



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**Caracterização de sementes, determinação do tamanho do genoma e
contagem cromossômica de *Amaranthus cruentus*, *A. viridis* e do
híbrido interespecífico**

VINICIUS NOGUEIRA GUIMARÃES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM AGRONOMIA

BRASÍLIA/DF

MARÇO/2017



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**Caracterização de sementes, determinação do tamanho do genoma e
contagem cromossômica de *Amaranthus cruentus*, *A. viridis* e do
híbrido interespecífico**

VINICIUS NOGUEIRA GUIMARÃES

Orientador: Professor Doutor Carlos Roberto Spehar

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM AGRONOMIA

PUBLICAÇÃO: 137/2017

BRASÍLIA/DF

MARÇO/2017



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**Caracterização de sementes, determinação do tamanho do genoma e
contagem cromossômica de *Amaranthus cruentus*, *A. viridis* e do
híbrido interespecífico**

VINICIUS NOGUEIRA GUIMARÃES

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO/TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA, COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE EM AGRONOMIA.**

APROVADA POR:

CARLOS ROBERTO SPEHAR, Doutor, Universidade de Brasília
CPF: 122.262.116-91, E-mail: spehar@unb.br

NARA OLIVEIRA SILVA SOUZA, Doutora, Universidade de Brasília
CPF: 033.300.726-36, E-mail: narasouza@unb.br

JULCEIA CAMILLO, Doutora, Universidade de Brasília
E-mail: julceia@gmail.com

BRASÍLIA/DF, 31 de MARÇO de 2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Guimarães, Vinicius Nogueira

Caracterização de sementes, determinação do tamanho do genoma e contagem cromossômica de *Amaranthus cruentus*, *A. viridis* e do híbrido interespecífico. /Vinicius Nogueira Guimarães; orientação Carlos Roberto Spehar – Brasília, 2017. 72 p.: il.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2017.

1. Amaranto; 2. Híbrido interespecífico; 3. Coloração de semente; 4. Morfologia.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

GUIMARÃES, V. N. **Caracterização de sementes, determinação do tamanho do genoma e contagem cromossômica de *Amaranthus cruentus*, *A. viridis* e do híbrido interespecífico.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2017, 72 p. Dissertação de Mestrado.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Vinicius Nogueira Guimarães

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Caracterização de sementes, determinação do tamanho do genoma e contagem cromossômica de *Amaranthus cruentus*, *A. viridis* e do híbrido interespecífico.

GRAU: MESTRE ANO: 2017

É concedida à Universidade de Brasília de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado para única e exclusivamente propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada à fonte.

Nome: Vinicius Nogueira Guimarães

CPF: 036.191.211-09

Endereço: Rua 21 Sul, Águas Claras, Brasília, Distrito Federal.

Tel.: (61) 3963-9563 Email: vnog.agro@gmail.com

Aos meus pais Uziel e Roseny Guimarães,
e irmãos Victor Nogueira e Anderson Rodrigues
por todo amor e dedicação.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo a Deus, por ter me sustentado, guardado e dado forças para superar todas as dificuldades e problemas encontrados.

A toda minha família pelo seu amor e carinho, por não terem exercido nenhuma pressão negativa ou contrária aos meus estudos e sim por terem me apoiado incondicionalmente.

Ao meu orientador, Professor Ph.D. Carlos Roberto Spehar, pela paciência, colaboração e pelos preciosos ensinamentos.

As Professoras Julceia e Taislene pelo seu tempo, paciência, votos de confiança e ensinamentos.

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia na pessoa do pesquisador Doutor Jonny que abriu as portas de seu laboratório, equipamentos e conhecimento, para a realização deste trabalho.

Aos amigos e colegas que encontrei ao longo dessa jornada, Paulo, Robson, Inaê, Samanta, Luciana, André, Filipe, Renan, Fernanda, Jennifer, Eliza e Gabriela.

Aos preciosos colegas e amigos de curso, Daiane, Hanna, Wallas, Bruna, Maria, Isadora e Cristian com quem compartilhei dias de alegria e aprendizado.

Aos amigos de todas as horas, João, Luciano, Rafael, Felipe, Glauco, Tiago, Eduardo, Rodolpho, Talita, Rejane, Thatiane, Rony, Filipe, Suwenay, Veranice, Aline, Monique e Patrícia, pelos momentos memoráveis.

Aos funcionários da Fazenda Água Limpa, por todo esforço e trabalho.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelos recursos financeiros destinados a realização deste trabalho.

E também a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, de alguma forma para que esse trabalho pudesse ser feito.

Muito obrigado.

RESUMO GERAL

Os grãos de amaranto (*Amaranthus cruentus*) são altamente nutritivos e contém elevados teores de cálcio e ferro. O amaranto apresenta alto poder energético, fácil digestão e pode ser utilizado em farinhas especiais, livres de glúten, ampliando o mercado de produtos nutritivos para celíacos. Estudos conduzidos pela Universidade de Brasília em campo de produção de *A. cruentus*, cultivar BRS Alegria, infestado com a espécie silvestre invasora *A. viridis*, evidenciou a presença de plantas diferenciadas e com características intermediárias entre as duas espécies. Desta forma, estudos têm sido conduzidos para confirmar a ocorrência de cruzamento interespecífico e a produção de híbridos de interesse para o melhoramento genético de *A. cruentus*. Hibridação interespecífica é uma importante ferramenta que possibilita a introgressão de genes de interesse em espécies cultivadas, ampliando variabilidade genética. O presente estudo teve como objetivo avaliar as características biométricas e germinativas das sementes de *A. viridis*, *A. cruentus* e seu provável híbrido interespecífico. Para tanto foram avaliadas sementes coletadas de 36 plantas de *A. viridis*, *A. cruentus* e do híbrido entre elas colhidas em 2015, na área experimental da Fazenda Água Limpa, Universidade de Brasília. As plantas híbridas apresentavam em sua morfologia combinação de características e de sementes da respectiva espécie cultivada e silvestre, dentre elas, destacaram-se a mancha na folha, típica de *A. viridis*, a coloração vermelha do caule e da inflorescência, típicos de *A. cruentus*, ramificação da inflorescência típica de *A. viridis*. As sementes foram obtidas por trilha manual, secadas para atingir 13 % de umidade e armazenadas em câmara fria. Realizou-se a biometria das sementes com o auxílio de lupa Leica EZ4 HD e do programa LAS EZ (Leica Application Suite, versão 3.2.1). Foram determinados o comprimento, largura e a espessura de 50 sementes de cada uma das 36 plantas, sendo o comprimento da semente medido a partir do hilo em direção à extremidade oposta. Para o peso de mil sementes foi realizada a contagem, ao acaso, de oito repetições de 100 sementes, pesadas em balança analítica e calculando-se a variância, o desvio padrão e o coeficiente de variação dos valores obtidos nas pesagens. Para os testes de germinação, e índice de velocidade de germinação (IVG) foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes de cada tratamento, semeadas em duas folhas de papel mata borrão (germitest), com três vezes o seu peso em água destilada, colocados no interior de caixas plásticas do tipo gerbox. As caixas foram mantidas em câmara de germinação tipo B.O.D. regulada a temperatura de 20°C. Os

resultados obtidos demonstraram que existe alta variabilidade entre as 36 plantas, pois apresentaram diferença significativa no comprimento e espessura das sementes para todos os indivíduos avaliados. A estimativa do tamanho do genoma foi realizada por citometria de fluxo, utilizando-se tampão Marie e *Pisum sativum*, como padrão interno de referência. Cromossomos metafásicos foram obtidos por fragmentos de pontas de raízes com aproximadamente 5 mm de comprimento, correspondente ao meristema radical dos tratamentos controle (*Amaranthus cruentus* cv BRS Alegria e *A. viridis*) e do híbrido interespecífico, para análise de ploidia, utilizando-se citometria de fluxo. O peso de mil sementes variou entre 354,3 e 923,7 mg, verificando-se correlação positiva entre coloração e o peso de mil sementes, sendo que as plantas com sementes escuras apresentaram sementes mais leves, quando comparadas com aquelas de sementes claras, típicas de *A. cruentus*. A germinação também apresentou efeitos ligados a coloração da semente, onde as sementes escuras apresentaram uma germinação tardia, por provável impermeabilidade da testa. Os valores do conteúdo de DNA variaram de 0,99 pg a 1,27 pg, sem apresentar diferença estatística. A amostra 21 apresentou menor conteúdo de DNA em uma de suas repetições, entretanto ao realizar a contagem cromossômica apresentou $2n = 34$, igualmente a *A. cruentus* e *A. viridis*. A obtenção de híbridos férteis sugere que as espécies *A. cruentus* e *A. viridis* apresentam proximidade genômica. Estudos adicionais se fazem necessários para elucidar a relação entre as espécies e possível uso no melhoramento genético.

Palavras-chave: Amaranato; híbrido interespecífico; coloração de semente; morfologia da planta.

ABSTRACT

Grains of amaranth (*Amaranthus cruentus*) are highly nutritious and contain high levels of calcium and iron. Amaranth has high energetic power, easy digestion and can be used in special flours, gluten-free, expanding the market of nutritious products for celiacs. Studies carried out by the University of Brasília in *A. cruentus* production field, BRS Alegria, infested with the invasive wild species *A. viridis*, evidenced the presence of differentiated plants with intermediate characteristics between the two species. Studies have been conducted to confirm the occurrence of interspecific crosses and the production of hybrids of interest for the genetic improvement of *A. cruentus*. Interspecific hybridization is an important tool that allows introgression of genes of interest in cultivated species, increasing genetic variability. The present study aimed to evaluate the biometric and germinative characteristics of *A. viridis*, *A. cruentus* and its probable interspecific hybrid. Seeds collected from 36 plants of *A. viridis*, *A. cruentus* and from the hybrid harvested in 2015, in the experimental area of Fazenda Água Limpa, University of Brasília, were evaluated. Hybrid plants had a combination of characteristics and seeds of the respective cultivated and wild species, such as *A. viridis* leaf spot, red stem and inflorescence, typical of *A. cruentus*, ramification of the typical *A. viridis* inflorescence. The seeds were threshed by hand, dried to 13% humidity and stored in a cold room. Seed biometry was performed using the Leica EZ4 HD magnifier and the LAS EZ program (Leica Application Suite, version 3.2.1). The length, width and thickness of 50 seeds of each of the 36 plants were determined, the length of the seed being measured from the wire towards the opposite end. For the weight of one thousand seeds, we counted, at random, eight replicates of 100 seeds, weighed in analytical balance and calculating the variance, the standard deviation and the coefficient of variation of the values obtained in the weighings. For germination and germination rate (IVG) tests, four replicates of 50 seeds of each treatment were used, sown on two sheets of germitest paper, with three times their weight in distilled water, placed in the Interior of gerbox plastic boxes. The boxes were kept in a germinating chamber (B.O.D.) Regulated at a temperature of 20 ° C. The results showed that there is a high variability among the 36 plants, as they showed a significant difference in seed length and thickness for all individuals evaluated. Genome size estimation was performed by flow cytometry, using the Marie and *Pisum sativum* buffer, as the internal reference standard. The metaphase chromosomes were obtained by fragments of root tips approximately 5

mm long, corresponding to the radical meristem of the control treatments (*Amaranthus cruentus* cv BRS Alegria and *A. viridis*) and of the interspecific hybrid, for ploidy analysis, using flow. The one thousand seed weight ranged from 354.3 to 923.7 mg, with a positive correlation between staining and the weight of one thousand seeds. The seeds with dark testa presented lighter seeds when compared to those with light color testa, Typical of *A. cruentus*. The germination also showed effects related to seed coloration, where the dark seeds had late germination, due to probable impermeability of testa. The values of the DNA content varied from 0.99pg to 1.27pg, without presenting statistical difference. Sample 21 had the lowest DNA content in one of its replicates. However, when performing the chromosome count, it was $2n = 34$, similarly to *A. cruentus* and *A. viridis*. The fertile hybrids suggest that *A. cruentus* and *A. viridis* present genomic proximity. Further studies are needed to elucidate the relationship between species and possible use in breeding.

Keywords: Amaranth; Interspecific hybrid; Seed coloration; Plant morphology.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Biometria das sementes de *A. cruentus* (A, B e C) e *A. viridis* (D, E e F) com auxílio da Lupa Leica EZ4 HD e do programa LAS EZ (versão 3.2.1) medindo a espessura (A e E), o comprimento e a largura (C e D) das sementes. 36
- Figura 2** - IVG, com a germinação média de BRS Alegria, *A. viridis* e das 34 progênes ao longo de 14 dias. 40
- Figura 3** - IVG, com a germinação média (A) sementes claras; (B) sementes escuras; ao longo de 14 dias. 41
- Figura 4** - Histograma da citometria de fluxo da amostra 21, Repetição 1 com tamanho diferenciado da Repetição 2 e do padrão interno de referência Ervilha 54
- Figura 5** - Quantidade de DNA nuclear: picos pretos representam espécies de *Amaranthus* e picos vermelhos, *Pisum sativum* e pró metáfases e metáfases mitóticas das progênes de A, *A. viridis* e B, *A. cruentus* cv. BRS Alegria, todas com $2n=2x=34$ cromossomos. 55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resumo da análise de variância da biometria das sementes, Comprimento, Espessura e Largura das sementes.....	35
Tabela 2 - Peso de mil sementes de progênes de <i>A. cruentus</i> , <i>A. viridis</i> e híbridos <i>A. cruentus</i> x <i>A. viridis</i>	37
Tabela 3 - Resumo da análise de variância do Teste de Germinação e Índice de Velocidade de Germinação (IVG).....	38
Tabela 4 - Valores médios do teste de germinação de progênes de <i>A. cruentus</i> , <i>A. viridis</i> e híbridos <i>A. cruentus</i> x <i>A. viridis</i>	39
Tabela 5 - Médias em ordem decrescente dos Testes de Germinação (GM em %), IVG, Espessura (ESP) e Comprimento (COMP), em mm, da semente e peso de mil sementes, em gramas, de progênes de <i>A. cruentus</i> , <i>A. viridis</i> e híbridos <i>A. cruentus</i> x <i>A. viridis</i> . As amostras com sementes pretas estão hachuradas. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade	42
Tabela 6 - Resumo da análise de variância da citometria de fluxo.....	52
Tabela 7 - Conteúdo de DNA nuclear (pg) em ordem decrescente de tamanho.	53

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO GERAL	1
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1- HISTÓRICO, USO E INTRODUÇÃO DA CULTURA DE AMARANTO NO BRASIL.....	3
2.2- DOMESTICAÇÃO DO AMARANTO	4
2.3- CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA.....	6
2.4- CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS.....	7
2.5- <i>Amaranthus cruentus</i>	8
2.6- CULTIVAR BRS ALEGRIA	8
2.7- <i>Amaranthus viridis</i>	9
2.8- CRUZAMENTOS NATURAIS COM BRS ALEGRIA	10
2.9- ANÁLISE DE SEMENTES.....	11
2.10- APLICAÇÃO DA CITOMETRIA DE FLUXO NO ESTUDO DO GENOMA VEGETAL.....	13
2.10.1- Princípios básico e instrumentações ou metodologia	13
2.10.2- Aplicação	14
2.10.3- Análise do conteúdo do DNA nuclear	15
2.10.4- Potencialidade da técnica no estudo de híbrido interespecífico de <i>Amaranthus</i>	15
2.11- ANÁLISE CITOGENÉTICA PARA IDENTIFICAÇÃO DE CARIÓTIPOS	16
3- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19

CAPÍTULO 1

Caracterização morfoagronômica de sementes de <i>Amaranthus cruentus</i> , <i>A. viridis</i> e seu provável híbrido interespecífico	28
RESUMO	29
ABSTRACT	30
1- INTRODUÇÃO	31
2- MATERIAL E MÉTODOS	33
2.1- MATERIAL BIOLÓGICO	33
2.2- BIOMETRIA DAS SEMENTES.....	33
2.3- PESO DE 1.000 SEMENTES	33

2.4- TESTE DE GERMINAÇÃO	34
2.5- ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG)	34
3- RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
3.1- BIOMETRIA DE SEMENTES.....	35
3.2- PESO DE MIL SEMENTES.....	36
3.3- TESTE DE GERMINAÇÃO E ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG)	38
4- CONCLUSÕES	43
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

CAPÍTULO 2

Estimativa do tamanho do genoma de <i>Amaranthus cruentus</i> cv. BRS Alegria, <i>Amaranthus viridis</i> e do híbrido interespecífico por de citometria de fluxo e contagem cromossômica.....	46
RESUMO.....	47
ABSTRACT	48
1- INTRODUÇÃO	49
2- MATERIAL E MÉTODOS.....	50
2.1- DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE DNA	50
2.2- CONTAGEM CROMOSSÔMICA.....	50
3- RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4- CONCLUSÕES	56
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

1- INTRODUÇÃO GERAL

O amaranto destinado à produção de grãos reúne espécies originária e domesticadas na América Tropical, representadas por *Amaranthus caudatus*, *A. cruentus*, *A. hypochondriacus* e *A. hybridus* (STALLKNECHT; SCHULZ-SACHAEFFER, 1993). Sua utilização como alimento remonta há milênios, por ser um grão rico em proteínas ou como hortaliça folhosa (PUTNAM et al., 1989). A produção vem aumentando consideravelmente em todo o mundo pois a cultura é capaz de se desenvolver em solos pobres e ainda pouco atacada por doenças e pragas (DA COSTA; BORGES, 2007).

