genome analysis. **Plant Molecular Biology**, v. 9, p. 292-305,1991.

CARVALHO, R.; SOARES, W. S.; BRASILEIRO-VIDAL, A. C.; GUERRA, M. The relationships among lemons, limes and citron: a chromosomal comparison. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 109, n. 1-3, p. 276-282, 2005.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: < www.conab.gov.br > acessado em 23 de setembro de 2009 às 15:00hs.

CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. 2ed. Bronx, USA, The New York Botanical Garden, 1988. 555 p.

FÁVERO, A. P. **Cruzabilidade entre espécies silvestres de *Arachis* visando a introgressão de resistência a doenças no amendoim cultivado**. 2004, 165 f. Tese (doutorado em Agronomia – Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas). ESALQ, São Paulo.

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.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **FAOSTAT**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>>. Acesso em: 29 de setembro de 2009.

FREGONEZI, J. N.; FERNAMDES, T.; TOREZAN, J. M. D.; VIEIRA, A. O. S.; VANZELA, A. L. L. Karyotype differential of four *Cestrum* species (Solanaceae) based on the physical mapping of repetitive DNA. **Genetic and molecular biology**. v. 29, n. 1, p. 97-104, 2006.

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

GREGORY, W. C.; KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, M. P. Structure variation and classification of *Arachis*. In: SUMMERFIELD, R. J.; BUNTING, A. H. (eds.).

Advances in Legume Science. Surrey, England: Royal Botanical Garden, p. 468-481. 1973.

GREGORY, W. C.; GREGORY, M. P.; KRAPOVICKAS, A.; SMITH, B. W.; YARBROUGH, J. A. Structures and genetic resources of peanuts. In: **PEANUTS:** culture and uses. Sillwater, Okla: American Peanut Research Association, p. 47-134. 1980.

GUPTA, M.; CHYI, Y. S.; ROMERO-SEVERSON, J.; OWEN, J. L. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 89, p. 998-1006, 1994.

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

GUPTA, P. K.; ROY, J. K.; PRASAD, M. Single nucleotide polymorphisms: A new paradigm for molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants. **Current Science**. v. 80, n.4, p. 4524-535, 2001.

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

HAYASHI, K. et al. Development off PCR- based SNP markers for rice blast resistance genes at Piz locus. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 108, n. 7, p. 1212- 1220, 2004.

HOWARD, T. D.; BLEECKER, E. R.; STINE, C. O. Fluorescent allele-specific PCR (FASPCR) improves the reliability of single nucleotide polymorphism screening. **Biotechnology**, v.26, p. 80-381, 1999.

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

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

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. 5 ed. Companhia Editora Nacional: São Paulo-SP, 1979. p. 371-382.

KANAZIN, V.; MAREK, L. F.; SHOEMAKER, R. C. Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 93, p. 11746-11750, 1996.

KERRIDGE, P. C.; HANDY, B. **Biology and Agronomy of Forage *Arachis***. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1994, p. 1-18.

KIM, E. S.; PUNINA, E.O; RODIONOV, A. V. Chromosome CPD (PI/DAPI)- and CMA/DAPI-banding patterns in *Allium cepa* L. **Russian Journal of Genetics**, v. 38, n. 4, p. 392-398, 2002.

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

KRAPOVICKAS, A. e RIGONI, V. A. Nuevas espécies de *Arachis* vinculadas al problema Del origen Del mani. **Darwiniana**, B. Aires, v.11, p.433-455, 1957.

LANDER, E.S., GREEN, P., ABRAHAMSON, L., BARLOW, A., DALY, M.J., LINCOLN, S.E. AND NEWBURG, S.E. Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. **Genomics**. v. 1, p. 174-181, 1987.

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. Karyotypes of *Arachis palustris* and *A. praecox* (Section *Arachis*), two species with basic chromosome number x 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.

LEITCH, A. R.; SCHWARZACHER, T.; JACKSON D.; LEITCH I. J. **In situ hybridization: a practical guide**. p. 1-3, 1994.

LIU, B.; WENDEL, J. F. Retroelement activation followed by rapid repression in interspecific hybrid plants. **Genome**. v. 43, p. 874-880, 2001.

LOARCE, Y.; GALLEGRO, R.; FERRER, E. A comparative analysis of the genetic relationship between rye cultivars using RFLP and RAPD markers. **Euphytica**. v. 88, n. 2, p. 107-115, 1996.

LOH, J. P.; KIEW, R.; HAY, A.; KE, A.; GAN, Y. Y. Intergeneric and interspecific relationships in Araceae tribe Caladieae and development of molecular markers using amplified fragment length polymorphism (AFLP). **Annals of Botany** . v. 85, p. 371-378, 2000.

MELO, N. F. **Caracterização citogenética de espécies silvestres e cultivadas de maracujazeiro (*Passiflora* spp.)**. Tese de doutorado, UFPE, Recife, 2002.

MELO, C.A.F. **Estudo citogenético e molecular em nove espécies do gênero *Solanum***. Dissertação de Mestrado, UFRPE, Recife, 2009.

MELO, N. F.; GUERRA, M. Variability of the 5S and 45S rDNA sites in *Passiflora* L. species with distinct base chromosome numbers. **Annals of Botany**, v. 92, p. 309-316, 2003.

MELLOTO, M; KELLY, J.D. Fine mapping of the Co-4 locus of common bean reveals a resistance gene candidate, COK-4, that encodes for a protein kinase. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 103, p.508-517, 2001.

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.

MUELLER, U. G.; WOLFENBARGER, L.L. AFLP genotyping and fingerprinting. **Trends in Ecology and Evolution**. v. 14, p. 389-394. 1999.

NODARI, R. O.; TSAI, S. M.; GILBERTSON, R. L.; GEPTS, P. Towards an integrated linkage map of common bean. II. Development of an RFLP- based linkage map. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 85, p. 513-520. 1993.

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, A. C. B.; CAIXETA. E. T.; ZAMBOLIM, E. M.; ZAMBOLIM, L.; SAKIYAMA, N. S. Aplicação técnica de marcadores moleculares no melhoramento de plantas. **Documentos IAC**, v. 81, Campinas: Instituto Agronômico, 2007, 17p.

OTERO, J. R. Notas de uma viagem aos campos do sul do Mato Grosso. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, 1941.

PARAN, I.; MICHELMORE, R. W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 85, n. 8, p. 985-993, 1993.

PEÑALOZA, A. P. S. **Avanços da citogenética do gênero *Arachis* no Brasil.** (Apresentação de Trabalhos/Conferencia ou palestras), 2004.

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.

PEÑALOZA, A.D.P.S.; VALLS, J.F.M. Contagem do número cromossômico em acessos de *Arachis decora* (Leguminosae). In: VEIGA, R.F.A; BOVI, M.L.A; BETTI, J.A.; VOLTAN, R.B.Q. (Eds.) SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS, 1., 1997, Campinas. **Programas e Resumos...** Campinas: IAC/Embrapa-Cenargen, 1997. p.39.

PEÑALOZA, A. P. S.; VALLS, J. F. M. ; GUERRA, M. . Caracterização citogenética das espécies brasileiras de *Arachis* (Leguminosae). In: III Simpósio de Recursos Genéticos para a América Latina e o Caribe, 2001, Londrina. **Anais**, 2001. p. 87-89.

PENNISI, E. How the genome readies itself for evolution. **Science** v.281, p.1131-1134, 1998.

RAINA, S. N.; MUKAI, Y. Detection of a variable number of 18S - 5.8S and 5S ribosomal DNA loci by fluorescent *in situ* hybridization in diploid and tetraploid *Arachis* species. **Genome**, v. 42, p. 552-59, 1999a.

RAINA, S. N.; MUKAI, Y. Genomic *in situ* hybridization in *Arachis* (*Fabaceae*) identifies the diploid wild progenitors of cultivated (*A. hypogaea*) and related wild (*A. monticola*) peanut species. **Plant Systematics and Evolucion**, v. 214, p. 251-262, 1999b

SANTOS, R. C.; GODOY, I. J. Hibridização em amendoim. In: BORÉM, A. (ed.). **Hibridização artificial em plantas**, Viçosa: UFV, 1999, p. 83-100.

SANTOS, R. C.; GODOY, I. J.; FÁVERO, A. P. Melhoramento do amendoim. In: SANTOS, R. C. (ed.). **O Agronegócio do Amendoim no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2005, p. 123-192.

SEIJO, J. G.; LAVIA, G. I.; FERNANDEZ, A.; KRAPOVICKAS, A.; DUCASSE, D.; e 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**, v. 91, n. 9, p. 1294-1303, 2004.

SHEN, R.; FAN, J-B.; CAMPBELL, D.; CHANG, W.; CHEN, J.; DOUCET, D.; YEAKLEY, J.; BIBIKOVA, M.; WICKHAM, G. E.; MCBRIDE, C.; STEEMERS, F.; GARCIA, F.; KERMANI, B. G.; GUNDERSON, K.; OLIPHANT, A. High-throughput SNP genotyping on universal bead arrays. **Mutation Research**, v. 573, p. 70-82, 2005.

SIMPSON, C. E. Use of wild *Arachis* species/introgression of genes into *a. hypogaea*. **Peanut Science**, v.28, n.2, p.114-116, 2001.

SINGH, U. e SINGH, B. Tropical grain legumes as important human foods. **Economic Botany**, 46: 310-321, 1992.

SINGH, A. K. Groundnut, *Arachis hypogaea* (Leguminosae-Papilionoideae). In: SMARTT, J.; SIMMONDS, N. W. (eds.). **Evolution of Crop Plants**, 2 ed., London, Longman, 1994, cap. 48, p. 246-250.

SMITH, K. **Genetic polymorphism and SNPs: Genotyping, haplotype assembly problem, haplotype map, functional genomics and proteomics.** p.1-13, 2002. http://www.cs.mcgill.ca/~kaleigh/compbio/snp/snp_summary.html.

STUESSY, T. F. 1990. Plant taxonomy – The systematic evolution of comparative data. Columbia University press, New York.

