



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

# Produção e caracterização de alotetraploides sintéticos entre espécies silvestres do gênero *Arachis*

SILVIO PEREIRA DOS SANTOS

Brasília – DF

2012



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

**Produção e caracterização de alotetraploides sintéticos entre espécies silvestres do gênero *Arachis***

SILVIO PEREIRA DOS SANTOS

ORIENTADOR: PROF. Dr. David John Bertioli

Dissertação apresentada ao Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração: Botânica.

Brasília – DF

2012

## FICHA CATALOGRÁFICA

SANTOS, Silvio Pereira.

Produção e caracterização de alotetraploides sintéticos entre espécies silvestres do gênero *Arachis*/Silvio Pereira dos Santos; Orientação de David John Bertoli – Brasília – DF, 2012.

62p.:il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília/ Departamento de Botânica, 2012.

1 Espécies silvestres. 2. *Arachis hypogaea*. 3. Cruzamentos interespecíficos, alotetraploide. 4. Introgressão de genes.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

SANTOS, S. P. **Produção e caracterização de alotetraploides sintéticos entre espécies silvestres do gênero *Arachis***. Brasília: Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília/ Departamento de Botânica, 2012. Dissertação de mestrado.

**Produção e caracterização de alotetraploide sintéticos entre espécies silvestres do gênero *Arachis*.**

Aprovada por:

---

Prof. Ph.D. – David John Bertioli, Departamento de Botânica (UnB)  
Presidente da banca examinadora (orientador)

---

Dr. Eduardo Gomes Gonçalves  
(Membro Titular da Banca Examinadora)

---

Dra. Glaucia Salles Cortopassi Buso  
(Membro Titular da Banca Examinadora)

---

Dr. Paulo Eduardo Aguiar Saraiva Camara  
(Membro Suplente da Banca Examinadora)

Brasília, 29 de junho de 2012.

Dedico ao meu pai Isaias Pereira, à minha mãe Ana Silva, à minha tia Maria Pereira da Silva, à minha esposa Josilei Souza, ao meu filho Brenno Pereira e aos meus irmãos, que me apoiaram em todos os momentos desta jornada. Obrigado por tudo.

## Agradecimentos

Ao meu orientador Dr. David John Bertioli por me fornecer todo o apoio para a realização desse projeto e ter acreditado em mim;

À Dra. Soraya Bertioli pela sua entrega à realização deste trabalho e pela solidificação das ideias levantadas;

Ao Dr. Márcio Moretzsohn por muita informação prestada, e grande influência na realização deste trabalho;

Ao Dr. Stephan Nielen que desenvolveu junto a mim, com excelência, a parte de citogenética, tornando-se um grande amigo;

Ao Dr. Valls pela concessão dos acessos de *Arachis* utilizados;

Ao Dr. Eduardo Gonçalves que me serviu de exemplo e estímulo para percorrer a carreira acadêmica;

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), em especial à mestre Ediene Gouveia por muitos auxílios, ao pesquisador Marco Antônio Ferreira (Marcão), à Zilneide Pedrosa (Neide) e ao Rodrigo Furtado pelos diversos momentos juntos, de aprendizagem no Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia;

A toda a equipe envolvida nos projetos de amendoim, pela colaboração;

À Universidade Católica de Brasília pelo espaço concedido para a condução deste trabalho, manejo do material pesquisado e as inúmeras atividades realizadas no Horto Botânico;

Ao Departamento de Botânica da UnB, pela concessão desse treinamento e aos professores da UnB, pelos ensinamentos;

Ao amigo e Coordenador do Horto Botânico Luciano Milhomens por estar sempre dando ânimo na continuidade deste trabalho;

À Bióloga Karinne Dantas que, além da amizade, formou comigo uma poderosa parceria nos trabalhos realizados neste projeto;

Ao Givaldo, companheiro em muitas etapas no manejo das plantas pesquisadas e por sempre estar disposto a ajudar;

Aos muitos outros que participaram em alguma fase deste trabalho, em especial, Uiara, Bruna Vidigal, Iugo Galhardo e Uriele.