O amaranto tem mostrado adaptabilidade às condições climáticas e edafológicas do Brasil Central (TEIXEIRA; SPEHAR; SOUZA, 2003). Como resultado do interesse no desenvolvimento desta cultura no Brasil, a Embrapa Cerrados, em Planaltina, DF, em cooperação com a Universidade de Brasília, têm trabalhado na inserção desta cultura no Brasil desde 1994. Resultados bastante promissores foram obtidos com o *Amaranto cruentus*, BRS Alegria (ASCHERI; CARVALHO; SPEHAR, 2004), que em sucessão aos cultivos de verão, em ausência de estresse hídrico e irrigado na entressafra, apresentou produções de biomassa e grãos em nível competitivo. Essas duas características, associadas ao curto período da emergência à maturação, a tornam um componente potencial do sistema plantio direto (SPEHAR et al., 2003).

Em amaranto BRS Alegria, novas combinações genótípicas com adaptabilidade ao Cerrado se originam de cruzamentos naturais, ensejando avanços no melhoramento genético (SANTOS, 2011). Paralelamente ao cultivo de amaranto comercial observa-se o cruzamento de plantas invasoras do gênero *Amaranthus*. Apesar das fases de crescimento e de desenvolvimento apresentarem baixa coincidência, é possível que durante a floração haja intercâmbio de pólen. Cruzamentos entre espécies cultivadas e de plantas invasoras podem tornar-se um problema ou uma oportunidade, dependendo do uso que se faça dos híbridos (SPEHAR, 2003a).

Dessa forma cruzamentos naturais entre *Amaranthus cruentus* e *A. viridis* podem resultar em recombinantes com alelos favoráveis à sua adaptação ao cultivo nas condições do Cerrado. Spehar (2003a) observou, pela primeira vez, possíveis cruzamentos interespecíficos de *A. viridis* em campo de amaranto BRS Alegria.

Além disso, a transferência de genes de espécies silvestres para espécies cultivadas via hibridação interespecífica é de grande interesse para a formação de novos recombinantes, ampliando-se a variabilidade e o potencial genético das espécies. Parentes silvestres de plantas cultivadas representam verdadeiros reservatórios de genes úteis que podem ser devidamente explorados, se transferidos para as espécies cultivadas (BÓREM, 2005). A hibridação interespecífica é uma importante ferramenta para a introgressão de genes de interesse em variedades cultivadas. Dessa maneira, complementam-se as características comerciais da espécie cultivada, com um ou mais fatores desejáveis provenientes dos materiais silvestres, como resistência a fatores abióticos (seca) e bióticos (micro-organismos patogênicos e insetos-praga). Outra consideração importante sobre a hibridação interespecífica relaciona-se com a ampla variabilidade genética geralmente obtida nas gerações subsequentes (SIQUEIRA; FONSECA; SONDHAL, 1988).

Diversas técnicas podem ser utilizadas na identificação desses híbridos, desde as baseadas em caracteres morfológicos, até as citogenéticas, citometria de fluxo (DOLEZEL, 1997), análises bioquímicas com sistemas isoenzimáticos (ABDULLAH et al., 1990), bandeamento cromossômico (SOARES FILHO et al., 1997), entre outras.

Ao longo dos anos de 2014 e 2015 foram coletadas na área de multiplicação de sementes da Fazenda Água Limpa, Universidade de Brasília, exemplares de possíveis cruzamentos entre *Amaranthus cruentus* e *A. viridis*. Indicativos de híbridos naturais foram baseados na coloração da planta, na presença de mancha na folha (*A. viridis*) e na conformação da panícula. Baseado nessas informações, o presente trabalho visa estudar o possível cruzamento natural entre *Amaranthus cruentus* cv BRS Alegria e a espécie silvestre, infestante de áreas agrícolas *Amaranthus viridis*. Espera-se o aporte genético da espécie invasora, com flexibilidade adaptativa frente às alterações ambientais de cultivo, conferindo capacidade de competição e sobrevivência (PITELLI, 1987), contribua com genes de maior adaptabilidade a *A. cruentus*.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- HISTÓRICO, USO E INTRODUÇÃO DA CULTURA DE AMARANTO NO BRASIL

No período pré-colombiano o grão de amaranto foi um dos alimentos básicos do Novo Mundo, tão importante quanto o milho e o feijão (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1984). Espécies do gênero *Amaranthus* têm sido utilizadas como hortaliça na América e em outras partes do mundo por muitos povos, mesmo antes da sua domesticação, conforme evidenciado por achados arqueológicos (TAPIA, 1990). Em regiões tropicais e subtropicais o amaranto tem sido considerado importante, especialmente por suas folhas, sendo cultivado e utilizado conjuntamente com milho, feijão e abóbora pelos Astecas, no Vale do México, Maias na Guatemala e os incas na América do Sul. No Peru, Bolívia e Equador, era consumido junto com a batata, milho e quinoa (MUJICA; BERTI; IZQUIERDO, 1997).

O gênero *Amaranthus* tem uma longa história de uso, seja como uma planta com fins ritualísticos, seja como alimento. Sua utilização como planta ornamental é também um fato recente. O nome “*Amaranthus*” deriva do grego “amarantos”, que significa “imperecível”, é uma referência adequada para longa duração da cor das inflorescências que pode variar entre vermelho profundo, verde ou amarelo (TOADER; ROMAN, 2009). O amaranto tem sido considerado como objeto de valor cultural por várias civilizações, estando presente, em muitos países, utilizado ao mesmo tempo como planta medicinal, nutricional e alimentícia (SANTOS; COSTA, 2007).

O amaranto se destaca por suas características nutricionais nos grãos e outras partes da planta. As folhas, brotos e talos tenros são consumidos na forma de molhos ou sopas, cozidos, como um prato principal ou mesmo in natura. Plantas trituradas têm sido usadas como forragem para o gado. As inflorescências podem ser usadas como componente ornamental. O amaranto não pertence à família das gramíneas, por conseguinte, não é considerado um cereal. No entanto, os grãos por apresentarem características semelhantes, na composição do grão, tem sido denominado pseudocereal (BRIEN; PRICE, 2008).

O grão de amaranto é usado na alimentação humana, de várias maneiras: como pipoca, em flocos como aveia ou moído na forma de farinha, para uso na produção em

pães, macarrão, panquecas, cereais, granulados, cookies ou em outros produtos à base de farinha (PUTNAM et al., 1989). É também utilizada como cobertura vegetal para a proteção do solo e, quando cultivada em associação com outras culturas, auxilia na absorção de nutriente, devido sua capacidade de extraí-los a uma profundidade maior (DA COSTA; BORGES, 2007).

Por não ser originária do Brasil, a planta e o grão têm sido pouco estudados, apesar de haver demanda interna, seu consumo não é mensurado. Existe, entretanto, um esforço técnico-científico entre diversos institutos de pesquisa, no sentido de adaptar três espécies graníferas americanas aos solos e ao clima do Cerrado brasileiro (AMAYA-FARFAN, J. ; MARCÍLIO, R. ; SPEHAR, 2005), e assim viabilizar o cultivo do amaranto em escala.

As espécies *A. caudatus*, *A. cruentus* e *A. hypochondriacus* têm sido alvo de diferentes estudos em virtude de suas características nutricionais e requerimentos para produção. O amaranto apresenta grande potencial para se tornar cultura valorizada e integrada aos sistemas de cultivo tradicionais ou modernos (TEIXEIRA; SPEHAR; SOUZA, 2003). O gênero *Amaranthus*, apresenta mais de 60 espécies, dentre elas *Amaranthus cruentus* da qual se obteve a cultivar BRS Alegria, primeira cultivar recomendada no Brasil (SPEHAR et al., 2003).

Dadas às características agronômicas, nutricionais e medicinais, o amaranto apresenta-se como uma cultura agrícola que poderá minimizar, num futuro próximo, as deficiências alimentares existentes em regiões pobres de muitos países em desenvolvimento (DA COSTA; BORGES, 2007).

2.2- DOMESTICAÇÃO DO AMARANTO

A composição genética atual das diversas culturas é o resultado da domesticação e melhoramento a que elas foram submetidas durante séculos. Dois dos principais fatores da evolução, a recombinação e a seleção, têm sido intensivamente utilizados pelos melhoristas com o emprego de métodos refinados desenvolvidos na primeira metade deste século. As mutações, o terceiro grande fator da evolução, são instrumentos adicionais, capazes de auxiliar os métodos convencionais de melhoramento para o aumento da variabilidade genética das espécies (DUVICK, 1986).

O amaranto granífero foi domesticado na América há mais de 6.000 anos pelas civilizações que nela se desenvolveram, tendo dispersado para outras partes do mundo (SAUER, 1993). O início da domesticação foi documentado nos depósitos de pólen, descobertos em levantamentos antropológicos, apesar da dificuldade em discriminá-los entre outras espécies afins. Assim, descobriu-se que, antes da origem da agricultura, tal qual se conhece na atualidade, algumas espécies de amaranto floresciam nos campos próximos a aldeias na pré-história (MUJICA; BERTI; IZQUIERDO, 1997).

Domesticações pré-históricas de variedades diferentes de amaranto ocorreram de forma independente na Ásia e nas Américas. Na Ásia espécies foram selecionadas principalmente como hortaliças, de crescimento rápido e folhas macias, sem o desenvolvimento grandes inflorescências ou grande produção de sementes. Nas Américas, a seleção foi diferenciada, principalmente, para o aumento da produção de grãos (SAUER, 1993).

Segundo Mujica *et al.* (1997), para a domesticação do amaranto o fator decisivo foi a seleção, pelos antigos agricultores, que aproveitaram formas mutantes de sementes claras, a partir daquelas de coloração escura e dormentes, predominantes nos tipos silvestres. Essa seleção possibilitou agregar outras características de interesse para o ser humano como tipo de planta, tamanho e formato de inflorescência e grãos maiores.

As espécies selvagens americanas incluíam algumas plantas de porte alto com inflorescências relativamente grandes. As variedades selecionadas, eram mais robustas e com enormes inflorescências. Em ambas as cultivares, asiáticas e americanas, selecionaram-se mutantes para vermelho-brilhante, vermelho-sangue, e outras pigmentações de plantas (SAUER, 1993).

De acordo com O'Brien e Price (2008) das várias espécies de amaranto, três foram selecionadas ao longo dos anos visando o consumo humano e animal. As espécies *A. hypochondriacus* (pena-do-príncipe) e *A. cruentus* (amaranto-roxo) são comumente cultivadas para a produção de grãos, enquanto *A. tricolor* (tampala) é cultivada, principalmente, para o aproveitamento das folhas. A quarta espécie, *A. caudatus* é cultivada para grãos, embora seja frequentemente cultivada como ornamental. Quando cultivadas para grão, as variedades de *A. caudatus* são mais bem adaptados para as terras tropicais altas, com temperaturas amenas. Outras espécies de amaranto cultivado são o *A. dubius* e *A. blitum*. Enquanto as espécies *A. retroflexus*

(caruru), *A. spinosus* (espinhoso amaranto) e *A. viridis* (caruru de mancha) são consideradas invasoras dos cultivos agrícolas do cerrado brasileiro (SPEHAR, 2003b).

2.3- CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA

O gênero *Amaranthus* pertence à família *Amaranthaceae* e possui mais de 60 espécies, dentre as mais importantes e conhecidas, pode-se citar: *Amaranthus caudatus* L.; *A. hypochondriacus* L.; *A. hybridus* L.; *A. tricolor* L.; *A. tristis* L.; *A. mangostanus* L.; *A. melancholicus* L.; *A. blitum* L.; *A. dubius* L.; *A. viridis* L. (MUJICA; BERTI; IZQUIERDO, 1997).

O gênero *Amaranthus* é uma espécie anual herbácea ou arbustiva, com diversas cores, verde, roxa ou púrpura, apresentando distintas variações intermediárias. O caule é cilíndrico e anguloso, com grossas estrias longitudinais, comprimento variável e espessura que diminui da base ao ápice. O caule pode ramificar-se; o início dessa ramificação ocorre na base, na axila das folhas ou à meia altura (SPEHAR, 2007).

A raiz é pivotante, com abundantes ramificações e múltiplas radículas finas que se estendem rapidamente. A raiz principal serve de suporte à planta, permitindo manter o peso da panícula, principalmente, quando os grãos se encontram cheios, antes da maturação fisiológica. As raízes primárias, que por sua vez apresentam consistência lenhosa, ancoram a planta quando ela cresce isolada (MUJICA; BERTI; IZQUIERDO, 1997).

Estudos mostraram que as plântulas de amaranto crescem a taxas diferentes, e que na fase adulta, podem variar de 5 a 200 cm de altura (MYERS-RL; JANICK-J, 2000). As sementes medem entre 1 a 1,5mm de diâmetro e 0,5mm de espessura. Podem ser brancas, amarelas, beges, rosadas, cinzas, vermelhas ou pretas. Grande parte de seu volume é preenchida pelo embrião, peso variando entre 0,49 e 0,93mg (NATIONAL RESERCH COUNCIL, 1984).

As plantas são monoicas na maior parte das espécies de amaranto (BRENNER, 2000); porém, são predominantemente autógamas, com variações no percentual de polinização cruzada nas cultivares. As flores são unissexuais muito pequenas, estaminadas no ápice e pistiladas na base, completando o glomérulo. O androceu é formado por cinco estames coloridos que mantêm as anteras por um ponto próximo da base; tornam-se bastante visíveis por ocasião da antese. O gineceu apresenta ovário

esférico, súpero coroado por três estigmas filiformes e pilosos que aloja uma semente (TAPIA, 1990).

Em amaranto, considera-se que a autogamia seja predominante, entretanto, há relatos de polinização cruzada em até 34%, variando conforme o ambiente, coincidência de floração e distância entre plantas de genótipos diferentes (MUJICA; BERTI; IZQUIERDO, 1997).

2.4 - CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS

Um das características agronômicas importantes do amaranto é a resistência ao estresse hídrico. Diferentemente de outras culturas alimentícias, o amaranto se desenvolve em condições desfavoráveis às dos cereais e às leguminosas, como é o caso das altas planícies da América do Sul. Outra característica importante é a sua capacidade de se desenvolver e frutificar em ambiente com luminosidade intensa, altas temperaturas (35 a 45°C) e restrição hídrica (AMAYA-FARFAN, J. ; MARCÍLIO, R. ; SPEHAR, 2005).

O amaranto é classificado como sensível ao fotoperíodo, uma planta de dias curtos, ou seja, inicia o florescimento quando os dias diminuem o comprimento. No entanto, estudos têm demonstrado que algumas espécies de amaranto se mostram pouco sensíveis (*A. hypochondriacus* e *A. cruentus*), crescendo satisfatoriamente em dias curtos, quando o plantio ocorre no outono na região de Cerrado (SPEHAR; SANTOS; JACOBSEN, 1998).

Durante as fases iniciais de crescimento da planta, o amaranto pode ser confundido com espécies semelhantes pertencentes ao mesmo gênero, plantas invasoras, a exemplo do *Amaranthus hybridus*, *A. deflexus*, *A. retroflexus*, *A. spinosus* e *A. viridis* L, conhecidos popularmente como caruru, caruru-bravo, bredo, caruru-rasteiro, entre outros (SPEHAR, 2003b).

Uma característica marcante do amaranto é sua capacidade de extrair nutrientes das camadas mais profundas do solo, o que poderá beneficiar outras culturas como o milho e a batata quando cultivadas em associação. As duas espécies de amaranto mais comumente cultivadas são *Amaranthus cruentus* e *Amaranthus hypochondriacus* (DA COSTA; BORGES, 2007).

As evidências indicam que a adaptação do amaranto a diversos ambientes e adversidades climáticas e de solos por maior eficiência de fotossíntese, melhor utilizando luz solar e água, em via de fixação de carbono C4 (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1984). Como uma planta C4, é uma das poucas dicotiledóneas em que o primeiro produto da fotossíntese é um composto de quatro carbonos. A combinação de características anatômicas resulta no aumento da eficiência de utilização de CO₂ sob ampla gama de temperatura e umidade, contribuindo à adaptabilidade geográfica da planta (STALLKNECHT; SCHULZ-SACHAEFFER, 1993).

2.5- *Amaranthus cruentus*

A espécie *Amaranthus cruentus* é um alimento antigo, vestígios foram encontrados em grutas de Tehuacan no México Central. Arqueólogos encontraram restos - tanto o grão pálido e os feixes de plantas trazidas para a debulha - em uma dúzia de níveis, que remontam há 5.500 anos. Esta espécie mexicana e guatemalteca é útil tanto como grão ou como hortaliça folhosa. Espécies destinadas a grãos têm sementes brancas; as utilizadas como hortaliças e aquelas usadas para extrair o corante vermelho, geralmente possuem sementes escuras. É provavelmente o mais adaptável, dentre as espécies de amaranto, florescendo sob ampla intensidade luminosa, diferentemente do que ocorre com outras espécies de amaranto (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1984).

Amaranthus cruentus é espécie anual, com ciclo variável, entre 90 a 100 dias, a depender da variedade. As sementes são pequenas e arredondadas; quando amadurecem, ao cair no solo, germinam rapidamente na presença de umidade. As plantas e suas respectivas inflorescências (panículas) possuem coloração variável entre o amarelo e roxo. No início do crescimento das plantas, por serem pequenas, são pouco competitivas com as invasoras. Após 30 dias de emergência, apresenta crescimento rápido. Variedades menos sensíveis ao fotoperíodo podem atingir até 2 m em semeaduras de verão ou safrinha, em presença de umidade favorável (SPEHAR; TEIXEIRA, 1999).

2.6- CULTIVAR BRS ALEGRIA

O *Amaranto cruentus* BRS Alegria originou-se de uma linhagem de *Amaranto cruentus* AM 5189, procedente dos Estados Unidos. Após dois anos de ensaios, a partir

de 1998, realizou-se seleção massal em AM 5189 e uniformizou-se em relação a características agronômicas (SPEHAR et al., 2003).