SUMNER, A. T. **Chromosomes: Organization and Function.** Blackwell Publishing Limited, 2003, 304 p.

VALLS, J. F. M.; SIMPSON, C. E. Taxonomy, natural distribution, and attributes of *Arachis*. In: KERRIDGE, P.C.; HARDY, B. Biology and Agronomy of Forage *Arachis*. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, p.1-18, 1994.

VALLS, J. F. M.; SIMPSON, C. E. Novas espécies de *Arachis* (Leguminosae). In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS, 1., 1997, **Anais...** Campinas-SP: Instituto Agronomico/IAC, 1997, p. 27-28.

VALLS, J.F.M; SIMPSON, C.E. New species of *Arachis* L. (Leguminosae) from Brazil, Paraguay and Bolivia. **Bomplandia**, v. 14, n. 1-4, p. 35-63, 2005.

VALLS, J. F. M. O gênero *Arachis* (Leguminosae): Importante fonte de proteínas na Pré-História Sul-Americana? In: REUNIÃO CIENTÍFICA DA SOCIEDADE DE ARQUEOLOGIA BRASILEIRA, 8, 1996, Porto Alegre, RS: Sociedade de Arqueologia Brasileira, **Anais...** 1996, v. 1, p. 265-280.

WILLIAMS, J. G.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, L. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

WYNNE, J. C.; HAIWARD, T. Cytogenetics and genetics of *Arachis*. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 8, n. 3, p. 189-220, 1989.

ZABEAU, M Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Application N° 0534858 A1, 1993.

ZÁRATER, S.; PÉREZ-NASSER, N.; CASAS, A. Genetics of wild and managed populations of *Leucaena esculenta* subsp. *Esculenta* (Fabaceae; Mimosoideae) in La Montaña of Guerrero, Mexico. **Genetic Resources and Crop Evolution**. v.52, p. 941-957, 2005.

Capítulo II

CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE QUATRO ESPÉCIES DE AMENDOIM NATIVO

CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE QUATRO ESPÉCIES DE AMENDOIM NATIVO

Maria Isabel Gomes Martins¹, Silvokleio da Costa Silva¹, Roseane Cavalcanti dos Santos², Péricles de Albuquerque de Melo Filho³ e Reginaldo de Carvalho¹

¹Laboratório de Genética-Bioquímica e Sequenciamento de DNA, Depto. de Biologia/Genética, UFRPE, Recife, PE, Brasil.

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

³Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife, PE, Brasil.

Resumo

Técnicas citogenéticas como coloração convencional, bandeamento cromossômico com fluorocromos e FISH foram empregadas para analisar quatro espécies da seção *Heterantheae*: *Arachis pusilla*, *A. giacomettii*, *A. dardani* e *A. sylvestris*. Todos os acessos apresentaram número cromossômico diplóide $2n=20$ com morfologia metacêntrica para a maioria dos cromossomos, e submetacêntrico para alguns. As espécies *A. pusilla* e *A. dardani* apresentaram fórmula cariotípica $18m+2sm$ e satélite tipo 2, enquanto que *A. giacomettii* e *A. sylvestris* possuem $16m+4sm$ e satélite tipo 10. A coloração com fluorocromos CMA e DAPI revelou em *A. pusilla* a maior quantidade de heterocromatina rica em guanina e citosina já registrada na literatura para essa espécie, localizada na posição pericentromérica. Blocos DAPI⁺ foram observados na região proximal principalmente, após a técnica de FISH. *Arachis dardani* apresentou dois grandes blocos subterminais CMA⁺. *A. giacomettii* e *A. sylvestris* apresentaram apenas dois blocos CMA⁺, na região terminal do único par cromossômico satelitado. A técnica de hibridização *in situ* foi utilizada em *Arachis pusilla* e *A. giacomettii*. Em *A. pusilla* foi evidenciado quatro sítios de DNAr 45S na região proximal de dois pares cromossômicos e dois sítios de DNAr 5S intercalar e adjacentes a um dos pares portador do DNA ribossomal. *A. giacomettii*, no entanto, apresentou apenas dois sítios de DNAr 45S na região terminal de um par cromossômico coincidindo com o único par de blocos CMA⁺.

Palavras-chaves: *Arachis*, *Heterantheae*, CMA/DAPI, FISH.

Introdução

O gênero *Arachis* L. é originário da América do Sul, suas espécies distribuem-se desde o Leste dos Andes, Sul da Amazônia, Norte da Planície Platina até o Noroeste da Argentina. Possui 80 espécies, das quais, 64 ocorrem no Brasil, sendo 47 restritas ao território brasileiro (Krapovickas e Gregory, 1994; Valls e Simpson, 2005). O gênero *Arachis* está organizado em nove seções taxonômicas (*Arachis*, *Caulorrhizae*, *Extranervosae*, *Erectoides*, *Heteranthae*, *Procumbentes*, *Rhizomatosae*, *Triectoides* e *Triseminatae*). *Arachis hypogaea* L., seção *Arachis*, o amendoim cultivado, é uma espécie tetraplóide com $2n=4x=40$ e a que melhor representa o gênero em importância econômica sendo a sexta oleaginosa mais cultivada no mundo (FAO, 2008). Suas sementes podem ser consumidas cruas, cozidas ou na forma de doces ou pastas (Santos et al., 1997; Fávero, 2004). As espécies da seção *Heteranthae* são endêmicas do Brasil, ocorrem principalmente na região Nordeste e nos Estados de Goiás e Minas Gerais, são anuais, de ciclo reprodutivo curto e com potencial, principalmente para uso forrageiro. A seção é composta por seis espécies (*Arachis dardani*, *A. giacomettii*, *A. interrupta*, *A. pusilla*, *A. seridoensis* e *A. sylvestris*), todas diplóides com um único número cromossômico $2n=20$ (Fernández e Krapovickas, 1994; Lavia, 1996; Peñaloza e Valls, 2005).

O número e a morfologia dos cromossomos em espécies do gênero *Arachis* foram inicialmente estudadas por Husted (1933; 1936). A maioria dos representantes desse gênero apresenta número cromossômico $2n=2x=20$ (diplóide), com exceção de *A. decora*, *A. palustris*, *A. porphyrcalyx* e *A. praecox* que possuem $2n=2x=18$ (Peñaloza e Valls, 1997; Lavia, 1998; Peñaloza et al., 2001). Apenas as espécies *A. glabrata*, *A. hypogaea*, *A. monticola*, *A. nitida* e *A. pseudovillosa* são tetraplóide, com $2n=4x=40$ (Krapovickas e Rigoni, 1951; Gregory et al., 1973; Fernández e Krapovickas, 1994; Peñaloza et al., 2001).

Dados citogenéticos associados com análises morfológicas têm auxiliado na caracterização de espécies do gênero *Arachis*. Esses estudos têm proporcionado melhor entendimento quanto à potencialidade dos recursos genéticos principalmente em relação às espécies silvestres. Além disso, as espécies silvestres vêm sendo introduzidas nos programas de melhoramento por serem importantes fontes de genes úteis (Simpson et al., 2001), característica essa que parece estar presente nas espécies da seção *Heteranthae*. O melhoramento genético é o principal processo que transforma um

componente da biodiversidade em um novo recurso genético e finalmente em um produto com valor econômico no mercado, gerando renda às populações locais.

O presente trabalho objetivou analisar cariotipicamente quatro espécies de *Arachis* pertencentes à seção *Heteranthes* através da técnica convencional com Giemsa, coloração com fluorocromos cromomicina A₃ (CMA), 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) e hibridização *in situ* (FISH), visando fornecer informações que possam beneficiar e potencializar a utilização dessas espécies em programas de melhoramento genético que utilizam hibridações tradicionais.

Materials e Métodos

Material vegetal

Foram estudados as espécies da seção *Heteranthes*, *A. pusilla* (V13109) e *A. giacomettii* (V15155), *A. dardani* (V15127; V15132) e *A. sylvestris* (V15161) todas obtidas do Banco de Germoplasma de *Arachis* da Embrapa, Recursos Genéticos e Biotecnologia/CENARGEN - Brasília, DF (Tabela 1).

Germinação e pré-tratamento

As sementes foram postas para germinar em papel de filtro e após o surgimento da primeira radícula, cortou-se o ápice radicular para estimular o crescimento de raízes secundárias. As pontas de raízes foram coletadas e pré-tratadas com 2 mM de 8-hidroxiquinoleína (8HQ) durante 24 h a 8 °C, fixadas em etanol-ácido acético (3:1, v/v) por 24 h e estocadas em freezer a -20 °C.

Análise convencional

Para análise convencional, seguiu-se a metodologia descrita por Guerra (1983) com algumas modificações. As raízes foram hidrolisadas em HCl 5N, e maceradas em lâmina de vidro contendo uma gota de ácido acético 45%, o conjunto lâmina-lamínula foi colocado em nitrogênio líquido para fixação das células e remoção posterior da lamínula. As células foram coradas com Giemsa 2% e montadas com Entellan. As células foram documentadas utilizando-se filme Fuji superia Asa 100 em microscópio binocular Bioval com sistema MPS 60 adaptado.

Medição cromossômica

Os cromossomos foram classificados baseados na nomenclatura proposta por Guerra (1986) e Morawetz e Samuel (1988). Os tipos de satélites descritos seguiram a classificação de Fernandez e Krapovickas (1994). As medições cromossômicas foram feitas utilizando o programa computacional Image Tool Versão 3.0.

Coloração com fluorocromos

Para a coloração com fluorocromos as raízes foram digeridas em solução enzimática (2% celulase-20% pectinase) a 37 °C por 1 h em seguida, as lâminas foram preparadas e envelhecidas por três dias, posteriormente foram coradas com cromomicina A₃ (CMA) a 0,5 mg/ml por 30 min e com 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) a 2 µg/ml por 1 h, sendo montadas em glicerol/McIlvaine (1:1, v/v) (Schweizer e Ambros, 1994). As melhores células foram fotografadas em microscópio Leica DMLB, usando o sistema de fotomicroscopia Leica wild MPS 48, utilizando luz UV, e filtros específicos com comprimento de onda de 360-390 nm para DAPI e de 430-470 nm para CMA.