A BRS Alegria possui hipocótilo com coloração rósea. As folhas, grandes e alongadas, são verdes, com coloração rósea na nervura, na face abaxial. O caule, ereto, apresenta coloração rósea. A inflorescência diferenciada é terminal, compacta, apresenta coloração rósea, a qual permanece mesmo após a planta atingir a maturação fisiológica. A semente contida em fruto do tipo pixídio, deiscente, é arredondada e de coloração bege. As plantas demoram a secar após a maturação fisiológica; quando a semeadura se dá no período de sucessão à safra de verão, as plantas amadurecem em pleno período de seca, nos cerrados, o que permite melhor secagem e colheita dos grãos (SPEHAR et al., 2003). A planta apresenta estatura média de 180 cm. A diferenciação floral ocorre aos 30 dias após a emergência e a antese, aos 45 dias. O período entre a emergência e a maturação fisiológica é de 90 dias, com resistência das plantas ao acamamento. Os grãos colhidos e armazenados, com umidade de 12%, apresentaram peso médio de 0,68 g por 1.000 grãos e conteúdo de proteína de 15%. A maturação fisiológica ocorre aos 90 dias; e a produção pode chegar a 2,3 t ha⁻¹ (sementes) e 5,6 t ha⁻¹ (biomassa total) (FERREIRA, 2012).

A cultivar BRS Alegria se diferencia morfologicamente das plantas invasoras quanto ao comprimento, largura, cor da nervura das folhas, número de ramificação da inflorescência, entre outros aspectos. Porém, a característica mais relevante de diferenciação das espécies é a cor da semente, sendo que *A. cruentus* apresenta coloração bege e as espécies invasoras apresentam coloração escura/preta (SPEHAR, 2003b).

2.7- *Amaranthus viridis*

Amaranthus viridis é uma espécie originária do Caribe, encontrada em regiões tropicais e subtropicais do mundo, conhecido por infestar mais de 50 diferentes espécies cultivadas, estando presente nas lavouras em mais de 80 países. Destaca-se pela sua capacidade de adaptação ao meio ambiente e grande produção de sementes (FRANCISCHINI et al., 2014).

É uma planta comum em certas partes do Ásia, especialmente no Paquistão, onde é consumida como hortaliça (KHAN et al., 2011). Na Índia são encontradas

normalmente em áreas cultivadas e em terrenos baldios. Folhas e inflorescências são usadas na alimentação. Além disto, a planta é usada como diurético, e laxativo durante problemas de estômago (RAJASAB; ISAQ, 2004).

No Brasil foi relatada a intoxicação de suínos ligada à ingestão de *A. viridis* e *A. quitensis* causando nefrose tubular tóxica (LEMOS et al., 1993). Na Amazônia é conhecida popularmente como bredo, é também uma planta medicinal muito utilizada contra enfermidades em geral. Além disso, as folhas têm sido utilizadas no tratamento de problemas hepáticos e Leishmaniose (ALBINO et al., 2015).

A espécie é anual e se reproduz por semente, sendo comum ocorrer aglomerações densas por dificuldade de dispersão a partir das inflorescências. Mais comum em solos de cultivo, é planta herbácea, ereta, de caule cilíndrico, estriado longitudinalmente, liso ou com escassa pilosidade e de pouca ramificação quando ereto. Apresenta folhas simples, alternas, ovaladas, com margens regulares ou levemente onduladas, de coloração verde intensa, apresentando manchas acinzentadas ou castanho-avermelhadas na parte mediana. As inflorescências formam espigas densas de cor verde pálida, com possibilidade de pigmentação vermelha, na parte terminal dos ramos. Sobre o eixo das espigas estão as flores. Os frutos têm a superfície muito rugosa com coloração variando de castanho claro a castanho escuro e preto, com superfície lisa e brilhante. Os frutos apresentam deiscência espontânea, sendo responsáveis pela dispersão da espécie (GAZZIERO et al., 2006).

2.8- CRUZAMENTOS NATURAIS COM BRS ALEGRIA

A variabilidade genética dentro de espécies cultivadas torna possível ampliar sua adaptação às mudanças ambientais, contribuindo à sua evolução (MALUF; MARTINS, 1991). Cruzamentos naturais entre espécies de amaranto podem ocorrer baseados nas características morfológicas da flor, similaridade genômica e coincidência de florescimento para o fluxo de pólen (SPEHAR, 2003b).

Em áreas infestadas com espécies de invasoras, quando a floração coincide com a do amaranto cultivado, a produção de sementes e o cultivo comercial ficam comprometidos. As espécies podem produzir híbridos férteis entre si, por cruzamentos naturais. Nesse caso, o caráter indesejável de coloração escura da semente pode ser

transferido ao amaranto cultivado; por outro lado, pode-se excluí-lo via seleção, pois é de herança simples, condicionado por um par de genes dominantes (BRENNER, 2000).

Spehar (2003a) observou possíveis cruzamentos interespecíficos num campo de amaranto, onde havia plantas de coloração, altura similares a da cultivar BRS Alegria, entretanto apresentando panículas ramificadas e com sementes pretas. Do plantio dessas sementes surgiram plantas de amaranto, que na maturidade, apresentavam características de invasoras, mas com altura um pouco menor que a BRS Alegria, sendo consideradas de possível cruzamento com *A. viridis*. O autor também concluiu que tais plantas poderiam carregar genes de interesse, como resistência a seca e toxidez a alumínio, necessitando assim de mais estudo.

2.9- ANÁLISE DE SEMENTES

A análise de sementes é o exame de uma amostra com a finalidade de estabelecer a qualidade das sementes de um determinado lote, sendo esta definida por parâmetros genéticos, físicos, fisiológicos e sanitários (LOPES; NASCIMENTO, 2009). As Regras para Análise de Sementes (RAS) editadas pelo Ministério da Agricultura, apresentam procedimentos para a avaliação da qualidade de sementes, de acordo com cada espécie. As regras especificam os diferentes métodos de análises, tamanhos máximos para os lotes de sementes, o peso mínimo das amostras médias e de trabalho para a análise de pureza e determinação do número de sementes de outras espécies. Apresenta, ainda, instruções para o teste de pureza, germinação, umidade, tetrazólio, peso de mil sementes e outras determinações (BRASIL, 2009).

O teste de germinação é definido como sendo a emergência e desenvolvimento das estruturas essenciais do embrião, em laboratório, demonstrando sua aptidão para produzir uma planta normal sob condições favoráveis de campo (BRASIL, 2009). O teste de controle de qualidade deve ser realizado em condições ideais de laboratório sob controle de luz, umidade e de temperatura (FERREIRA; BORGHETTI, 2004).

Os principais objetivos do teste de germinação visam determinar o valor das sementes em comparação de diferentes lotes (VALADRES; PAULA, 2008). Para Carvalho (2000) o teste de germinação é o principal critério utilizado na avaliação da qualidade fisiológica das sementes, com implicações diretas no potencial germinativo. A emergência e desenvolvimento das estruturas essenciais do embrião demonstram a

aptidão da semente em produzir planta normal sob condições favoráveis de campo (BRASIL, 2009).

Existem vários trabalhos sobre a resposta de *Amaranthus* a fatores que influenciam a germinação, como demonstraram Thomas et al., (2006), ao avaliar a germinação de *A. viridis* a diferentes temperaturas de germinação, soluções de pH, substratos e profundidade de semeadura. Outros fatores influenciam o estabelecimento da planta como profundidade de semeadura (GHORBANI; SEEL; LEIFERT, 1999), luminosidade (GALLAGHER; CARDINA, 1998), potencial osmótico e salinidade (GHORBANI; SEEL; LEIFERT, 1999), hormonais (KEPCZYNSKI; CORBINEAU; COME, 1996) e temperatura (GHORBANI; SEEL; LEIFERT, 1999).

A influência da luminosidade e temperatura (CARVALHO; CHRISTOFFOLETI, 2007), do substrato (DA COSTA; DANTAS, 2009), do armazenamento (MOSCON, 2015; NOBRE et al., 2013), de herbicidas (DE CARVALHO; CHRISTOFFOLETI, 2007), de salinidade (COSTA, 2007), foram investigados nas condições agrícolas brasileiras.

Sementes com alto potencial fisiológico, capazes de germinar uniforme e rapidamente sob ampla variação do ambiente, são caracterizadas pelo teste de velocidade de germinação, de modo que a emergência tardia de plântulas reflete menor vigor. A rapidez e sincronia são muito importantes porque permitem reduzir o grau de exposição das sementes e das plântulas a fatores adversos (MARCOS FILHO, 2015).

O tamanho da semente também interfere no vigor da planta. Geralmente, sementes maiores produzem plântulas mais vigorosas, influenciando no peso e na quantidade de reserva disponibilizada para o eixo embrionário. Sementes pequenas tem inicialmente um desenvolvimento menor, porém com o passar do tempo essa diferença diminui e a planta se recupera, a depender da espécie (CARVALHO, 2000). Amarantho, por sua característica de C4, apresenta extraordinário crescimento, compensando pela pequenez da semente (TEIXEIRA; SPEHAR; SOUZA, 2003). Em algumas condições as sementes maiores podem ter piores desempenhos, em virtude de condições ambientais não favoráveis à sua qualidade ou devido a danos mecânicos.

2.10- APLICAÇÃO DA CITOMETRIA DE FLUXO NO ESTUDO DO GENOMA VEGETAL

A citometria de fluxo é uma técnica originalmente desenvolvida no final dos anos 1950 para a contagem e análise de células sanguíneas. Com o desenvolvimento técnico e com o aparecimento de novos fluorocromos, foi com naturalidade que o uso desta técnica se expandiu a outras áreas científicas, como a botânica e a microbiologia (LOUREIRO et al., 2012).

2.10.1- Princípios básico e instrumentações ou metodologia

A citometria de fluxo é uma técnica que envolve a análise das propriedades ópticas (dispersão da luz e fluorescência) de partículas que fluem numa suspensão líquida e baseia-se, na intensidade de fluorescência relativa de núcleos corados com um fluorocromo específico para o DNA (LOUREIRO; SANTOS, 2004). Os citômetros de fluxo são equipamentos utilizados para esse fim, possuindo um sistema constituído por cinco elementos: fonte (s) de radiação, (lâmpada de mercúrio ou laser), câmara de fluxo, unidades de filtros ópticos para seleção de intervalo de comprimento de onda específico a partir de ampla gama espectral, fotodiodos ou fotomultiplicadores para a detecção sensível e processamento dos sinais com interesse e unidade que processa os dados obtidos (SILVA et al., 2004).

Os citômetros de fluxo têm como princípio básico aspirar células ou partículas de uma suspensão previamente preparada e forçá-las a passar por uma câmara especial (flow cell) que faz com que as células fiquem envolvidas e centralizadas num fluxo contínuo de líquido (sheath fluid) e saiam desta câmara, uma após a outra, de modo que uma única célula seja interceptada pelo laser. Uma vez interceptada pelo laser, dois tipos de fenômenos físicos ocorrem e fornecem informações acerca da célula. Primeiro, uma parte da luz é espalhada (scatter) de acordo com as características morfológicas e estruturais da célula. O Forward Scatter (FS) se relaciona com o tamanho e o Side Scatter (SS) com a granularidade da célula ou partícula. Segundo, as células previamente coradas com fluorocromos, uma vez excitadas pelo laser, emitem luz de acordo com suas características fluorescentes, sendo utilizadas para examinar aspectos bioquímicos, biofísicos e moleculares das células. Uma série de lentes colocadas próximas a esta zona de interceptação (célula-laser) coletam a luz dispersa e enviam-na para tubos fotomultiplicadores (PMTs) que convertem o sinal luminoso em pulsos

elétricos, os quais são proporcionais à quantidade de luz dispersa ou fluorescente captada pelos PMTs (BERTHO, 2001).

Para a seleção e captação destes sinais luminosos, filtros óticos são usados para bloquear determinados comprimentos de onda da luz incidente e deixar passar somente a luz de comprimento de onda desejado. Os sinais elétricos gerados pelos PMTs são amplificados, convertidos para a forma digital e enviados para um computador. A amostragem dos dados, as análises e a interpretação podem, então, ser realizadas através de softwares específicos. Seis parâmetros são considerados básicos e podem ser medidos simultaneamente, são eles: tamanho celular (FS); granularidade interna das células (SS); fluorescência verde (FL1); fluorescência amarela (FL2); fluorescência laranja (FL3); Fluorescência vermelha (FL4); Fluorescência roxa (FL5) (BERTHO, 2001).

A dispersão da luz fornece dados quantitativos relativos ao tamanho e complexidade das partículas que estão a ser analisadas, enquanto através da fluorescência se pode quantificar qualquer composto celular que apresente autofluorescência ou que tenha sido previamente marcado com corantes fluorescentes. Os dados de cada partícula são obtidos em tempo real na forma de histogramas monoparamétricos ou biparamétricos, visualizados e interpretados com recurso a programas informáticos. É assim possível obter simultaneamente as distribuições dos valores de frequência e/ou densidade de cada parâmetro ótico medido. As análises a velocidades elevadas e com elevado rigor permitem analisar num curto espaço de tempo numerosas partículas de interesse, incluindo eventos raros que de outra forma poderiam passar despercebidos (DOLEZEL; GREILHUBER; SUDA, 2007).

2.10.2- Aplicação

A citometria de fluxo é uma ferramenta muito útil ao sequenciamento de DNA, já que permite determinar a quantidade de DNA a ser sequenciada em um genoma (FERREIRA, 2003), além de permitir posteriormente, a diferenciação entre espécies afins e/ou seus híbridos. A citometria de fluxo pode ser aplicada para análises de ploidia (MADON et al., 2008), determinação do sexo em uma fase prévia do crescimento, detecção de genotoxicidade, análises do ciclo celular, alterações ocorridas no DNA durante as fases de cultura de tecidos (SRISAWAT et al., 2005), análises e separações de cromossomos (DOLEZEL, 1994).

2.10.3- Análise do conteúdo do DNA nuclear

A maior parte das aplicações da citometria de fluxo na área da botânica relaciona-se à análise do conteúdo em DNA nuclear, seja em termos relativos, como análises do nível de ploidia, seja em termos absolutos, como estimativas do tamanho do genoma. As metodologias desenvolvidas para o efeito são baseadas no isolamento e coloração de núcleos vegetais (LOUREIRO et al., 2012).

O método mais simples e eficaz foi desenvolvido em 1983 (GALBRAITH et al., 1983), tendo passado por poucas modificações desde então. A metodologia consiste em obtenção do tecido vegetal (preferencialmente folhas jovens frescas, mas também sementes ou outros tecidos), posteriormente cortado com uma lâmina de barbear em uma placa de Petri com tampão de isolamento de núcleos. Trata-se de uma análise relativamente simples que permite quantificar o número de células que se encontra nas diversas fases do ciclo celular (G1, S e G2), cada fase com conteúdo de DNA distintos: na fase de crescimento celular (G1), uma célula diploide apresenta um conteúdo 2C (i.e., duas cópias de cada gene); durante a fase (S) ocorre a duplicação do genoma; e na segunda fase de crescimento celular (G2), o conteúdo de DNA nuclear é de 4C. Mesmo em folhas bastante jovens, o histograma apresenta um pico dominante que corresponde aos núcleos na fase G1, e um pico menor que corresponde aos núcleos na fase G2 (LOUREIRO, 2007).

As análises do conteúdo de DNA nuclear utilizam um padrão de referência cujo tamanho do genoma seja previamente conhecido. O padrão deve ser escolhido de acordo com a espécie estudada e com um conteúdo de DNA próximo, que não seja sobreposto aos picos 2C e 4C da planta a analisar (LOUREIRO, 2007). Para estimar o nível de ploidia, a posição do pico G1 de um histograma é comparada com o pico de uma planta padrão com uma ploidia conhecida (DOLEZEL, 1997). Em cruzamentos interespecíficos em que as espécies parentais diferem o suficiente no conteúdo em DNA nuclear a citometria de fluxo consegue detectar híbridos interespecíficos de acordo com os valores de DNA intermediários (HIRSCH et al., 2001; KELLER et al., 1996).

2.10.4- Potencialidade da técnica no estudo de híbrido interespecífico de

Amaranthus

Dentre as várias aplicações do uso da citometria de fluxo, citam-se a confirmação da natureza híbrida de populações resultantes de cruzamentos

intraespecífico ou interespecífico (DOLEZEL, 1997). Depois da obtenção de híbridos, a análise do conteúdo de DNA, por meio da citometria de fluxo, é um meio fácil e rápido de se confirmar o sucesso da ocorrência da hibridação (KATO; MII, 2012).

Trabalhos visando à identificação de híbridos por meio da citometria de fluxo, têm sido realizados em vários gêneros como *Eucalyptus* (GRATTAPAGLIA; BRADSHAW, 1994), *Elytrigia* (MAHELKA et al., 2005), *Brassica* (SABHARWAL; DOLEZEL, 1993), *Cucurbita* (SISKO et al., 2003), *Allium* (KELLER et al., 1996), *Cirsium* (BUREŠ et al., 2004), *Zea* (RAYBURN et al., 1993), *Alstroemeria* (BUITENDIJK; BOON; RAMANNA, 1997), *Actinidia* (HIRSCH et al., 2001), (TRABELSI et al., 2005) e *Elaeis* (CAMILLO, 2012).

Além de que a análise do conteúdo de DNA nuclear por meio da citometria de fluxo nas células em interfase é uma boa alternativa aos métodos microscópicos clássicos de contagem de cromossomos. A citometria de fluxo apresenta como vantagens: fácil preparação e processamento de dezenas de amostras em único dia de trabalho; não necessita de células em divisão; metodologia não destrutiva (uma amostra pode ser preparada, p.e., a partir de 50 mg de tecido foliar); é capaz de detectar mixoploidias. Por estes motivos, a citometria de fluxo é uma metodologia utilizada em diferentes áreas que vão desde a investigação básica até ao melhoramento de plantas e indústria (DOLEZEL, 1997).

2.11- ANÁLISE CITOGENÉTICA PARA IDENTIFICAÇÃO DE CARIÓTIPOS

A citogenética, área das ciências biológicas que reúne conhecimento da Citologia e da Genética, tem como objetivo o estudo e a compreensão das características dos cromossomos. Informações cromossômicas têm sido utilizadas na identificação de híbridos, em estudos taxonômicos, sistemáticos e evolutivos e em programas de melhoramento genético (HESLOP-HARRISON, 2000; LEWIS; ELVIN-LEWIS, 1995).

A partir da forma e do número de cromossomos se estabelece o cariótipo de espécies. A representação do cariótipo pode ser um cariograma (imagem dos cromossomos) ou um ideograma (esquema dos cromossomos) fornecendo informação substancial ao estabelecimento de relações entre espécies, relativa à organização dos cromossomos (SOARES-SCOTT et al., 2005).

Os cariogramas simétricos apresentam o centrômero localizado em região mediana ou submediana, enquanto aqueles cromossomos apresentando centrômeros terminais e cromossomos mais heterogêneos são assimétricos. O índice de assimetria é obtido pela razão entre o somatório do comprimento dos braços curtos na fase haplóide. O comprimento relativo dos cromossomos permite detectar rearranjos estruturais, tornando possível a detecção de modificações na posição do centrômero, número cromossômico, tamanho e posição de satélites (MAYEDA, 1997).

A análise citogenética clássica, em geral, é realizada em cromossomos metafásicos mitóticos, corados Giemsa ou o Carmim Acético, por exemplo. Em análise de células mitóticas, aspectos como o número e comprimento dos cromossomos, razão entre braços cromossômicos, padrão de condensação e de coloração, além de características físicas adicionais, como presença e posição de constrição secundária, permitem comparar espécies e identificar variações cromossômicas inter- e intra-específicas (GUERRA; DE SOUZA, 2002).

A simples e direta análise cariotípica pode identificar alterações ou aberrações cromossômicas numéricas e/ou estruturais, além de possibilitar a descrição do comportamento meiótico. Permite avaliar taxa de fertilidade, problemas de pareamento ou reconhecimento dos cromossomos homólogos nos parentais e na progênie híbrida, além dos casos de não disjunção, ou seja, não segregação das cromátides nas anáfases, podendo levar à formação de gametas aneuploides. Por outro lado, a caracterização citogenética detalhada, como o mapeamento físico cromossômico, possibilita a descrição clara da homologia cariotípica de variações da mesma espécie. Assim, com inclusão desta informação em esquemas de cruzamentos e retrocruzamentos, minimizam-se possíveis erros de seleção de progênies, determinando o percentual dos genomas parentais nos seus híbridos. Dessa forma, a indicação de parentais favoráveis às hibridações pode ser facilitada por meio do uso de características citogenéticas (SINGH, 2016).

Na constituição genômica de *Amaranthus* a maior parte das espécies apresenta $n = 16$ ou $n = 17$; com exceção de *A. dubius* com $n = 32$ (BRENNER, 2000). As espécies de amaranto são classificadas como paleoalelotetraplóides, com pareamento dos cromossomos restrito a cada genoma na meiose (GREIZERSTEIN; NARANJO;

POGGIO, 1997). No gênero *Amaranthus* os dois números gaméticos ($n = 16$ e $n = 17$) podem ocorrer na mesma espécie.

Entretanto, 32 cromossomos, correspondendo à fórmula $2n = 4x = 32$ têm sido relatados para *A. cruentus* (TANDON; TAWAKLEY, 1970), entretanto em outros trabalhos 34 cromossomos são descritos, correspondendo a 16 cromossomos em um dos genomas e a 18 em outro dos dois que compõe a espécie (GRANT, 1959; PAL; KHOSHOO, 1973; PALOMINO; RUBÍ, 1991). Brenner, (2000); Bonasora; Poggio; Greizerstein, (2013), e Samartini et al., (2016), também descreveram o número cromossômico como $n = 17$, enquanto que Clouse et al., (2016), o descreveram como $n = 16$. Não foi encontrada literatura sobre o cariótipo da cultivar BRS Alegria, evidenciando a necessidade de estudos.

Dentro de um gênero ou mesmo de uma espécie, podem ocorrer diversos números gaméticos que são múltiplos perfeitos, denominados de série poliplóide, sendo considerado como número básico o menor número haplóide dessa série, representado por x (GUERRA, 1988; RIEGER; MICHAELIS; GREEN, 1976).

Pal, Pandey e Khosoo, (1982), em seu trabalho sugeriram que o número gamético $n = 17$, foi originado a partir do $n = 16$ através de trissomia primária. Greizerstein e Poggio, (1994), embasados na análise citogenética de híbridos interespecíficos apoiam esta hipótese, e ainda propõem que as espécies com $2n = 32$ são poliploides (número básico $x = 8$) e $x_1 = 16$ é um número básico derivado. Então o número básico $x_2 = 17$ apareceu posteriormente, causado por trissomia primária. Greizerstein e Poggio (1994), ainda relataram as fórmulas do cariótipo e conteúdo total de DNA de quatro espécies de amaranto produtores de grãos no gênero *Amaranthus*. De acordo com os seus resultados *A. caudatus* de $2n = 32$, *A. cruentus* $2n = 34$, *A. hypochondriacus* $2n = 32$ e *A. Mantegazzianum* $2n = 32$ diferem na sua fórmula cariôtípica e mostram pequenas diferenças nos seus índices de assimetria A_1 e A_2 . Em alguns indivíduos de *A. caudatus* foi observado um pequeno cromossomo B.

Quanto a *A. viridis* o número cromossômico $n = 17$ foi encontrado (MADHUSOODANAN; NAZEER, 1983; SHEIDAI; MOHAMMADZADEH, 2008). Srivastava e Bijoy, (2012), confirmaram o número cromossômico $n = 17$ e analisaram o cariótipo, descrevendo a existência de 17 cromossomos, dos quais 7 são metacêntricos, 6 submetacêntricos e 4 subtelocêntricos.

3- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAH, G. et al. Intergeneric hybridization between *Poncirus trifoliata* and *Citrus meyeri* or Tangelo nova: determination by electrophoresis of zygotic or nucellar embryos from the cross *P. trifoliata* x Tangelo nova. **Fruits**, v. 45, n. 6, p. 51–597, 1990.

ALBINO, A. M. et al. PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DO EXTRATO ETANÓLICO DAS INFLORESCÊNCIAS E FOLHAS DE *Amaranthus viridis* L (AMARANTHACEAE). v. 2, n. 2, 2015.

AMAYA-FARFAN, J. ; MARCÍLIO, R. ; SPEHAR, C. R. Deveria o Brasil investir em novos grãos para a sua alimentação? A proposta do amaranto (*Amaranthus* sp.). Segurança alimentar e nutricional. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 12, n. 1, p. 47–56, 2005.

ASCHERI, J. L. R.; CARVALHO, C. W. P.; SPEHAR, C. R. **A Extrusão do Amaranto no Desenvolvimento de Produtos: Caracterização Físico Química**. 2004.

BERTHO, Á. L. **Citometria de fluxo**. [s.l.] Instituto Oswaldo Cruz, 2001.

BONASORA, M. G.; POGGIO, L.; GREIZERSTEIN, E. J. Cytogenetic studies in four cultivated *Amaranthus* (Amaranthaceae) species. **Comparative Cytogenetics**, v. 7, n. 1, p. 53–61, 2013.

BÓREM, A. A história da biotecnologia. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 34, p. 10–12, 2005.

BRASIL. **Regras para análise de sementes**. Brasília. p. 395, 2009.

BRENNER, D. Genetic resources and breeding of *Amaranthus*. **Plant Breeding Reviews**, 2000.

BRIEN, B. G. K. O.; PRICE, M. L. Grain & Vegetable Types What “s Inside : 2008.

BUITENDIJK, J.; BOON, E.; RAMANNA, M. Nuclear DNA Content in twelve Species of *Alstroemeria* L . and Some of their. **Annals of Botany**, v. 79, p. 343–353, 1997.

BUREŠ, P. et al. Genome size variation in Central European species of *Cirsium* (Compositae) and their natural hybrids. **Annals of Botany**, 2004.

CAMILLO, J. **DIVERSIDADE GENÉTICA, CONSERVAÇÃO IN VITRO DE GERMOPLASMA E ANÁLISE DO CONTEÚDO DE DNA NUCLEAR EM PALMA DE ÓLEO {*Elaeis guineensis* Jacq. E *Elaeis oleifera* (Kunth) Cortés}**. [s.l.] Universidade de Brasília, 2012.

CARVALHO, M. N. Germinação de sementes. **Sementes: Ciência, tecnologia e produção**, v. 4, 2000.

CARVALHO, S. J. P. DE; CHRISTOFFOLETI, P. J. Influência da luz e da temperatura na germinação de cinco espécies de plantas daninhas do gênero *Amaranthus*. **Bragantia**, v. 66, n. 4, p. 527–533, 2007.

CLOUSE, J. W. et al. The amaranth genome: genome, transcriptome, and physical map assembly. **The Plant Genome**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2016.

COSTA, D. M. A. DA. **IMPACTOS DO ESTRESSE SALINO E DA COBERTURA MORTA NAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DO SOLO E NO DESENVOLVIMENTO DO AMARANTO**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2007.

DA COSTA, D. M. A.; BORGES, A. S. Avaliação da produção agrícola do amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*). **Holos**, v. 1, p. 97–111, 2007.

DA COSTA, D. M. A.; DANTAS, J. A. Effects of substrate on the germination of amaranth seeds (*Amaranthus* spp). **Revista Ciencia Agronomica**, p. 498–504, 2009.

DE CARVALHO, S. J. P.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Influência da luz e da temperatura na germinação de cinco espécies de plantas daninhas do gênero *Amaranthus*. **Bragantia**, v. 66, n. 4, p. 527–533, 2007.

DOLEZEL, J. Plant Chromosome Analysis and Sorting by Flow Cytometry. **Critical Reviews in Plant Sciences**, 1994.

DOLEZEL, J. Application of flow cytometry for the study of plant genomes. **Journal of applied Genetics**, v. 3, n. 38, p. 285–302, 1997.

DOLEZEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. **Flow cytometry with plant cells, analysis of genes, chromosomes and genomes**. 2007.

DUVICK, D. N. Plant breeding: Past achievements and expectations for the future. **Economic Botany**, v. 40, n. 3, p. 289–297, jul. 1986.

FERREIRA, A.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao avançado**. 2004.

FERREIRA, C. C. **EFEITO DA DENSIDADE DE PLANTAS E DOSES DE NITROGÊNIO SOBRE A PRODUTIVIDADE, FENOLOGIA E COMPOSIÇÃO ORGANOMINERAL DE AMARANTO EM LATOSSOLO DE CERRADO**. [s.l.] Universidade de Brasília, 2012.

FERREIRA, M. E. Melhoramento genético de arroz: impactos da genômica. In: **Melhoramento genômico**. Viçosa, Minas Gerais, Brazil: Universidade Federal de Viçosa Press, 2003. p. 73–127.

FRANCISCHINI, A. C. et al. First report of *Amaranthus viridis* resistance to herbicides. **Planta Daninha**, v. 32, n. 3, p. 571–578, set. 2014.

GALBRAITH, D. W. et al. Rapid Flow Cytometric Analysis of the Cell Cycle in Intact Plant Tissues. **Science**, 1983.

GALLAGHER, R. S.; CARDINA, J. Phytochrome-mediated *Amaranthus* germination I: effect of seed burial and germination temperature. **Weed Science**, 1998.

GAZZIERO, D. L. P. et al. **Documentos Manual de identificação de plantas daninhas da cultura da soja**. Londrina, PR: Embrapa Soja, 2006.

GHORBANI, R.; SEEL, W.; LEIFERT, C. Effects of environmental factors on germination and emergence of *Amaranthus retroflexus*. **Weed Science**, 1999.

GRANT, W. F. CYTOGENETIC STUDIES IN *AMARANTHUS*.: III. Chromosome numbers and phylogenetic aspects. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v. 1, n. 4, p. 313–328, dez. 1959.

GRATTAPAGLIA, D.; BRADSHAW, H. D. Nuclear DNA content of commercially important Eucalyptus species and hybrids. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 24, n. 5, p. 1074–1078, 1994.

GREIZERSTEIN, E. J.; POGGIO, L. Karyological Studies in Grain Amaranths. **The Japan Mendel Society**, v. 59, n. 1964, p. 25–30, 1994.

GREIZERSTEIN, E.; NARANJO, C. A.; POGGIO, L. Karyological in Five Wild Species of Amaranths. **The Japan Mendel Society**, v. 62, n. Umsp 30, p. 115–120, 1997.

GUERRA, M.; DE SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Ribeirão Preto, p. 201, 2002.

GUERRA, M. DOS S. **Introdução à citogenética geral**. [s.l.] Guanabara Koogan, 1988.

HESLOP-HARRISON, J. S. Comparative genome organization in plants: from sequence and markers to chromatin and chromosomes. **The Plant cell**, v. 12, n. 5, p. 617–636, 1 maio 2000.

HIRSCH, A. et al. Embryo rescue from interspecific crosses in the genus *Actinidia* (kiwifruit). **Plant Cell Reports**, v. 20, n. 6, p. 508–516, 1 set. 2001.

KATO, J.; MII, M. Production of interspecific hybrids in ornamental plants. **Methods in Molecular Biology**, p. 233–245, 2012.

KELLER, E. R. J. et al. Interspecific crosses of onion with distant *Allium* species and characterization of the presumed hybrids by means of flow cytometry, karyotype analysis and genomic in situ hybridization. **Theoretical and Applied Genetics**, 1996.

KEPCZYNSKI, J.; CORBINEAU, F.; COME, D. Responsiveness of *Amaranthus retroflexus* seeds to ethephon, 1-aminocyclopropane 1-carboxylic acid and gibberellic acid in relation to temperature and dormancy. **Plant growth regulation**, 1996.

KHAN, M. et al. Pharmacognostic evaluation of the *Amaranthus viridis* L. **Research In Pharmaceutical Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 11–16, 2011.

LEMOS, R. A. et al. Intoxicação espontânea por *Amaranthus spinosus* (Amaranthaceae) em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 13, n. 1/2, p. 25–34, 1993.

LEWIS, W. H.; ELVIN-LEWIS, M. P. **Medicinal Plants as Sources of New Therapeutics** *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 1995.

- LOPES, A. C. A.; NASCIMENTO, W. M. **Análise de sementes de hortaliças**. Gama: [s.n.].
- LOUREIRO, J. et al. Aplicações da citometria de fluxo em horticultura. **Revista da Associação Portuguesa de Horticultura**, v. 108, n. MARCH, p. 25–28, 2012.
- LOUREIRO, J. C. M. Flow cytometric approaches to study plant genomes. v. Doctor of, 2007.
- LOUREIRO, J.; SANTOS, C. Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal. **Boletim de Biotecnologia**, v. 77, n. Doležel 1991, p. 18–29, 2004.
- MADHUSOODANAN, K. J.; NAZEER, M. A. Comparative morphology of the somatic karyotypes of vegetable amaranths and its phylogenetic significance. v. 48, n. 2, p. 237–244, 1983.
- MADON, M. et al. Application of flow cytometry for estimation of nuclear DNA content in *Elaeis*. **Journal of Oil Palm Research**, 2008.
- MAHELKA, V. et al. Genome size discriminates between closely related taxa *Elytrigia repens* and *E. intermedia* (Poaceae: Triticeae) and their hybrid. **Folia Geobotanica**, 2005.
- MALUF, A. M.; MARTINS, P. S. Caracterização preliminar de *Amaranthus hybridus* L. e *Amaranthus viridis* L. através de isoenzimas. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, v. 48, p. 23–39, 1991.
- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de Sementes de Plantas Cultivadas**. 2005.
- MAYEDA, L. Y. **Estudos Citogenéticos em Dez Táxons do Gênero Passiflora L. (Passifloraceae)**. [s.l.] USP, Piracicaba, 1997.
- MOSCON, E. S. **Cinética de secagem e propriedades físicas de quinoa e amaranto e qualidade de sementes de quinoa**. 2015.
- MUJICA, A.; BERTI, M.; IZQUIERDO, J. **El cultivo del amaranto (*Amaranthus* spp.): producción, mejoramiento genético y utilización**. Santiago de Chile: FAO, 1997.
- MYERS-RL; JANICK-J. Amaranth: new crop opportunity. **Progress in new crops**:

Proceedings of the Third National Symposium Indianapolis, Indiana, 22 25 October, 1996, 2000.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Amaranth: Modern prospects for an ancient crop**. 1984.

NOBRE, D. A. C. et al. Influência do ambiente de armazenamento na qualidade fisiológica de sementes de amaranto. v. 4, n. 2, p. 216–219, 2013.

PAL, M.; KHOSHOO, T. N. Evolution and improvement of cultivated amaranths. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 43, n. 8, p. 343–350, 1973.

PAL, M.; PANDEY, R. M.; KHOSHOO, T. N. Evolution and improvement of cultivated amaranths: IX. Cytogenetic relationship between the two basic chromosome numbers. **Journal of Heredity**, v. 73, n. 5, p. 353–356, 1982.

PALOMINO, G.; RUBÍ, R. Diferencias cromosómicas entre algunas especies y tipos del género *Amaranthus* distribuidos en México. In: **Actas Primer Congreso Internacional del Amaranto**. Morelos, Mexico. 1991.

PITELLI, R. A. Competição e Controle das Plantas Daninhas em Áreas Agrícolas. **Série Técnica IPEF**, v. 4, n. 12, p. 24, 1987.

PUTNAM, D. H. et al. **Amaranth. Alternatie field crops manual**. Univ. Wisc ed. St Paul: Univ. Minesota, 1989.

RAJASAB, A H.; ISAQ, M. Documentation of folk knowledge on edible wild plants of North Karnataka. **Indian Journal of Traditional Knowledge**, v. 3, n. 4, p. 419–429, 2004.

RAYBURN, A. L. et al. Nuclear DNA content in F1 hybrids of maize. **Heredity**, 1993.