Hibridização *in situ*

A técnica de hibridização *in situ* envolveu a preparação de sonda específica de DNA ribossomal 45S. A sonda foi obtida de *Arabidops thaliana* e marcada com digoxigenina 11-dUTP. As lâminas contendo as preparações citológicas foram tratadas com fixador Carnoy e submetidas a uma série alcoólica. Em seguida foram desnaturadas a 75 °C em solução salina de 2xSSC por 7 min. A desnaturação da sonda ocorreu também a 75 °C durante 10 min. Depois de hibridizadas com a sonda marcada, as lâminas foram transferidas para uma câmara úmida pré-aquecida a 37 °C *overnight*. A detecção da sonda foi feita com dois conjuntos de anticorpos FITC (sheep anti-digoxigenin e rabbit anti-sheep, respectivamente) e as lâminas foram montadas com DAPI (2 µg/mL) / Vectashield (Moraes *et al.*, 2007). Utilizou-se um fotomicroscópio Leica DMRB, equipado com luz ultravioleta e câmera de vídeo DC 300F da Leica para captura das imagens as quais foram processadas no programa Image Manager 5.0.

Resultados e Discussão

Todos os acessos analisados foram diplóides com $2n=2x=20$, cariótipo moderadamente assimétrico e núcleo interfásico arreticulado (Fig.1). A maioria das espécies pertencentes ao gênero *Arachis* são diplóides com $2n=2x=20$ ou com $2n=2x=18$ e somente quatro são tetraplóides ($2n=4x=40$), duas pertencente à seção *Arachis* e duas à seção *Rhizomatosae* (Fernandéz e Krapovickas, 1994; Peñaloza e Valls, 2005). Entre as espécies foram observadas diferenças principalmente em relação ao tipo de satélite e ao número e tamanho dos blocos heterocromáticos. *Arachis pusilla* e *A. dardani* apresentaram fórmula cariotípica com 18 cromossomos metacêntricos e dois submetacêntricos ($18m+2sm$) com comprimento médio do complemento cromossômico igual a $1,58 \mu\text{m}$ e satélite do tipo 2. *Arachis giacomettii* e *A. sylvestris* revelaram um cariótipo com 16 cromossomos metacêntricos e quatro submetacêntricos ($16m+4sm$) e comprimento médio do complemento cromossômico igual a $2,0 \mu\text{m}$ (Tabela 1).

O padrão de condensação cromossômica, observado em prometáfases, foi do tipo proximal, ou seja, início da condensação nas regiões centroméricas e término nos telômeros. Quanto ao tamanho cromossômico, Lavia e Fernandez (2002), analisaram seis seções do gênero e observaram que *Heterantheae* apresentou um dos menores tamanhos de complemento cromossômico e conteúdo de DNA nuclear. Segundo Krapovickas e Gregory (1994), nas espécies mais primitivas são observados maiores conteúdos de DNA. Contudo, Stebbins (1956) relatou a não existência de correlação entre o conteúdo de DNA e evolução e sim correlação entre adaptação ecológica e conteúdo de DNA.

Arachis giacomettii e *A. sylvestris* apresentaram satélites tipo 10, enquanto que os acessos de *A. pusilla* e *A. dardani* possuíram um par de cromossomos satelitado do tipo 2, de acordo com o proposto por Krapovickas e Gregory (1994). Todos acessos analisados apresentaram apenas um par de satélites no braço curto (Fig.1). Os satélites variaram em relação ao tamanho e conseqüentemente aos tipos. Fernandéz e Krapovickas (1994) classificaram os cromossomos satelitados em 10 diferentes tipos, levando em consideração o seu tamanho relativo e a posição em relação ao centrômero. Os satélites do tipo 1 a 8 são considerados “macrossatélites”, enquanto que os do tipo 9 e 10 são considerados “microssatélites”. Satélites do tipo dois e três são considerados os mais primitivos, estando estes presentes na maioria das espécies do gênero. Rearranjos

cromossômicos como translocações ou inversões estariam relacionados à diversidade dos tipos de satélites, sugerindo um modo evolutivo para as espécies deste gênero (Fernandéz e Krapovickas, 1994).

O padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva em *A. giacomettii* e *A. sylvestris* revelou dois blocos CMA positivos (CMA⁺), localizados na região terminal de um par cromossômico (Fig. 2 a,d). *Arachis dardani* apresentou dois grandes blocos CMA⁺ na posição intercalar, do braço curto de um par cromossômico submetacêntrico (Fig.2 c).

O caso mais surpreendente quanto à ocorrência de heterocromatina CMA⁺ ocorreu em *Arachis pusilla* na qual, foi observada a presença de 18 blocos CMA⁺ pericentroméricos em oito pares cromossômicos. Além da presença de um par cromossômico marcador e heteropicnótico e bandas terminais e subterminais (Fig.2 b). Toda espécie portadora deste par cromossômico heteropicnótico é considerada portadora do genoma “A”. O termo “genoma B” foi empregado para os indivíduos que não apresentavam o par de cromossomos “A” (Husted, 1933, 1936). Por outro lado, genoma “D” foi proposto para os representantes da espécie *A. glandulifera* que apresentou seis pares de cromossomos acrocêntricos (Stalker, 1991). Adicionalmente a estas observações, bandas DAPI⁺ proximais também foram visualizadas adjacentes aos blocos CMA⁺ em um menor número de pares cromossômicos na espécie *A. pusilla*. Contudo, esses blocos somente foram visualizados após as células terem passado pela FISH, cujo processo envolve temperaturas elevadas, desnaturação e remoção parcial da cromatina (Fig.2 e).

A técnica de FISH revelou, em *A. pusilla*, quatro sítios de DNAr 45S na posição proximal de dois pares cromossômicos metacêntricos. Além disso, dois sinais DNAr 5S adjacentes a dois sítios 45S foram observados (Fig.2 f). Já a espécie *A. giacomettii*, apresentou dois sinais de hibridização de DNAr 45S na região terminal de um par cromossômico de tamanho médio (Fig.2 g). Estes sinais correspondem ao par cromossômico portador da constrição secundária distendida observada pela coloração com CMA. A porção cromossômica correspondente ao DNAr 5S não foi visualizada, talvez devido ao pequeno tamanho dos satélites ou a problemas durante a execução dos experimentos. Este resultado constitui o primeiro registro citogenético de FISH em representantes da seção *Heterantheae*. A hibridização *in situ* por sua vez, tem mostrado grande importância na citogenética molecular por permitir a detecção de seqüências específicas dentro das células por meio de sondas complementares, e dessa maneira, têm

apresentado vantagens em relação às técnicas de citogenética clássica. Análise de número e morfologia cromossômica, sítios de heterocromatina constitutiva, localização de genes de DNA ribossomais, incrementaram grandemente o entendimento da filogenia das plantas em todos os níveis taxonômicos (Guerra, 2004). As análises cromossômicas foram úteis na diferenciação interespecífica das espécies de amendoim nativo.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq pela concessão da bolsa de pesquisa, à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia por ter cedido o material para realização dos estudos.

Tabela 1. Dados dos acessos, com respectiva fórmula cariotípica (m-metacêntrico; sm-submetacêntrico), tipo de satélite (SAT), comprimento médio do complemento cromossômico (CMC), comprimento médio do maior par cromossômico (C1) e comprimento médio do menor par cromossômico (C2).

Espécie	Coletores	Acesso	BRA	Município	UF	Latitude	Longitude	45	tipo	Sat	CMC (μm)	C1 (μm)	C2 (μm)
						S	W						
<i>A. pusilla</i>	V,Fa,Pz,Sv	V13109	030317	Januária	MG	15 32 33.1	044 24 22.3		18m+2sm	2	1,60+/-0,25	2,08	1,16
<i>A. dardani</i>	V,S,Su	V15127	025585	Pombal	PB	06 42 56.9	037 49 10.7		18m+2sm	2	1,55+/-0,28	2,10	1,06
<i>A. giacomettii</i>	V,Ap,Nu	V15155	040568	Montalvânia	MG	14 21 17.1	044 23 36.3		16m+4sm	10	2,00+/-0,25	2,50	1,62
<i>A. sylvestris</i>	V,Nu	V15161	040576	Porto Nacional	TO	10 42 29.0	048 25 07.1		16m+4sm	10	2,00+/-0,25	2,50	1,62

Coletores: Fa=L.Faraco de Freitas; Nu=A.C.G.S.Nunes; Pz=E.A.Pizarro; S=C.E.Simpson; Su=T.M.F. Suassuna; Sv=G.P.Silva; V=J.F.M.Valls; Ap=A.P.S.Peñaloza; W=W.L.Werneck.

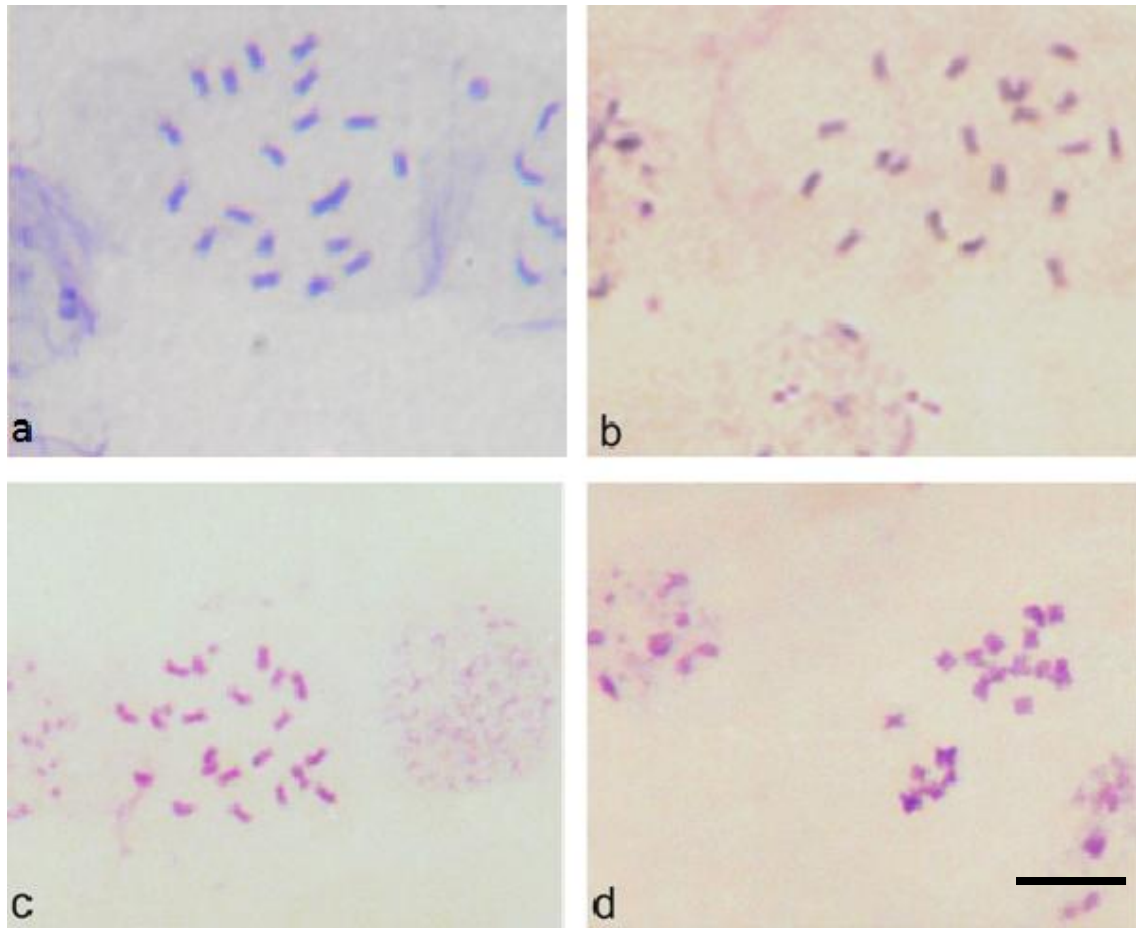


Fig. 1. Metáfase mitótica de espécies da seção *Heterantheae* coradas convencionalmente. **a.** *Arachis giacometti*; **b.** *A. pusilla*; **c.** *A. dardani*; **d.** *A. sylvestris*. Escala corresponde a 10 μm .

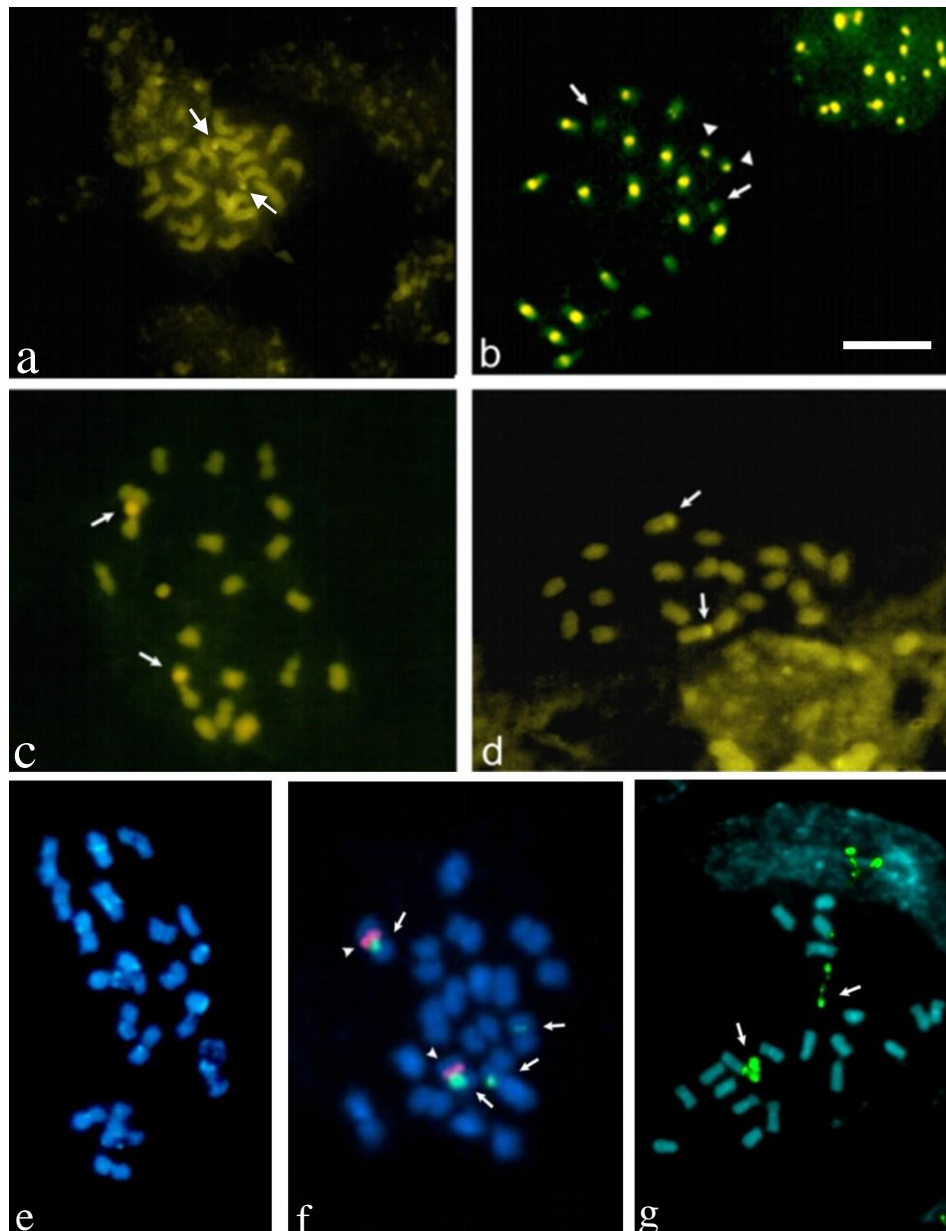


Fig. 2. Metáfases mitóticas de espécies da seção *Heterantheae* coradas com cromomicina (CMA), DAPI e técnica de FISH. **a.** *Arachis giacomettii*, setas indicam par satelitados. **b.** *A. pusilla*, setas indicando par cromossômico heteroploid e cabeça de seta indicam par satelitados. **c.** *A. dardani*, setas indicam blocos CMA⁺; **d.** *A. sylvestris*, setas indicam blocos CMA⁺. **e.** *A. pusilla* evidenciando blocos DAPI⁺. **f.** *A. pusilla*, setas indicam sítios de DNAr 45S e cabeças de setas sítio 5S; **g.** *Arachis giacomettii*, setas indicando a RON. Escala corresponde a 10 µm.

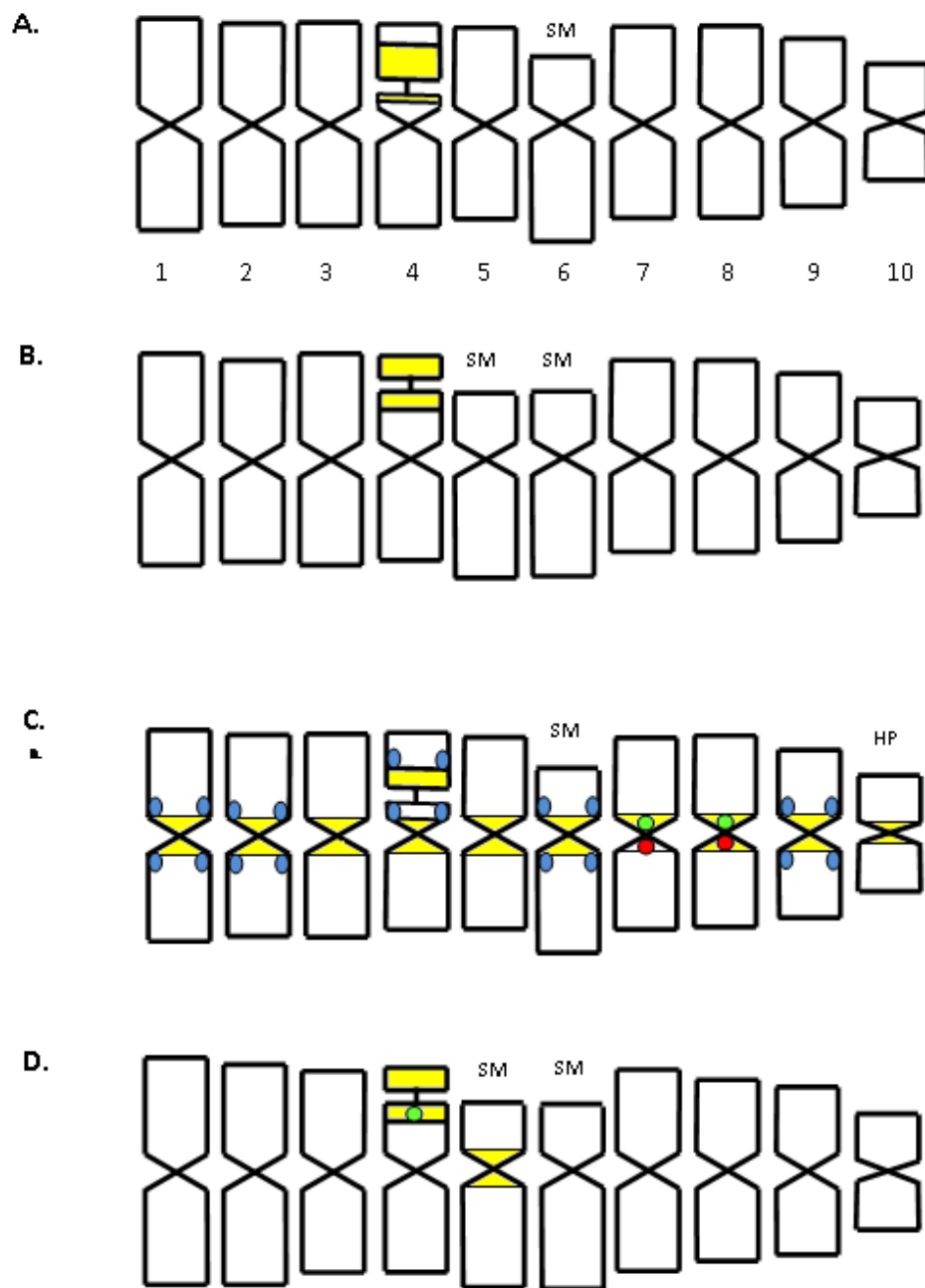


Figura 3. Idiograma de espécies do gênero *Arachis* evidenciando regiões ricas em GC ou AT e FISH, reveladas, respectivamente, pelos fluorocromos CMA⁺ (■), DAPI⁺ (●) e sonda 45S (●) e sonda 5S (●) nas espécies: **a.** *Arachis dardani*; **b.** *A. sylvestris*; **c.** *A. pusilla* e **d.** *A. giacomettii*. **SM.** Cromossomo submetacêntrico. **HP.** Cromossomo heteroploid negativo.