RIEGER, R.; MICHAELIS, A.; GREEN, M. M. **Glossary of genetics and cytogenetics. Classical and molecular**. [s.l.] Springer Verlag, 1976.

SABHARWAL, P. S.; DOLEZEL, J. Interspecific hybridization in Brassica: Application of flow cytometry for analysis of ploidy and genome composition in hybrid plants. **Biologia Plantarum**, v. 35, n. 2, p. 169–177, jun. 1993.

SAMARTINI, C. Q. et al. Número cromossômico e conteúdo de DNA nuclear em

espécies do gênero *Amaranthus* (Amaranthaceae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 8, p. 998–1001, 2016.

SANTOS, E. C. **Avaliação agronômica de progênies em híbridos naturais de amaranto na cultivar BRS Alegria**. 2011.

SANTOS, P. G.; COSTA, D. M. A. Vantagens do cultivo de amaranto. **II Congresso De Pesquisa E Inovação Da Rede Norte Nordeste De Educação Tecnológica**, n. 1, 2007.

SAUER, J. D. Historical Geography of Crop Plants: A Select Roster. In: **Historical Geography of Crop Plants: A Select Roster**. 1993.

SHEIDAI, M.; MOHAMMADZADEH, Z. Cytogenetic study of *Amaranthus* L. species in Iran. **Cytologia**, v. 73, n. 1, p. 1–7, 2008.

SILVA, T. L. et al. Citometria de fluxo: funcionalidade celular on-line em bioprocessos. **Boletim de Biotecnologia**, v. 77, p. 32–40, 2004.

SINGH, R. J. Karyotype Analysis. In: **Plant Cytogenetics**. Urbana, Illinois, USA: CRC Press, 2016. p. 141–151.

SIQUEIRA, W. J.; FONSECA, M. I. S.; SONDHAL, M. R. Regeneração de plantas híbridas entre *Lycopersicon esculentum* e *L. peruvianum* a partir de calos com dois anos de cultura in vitro. **Bragantia**, v. 47, n. 1, p. 1–8, 1988.

SOARES-SCOTT, M. D. et al. Citogenética clássica e molecular em passifloras. In: **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. [s.l: s.n.]. p. 210–240.

SOARES FILHO, W. DOS S. et al. **Programa de melhoramento genético de citros da EMBRAPA-CNPMF: obtenção de híbridos**. Cruz das Almas: EMBRAPA-CNPMF, 1997.

SPEHAR, C. R. et al. Amaranto BRS Alegria: Alternativa para diversificar os sistemas de produção. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 5, p. 659–663, 2003.

SPEHAR, C. R. Spontaneous Hybridization Between *A. cruentus* cv. BRS Alegria and *A. viridis*. **Legacy**, v. XV, 2003a.

SPEHAR, C. R. Diferenças morfológicas entre *Amaranthus cruentus*, cv. BRS Alegria,

e as plantas daninhas *A. hybridus*, *A. retroflexus*, *A. viridis* e *A. spinosus*. **Planta Daninha**, v. 21, n. 3, p. 481–485, dez. 2003b.

SPEHAR, C. R. **Amaranto; opção para diversificar a agricultura e os alimentos**. Planaltina: EMBRAPA CERRADOS, 2007.

SPEHAR, C. R.; SANTOS, R. L. B.; JACOBSEN, S.-E. **Andean grain crop introduction to the Brazilian Savannah**. Rio de Janeiro: [s.n.].

SPEHAR, C. R.; TEIXEIRA, D. L. **Amaranto: alternativa na cobertura do solo e na produção de grãos** Guia técnico do produtor rural. EMBRAPA CERRADOS, 1999.

SRISAWAT, T. et al. Flow cytometric analysis of oil palm : a preliminary analysis for cultivars and genomic DNA alteration. **Songklanakarian J Sci Technol**, v. 27, n. June 2005, p. 645–652, 2005.

SRIVASTAVA, R.; BIJOY, K. R. CYTOGENETIC STUDIES : KARYOTYPIC AND EVOLUTIONARY ASPECTS OF SOME CULTIVATED AND WILD SPECIES OF *AMARANTHUS* L. **International Journal of Innovations in Bio-Sciences**, v. 2, n. 3, p. 154–161, 2012.

STALLKNECHT, G. F.; SCHULZ-SACHAEFFER, J. R. Amaranth Rediscovered. **New Crops**, p. 211–218, 1993.

TANDON, S. L.; TAWAKLEY, M. No Title. In: **IOPB Chromosome Number Reports. XXVI**. [s.l: s.n.]. p. 264–269, 1970.

TAPIA, M. E. **Cultivos andinos subexplotados y su aporte a la alimentación**. Santiago de Chile: FAO, 1990.

TEIXEIRA, D. L.; SPEHAR, C. R.; SOUZA, L. A. C. Caracterização agrônômica de amaranto para cultivo na entressafra no Cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 1, p. 45–51, 2003.

THOMAS, W. E. et al. Influence of environmental factors on slender amaranth (*Amaranthus viridis*) germination. **Weed Science**, v. 54, n. 2, p. 316–320, 2006.

TOADER, M.; ROMAN, G. V. Experimental Results Regarding Morphological , Biological an Yield Quality of *Amaranthus Hypochondriacus* L . Species Under the

Central Part of Romanian Plain Conditions Rezultate Experimentale Privind Caracteristicile Morfologice , Biologice Şi De Calitat. v. 41, n. 1, p. 54–57, 2009.

TRABELSI, S. et al. Somatic hybrids between potato *Solanum tuberosum* and wild species *Solanum vernei* exhibit a recombination in the plastome. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, 2005.

VALADRES, J.; PAULA, R. C. DE. Qualidade fisiológica de lotes de sementes de *Poecilanthe parviflora* Benth (Fabaceae - Faboideae). **Ceres**, v. 55, n. 4, p. 273–279, 2008.

CAPÍTULO 1

Caracterização morfoagronômica de sementes de *Amaranthus cruentus*, *A. viridis* e seu provável híbrido interespecífico

CARACTERIZAÇÃO MORFOAGRONÔMICA DE SEMENTES DE *AMARANTHUS CRUENTUS*, *A. VIRIDIS* E SEU PROVÁVEL HÍBRIDO INTERESPECÍFICO

RESUMO

No gênero *Amaranthus* a coloração da semente é importante, permitindo separar espécies invasoras ou silvestres das cultivadas. Estudos conduzidos pela Universidade de Brasília em campo de produção de *A. cruentus*, cultivar BRS Alegria, infestado com a espécie silvestre invasora *A. viridis*, evidenciou a presença de plantas diferenciadas e com características intermediárias entre as duas espécies. As plantas híbridas apresentavam em sua morfologia combinação de características e de sementes da respectiva espécie cultivada e silvestre, dentre elas, mancha na folha, típica de *A. viridis*, coloração vermelha do caule e da inflorescência, típicos de *A. cruentus*, ramificação da inflorescência típica de *A. viridis*. Este estudo objetivou confirmar a ocorrência de cruzamento interespecífico gerando híbridos de interesse ao melhoramento genético de *A. cruentus*. Avaliaram-se as características biométricas e germinativas das sementes de *A. viridis*, *A. cruentus* e seu provável híbrido interespecífico. Sementes coletadas de 36 plantas de *A. viridis*, *A. cruentus* e do possível híbrido interespecífico, colhidas no ano de 2015, na área experimental da Fazenda Água Limpa, da Universidade de Brasília. No estudo biométrico, realizado com o auxílio de lupa Leica EZ4 HD e do programa LAS EZ (Leica Application Suite, versão 3.2.1), determinaram-se comprimento, largura e a espessura de 50 sementes por planta, sendo o comprimento da semente medido a partir do hilo em direção à extremidade oposta. Para o peso de mil sementes foi realizada a contagem, ao acaso, de oito repetições de 100 sementes, pesadas em balança analítica e calculando-se a variância, o desvio padrão e o coeficiente de variação dos valores obtidos nas pesagens. Para os testes de germinação, e índice de velocidade de germinação (IVG) foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes de cada tratamento, semeadas em duas folhas de papel mata borrão (germitest), com três vezes o seu peso em água destilada, colocados no interior de caixas plásticas do tipo gerbox. As caixas foram mantidas em câmara de germinação tipo B.O.D. regulada a temperatura de 20°C. Existe alta variabilidade entre as 36 plantas, pois apresentaram diferença significativa no comprimento e espessura das sementes para todos os indivíduos avaliados. O peso de mil sementes variou entre 354,3 e 923,7 mg verificando-se correlação positiva entre coloração e peso de mil sementes, em que aquelas de coloração escura apresentaram sementes mais leves, quando comparadas às de sementes claras. A germinação também apresentou efeitos ligados a coloração da semente, onde as sementes escuras apresentaram uma germinação tardia.

Palavras-chave: Amarantho; melhoramento genético; coloração de semente; peso de semente; velocidade de germinação.

ABSTRACT

In the genus *Amaranthus* seed color is important, allowing to separate invasive or wild species of the cultivated ones. Studies carried out by the University of Brasília in *A. cruentus* production field, cv. BRS Alegria, infested with the invasive wild species *A. viridis*, evidenced the presence of differentiated plants with intermediate characteristics between the two species. Hybrid plants had a combination of characteristics and seeds of the respective cultivated and wild species, including *A. viridis* leaf spot, red stem color and inflorescence, typical of *A. cruentus*, inflorescence branching Typical of *A. viridis*. This study aimed to confirm the occurrence of interspecific crosses generating hybrids of interest for the genetic improvement of *A. cruentus*. The biometric and germinative characteristics of *A. viridis*, *A. cruentus* and its probable interspecific hybrid were evaluated. Seeds collected from 36 plants of *A. viridis*, *A. cruentus* and the probable interespecific hybrid, harvested in the year 2015, in the experimental area of Fazenda Água Limpa, University of Brasilia. In the biometric study, the length, width and thickness of 50 seeds per plant were determined using the Leica EZ4 HD magnifier and the LASEZ program (Leica Aplicacion Suite, version 3.2.1). The length of the seed was measured from the hylum towards the opposite end. For the weight of one thousand seeds, eight replicates of 100 seeds were weighed in analytical balance and subject to variance analysis. For germination and germination velocity index (GVI) tests, four replicates of 50 seeds of each treatment were sown on two sheets of germitest paper, soaked with distilled water, three times their dry weight, inside gerbox plastic boxes. The boxes were kept in a germinating chamber (B.O.D.), regulated at 20 ° C temperature. There was high variability among the 36 plants, as they showed a significant difference in seed length and thickness for all individuals evaluated. The weight of a thousand seeds ranged from 354.3 to 923.7 mg, with a positive correlation between staining and weight of one thousand seeds, in which those with a dark color had smaller seeds when compared to those with light seeds. The germination also showed effects related to seed coloration, where the dark seeds presented a late germination due to low permeable testa.

Keywords: Amaranth; Genetic enhancement; Seed coloration; Seed weight; Germination speed.

1- INTRODUÇÃO

As sementes de amaranto apresentam grande potencial para uso na dieta alimentar e aplicação na indústria de alimentos, sendo ingrediente de uma grande variedade de produtos. As sementes e seus derivados contêm substâncias que desempenham várias atividades biológicas na alimentação, como inibidores de protease, atividades antimicrobianas, compostos peptídicos, lecitinas, e compostos antioxidantes (SOARES, 2008).

No gênero *Amaranthus* a coloração da semente é muito importante, pois permite separar espécies invasoras ou silvestres das cultivadas. Aquelas que apresentam semente clara não tem dormência, em contraste com as que apresentam sementes pretas, que se armazenam no solo formando bancos de sementes, que germinam gradativamente e colonizam áreas cultivadas (SPEHAR, 2003).

Essa característica de coloração é condicionada por até dois pares de genes, nos quais coloração escura representa o alelo dominante sobre a clara (KULAKOW; HAUPTLI; JAIN, 1985). Nesse gênero seus ancestrais apresentavam sementes de coloração escura e dormentes. Isso sugere que mutações estratégicas têm ocorrido ao longo de milhares de anos para sementes claras e selecionadas durante a domesticação das espécies (SPEHAR, 2007).

As plantas invasoras do gênero *Amaranthus* apresentam alta viabilidade e produção de sementes (superior a 200.000 em plantas de grande porte), extenso período de germinação, com dificuldade de identificação das diferentes espécies e crescimento rápido (AHRENS; WAX; STOLLER, 1981; HORAK; LOUGHIN, 2000; KISSMAM; GROTH, 1999). Estudos realizados por Spehar (2003) evidenciaram que a característica mais relevante de diferenciação das espécies tidas como invasoras de *Amaranthus* é a cor da semente, onde o *A. cruentus* apresenta coloração bege dos grãos, e as espécies de plantas daninhas apresentam coloração escura/preta dos mesmos.

As sementes de amaranto têm diâmetro que varia de 1,0 a 1,5 mm e espessura de 0,5 mm. Apresentam coloração variada: branca, bege, amarela, rosada, cinza, vermelha ou preta. O embrião ocupa grande parte de seu volume. O peso dos grãos varia de 0,49 a 0,93 mg (NATIONAL RESERCH COUNCIL, 1984).

O presente estudo teve como objetivo avaliar as características biométricas e a capacidade germinativa das sementes de *A. viridis*, *A. cruentus* e seu possível híbrido interespecífico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1- MATERIAL BIOLÓGICO

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Tecnologia e Análises de Sementes, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, FAV, Universidade de Brasília, Brasília, DF e no Laboratório de Cultura de tecidos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília, DF, nos anos de 2015 e 2016.

Durante 2014 e 2015, foram coletadas na área de multiplicação de sementes de amaranto na Fazenda Água Limpa, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 34 plantas de *Amaranthus cruentus* cv. BRS Alegria e prováveis híbridos com *Amaranthus viridis*, visando o estudo de progênies. As plantas híbridas apresentavam em sua morfologia combinação de características e de sementes da respectiva espécie cultivada e silvestre, dentre elas, destacaram-se a mancha na folha, típica de *A. viridis*, a coloração vermelha do caule e da inflorescência, típicos de *A. cruentus* e a ramificação da inflorescência típica de *A. viridis*. As sementes foram obtidas por trilha manual, secadas até atingir 13 % de umidade e armazenadas em câmara fria.

Assim, o experimento foi composto pelas progênies, incluindo-se mais dois tratamentos controle, um com sementes de *Amaranthus cruentus* cv. BRS Alegria e outro com sementes de *Amaranthus viridis*, também colhidas na área de multiplicação de sementes de amaranto na Fazenda Água Limpa, em 2015, totalizando 36 tratamentos.

2.2- BIOMETRIA DAS SEMENTES

Os estudos biométricos foram realizados com o auxílio de lupa Leica EZ4 HD e do programa LAS EZ (Leica Application Suite, versão 3.2.1), para determinação do comprimento, largura e a espessura de 50 sementes de cada uma das 36 plantas, sendo o comprimento da semente medido a partir do hilo em direção à extremidade oposta. Para a análise estatística foram consideradas cinco repetições, cada repetição com a média de 10 sementes, em delineamento experimental inteiramente casualizado.

2.3- PESO DE 1.000 SEMENTES

De acordo com a metodologia estabelecida pela RAS - Regras para Análises de Sementes, (BRASIL, 2009), contaram-se ao acaso oito amostras de 100 sementes para cada tratamento. Em seguida as sementes de cada repetição foram pesadas, calculando-se então a variância, o desvio padrão e o coeficiente de variação dos valores obtidos nas

pesagens. O resultado da determinação foi calculado multiplicando-se por 10 o peso médio obtido das repetições de 100 sementes, sem que o coeficiente de variação excedesse 4%, obtendo-se o peso de 1.000 sementes.

2.4- TESTE DE GERMINAÇÃO

Foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes de cada tratamento, semeadas em duas folhas de papel mata borrão (germitest), com três vezes o seu peso em água destilada, colocados no interior de caixas plásticas do tipo gerbox (11 x 11 x 3 cm). As caixas foram mantidas em câmara de germinação tipo B.O.D. regulada a temperatura de 20°C. A avaliação de plântulas normais foi realizada do quinto dia até o décimo quarto dia, seguindo os preceitos da Regras para Análises de Sementes - RAS (BRASIL, 2009). Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais.

2.5- ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG)

Determinado através de contagens diárias, realizadas no mesmo horário, do número de plântulas normais identificadas no teste de germinação. As avaliações foram realizadas até o décimo quarto dia e o IVG foi calculado seguindo a fórmula de Maguire (1962):

$$IVG = \frac{G_1}{N_1} + \frac{G_2}{N_2} + \dots + \frac{G_n}{N_n}$$

em que IVG = índice velocidade de germinação; G_1, G_2, \dots, G_n = número de plântulas normais a cada dia; N_1, N_2, \dots, N_n = número de dias decorridos da semeadura da primeira até a última contagem.

Para comparação dos resultados da biometria, do teste de germinação e do índice de velocidade de germinação de sementes, foram feitas as análises estatísticas por meio da análise de variância pelo Teste de Scott-Knott, com o auxílio do programa ASSISTAT versão 7.7p (SILVA; AZEVEDO, 2016).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1- BIOMETRIA DE SEMENTES

A espessura e o comprimento das sementes diferem estatisticamente entre si, enquanto a largura das sementes não apresenta diferença estatística significativa, como mostrado na análise de variância, apresentaram efeito significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F (Tabela 1).

Tabela 1 - Resumo da análise de variância da biometria das sementes, Comprimento, Espessura e Largura das sementes.