Referências

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **FAOSTAT**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>>. Acesso em: 29 de setembro de 2009.

FÁVERO, A. P. **Cruzabilidade entre espécies silvestres de *Arachis* visando a introgressão de resistência a doenças no amendoim cultivado**. 2004, 165 f. Tese (doutorado em Agronomia – Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas). ESALQ, São Paulo.

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

GREGORY, W. C.; GREGORY, M. P.; KRAPOVICKAS, A.; SMITH, B. W.; YARBROUGH, J. A. Structures and genetic resources of peanuts, en C.T. Wilson (ed.). **Peanuts – culture and uses**. Am, Peanut Res. And Educ. Assoc., Stillwater, v. 3, p. 47-134, 1973.

GUERRA, M. O uso Giemsa na citogenética vegetal - comparação entre a coloração simples e o bandeamento. **Ciência e Cultura**, São Paulo-Brasil, v. 35, p. 190-193, 1983.

GUERRA, M. Reviewing the chromosome nomenclature of Levan. **Revista Brasileira de Genética**, v. 9, p. 741-743, 1986.

GUERRA, M. **FISH - Conceitos e Aplicações na Citogenética**. Ribeirão Preto: SBG, 2004, 176 p.

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

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

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

KRAPOVICKAS, A.; RIGONI, V. A. Estudios citológicos en el género *Arachis*. **Ver. Invest. Agric.** v. 5, n. 3, p. 289-293, 1951.

LAVIA, G. I. Estudios cromosómicos en *Arachis* (Leguminosae). **Bonplandia**. v. 9, n. 1-2, p. 111-120, 1996.

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.; FERNÁNDEZ, A. Contenido de ADN nuclear en especies silvestres y cultivadas del género *Arachis*. **Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE) - Facultad de Cs. Agrarias – UNNE**, 2002.

MORAES, A.P., SOARES FILHO, W.S., GUERRA, M. Karyotype diversity and the origin of grapefruit. **Chromosome Research**. v.15, p.115-121, 2007.

MORAWETZ, W.; SAMUEL M.R.A. Karyological patterns in the *Hamamelidae*. In: CRANE, P.; BLACKMORE, S. Evolution, systematics and fossil history of the *Hamamelidae*. **Clarendon Press**. Oxford, v. 40, p.129-154, 1988.

PEÑALOZA, A. P. S; VALLS, J. F. M. Contagem do número cromossômico em acessos de *Arachis decora* (Leguminosae). In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS, Campinas: IAC, **Anais**, v. 39, 1997.

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.

PEÑALOZA, A. P. S; VALLS, J. F. M.; GUERRA, M. Caracterização citogenética de espécies brasileiras de *Arachis*. - **Anais do III SIRGEALG - Simpósio de Recursos Genéticos para a América Latina e Caribe**; Londrina-PR, Brasil, 2001.

SANTOS, R. C.; MELO FILHO, P. A.; BRITO, S. F. M.; MORAES, J. S. Fenologia de genótipos de amendoim dos tipos botânicos Valência e Virgínia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 32, n. 6, p. 607-612, 1997.

SIMPSON, C. E.; KRAPOVICKAS, A.; VALLS, J. F. M. History of *Arachis* including evidence of *A. hypogaea* L. progenitors. **Peanut Science**, v.28, n.2, p.78-80, 2001.

STALKER, H.T. A New Species in Section *Arachis* of Peanuts with a D Genome. **American Journal of Botany**, v. 78, n. 5, p. 630-637, 1991.

SCHWEIZER D, AMBROS, P.F. Chromosome banding. **In: methods in molecular biology, Chromosome analysis protocols**. v. 29, p.97-113, 1994.

STEBBINS, G.L. Artificial polyploidy as a tool in plant breeding. Brookhaven **Symposium Biology** v. 9, p.37-52, 1956.

VALLS, J.F.M; SIMPSON, C.E. New species of *Arachis* L. (Leguminosae) from Brazil, Paraguay and Bolivia. **Bomplandia**, v. 14, n. 1-4, p. 35-63, 2005.

Capítulo III

DETECÇÃO DE POLIMORFISMO DE BASE ÚNICA (SNP) EM DOIS ACESSOS DE AMENDOIM (*A. hypogaea* L.)

DETECÇÃO DE POLIMORFISMO DE BASE ÚNICA (SNP) EM DOIS ACESSOS DE AMENDOIM (*A. hypogaea* L.)

Maria Isabel Gomes Martins¹, Roseane Cavalcanti dos Santos², Péricles de Albuquerque de Melo Filho³ e Reginaldo de Carvalho¹

¹*Laboratório de Genética-Bioquímica e Sequenciamento de DNA, Depto. de Biologia/Genética, UFRPE, Recife, PE, Brasil.*

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

³*Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife, PE, Brasil.*

Resumo

Devido à alta frequência de ocorrência nos genomas, os SNPs são uma rica fonte de variabilidade por apresentar-se como forma abundante de polimorfismos entre alelos de um determinado gene. O objetivo deste trabalho foi localizar SNP em diversas sequências de DNA amplificadas via PCR entre os acessos de amendoim ‘BR1’ e ‘LVIFE’, comumente utilizados em cruzamentos para formação de populações segregantes, e obter um painel de endonucleases recomendadas para gerar marcas polimórficas entre esses acessos com base nos oligonucleotídeos utilizados. Para isto, foram utilizados 35 oligonucleotídeos iniciadores provenientes de bibliotecas de seqüências de expressão de leguminosas. Os produtos de PCR variaram de 300 a 1500 pares de bases. Do total de oligonucleotídeos iniciadores, três geraram polimorfismos diretamente da PCR entre os acessos investigados. Das demais bandas obtidas e monomórficas, dez foram purificados, sequenciados e alinhados para a identificação dos SNPs candidatos a geração dos mapas de restrição e conversão em marcas moleculares. Um total de 44 SNPs foi identificado, sendo 52,27% transição (substituição entre purinas ou pirimidinas) e 47,73% transversão (pareamento entre purina e pirimidina ou vice-versa). A maioria dos SNPs foi informativa quanto à construção de mapas de restrição com modificação do sítio de corte da enzima entre os acessos, contribuindo na geração de um painel de endonucleases recomendadas para gerar marcas polimórficas úteis.

Introdução

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é a sexta oleaginosa mais cultivada no mundo (FAO 2008). Sua importância econômica deve-se ao seu valor nutricional e à diversidade de formas de consumo como produtos industrializados, óleo comestível, doces, pastas ou consumo direto na forma de sementes cruas ou cozidas (FÁVERO, 2004), gerando ainda subprodutos como torta ou farelo utilizado na alimentação animal (SANTOS et al., 1997). Os programas de melhoramento genético têm como principal objetivo a produção de novas variedades agronômicas, a preservação dos recursos genéticos vegetais e o aumento da variabilidade genética via cruzamentos. Todo esse processo se justifica pela obtenção de caracteres agronômicos importantes como, produção de vagens, precocidade, hábito de crescimento, qualidade de produção e resistência a fatores bióticos e abióticos e aumento das propriedades nutricionais (SANTOS et al., 2005).

Os marcadores moleculares são abundantes nos genomas comportando-se muitas vezes como ferramentas rápidas e eficazes para o estudo dos diferentes genomas, uma vez que detectam polimorfismos diretamente ou indiretamente a nível do DNA, não sofrendo influência ambiental e sendo independentes do estado de desenvolvimento da planta (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Em geral, são baseados na amplificação de fragmentos de DNA por reação em cadeia da polimerase e têm sido grandemente empregados nos programas de melhoramento de plantas.

Dentre as diversas classes de marcadores destaca-se o marcador de base única ou SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*). O SNP tem sido considerado um marcador de grande potencial para aplicação direta no melhoramento genético de plantas e na construção de mapas (HAYASHI, 2004). Esse marcador é baseado em erros de pareamentos de bases durante a replicação do DNA gerando ligações incomuns ou bases selibatárias, sendo nesse caso chamados de InDels (inserções ou deleções). O método “SNP genotyping”, para geração de polimorfismo, utiliza a clivagem, por enzimas de restrição, de sítios polimórficos amplificados em reação em cadeia da polimerase, podendo ser utilizados amplicons produzidos por outros marcadores na forma de bandas simples ou múltiplas bandas como de RAPD, RFLP ou PCR de sequências expressas (YAMANAKA et al. 2004, BUNDOCK et al. 2005). Contudo, torna-se necessária a análise das sequências de DNA, clonadas ou não para o desenvolvimento da tecnologia baseada em SNPs. GUPTA et al. (2001) relataram a frequência de cerca de um SNP a

cada 100-300 pb no genoma de plantas. Em milho (*Zea mays* L.), por exemplo, foi relatada a ocorrência de pelo menos um SNP a cada 60-120 pares de base (CHING et al., 2002). O método para detecção de SNPs é extremamente eficiente, necessitando apenas uma pequena quantidade de DNA template além poucos equipamentos laboratoriais. Entretanto, nem todos os SNPs modificam o sítio de restrição das enzimas entre o DNA dos genótipos estudados.