Fonte de Variação	Comprimento			Espessura		Largura	
	GL	QM	F	QM	F	QM	F
Progênie	35	0,03744	45,9900**	0,03360	48,7633**	16,14139	0,9803ns
Resíduo	144	0,00081		0,00069		16,04900	
Total	179						

** Significativo a 1% de probabilidade pelo Teste F.

ns - Não significativo ($p > 0,05$)

A espessura das sementes variou de 0,56 a 0,84 mm, enquanto que o comprimento variou de 1,11 a 1,40 mm e a largura de 1,07 a 1,30 mm. A biometria das sementes de *A. cruentus* cv. BRS Alegria, após a antese, tendo a espessura, comprimento e largura, variando respectivamente, de 0,62 a 078 mm; de 1,29 a 1,38 mm e de 1,14 a 1,25 mm (MENDES, 2014). Nieto (1990) a descreve como tendo de 1 a 1,5 mm de comprimento, enquanto que Teixeira et al., 2003, observaram que as sementes têm de 1 a 1,5 mm de comprimento e 0,5 mm de espessura.

As medidas foram feitas com auxílio da lupa Leica EZ4 HD (Figura 1), ao invés do paquímetro (MENDES, 2014; TEIXEIRA; SPEHAR; SOUZA, 2003), pela dificuldade em lidar com o tamanho diminuto da semente, facilitando a padronização das medidas, evitando-se possíveis erros. A lupa permite observar que as sementes de *A. cruentus* e *A. viridis*, se assemelham, no formato, com as de *A. spinosus* descrita por

Andrade (2007) tendo conformação ovalada, coloração clara brilhante em *A. cruentus* e escura brilhante em *A. viridis*, com tegumento delgado e liso, com presença de pleurograma. O hilo é basal e apresenta uma pequena fenda circular na sua borda.

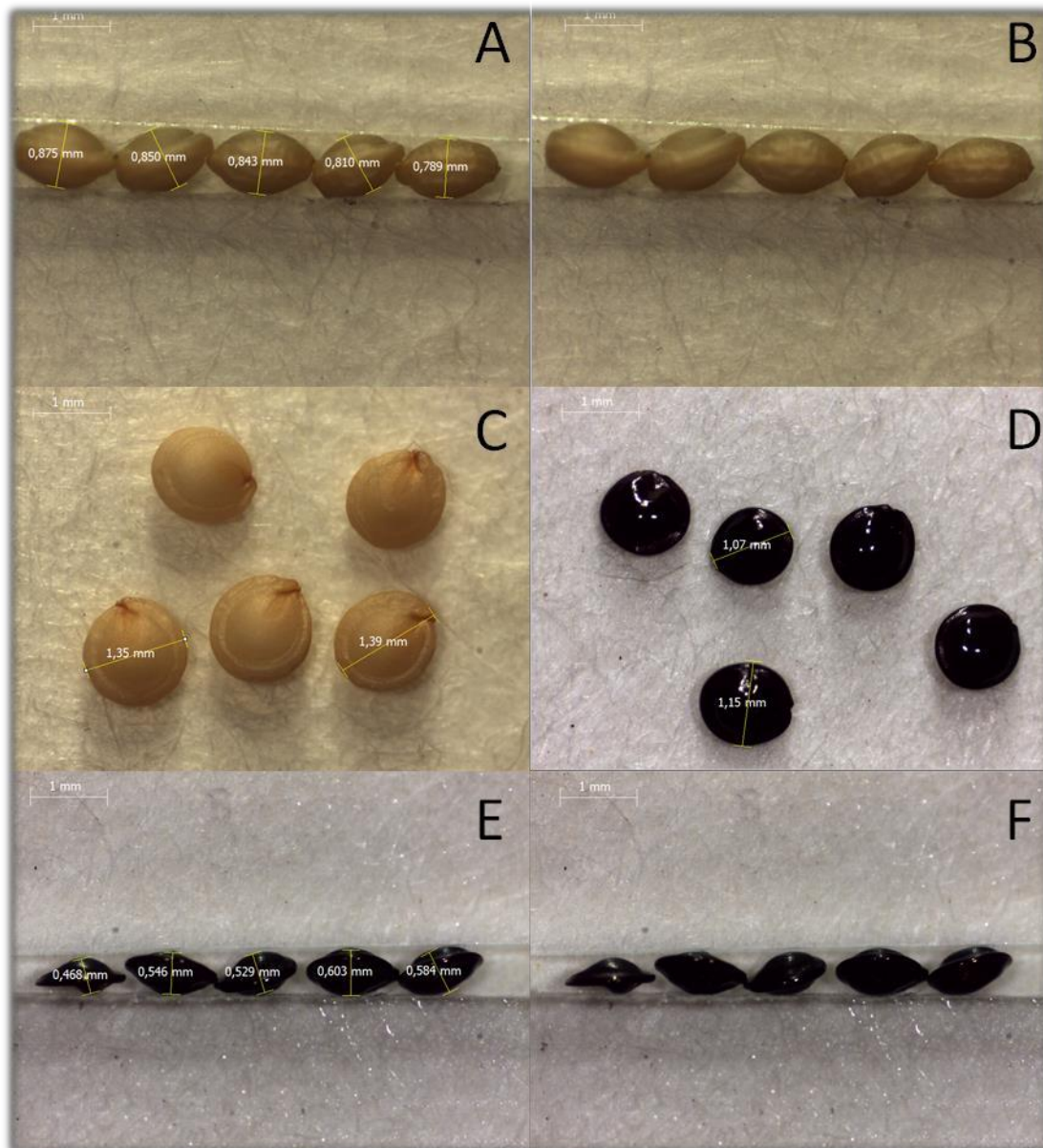


Figura 1- Biometria das sementes de *A. cruentus* (A, B e C) e *A. viridis* (D, E e F) com auxílio da Lupa Leica EZ4 HD e do programa LAS EZ (versão 3.2.1) medindo a espessura (A e E), o comprimento e a largura (C e D) das sementes.

3.2- PESO DE MIL SEMENTES

O peso de mil sementes mostrou variações entre 0,35g para progênies de *A. viridis* e 0,92g para progênies de *A. cruentus*, (Tabela 2). Estes valores se aproximam aos

relatados pelo National Reserch Council (1984), entre 0,49 a 0,93 mg por semente. Enquanto que *A. cruentus* cultivar BRS Alegria apresentam peso médio de 0,70 g em 1000 sementes (COSTA, 2007). Variações na densidade de sementes pode ter relação com o ambiente produtivo e com a quantidade de umidade na semente, explicando diferenças registradas na literatura.

Tabela 2 - Peso de mil sementes de progênes de *A. cruentus*, *A. viridis* e híbridos *A. cruentus* x *A. viridis*.

PROGÊNIE	1.000 Sementes (g)	PROGÊNIE	1.000 Sementes (g)
1 ¹	0,8887	19 ²	0,6153
2 ¹	0,783	20 ²	0,5677
3 ¹	0,826	21 ²	0,6097
4 ¹	0,7803	22 ¹	0,845
5 ¹	0,8117	23 ¹	0,8653
6 ²	0,5733	24 ¹	0,773
7 ²	0,6493	25 ¹	0,8797
8 ¹	0,8407	26 ¹	0,85
9 ¹	0,789	27 ¹	0,9053
10 ²	0,4217	28 ¹	0,8567
11 ¹	0,7357	29 ¹	0,883
12 ¹	0,8717	30 ¹	0,7887
13 ¹	0,811	31 ¹	0,837
14 ²	0,6113	32 ²	0,4193
15 ¹	0,8447	33 ²	0,4077
16 ¹	0,8063	34 ²	0,3543
17 ¹	0,8317	35 ³	0,7243
18 ¹	0,9237	36 ⁴	0,375

¹*Amaranthus cruentus*; ²*A. cruentus* x *A. viridis*; ³BRS Alegria; ⁴ *A. viridis*

O número de sementes por grama pode variar de 3.000 sementes (mais comumente nas espécies silvestres) a 1.000 sementes nas cultivadas (NIETO, 1990), esta relação permite separar as espécies e seus prováveis híbridos. Neste trabalho, houve variações para as respectivas progênes, entretanto, os híbridos se aproximaram do tamanho de sementes de *A. viridis*. Ademais, em espécies invasoras e silvestres de amaranto o peso de mil sementes mostrou variar de 0,23 a 0,39g/1.000 sementes

(SPEHAR, 2007). Portanto, os híbridos entre *A. cruentus* e *A. viridis* apresentaram sementes escuras e com valores intermediários entre as duas espécies

3.3- GERMINAÇÃO E ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG)

A análise de variância do Teste de Germinação e Índice de Velocidade de Germinação (IVG) mostrou significância para $P = 0,01$ (Tabela 3). Onde foi encontrada diferença significativa entre a taxa de germinação das amostras.

Tabela 3 - Resumo da análise de variância do Teste de Germinação e Índice de Velocidade de Germinação (IVG).

Fonte de Variação	Teste de Germinação			IVG	
	GL	QM	F	QM	F
Progênie	35	1223,84444	94,4109**	4251,50843	101,1295**
Resíduo	108	12,96296		42,04025	
Total	143				

** Significativo a 1% de probabilidade pelo Teste F.

A média do teste de germinação variou de 35 a 100 % (Tabela 4), sendo que as sementes de todas as progênies apresentaram germinação. Ficou evidente que, o híbrido interespecífico entre as espécies gera sementes viáveis. Assim, cruzamentos naturais podem ocorrer entre espécies de amaranto, a depender dos genomas que as compõe, como previsto por Brenner (2000).

Tabela 4 - Valores médios do teste de germinação de progênies de *A. cruentus*, *A. viridis* e híbridos *A. cruentus* x *A. viridis*

Progênie	%	Progênie	%
1 ¹	90,5	19 ²	76
2 ¹	98	20 ²	55
3 ¹	99,5	21 ²	67
4 ¹	96,5	22 ¹	100
5 ¹	99	23 ¹	100
6 ²	67,5	24 ¹	98
7 ²	43,5	25 ¹	100
8 ¹	99,5	26 ¹	100
9 ¹	91,5	27 ¹	99,5
10 ²	35	28 ¹	99,5
11 ¹	86	29 ¹	100
12 ¹	100	30 ¹	99
13 ¹	97	31 ¹	99
14 ²	67,5	32 ²	93,5
15 ¹	98,5	33 ²	88,5
16 ¹	92,5	34 ²	80,5
17 ¹	100	35 ³	100
18 ¹	99	36 ⁴	62,5

¹*Amaranthus cruentus*; ²*A. cruentus* x *A. viridis*; ³BRS Alegria; ⁴ *A. viridis*

De acordo com Spehar et al. (2003) a porcentagem de germinação das sementes de amaranto, cultivar BRS Alegria, verificada 30 dias após ter atingido a maturação fisiológica foi de 99%. Como as sementes foram obtidas ao longo dos anos de 2014 e 2015, e o teste ocorreu em 2016, decréscimo em sua qualidade fisiológica poderia ter ocorrido, pois tempo de armazenamento é um dos vários fatores que influenciam a germinação de *Amaranthus* (MOSCON, 2015; NOBRE et al., 2013). Apesar do tempo de armazenamento as sementes apresentaram uma porcentagem de germinação elevada, sendo que as sementes de BRS Alegria apresentaram 100% de germinação, por ausência de dormência. Entretanto, progênies de híbridos, com sementes escuras, tenderam a germinar mais lentamente.

O índice de velocidade de germinação (IVG) ou porcentagem de germinação entre as progênes durante 14 dias, com a progênie 10 com o menor e a 15 com o maior índice de velocidade, no primeiro dia de contagem do experimento a progênie 15 apresentou 73% de germinação (Figura 2). Observou-se um pico de emergência no segundo dia, como aconteceu com a BRS Alegria com 99,5% de emergência, diferindo do relatado por Costa e Dantas, 2009, em que BRS Alegria após sementeira com 70% de germinação. Por outro lado, apenas no terceiro dia as sementes de *Amaranthus viridis* iniciaram emergência.

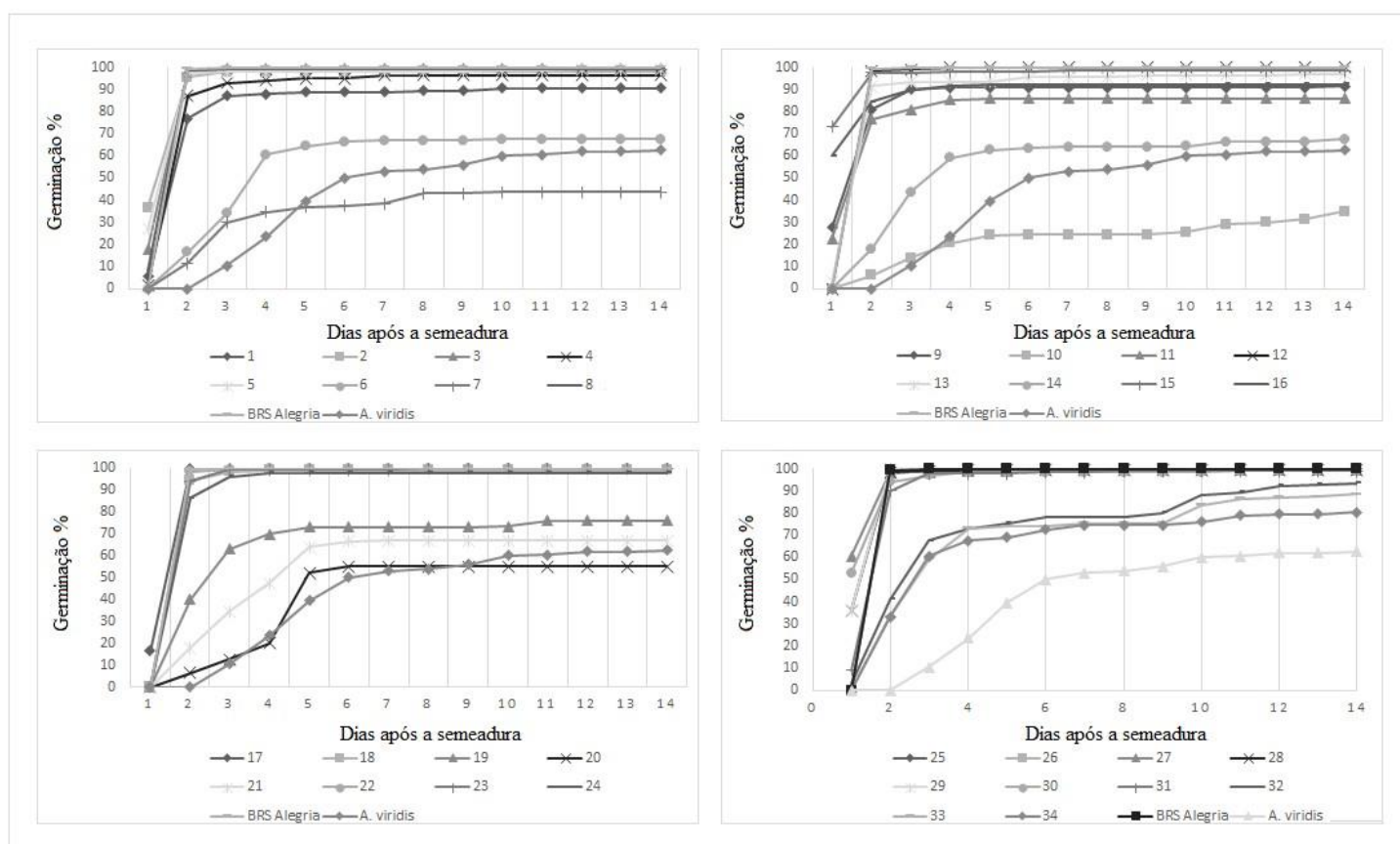


Figura 2- Germinação média de BRS Alegria, *A. viridis* e das 34 progênes ao longo de 14 dias.

Das progênes com sementes de coloração escura apenas a 33 apresentou emergência inicial no primeiro dia de contagem, com 3% de germinação, com exceção da *A. viridis*, as demais sementes começaram a emergir a partir do segundo dia, a literatura em *Amaranthus* associando coloração escura à dormência de sementes, muito comum em espécies silvestres ou invasoras (SPEHAR, 2003). Mesmo assim, pode-se especular que, em função dos genomas, a coloração de semente pode estar condicionada por vários genes, localizados em sequências de bases similares nos cromossomos

homólogos. Desta forma, se teria variações na espessura da testa, levando a tempos distintos para as sementes embeberem e germinar.

No índice de velocidade de germinação, separando as sementes pela cor (Figura 3), verifica-se que as sementes claras germinaram de maneira uniforme e rápida, uma germinação homogênea, demonstrando um alto potencial fisiológico, como descrito por Marcos Filho (2015) de modo que a emergência tardia das sementes escuras reflete relativa impermeabilidade das mesmas.

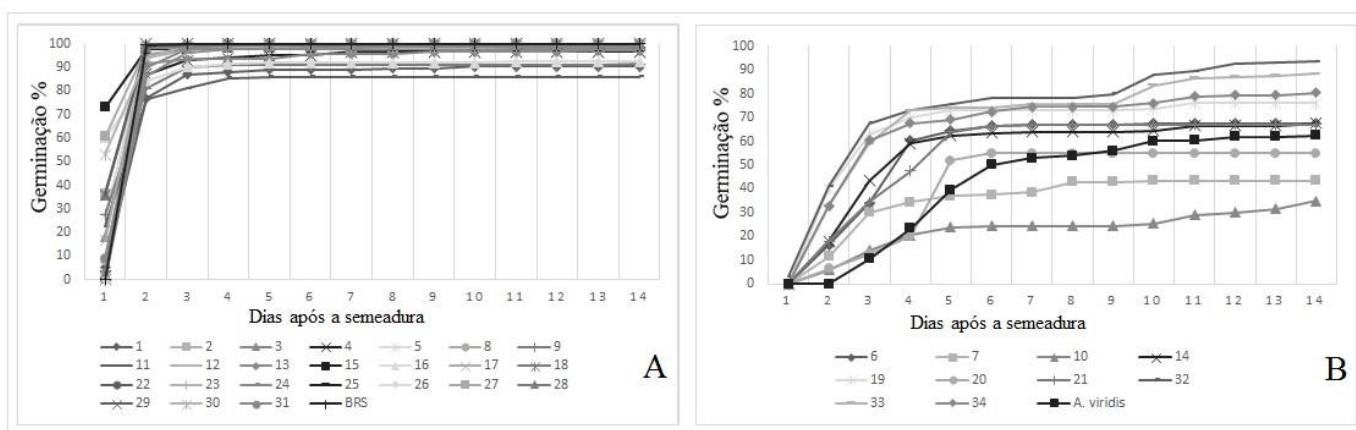


Figura 3- Germinação média (A) sementes claras; (B) sementes escuras; ao longo de 14 dias.

Para Spehar et al., 2003, a reduzida germinação das sementes escuras pode ser atribuída a baixa permeabilidade da casca ou testa. Segundo Braccini (2011) a impermeabilidade do tegumento à água é um dos mecanismos de dormência das sementes, sendo classificadas por esse mecanismo. No amaranto BRS Alegria, as características de maturação uniforme, panículas com dominância apical concentradas no topo da planta, características favoráveis à colheita mecanizada e sementes claras, não dormentes, eliminam a possibilidade dela se tornar invasora.

Nos testes de sementes foi possível notar a correlação da coloração de semente com as médias gerais de germinação (Tabela 5). As sementes de amaranto são pequenas e arredondadas (SPEHAR; TEIXEIRA, 1999), então ao comparar peso e tamanho de semente verifica-se uma relação diretamente proporcional, ou seja, quanto menor as dimensões da semente de amaranto (largura, espessura e comprimento), menor o seu peso e maior a superfície específica.

Mesmo se o híbrido interespecífico natural possuir o caráter indesejável de cor de semente, é possível excluí-lo via seleção, pois é condicionado por genes dominantes

(BRENNER, 2000). Assim, na seleção em populações híbridas interespecíficas, buscam-se recombinantes que apresentem coloração clara. Isto ocorrerá com avanço de gerações, quando recessivos de coloração clara ocorrerão.

Tabela 5 - Médias em ordem decrescente dos Testes de Germinação (GM em %), IVG, Espessura (ESP) e Comprimento (COMP), em mm, da semente e peso de mil sementes, em gramas, de progênes de *A. cruentus*, *A. viridis* e híbridos *A. cruentus* x *A. viridis*. As amostras com sementes pretas estão hachuradas. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

GM			IVG			ESP			COMP			P 1.000	
12	100	a	15	146,819	a	23	0.83974	a	18	1,4028	a	18	0,9237
17	100	a	27	141,736	a	25	0.83284	a	25	1,397	a	27	0,9053
22	100	a	30	136,095	a	31	0.83152	a	27	1,3966	a	1	0,8887
23	100	a	16	131,382	b	13	0.82054	a	26	1,3914	a	29	0,883
25	100	a	29	130,578	b	27	0.81896	a	12	1,385	a	25	0,8797
26	100	a	28	129,682	b	29	0.81874	a	23	1,3828	a	12	0,8717
29	100	a	2	127,952	b	5	0.81726	a	22	1,3794	a	23	0,8653
BRS Aleg.	100	a	5	123,865	c	1	0.81678	a	29	1,3784	a	28	0,8567
3	99,5	a	3	120,64	c	18	0.81430	a	30	1,3784	a	26	0,85
8	99,5	a	17	120,828	c	16	0.81426	a	15	1,371	a	22	0,845
27	99,5	a	8	115,619	d	30	0.80956	a	24	1,3668	a	15	0,8447
28	99,5	a	9	113,547	d	22	0.81088	a	13	1,3558	a	8	0,8407
5	99	a	31	113,233	d	26	0.80077	a	BRS Aleg.	1,3524	a	31	0,837
18	99	a	26	112,453	d	3	0.79890	a	3	1,3518	a	17	0,8317
30	99	a	BRS Aleg.	112,453	d	11	0.79368	a	8	1,3428	b	3	0,826
31	99	a	22	112,12	d	12	0.79734	b	28	1,3424	b	5	0,8117
15	98,5	a	12	112,037	d	4	0.79102	b	1	1,342	b	13	0,811
2	98	a	25	111,995	d	BRS Aleg.	0.78340	b	16	1,34	b	16	0,8063
24	98	a	23	110,805	d	28	0.78028	b	5	1,33324	b	9	0,789
13	97	a	18	110,244	d	15	0.77940	b	11	1,3308	b	30	0,7887
4	96,5	a	13	107,533	d	9	0.77800	b	2	1,32432	b	2	0,783
32	93,5	b	24	107,118	d	2	0.77686	b	9	1,3198	b	4	0,7803
16	92,5	b	4	105,842	d	24	0.76554	c	17	1,3194	b	24	0,773
9	91,5	b	11	104,796	d	8	0.75482	c	4	1,2942	c	11	0,7357
1	90,5	b	1	99,8622	e	17	0.74374	c	14	1,2784	c	BRS Aleg.	0,7243
33	88,5	b	32	87,8093	f	14	0.69682	d	21	1,2676	c	7	0,6493
11	86	c	33	73,339	g	21	0.68194	d	6	1,2664	c	19	0,6153
34	80,5	d	19	72,3993	g	19	0.67806	d	19	1,2474	d	14	0,6113
19	76	e	34	70,4652	g	6	0.67442	d	7	1,2216	d	21	0,6097
6	67,5	f	14	58,5959	h	20	0.66214	d	20	1,215	d	6	0,5733
14	67,5	f	21	57,5595	h	7	0.66094	d	10	1,1945	d	20	0,5677
21	67	f	6	56,5614	h	10	0.63014	e	A. viridis	1,1554	e	10	0,4217
A. viridis	62,5	g	20	43,3853	i	33	0.60260	f	31	1,15548	e	32	0,4193
20	55	h	7	37,5122	i	32	0.59538	f	33	1,15548	e	33	0,4077
7	43,5	i	A. viridis	36,0261	i	A. viridis	0.57138	g	32	1,1146	f	A. viridis	0,375
10	35	j	10	21,6596	j	34	0.56380	g	34	1,10772	f	34	0,3543

4. CONCLUSÕES

A seleção por sementes claras, conduzido ao longo do tempo, resultou em características de interesse, como o tamanho de semente e germinação uniforme.

O peso das sementes de amaranto é proporcional ao tamanho das mesmas, ou seja, quanto maior as medidas da semente (espessura, comprimento e largura), maior será o seu peso.

As diferenças de tamanho entre as sementes de amaranto não refletem no seu potencial germinativo em laboratório, sendo a germinação afetada pela impermeabilidade do tegumento à água, característica ligada à coloração escura das sementes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHRENS, W. H.; WAX, L. M.; STOLLER, E. W. Identification of triazine-resistant *Amaranthus* spp. **Weed Science**, p. 345–348, 1981.
- ANDRADE, D. A. V. DE. Caracterização Morfológica E Citogenética De Sementes E Plântulas De Algumas Espécies De Plantas Tóxicas. p. 53, 2007.
- BRACCINI, A. DE L. E. Banco de Sementes e Mecanismos de Dormência em Sementes de Plantas Daninhas. In: **Biologia e Manejo de Plantas Daninhas**. [s.l.: s.n.]. p. 37–66, 2001.
- BRASIL. **Regras para análise de sementes**. Brasília. p. 395, 2009.
- BRENNER, D. Genetic resources and breeding of *Amaranthus*. **Plant Breeding Reviews**, 2000.
- COSTA, D. M. A. DA. **IMPACTOS DO ESTRESSE SALINO E DA COBERTURA MORTA NAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DO SOLO E NO DESENVOLVIMENTO DO AMARANTO**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2007.
- HORAK, M. J.; LOUGHIN, T. M. Growth analysis of four *Amaranthus* species. **Weed Science**, 2000.
- KISSMAM, K. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: BASF, 1999.
- KULAKOW, P. A.; HAUPTLI, H.; JAIN, S. K. Genetics of grain amaranths: I. Mendelian analysis of six color characteristics. **Journal of Heredity**, v. 76, n. 1, p. 27–30, 1985.
- MAGUIRE, J. D. Speed of germination - aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, 1962.
- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de Sementes de Plantas Cultivadas**. 2005.
- MENDES, L. D. **MATURAÇÃO FISIOLÓGICA EM AMARANTO (*Amaranthus cruentus* L .)**. 2014.
- MOSCON, E. S. **Cinética de secagem e propriedades físicas de quinoa e amaranto e**

qualidade de sementes de quinoa. 2015.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Amaranth: Modern prospects for an ancient crop.** 1984.

NIETO, C. Identificación de microcentros de variabilidad en quinua, Amaranto y chocho en Ecuador. **Publicación Miscelánea**, n. 52, 1990.

NOBRE, D. A. C. et al. Influência do ambiente de armazenamento na qualidade fisiológica de sementes de amaranto. v. 4, n. 2, p. 216–219, 2013.

SILVA, F. DE A. S. E S.; AZEVEDO, C. A. V. DE A. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **African Journal of Agricultural Research**, 2016.

SOARES, R. A. M. **Identificação de peptídeos hipocolesterolemizantes do isolado protéico do grão de amaranto (*Amaranthus cruentus* L. BRS-Alegria).** [s.l.] Universidade de São Paulo, 2008.

SPEHAR, C. R. et al. Amaranto BRS Alegria: Alternativa para diversificar os sistemas de produção. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 38, n. 5, p. 659–663, 2003.

SPEHAR, C. R. Diferenças morfológicas entre *Amaranthus cruentus*, cv. BRS Alegria, e as plantas daninhas *A. hybridus*, *A. retroflexus*, *A. viridis* e *A. spinosus*. **Planta Daninha**, v. 21, n. 3, p. 481–485, dez. 2003.

SPEHAR, C. R. **Amaranto; opção para diversificar a agricultura e os alimentos.** Planaltina: EMBRAPA CERRADOS, 2007.

SPEHAR, C. R.; TEIXEIRA, D. L. **Amaranto: alternativa na cobertura do solo e na produção de grãos** Guia técnico do produtor rural. EMBRAPA CERRADOS, 1999.

TEIXEIRA, D. L.; SPEHAR, C. R.; SOUZA, L. A. C. Caracterização agrônômica de amaranto para cultivo na entressafra no Cerrado. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 38, n. 1, p. 45–51, 2003.

CAPÍTULO 2

Estimativa do tamanho do genoma de *Amaranthus cruentus* cv. BRS Alegria, *Amaranthus viridis* e do híbrido interespecífico por de citometria de fluxo e contagem cromossômica

ESTIMATIVA DO TAMANHO DO GENOMA DE *Amaranthus cruentus* CV. BRS ALEGRIA, *Amaranthus viridis* E DO HÍBRIDO INTERESPECÍFICO POR DE CITOMETRIA DE FLUXO E CONTAGEM CROMOSSÔMICA

RESUMO

Diferenciam-se no gênero *Amaranthus* mais de 60 espécies com difícil taxonomia, devido à grande semelhança entre elas e a sua ampla distribuição geográfica. Com apoio da citogenética e da biologia molecular, é possível agrupá-las, com objetivo no melhoramento genético. Estudos conduzidos pela Universidade de Brasília em campo de produção de *A. cruentus*, cultivar BRS Alegria, infestado com a espécie silvestre invasora *A. viridis*, evidenciou a presença de plantas diferenciadas e com características intermediárias entre as duas espécies. Estes estudos objetivaram confirmar a ocorrência de cruzamento interespecífico e a produção de híbridos de interesse para o melhoramento genético de *A. cruentus*, estimando-se o tamanho do genoma de *A. viridis*, *A. cruentus* e seu provável híbrido interespecífico. Compararam-se o número cromossômico das espécies do híbrido, para associar com a viabilidade de seu cruzamento. Sementes de 36 progênies de plantas de *A. viridis*, *A. cruentus* e do híbrido, colhidas no ano de 2015, na área experimental da Fazenda Água Limpa, da Universidade de Brasília. A estimativa do tamanho do genoma foi realizado por citometria de fluxo, utilizando-se tampão Marie e *Pisum sativum*, como padrão interno de referência. Cromossomos metafásicos das progênies foram obtidos por fragmentos de pontas de raízes com aproximadamente 5 mm de comprimento, correspondente ao meristema radicular dos tratamentos controle (*Amaranthus cruentus* cv BRS Alegria e *A. viridis*) e do híbrido interespecífico, identificado via citometria de fluxo. Os valores do conteúdo de DNA variaram de 0,99 pg a 1,27 pg, sem apresentar diferença estatística. A amostra 21 apresentou menor conteúdo de DNA em uma de suas repetições, entretanto ao realizar a contagem cromossômica apresentou $2n = 34$, igualmente a *A. cruentus* e *A. viridis*. O trabalho contribuiu para ampliar os conhecimentos acerca da caracterização genética de a *A. cruentus* e *A. viridis* e seu híbrido interespecífico.

Palavras-chave: Amarantho; melhoramento genético; híbrido interespecífico.

ABSTRACT

There are more than 60 species with a difficult taxonomy in the genus *Amaranthus*, due to the great similarity between them and their wide geographic distribution. With the support of cytogenetics and molecular biology, it is possible to group them, aiming at genetic improvement. Studies carried out by the University of Brasília in *A. cruentus* production field, BRS Alegria, infested with the invasive wild species *A. viridis*, evidenced the presence of differentiated plants with intermediate characteristics between the two species. These studies aimed to confirm the occurrence of interspecific crosses and the production of hybrids of interest for the genetic improvement of *A. cruentus*. Estimates of the genome size of *A. viridis*, *A. cruentus* and its probable interspecific hybrid were carried out. The chromosome number of the hybrid species was compared to associate with the viability of their crossing. Seeds of 36 progenies of *A. viridis*, *A. cruentus* and hybrid plants were harvested in the experimental area of Fazenda Água Limpa, University of Brasília. Genome size estimation was performed by flow cytometry, using the Marie and *Pisum sativum* buffer, as the internal reference standard. Metaphase chromosomes of the progenies were obtained by fragments of root tips approximately 5 mm long, corresponding to the root meristem of the control treatments (*Amaranthus cruentus* cv BRS Alegria and *A. viridis*) and the interspecific hybrid identified by flow cytometry. The values of the DNA content varied between 0.99pg and 1.27pg, without statistical difference among treatments. Sample 21 had the lowest DNA content in one of its replicates. However, when performing the chromosome count, it was $2n = 34$, similarly to *A. cruentus* and *A. viridis*. The work contributed to increase the knowledge about the genetic characterization of *A. cruentus* and *A. viridis* and its interspecific hybrid.

Keywords: Amaranth; genetical enhancement; Interspecific hybrid.

1- INTRODUÇÃO

As hibridações em amaranto podem ocorrer de forma espontânea ou controlada (SPEHAR, 2003b). No melhoramento, pode-se contar com espécies cultivadas, semidomesticadas e silvestres. Por se originarem em regiões de climas e solos diversos, as espécies de amaranto são capazes de se adaptar a diferentes sistemas produtivos, pois apresentam plasticidade genética (BRENNER, 2000).

O gênero *Amaranthus* é composto por mais de 60 espécies, o que dificulta sua taxonomia, devido à grande semelhança entre as espécies e a sua ampla distribuição geográfica. Com apoio da citogenética e da biologia molecular, tem sido possível agrupá-las, de acordo com os objetivos no melhoramento genético (SPEHAR, 2007).

Greizerstein, Naranjo e Poggio (1997) relatam que no gênero *Amaranthus* foram reportados dois números gaméticos ($n = 16$ e $n = 17$) e que em alguns casos poderiam ocorrer os dois na mesma espécie. Existe divergência em relação a *A. cruentus*, com $2n = 4x = 32$ ou com $2n = 4x = 34$ (BONASORA; POGGIO; GREIZERSTEIN, 2013; BRENNER, 2000; CLOUSE et al., 2016; GRANT, 1959; PAL; KHOSHOO, 1973; PALOMINO; RUBÍ, 1991; SAMARTINI et al., 2016; TANDON; TAWAKLEY, 1970).

As espécies de amaranto são classificadas como paleo-alotetraploides. Ou seja, os cromossomos dos genomas componentes somente pareiam entre si, com segregação diploide. Ademais, as espécies ancestrais correspondentes a cada genoma, foram extintas (GREIZERSTEIN; POGGIO, 1994). Estudos sobre o comportamento na meiose ainda são necessários para elucidar as compatibilidades de cruzamentos entre espécies de amaranto (BRENNER, 2000).

O presente estudo teve como objetivo estimar o tamanho do genoma de *A. viridis*, *A. cruentus* e seu híbrido interespecífico. E comparar o número cromossômico das espécies para estabelecer possíveis relações que explicam a viabilidade de seu cruzamento.

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1- DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE DNA

Para determinação do conteúdo de DNA foram analisadas três amostras de *Amaranthus cruentus*, *A. viridis* e do provável híbrido *A. cruentus* x *A. viridis* utilizou-se 1 cm² de tecido foliar jovem (cerca de 20 mg) e a mesma quantidade de tecido foliar jovem de ervilha, *Pisum sativum*, (utilizada como padrão interno de referência). As amostras de tecido foram trituradas em placa de Petri contendo 1 mL de tampão MARIE gelado, para obtenção da suspensão nuclear. A suspensão nuclear foi adicionado 25µl de iodeto de propídio e 25µl de RNase. Para cada amostra foram analisados pelo menos 10 mil núcleos, tanto na escala linear como logaritmica (DOLEZEL; GREILHUBER; SUDA, 2007). As análises foram realizadas em citômetro de fluxo, gerando-se histogramas que foram gerados e analisados em software.

No Citrometro CFlow® Versão 1.0.227.4 o conteúdo de DNA nuclear, em picogramas (pg), das amostras, foi estimado por comparação com a posição do pico G1 do padrão interno de referência (*Pisum sativum*), utilizando a relação $Q = (E/S) \times R$, onde: Q é a quantidade de DNA da amostra (pg/2C); E é a posição do pico G1 da amostra; S é a posição do pico G1 do padrão de referência; R é o conteúdo de DNA do padrão de referência (9,09 pg/2C);

Para comparação dos resultados, foi feita a análise estatística por meio da análise de variância, onde se utilizou o programa ASISTAT versão 7.7p (SILVA; AZEVEDO, 2016).