Com o avanço da biologia molecular tornou possível a caracterização e clonagem de genes. A partir de então muitos genes de espécies vegetais já foram identificados. A descoberta dos domínios conservados entre o DNA de diversas espécies possibilitou a clonagem de genes homólogos em vegetais. No presente trabalho, 35 oligonucleotídeos iniciadores provenientes de bibliotecas de expressão das leguminosas *Lotus japonicus* L., *Glicine max* L. e *Medicago truncatula* L. foram aplicados em duas linhagens de amendoim acessos 'BR1' e 'LVIPE', comumente utilizados na formação de populações segregantes, para identificar e caracterizar polimorfismos via marcador SNP e para gerar um painel de endonucleases recomendadas para gerar marcas polimórficas úteis na progênie entre esses acessos a fim de auxiliar projetos futuros de melhoramento genético de amendoim.

Material e métodos

Foram utilizados 35 Oligonucleotídeos iniciadores, ‘Olii’ (senso e antisenso) do banco de dados de seqüências expressas (ESTs) das leguminosas *Lotus japonicus* L., *Glicine max* L. e *Medicago truncatula* L. (<http://bioweb.abc.hu/cgi-mt/pisprim/pisprim.pl>) para amplificar regiões específicas do genoma de dois acessos de *Arachis hypogaea* L., ‘BR1’ e ‘VLIPE-06’ contrastantes para tolerância a seca. Os acessos foram provenientes do Centro Nacional de Pesquisas do Algodão – Embrapa CNPA.

Extração de DNA

Folhas jovens, situadas no terço superior da planta, foram coletadas para extração de DNA, seguindo-se a metodologia de Doyle & Doyle (1990). As amostras foram quantificadas em gel de agarose 1,0% e visualizadas sobre luz ultravioleta. Todas as amostras foram aliqüotadas a 5 ng/µl (sol. uso) para utilização em reações de PCR.

Amplificação por PCR

Utilizou-se para as amplificações, o protocolo de PCR “touchdown” como a seguir: desnaturação inicial de 5’ a 95 °C, seguida de oito ciclos de desnaturação de 20” a 94 °C, anelamento a 60 °C por 30” e extensão de 2’ a 72 °C. Em seguida, realizou-se 35 ciclos seguidos de 20” de desnaturação a 94 °C, anelamento a 54 °C por 30” e extensão de 2 min a 72 °C, extensão final de 5’ a 72 °C.

As reações foram compostas de 2,5 µL de DNA, 2,5 µL tampão 10x, 1,8 mM MgCl₂, 10 mM de dNTPs, 0,5 µM de Olii e 0,1 U ‘*Taq* DNA polimerase ‘Fermentas’, sendo o volume final da reação ajustado para 25 µL. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1,2 % em tampão TAE 1X e corados em Sybr Gold. Em seguida fotodocumentados sobre luz ultravioleta.

Purificação das amostras

Os produtos amplificados que não geraram polimorfismos direto da PCR, foram purificados com o kit SureClean (Bioline). Este protocolo utilizou 10 uL do produto de Reação em cadeia da polimerase (PCR) e 10 uL da solução SureClean, seguido de 10 min TA, centrifugação, descarte do sobrenadante, lavagem do pellet com etanol 70% e

ressuspensão em EB buffer. A quantificação do DNA foi efetuada pelo método comparativo em gel de agarose a 1,2% usando-se λ -DNA como referencial.

Sequenciamento e análise das sequências

Os produtos purificados foram seqüenciados no seqüenciador de capilar MegaBACE 1000 do Laboratório de Genética, Bioquímica e Sequenciamento de DNA - UFRPE. Cada seqüenciamento foi realizado para as fitas senso e antiseno utilizando o Kit DYEnamic ET Terminator (GE Healthcare). As seqüências foram analisadas pelo Programa Mega Bace Sequence Analyzer e dados fornecidos pelo programa Mega Bace Score Card.

O alinhamento das seqüências foi obtido pelo programa Clustal-W (THOMPSON et al., 1994) (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) e editado no programa BioEdit V7.0.5.2 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) (HALL, 1999). Os SNPs bem como o mapa de restrição foram identificados através dos programas BioEdit V7.0.5.2 e NEBcutter V2.0, respectivamente.

Resultados e discussão

Dos 35 Oligonucleotídeos utilizados, 54,3% geraram produtos de PCR na forma de bandas simples ou duplas, sendo a maioria monomórficas. Esse percentual de amplificação revelou a existência de grande quantidade de seqüências conservadas entre as leguminosas soja, lotus e medicago e o amendoim, uma vez que os Olii foram desenhados especificamente a partir do cDNA de cada uma das espécies. A caracterização molecular de genes de resistência em vegetais, revelou a existência de domínios conservados originando os chamados RGA's ou Genes análogos de resistência. A existência de tais domínios pode ser utilizada como estratégia de clonagem de genes homólogos de resistência em amendoim cultivado. Em soja, por exemplo, produtos de PCR amplificados de genes homólogos de resistência mostraram-se ligados aos genes *RsvI*, Resistência para o vírus do mosaico comum da soja e *Rpv* para resistência ao vírus do mosqueado do amendoim (YU et al., 1998).

Os produtos de PCR amplificados variaram no tamanho entre 300 a 1500 pares de bases. Do total de oligonucleotídeos iniciadores, apenas três geraram polimorfismos diretamente da PCR entre os acessos investigados, 1M-Gm, 4M-Gm e Leg036. (Figura

1). Neste caso, estes oligonucleotídeos poderão ser utilizados na progênie para seleção de indivíduos através da herança mendeliana de características agrônômicas.

Dos amplicons monomórficos, dez foram purificados, sequenciados e alinhados para a identificação dos SNPs candidatos a geração dos mapas de restrição e conversão em marcas moleculares. Apenas as sequências do Olli da citocromo oxidase CyB6-1, não apresentaram SNPs em aproximadamente 200 pares de bases analisadas de um total de 300pb. Todas as outras seqüências alinhadas apresentaram SNPs, cujo número variou de 3 a 8 SNPs. Um total de 44 SNPs foram identificados sendo 52,27% transição (substituição entre purinas ou pirimidinas) e 47,73% transversão (troca entre purina e pirimidina ou vice-versa) (Tabela 1). No presente trabalho, a maioria dos SNPs foi informativa quanto a construção de mapas de restrição com modificação do sítio de corte em apenas um dos acessos utilizados (Tabela 2). Do total de SNPs identificados, 19 (43,18%) foram polimórficos mostrando-se bons candidatos para geração de marcadores CAPs ou seqüências polimórficas amplificadas e clivadas (Figura 2). Um total de 9,1% das seqüências alinhadas apresentaram InDels. Em muitos casos, os InDels têm sido utilizados para geração de polimorfismo, devido a modificação do sítio de restrição entre genótipos.

Marcadores SNPs são variações de nucleotídeos na seqüência de DNA entre indivíduos na população e constituem o mais abundante marcador molecular no genoma. São utilizados para rápida identificação de plantas cultivadas, construção de mapas de alta densidade, podem ser usados para uma rápida identificação de cultivares, entre outros estudos evolutivos (DOUABIN-GICQUEL et al., 2001). Os SNPs são amplamente distribuídos no genoma de plantas, principalmente nas regiões não codificantes (SOLEIMANI et al. 2003; YAMANAKA et al. 2004). Soleimani et al. (2003) identificaram 214 SNPs com 71% das mutações do tipo transição e 29% do tipo transversão, os quais geraram polimorfismos e marcas cultivares específicas em plantas de cevada. Os autores afirmaram ainda que o gel de agarose foi eficiente na distinção de mutações de uma única base em corrida de eletroforese para a validação dos SNPs. Várias abordagens podem ser utilizadas para a descoberta de novos SNPs e cerca de uma dúzia de diferentes métodos estão disponíveis para procedimentos de genotipagem (GUPTA et al., 2001). A detecção experimental pode ser feita utilizando sequenciamento de DNA e software computacionais (BUETOW et al., 1999). Os quais são facilitados pelo grande aumento no número de seqüências ESTs disponíveis em bancos de dados públicos. Muitos SNPs têm sido validados, incluindo fragmentos

contendo pequenas quantidades de base (CHEN et al., 1999; ROSS et al., 1998) e subsequente clivagem com enzimas de restrição (CAPs) (GROSSMAN et al., 1994).

WEILAND e YU (2003) Compararam bases geradas entre sequências em plantas resistentes e susceptíveis, na qual revelou um grande número de substituições de nucleotídeos. A substituição de uma adenina por uma guanina na sequência de bases TTAGATAA e TTAAATAA, associada à susceptibilidade levou ao reconhecimento de um sítio de clivagem pela endonuclease de restrição *MseI*. Assim plantas que apresentaram o nucleotídeo **A** no sítio de reconhecimento da enzima tiveram seu DNA digerido pela enzima *MseI*, característica esta, associada à susceptibilidade ao nematóide. Os autores puderam mostrar de forma prática, como a identificação e a validação dos SNPs podem ser úteis no reconhecimento de genótipos com características genéticas herdáveis e de importância agrônômica.

Com isso, os resultados obtidos poderão auxiliar no programa de melhoramento genético de amendoim na identificação de alelos herdáveis entre indivíduos de determinada progênie.

Tabela 1. Painel de SNPs identificados, enzimas de restrição, sequências dos oligonucleotídeos, tamanho dos fragmentos amplificados.