2.2- CONTAGEM CROMOSSÔMICA

Para a contagem de cromossomos metafásicos foram coletados, entre quinze e vinte dias após germinação, fragmentos de pontas de raízes com aproximadamente 5 mm de comprimento, correspondente ao meristema radical dos tratamentos controle (*Amaranthus cruentus* cv BRS Alegria e *A. viridis*) e do híbrido interespecífico de diferente tamanho de conteúdo genômico, identificado via citometria de fluxo. As amostras foram imersas em solução de 8-hidroxiquinoleína 0,002 M por duas horas à temperatura ambiente, seguida por mais duas horas a 4°C. As amostras foram então incubadas em solução fixadora contendo etanol 100% e ácido acético glacial (3:1 v/v) e armazenadas a - 20° C. As amostras foram pré-tratadas com água destilada por 15

minutos à temperatura ambiente e digeridas celololiticamente em uma solução contendo enzimas proteolíticas: 0,6% de celulase “Onozuka” R-10 de *Trichoderma viride* (Serva 0,96 U/mg, código 16419); 5,4% de celulase de *Aspergillus niger* (Sigma 5,1 U/mg, cód. 2415) e 9% de pectinase Macerase de *Rhizopus* sp. (Calbiochem, 3.500 U/g, código 441201) por 3 horas a 37°C. As células meristemáticas foram isoladas em uma gota de ácido acético 45% sobre uma lâmina histológica com auxílio de pinça e microscópio estereoscópico. O espalhamento das células meristemáticas foi realizado por pressão manual de lamínula sobre lâmina. As lâminas foram analisadas em microscópio com contraste de fase e aquelas contendo ao menos cinco conjuntos completos de cromossomos em metáfase, livres de restos citoplasmáticos e bem espalhados foram selecionadas para contagem cromossômica.

As lamínas foram coradas com 20 µl da solução DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) (20 µl a 100 µg/ml) diluído em 980 µl de Vectashild. As lâminas foram armazenadas em ambiente livre de umidade e luz e analisadas em microscópio epifluorescente Axiophot (Zeiss, Alemanha). As imagens foram digitalmente adquiridas com o *software* Axiovision 4.8.

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tamanho do genoma de *Amaranthus cruentus* cv. BRS Alegria, *Amaranthus viridis* e do híbrido *A. cruentus* x *A. viridis*, através de citometria de fluxo, não apresentaram diferenças estatísticas (Tabela 6).

Tabela 6 - Resumo da análise de variância da citometria de fluxo.

Fonte de Variação	Citometria de fluxo		
	GL	QM	F
Progênie	35	0,00581	0,9898 ns
Resíduo	72	0,00586	
Total	107		

ns Não significativo ($p > = 0,05$)

Os valores do conteúdo de DNA variaram de 0,99 pg a 1,27 pg (Tabela 4) e não foi observada diferença estatística significativa entre as espécies *A. cruentus* e *A. viridis*. O maior conteúdo de DNA foi observado na amostra 22, correspondendo a uma das progênes de BRS Alegria, ainda que não houvesse diferença estatística entre progênes da cultivar, de *A. viridis* e do respectivo híbrido.

O valor de conteúdo de DNA nuclear da espécie *A. viridis*, (Tabela 4), apresentou valor intermediário aos valores relatados por Pratt, Jhangiani e Wiggers (2008), e também por Samartini et al., (2016). Estes autores descreveram para *A. viridis*, 0,89 pg, e 1,36 pg, respectivamente. Para a espécie *A. cruentus* foi relatado no presente trabalho $2C = 1,24$ pg, valor próximo o encontrado por Greizerstein e Poggio (1994) $2C = 1,26$ pg.

Entretanto, Greizerstein e Poggio (1994) utilizaram a Densimetria de Feulgen, está técnica quando comparada com a citometria de fluxo apresenta uma maior facilidade e rapidez no preparo das amostras (SCHIFINO-WITTMANN, 2001). Por outro lado, fatores externos podem contribuir para estas variações, como condições de crescimento da planta, cultivar, *A. cruentus* L. cv. Don Giem (cult. No. 91-417). -cv. Don Armando (cult. No. 91-418). -de Guerrero, Mexico, e do padrão de referência utilizado (DOLEZEL; BARTOS, 2005).

Tabela 7 - Conteúdo de DNA nuclear (pg) em ordem decrescente de tamanho.

Progênie	Pg		Progênie	pg	
22	1,27894	a	3	1,21053	ab
4	1,25768	a	20	1,20837	ab
24	1,2509	a	11	1,2052	ab
12	1,24589	ab	8	1,20312	ab
10	1,24086	ab	32	1,20041	ab
BRS	1,23938	ab	7	1,19816	ab
29	1,22855	ab	15	1,19809	ab
34	1,22804	ab	33	1,19438	ab
14	1,22577	ab	9	1,19141	ab
30	1,2251	ab	6	1,18638	ab
13	1,22047	ab	23	1,18582	ab
17	1,21895	ab	2	1,18484	ab
16	1,21887	ab	31	1,18464	ab
25	1,21654	ab	<i>A. viridis</i>	1,17868	ab
19	1,21447	ab	28	1,17385	ab
5	1,21347	ab	26	1,17296	ab
27	1,21255	ab	1	1,16233	ab
18	1,2106	ab	21	0,9957	b

pg - picogramas

Uma das repetições da amostra 21 apresentou tamanho diferenciado das demais (Figura 4). Ao compará-la com outra repetição e com a ervilha é possível constatar seu tamanho reduzido.

Apesar da leitura dessa repetição apresentar tamanho diferenciado, o número cromossômico encontrado nas amostras 21, *A. cruentus* e *A. viridis* foi o mesmo $2n = 34$ (Figura 5). Segundo Dolezel, Greilhuber e Suda (2007) existem fatores no preparo da amostra que podem causar essa interferência, como a presença de doença ou injúrias no tecido foliar, que contribuem para gerar valores inconsistentes como o encontrado na progênie 21 de *A. cruentus*.

Os resultados aqui relatados de $2n = 4x 34$ em *A. cruentus* e *A. viridis* estão de acordo com os encontrados na literatura (BONASORA; POGGIO; GREIZERSTEIN, 2013; BRENNER, 2000; GRANT, 1959; MADHUSOODANAN; NAZEER, 1983;

PAL; KHOSHOO, 1973; PALOMINO; RUBÍ, 1991; SAMARTINI et al., 2016; SHEIDAI; MOHAMMADZADEH, 2008).

Acessos de *A. caudatus* cruzaram com *A. hypochindiacus* produzindo híbridos férteis (KAUFFMAN; WEBER, 1990). Hibridação de *A. cruentus* com *A. caudatus* e *A. hypochindiacus* possuindo $n = 2x = 16$ (BRENNER, 2000), não geraram progênes férteis por ausência de pareamento. Enquanto *A. viridis* possuindo $n = 17$, similar a *A. cruentus* resultando híbrido fértil representa uma proximidade genômica ainda não relatada. Provavelmente, a sequência de bases nos genomas seja similar o suficiente para permitir pareamento na meiose, levando ao cruzamento interespecífico.

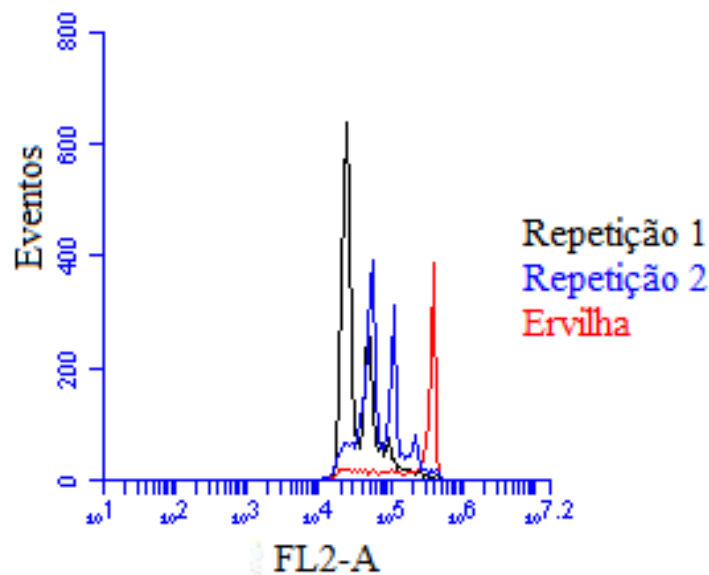


Figura 4- Histograma da citometria de fluxo da amostra 21, Repetição 1 com tamanho diferenciado da Repetição 2 e do padrão interno de referência Ervilha.

Por gerar híbridos férteis, *A. cruentus* e *A. viridis* possuem conteúdo genômico muito próximo, não sendo possível detectar diferença estatística entre as progênes. Por apresentarem o mesmo número cromossômico e tamanho genômico, é de se imaginar um possível pareamento na meiose, mesmo diante de diferenças de cromossomos em *A. viridis*, formado por 7 metacêntricos, 6 submetacêntricos e 4 subtelocêntricos (SRIVASTAVA; BIJOY, 2012) e *A. cruentus*, com 3 cromossomos metacêntricos, 7 submetacêntricos e 7 telocêntricos (GREIZERSTEIN; POGGIO, 1994).

De acordo com Spehar, 2007, no Brasil foi registrado híbrido espontâneo entre BRS Alegria e *A. viridis*. Esse evento exige maior cuidado em plantios comerciais,

abrindo, todavia, janela para o melhoramento através da introgressão gênica. Assim, pode-se resgatar genes de interesse, como resistência a doenças, tombamento, indeiscência ou até mesmo resistência a toxidez por alumínio, comum em solos tropicais.

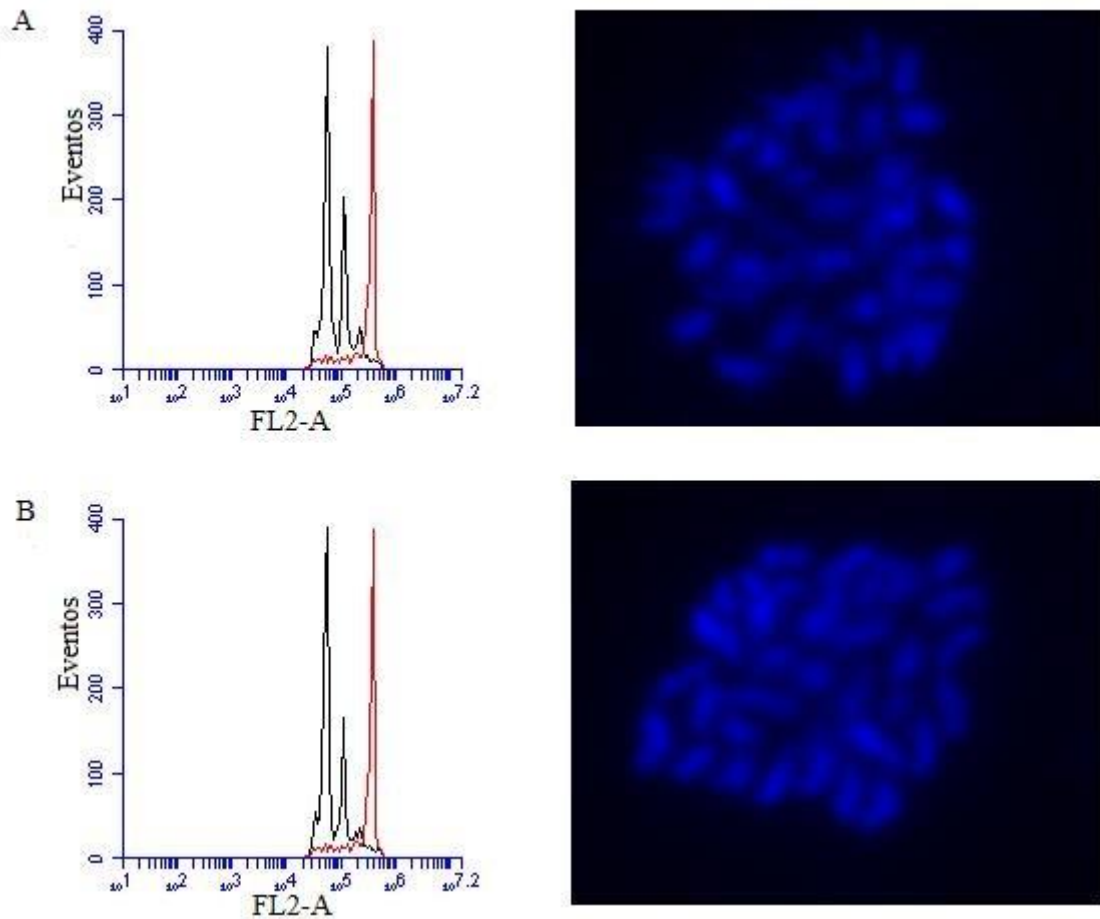


Figura 5- Quantidade de DNA nuclear: picos pretos representam espécies de *Amaranthus* e picos vermelhos, *Pisum sativum* e pró metáfases e metáfases mitóticas das progênes de A, *A. viridis* e B, *A. cruentus* cv. BRS Alegria, todas com $2n=2x=34$ cromossomos.

4 CONCLUSÕES

A avaliação genômica por citometria de fluxo permite estabelecer relação de proximidade entre *A. viridis* e *A. cruentus*.

O número cromossômico de *Amaranthus cruentus* cv BRS Alegira e *Amaranthus viridis* é $2n = 34$, bem como de progênies resultando da hibridação entre *A. cruentus* e *A. viridis*.

As duas espécies, ainda que apresentem distanciamento geográfico, possuem genomas com proximidade suficiente para pareamento cromossômico na fecundação, resultando em híbridos férteis.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BONASORA, M. G.; POGGIO, L.; GREIZERSTEIN, E. J. Cytogenetic studies in four cultivated *Amaranthus* (Amaranthaceae) species. **Comparative Cytogenetics**, v. 7, n. 1, p. 53–61, 2013.

BRENNER, D. Genetic resources and breeding of *Amaranthus*. **Plant Breeding Reviews**, 2000.

CLOUSE, J. W. et al. The amaranth genome: genome, transcriptome, and physical map assembly. **The Plant Genome**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2016.

DOLEZEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, v. 95, n. 1, p. 99–110, 2005.

DOLEZEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. **Flow cytometry with plant cells, analysis of genes, chromosomes and genomes**. 2007.

GRANT, W. F. CYTOGENETIC STUDIES IN *AMARANTHUS*.: III. Chromosome numbers and phylogenetic aspects. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v. 1, n. 4, p. 313–328, dez. 1959.

GREIZERSTEIN, E. J.; POGGIO, L. Karyological Studies in Grain Amaranths. **The Japan Mendel Society**, v. 59, n. 1964, p. 25–30, 1994.

GREIZERSTEIN, E.; NARANJO, C. A.; POGGIO, L. Karyological in Five Wild Species of Amaranths. **The Japan Mendel Society**, v. 62, n. Umsp 30, p. 115–120, 1997.

KAUFFMAN, C.; WEBER, L. Grain amaranth. **Advances in new crops**, p. 127–139, 1990.

MADHUSOODANAN, K. J.; NAZEER, M. A. Comparative morphology of the somatic karyotypes of vegetable amaranths and its phylogenetic significance. v. 48, n. 2, p. 237–244, 1983.

PAL, M.; KHOSHOO, T. N. Evolution and improvement of cultivated amaranths. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 43, n. 8, p. 343–350, 1973.

PALOMINO, G.; RUBÍ, R. Diferencias cromosómicas entre algunas especies y tipos

del género *Amaranthus* distribuidos en México. In: **Actas Primer Congreso Internacional del Amarantho**. Morelos, Mexico. 1991.

PRATT, D. B.; JHANGIANI, S. N.; WIGGERS, R. J. 2C DNA content values in *Amaranthus* (Amaranthaceae). **Journal of the Botanical Research Institute of Texas**, p. 1219–1223, 2008.

SAMARTINI, C. Q. et al. Número cromossômico e conteúdo de DNA nuclear em espécies do gênero *Amaranthus* (Amaranthaceae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 8, p. 998–1001, 2016.

SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Determinação da quantidade de DNA nuclear em plantas - Revisão Bibliográfica. **Ciência Rural**, 2001.

SHEIDAI, M.; MOHAMMADZADEH, Z. Cytogenetic study of *Amaranthus* L. species in Iran. **Cytologia**, v. 73, n. 1, p. 1–7, 2008.

SILVA, F. DE A. S. E S.; AZEVEDO, C. A. V. DE A. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **African Journal of Agricultural Research**, 2016.

SPEHAR, C. R. Diferenças morfológicas entre *Amaranthus cruentus*, cv. BRS Alegria, e as plantas daninhas *A. hybridus*, *A. retroflexus*, *A. viridis* e *A. spinosus*. **Planta Daninha**, v. 21, n. 3, p. 481–485, dez. 2003.

SPEHAR, C. R. **Amaranto; opção para diversificar a agricultura e os alimentos**. Planaltina: EMBRAPA CERRADOS, 2007.

SRIVASTAVA, R.; BIJOY, K. R. CYTOGENETIC STUDIES : KARYOTYPIC AND EVOLUTIONARY ASPECTS OF SOME CULTIVATED AND WILD SPECIES OF *AMARANTHUS* L. **International Journal of Innovations in Bio-Sciences**, v. 2, n. 3, p. 154–161, 2012.

TANDON, S. L.; TAWAKLEY, M. No Title. In: **IOPB Chromosome Number Reports. XXVI**. [s.l: s.n.]. p. 264–269, 1970.