N ^o	Olii	Sequência	Tam prod\PCR	Enzima de restrição	SNPs		InDels	Tam analisado
					(A/G; C/T transi; A/C; G/T transv)			
1	1M-Gm	F: CTTGGGATGCAAGCCACGGTTGG R: TCCAGTGAGAAAASAAGYCCAAGGAAATG	N; 1000, 650, 400					
2	17M-Gm	F: ATGGGAGCTCARAAGAGCATCCATGC R: GTCCCAYGAAACATCAAGCTTCTCACTTCC	500	TaqI; Mse I	7 SNPs (4 transi; 3 transv)	4	430	
3	20M-Gm	F: CAGTGGCAACCTCCATCTTTGCACTGG R: GAGCMATARCCATAGCCAGCAACTC	1000	MseI; HpyAV	8 SNPs (4 transi; 4 transv)	2	790	
4	CYB6-1	F:CTTTTGTGTTGAGCCGTACGAGATGA R:AAGTCATAGCAAACCCGTCGCTACT	300	_____	_____	_____	197	
5	Leg199	F: CGARAACGACYTGAAMGCCGCCGCGC R: TCCATTKAGCYGCHGCAGGAACCTCAAC	500	AccI; HgaI	3 SNPs (3 transi)	_____	420	
6	Leg231	F: CTTATTGYGAGCTWAAACTTGATTC R: AGCTAAAATGAAGTTAGCAAAGTCAGACTCT	1500					
7	Leg729	F: TGAAGCCAAAYCGACCCWCACTTGTGTGAAGCAG R: GACAGCCACATGGTMCGAAATGCCACACG	500	MboI; ApoI	3 SNPs (1 transi; 2 transv)	3	390	
8	Leg732	F: CGWAGTCTCCKCCTGCTTTT R: TCTTCATCATCAGCATAGTAWGARATTTTCAG	400	Tps509I; HincII	3 SNPs (1 transi; 2 transv)	1	310	
9	Leg736	F: TTGCTGGRAAGGTTTTCAGAATWGGACATCTTGGC R: AGTATGCACTRGCAGCAGCAACTCCACTTCC	650	StyI; BsaI	3 SNPs (2 transi; 1 transv)	1	583	
10	TC987	F: TTCAGAAGCCTTCCACCSFTGTTTTG R: GCAATTCCAAYTCAGTATGGAAYTCAGC	1000	MboI; DpnII	7 SNPs (4 transi; 3 transv)	2	812	
11	11M-Gm	F: AATCAGAGCTBAGCGABAAGCAGAAAG R: CGAAATTCCTTCAATRTATGSAGATGGAAGTTC	N					
12	23M-Gm	F: GAGGCRARTCCTCTTCTCMAMCA R: CACACAAGGAGCCCACTCC	N					
13	3M-Gm	F: GGCAAGABTGGTGGYACYCCAACAG R: CCCATTATKAGGATTTTCTTGGTGC	N					
14	4M-Gm	F: TTGCTTACTGGGCTTAATGTGG R: CAATAGAGTYYTGAATCAAACCAAC	500;650					
15	7M-Gm	F: CATTCCMAAATAATGAACAGACTG R: GTCTTCCMACATTTGCTATTGCAAG	N					
16	Leg036	F: GCTAATATTGGACCAGAAACAAATGTG R: GAAACTCAAGGCAAGAGGCCATG	N;1000					
17	Leg304	F: CTTGAWGGTYCTTAAAGCTCTGGAAGC R: TCCAATWGRCTTTCACGGTCAGCA	N					
18	Leg423	F: AATCAGGCAATGYTACTGGKTCTGGTG R: TGAGGTACCAGCAAKAGAGTACGAGGTAGAGGG	300					
19	Leg450	F: TCCTCGATCTCAAGTCYCGATTYAGATCTACGGC R: ACCAACTCCTTCCCTCCACATKGTAGAGG	930	MseI; MboI	7 SNPs (2transi; 5 transv)	5	820	
20	Leg713	F: TGGAAGCCGWGTTAAACCCAAATGYTACACTCTCT R: TGACYAGGCTCCAGAGAA	400					
21	Leg721	F: TTGTTCTTGTSTCAGGRTTAAAGTGTGGGAGCAGC R: AGGTGCAGTKGGTGCCAAATGCCTCCATC	N					

Continuação da Tabela 1.

Olii	Sequência	Tam prod\PCR	Enzima de restrição	SNPs	InDels	Tam analisado
Nº				(A/G; C/T transi) (A/C; G/T transv)		
22	Leg763 F: TGCAAGCCTGTAGATTATAGWGCTGA R: CAATGTAAAGGTGAATATARAGGACATTCTCCCA	N				
23	Leg843 F: AGCATGCYTRAGYGTTTCTAGAGCHAT R: GGYTGATGGAAGAGTTWGCTCCTTGTTTCATG	N				
24	Leg924 F: GTGGCYTGTGGTATTCTTGACGCTTG R: TCAGCWCATCAAACCTGGCATCTGACATGAGTGC	N				
25	Leg929 F: TGATAGGAAC TGGGWGCTGGTTGGCACC R: ACGCATTGCAGTAGAACCCAGACCCCAT	400	HpyCH4IV	3 (2 transi; 1 transv)	1	315
26	TC811 F: YTAYSAGCAATGGGATTTCRCTTAC R: TCTYTCCTTGGCAAAGTATGAAAG	N				
27	mtmt_102 6 F: CATCGGACATATGCTGTTGC R: GGCTGCCAGTTTCATTTTCAT	400				
28	mtmt_336 F: ATCCGTAGGCTTGCTGAAGA R: AAACGATTTCTGTTGGTGGC	N				
29	mtmt_853 F: TAACCTTGATGGATTGGGGA R: CTCCACGCTTAAGATTTTCGC	N				
30	mtmt_241 01_05 F: CACAATGAGTGGTGCCAAAC R: TTGCCTTGGAAGCTGAAACT	650				
31	mtmt_204 03 F: ATCCGTAGGCTTGCTGAAGA R: AAACGATTTCTGTTGGTGGC	N				
32	mtmt_992 02_1 F: ATGTGTTTCAGCTCGCTTT R: TCCAAGGTTCCAGTTTCAC	N				
33	mtmt_355 07_1 F: GCTGAAATGGTTGGACCTGT R: CCTTCTGCCGGTCTTCATAG	N				
34	mtmt_578 04_1 F: GGCGAAGCTTAATGATGAGC R: GCAGCAGCATCAAAATCAA	N				
35	mtmt_185 03_1 F: TTTTGGTCTCGGCAGAAATGT R: ACCAAAGGATGCTCGTCAAC	N				

(N) Oligonucleotídeos iniciadores que não amplificaram fragmentos.
 Marcação em vermelho para polimorfismo direto (BR1 e LVIPE-06)

Tabela 2. Endonucleases recomendadas para geração de polimorfismos entre os parentais contrastantes de amendoim de acordo com o oligonucleotídeo utilizado.

N°	Olii	Acessos	Enzimas de restrição
1	17M-Gm	BR1	Sau96I; AvaII; Tps509I; TaqI
		LVIPE	NlaIV; MseI; AleI
2	20M-Gm	BR1	MseI; XbaI; Hpy188III; BfaI; DraI; Tps509I; ApoI; FokI; BslI
		LVIPE	HpyAV
3	CYB6-1	BR1	-----
		LVIPE	-----
4	Leg199	BR1	AccI
		LVIPE	Hpy188I; HgaI
5	Leg729	BR1	MboI; DpnII; DpnI
		LVIPE	ApoI
6	Leg732	BR1	Tps509I; Hpy166II; HincII
		LVIPE	-----
7	Leg736	BR1	XcmI; StyI; BsaJI
		LVIPE	Sau3AI; MboI; DpnII; BfuCI; BstYI
8	TC987	BR1	BlpI; DdeI;
		LVIPE	TseI; SfcI; HpyCH4V; PtsI; ApoI; AflIII
9	Leg929	BR1	HpyCH4IV
		LVIPE	-----
10	Leg450	BR1	Tth111I; PflFI; AciI; HgaI; MseI; AseI; Tps509I; ApoI
		LVIPE	Hpy188III; MboI; DpnII; Sau3AI; PvuI; CviKI-1; FokI; MfeI

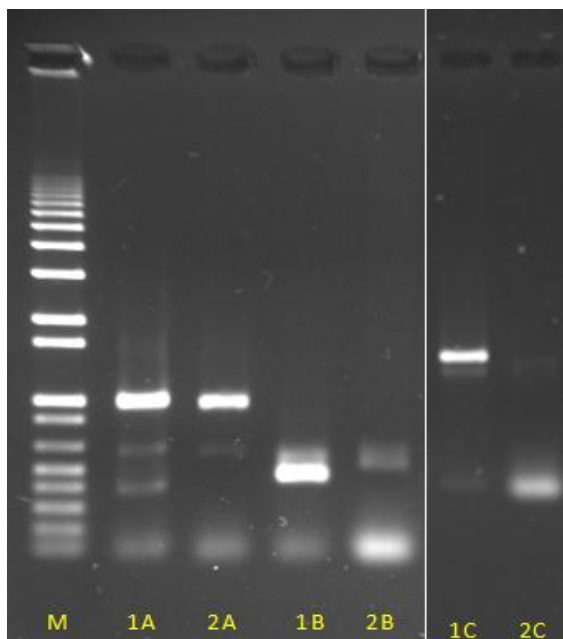


Figura 1. Gel de agarose 1,2% exibindo os produtos da reação de amplificação dos oligonucleotídeos: 1- BR1; 2- LVIPE; A - 1M-Gm; B - 4M-Gm e C - Leg036. Sigla: M – Marcador Molecular Ladder plus 1Kb (Invitrogen)

Br1 - CCACAAAGAGCATCAAACGCATTGAGATGAATTTTGGTGCCACTGCTCAAG
 Ano- CCACAAAGAGCATCAGACGCATTGAAATGAATTTTGGTGCCACTGCTCAAG

BR1 – CCACAAAGAGCATCAAACGCATTGAGATG AATTTTGGTGCCACTGCTCAAG



ANO – CCACAAAGAGCATCAGACGCATTGAAATGAATTTTGGTGCCACTGCTCAAG

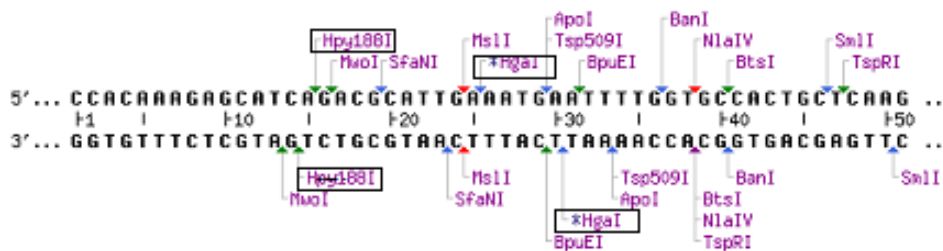


Figura. 2. Mapa de restrição com modificação do sítio de corte em um dos acessos BR1 e LVIPE-06 para o oligonucleotídeo Leg199. ANO refere-se ao acesso LVIPE-06.

Referências

BUETOW, K. H.; EDMONSON, M. N. and CASSIDY, A. B. Reliable identification of large numbers of candidate SNPs from public EST data. **Nature Genetics** v.21, p.323–325,1999.

BUNDOCK, P.C.; CROSS, M.J.; SHAPTER, F.M.; HENRY, R.J. Robust allele-specific polymerase chain reaction markers developed for single nucleotide polymorphisms in expressed barley sequences. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 112, p. 358–65, 2005

CHEN, X.; LEVINE, L.; KWOK, P.Y. Fluorescence polarization in homogeneous nucleic acid analysis. **Genome Research**. v. 9, p. 492-498, 1999.

CHING, A.D.A.; CALDWELL, K.S.; JUNG, M.; DOLAN, M.; SMITH, O.S.; TINGEY, S.; MORGANTE, M.; RAFALSKI, A. SNP frequency, haplotype structure and linkage disequilibrium in elite maize inbred lines. **BMC Genetics**. v. 3, p. 19. 2002.

DOUABIN-GICQUEL, V.; SORIANO, N.; FERRAN, H.; WOJCIK, F. Identificaiton of 96 single nucleotide polymorphisms in eight genes involved in iron metabolism: efficiency of bioinformatic extraction compared with a systematic sequencing approach. **Human Genetic**, v.109, p.393-401, 2001.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.

FÁVERO, A. P. **Cruzabilidade entre espécies silvestres de *Arachis* visando a introgressão de resistência a doenças no amendoim cultivado.** 2004, 165 f. Tese (doutorado em Agronomia – Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas). ESALQ, São Paulo.

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

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **FAOSTAT.** Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>>. Acesso em: 29 de setembro de 2009.

GROSSMAN, P.D.; BLOCH, W.; BRINSON, E.; CHANG, C.C.; EGGERDING, F.A.; FUNG, S.; IOVANNISCI, D.M.; WOO, S.; WINN-DEEN, E.S.; IOVANNISCI, D.A. High-density multiplex detection of nucleic acid sequences: oligonucleotide ligation assay and sequence-coded separation. **Nucleic Acids Research.** v. 22, p. 4527-4534. 1994.

GUPTA, P.K.; ROY, J.K.; PRASAD, M. Single nucleotide polymorphisms: A new paradigm for molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants. **Current science,** v. 80, n. 4, 2001.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl Acids Symp Ser.** 1999, v.41, p.95–98.

ROSS, P.; HALL, L.; SMIRNOV, I.; HAFF, L. High level multiplex genotyping by MALDI-TOF mass spectrometry. **Nature Biotechnology**. v. 16, p. 1347-1351, 1998.

SANTOS, R. C.; MELO FILHO, P. de A.; BRITO, S. de F. M.; MORAES, J. de S. Fenologia de genótipos de amendoim dos tipos botânicos Valência e Virgínia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 32, n. 6, p. 607-612, 1997.

SANTOS, R. C.; GODOY, I. J.; FÁVERO, A. P. Melhoramento do amendoim. In: SANTOS, R. C. (ed.). **O Agronegócio do Amendoim no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2005, p. 123-192.

SOLEIMANI, V.D.; BAUM, B.R.; JOHNSON, D.A. Efficient validation of single nucleotide polymorphisms in plants by allele-specific PCR, with an example from barley. **Plant Molecular Biology**. v. 21, p. 281–8, 2003.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G. & GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**. v.22, p.4673-4680, 1994.

WEILAND, J.J.; YU, M.H. Seqüência Polimórfica Amplificada e Clivada (CAPS Marker) Associada com Resistência a Nematóide de Raiz em Beterraba. **Crop Science**, v. 43, p. 1814- 1818, 2003.

YAMANAKA, S.; NAKAMURA, I.; WATANABE, K.N.; SATO, Y.I. Identification of SNPs in the waxy gene among glutinous rice cultivars and their evolutionary

significance during the domestication process of rice. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 108, p. 1200-4, 2004

YU, Y.G.; SAGHAL, M.A.; ROOF, M.A. Isolation of a superfamily of candidate disease – resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide – binding site. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.95, p. 1663-1668, 1998.

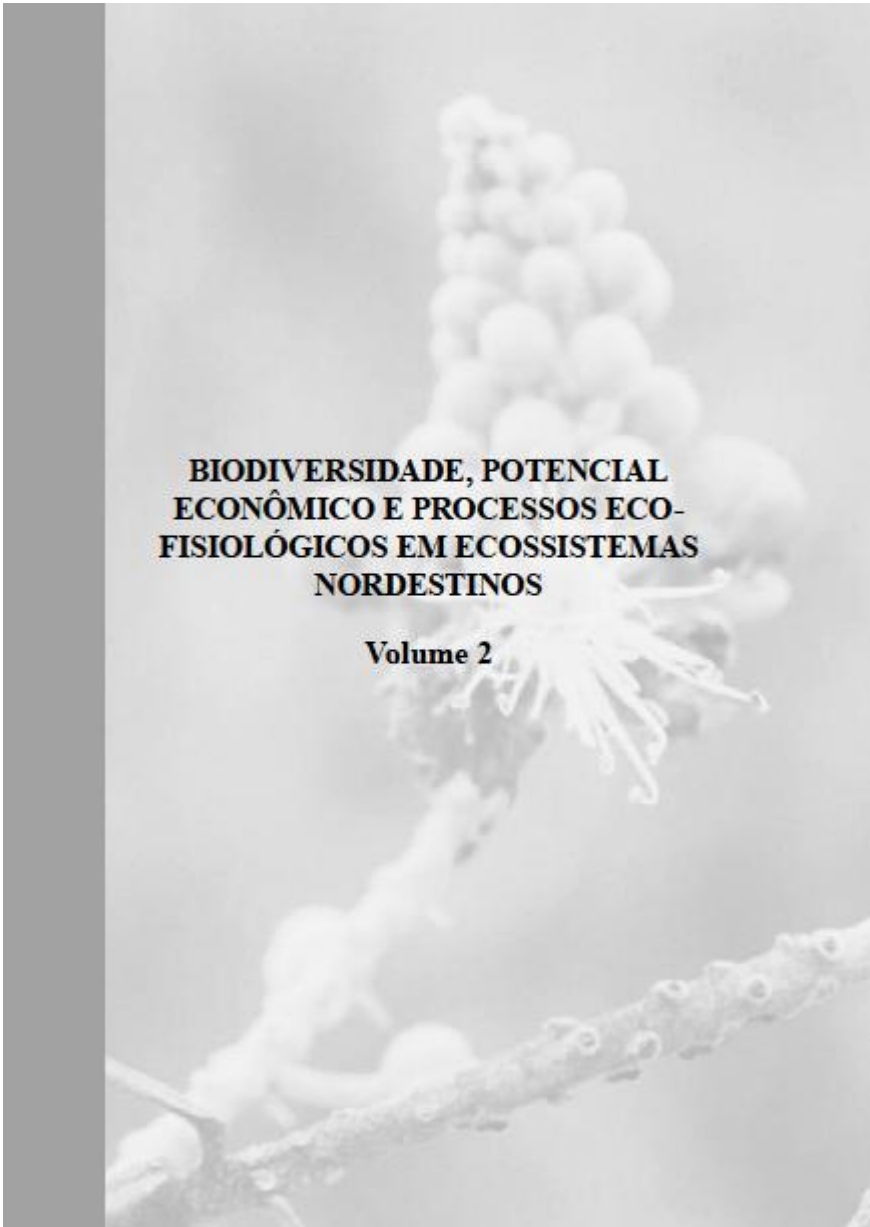
Conclusões Gerais

CONCLUSÕES

As análises cromossômicas revelaram uma similaridade cariotípica em relação ao número diplóide, núcleo interfásico, padrão de condensação, ocorrência de cromossomos satelitados e simetria no complemento cromossômico. Contudo, observou-se diferenças cariotípicas consistentes e suficientes para agrupar *A. pusilla* e *A. dardani*, que apresentaram 18m+2sm e satélite tipo 2. *a. giacomettii* e *A. sylvestris* ficaram em um segundo grupo por apresentar fórmula cariotípica 16m+4sm e satélite tipo 10. Por outro lado, o resultado mais surpreendente foi observado em *A. pusilla* por apresentar maior quantidade de heterocromatina rica em guanina e citosina, revelada pelo CMA, já registrada na literatura, além de bandas DAPI em todos cromossomos.

A técnica de SNPs apresentou resultado satisfatório por apresentar polimorfismo entre as sequências dos dois acessos estudados, uma vez que os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram provenientes de sequências expressas (ESTs) de espécies diferentes de *A. hypogaea*, revelando sintenia gênica entre o amendoim e demais leguminosas. Esses resultados poderão auxiliar no programa de melhoramento genético de amendoim na identificação de alelos herdáveis entre indivíduos de determinada progênie.

ANEXOS



**BIODIVERSIDADE, POTENCIAL
ECONÔMICO E PROCESSOS ECO-
FISIOLÓGICOS EM ECOSISTEMAS
NORDESTINOS**

Volume 2