## Sumário

I. Lista de Figuras.....	x
II. Lista de Tabelas.....	xv
III. Abreviaturas.....	xvi
RESUMO.....	xix
ABSTRACT.....	xxii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. O gênero <i>Arachis</i> .....	1
1.2. Espécies Silvestres.....	1
1.3. Espécie Cultivada.....	3
1.3.1. Tolerância A Estresses Bióticos.....	4
1.4. – Utilização de Germoplasma Silvestre no Melhoramento do Amendoim Cultivado.....	5
1.5. Herança de Cloroplasto.....	7
2. OBJETIVOS.....	7
3. HIPÓTESES CIENTÍFICAS.....	8
4. METODOLOGIA.....	8
4.1. Material Vegetal.....	8
4.1.1. Cruzamentos dos Parentais e Obtenção dos Híbridos.....	9
4.2. Identificações de Híbridos.....	11
4.2.1. Extração de DNA.....	12
4.2.2. PCR dos locos SSR.....	12
4.3. Tetraploidização dos Híbridos Diploides.....	13
4.3.1. Adequação de Protocolos para Duplicação Cromossômica.....	14
4.4. Cruzabilidade entre Alotetraploides sintéticos e <i>A. hypogaea</i> .....	16
[A. batizocoi K9484 x <i>A. duranensis</i> V14167] <sup>4x</sup> .....	17
[A. batizocoi K9484 x <i>A. duranensis</i> SeSn 2848] <sup>4x</sup> .....	17
[A. batizocoi K9484 x <i>A. stenosperma</i> V10309] <sup>4x</sup> .....	17
4.5. Determinação da Área Foliar de Alotetraploides e Parentais Diploides	18
4.6. Teste de Resistência ao Fungo Patogênico <i>Puccinia arachidis</i> .....	18
4.7. Herança do DNA de Cloroplasto.....	20
4.8. Análises Citogenéticas.....	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24



5.1. Hibridização e Duplicação Cromossômica .....	24
<i>A. gregoryi</i> V6389 x <i>A. stenosperma</i> V10309.....	26
5.2. Cruzabilidade entre Alotetraploides Sintéticos com <i>A. hypogaea</i> .....	27
5.2.1. Porcentagem de Ginóforos Produzidos por Flor Polinizada .....	33
5.2.2. Porcentagem de Sementes Produzidas pelo Número de Flores Polinizadas .....	35
5.2.3. Número de Sementes F <sub>2</sub> Produzidas por Planta F <sub>1</sub> Fértil em Cruzamentos Cultivar X Alotetraploide. ....	38
5.2.4. Número de Sementes F <sub>2</sub> Produzidas Considerando as Plantas F <sub>1</sub> Férteis e Inférteis. ....	40
5.3. Análise da Área Foliar de um Alotetraploide e seus Parentais Diploides	43
5.4. Análise Fitopatológica (ver subrahmanyam 1993 e favero tese) .....	49
5.5. Herança do DNA de Cloroplasto .....	53
5.6. Análises Citogenéticas .....	54
6. CONCLUSÕES .....	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	58
8. ANEXO I.....	66

## I. Lista de Figuras

- Figura 1.** Cruzamento dos parentais silvestres; obtenção do híbrido tetraploide. (A) Coleta de pólen da planta doadora; (B) Flor emasculada preparada para receber o pólen; (C) etiqueta de marcação da flor polinizada; (D) planta jovem hibridizada, diploide, oriunda de cruzamento; (E) estacas de híbridos diploides submetidas ao tratamento com colchicina; (F) pontas de ramas de híbridos diploides submetidas ao tratamento com colchicina. .... 11
- Figura 2.** Obtenção de alotetraploides sintéticos, (a) estacas submetidas ao tratamento com colchicina (0,2%), (b) estacas tratadas em brotamento (c) estacas tratadas em substrato definitivo e (d) brotamento lateral de um possível tetraploide..... 14
- Figura 3.** Protocolo de duplicação de cromossomos com tratamento usando colchicina. (a) pontas das ramas não destacadas tratadas com colchicina, (b) podas das folhas para indução de brotamento (c) ponta da rama com brotação (d) ponta da rama com o ginóforo. .... 15
- Figura 4.** Passos para duplicação dos cromossomos utilizando a técnica de total imersão das estacas em solução de colchicina 0,2%. (a) estacas com o ápice de crescimento em uma das extremidades; (b) união das estacas com barbantes; (c,d) total imersão das estacas na solução. .... 16
- Figura 5.** Preparação da folha para determinação da área foliar. A imagem da folha obtida (a) foi convertida para escala de cinza (b), em seguida para cor verde (c) e analisada pelo programa computacional QUANT®, o qual reconhece o limbo foliar. .... 18
- Figura 6.** Bioensaio para teste de resistência ao fungo *P. arachidis* nos parentais, alotetraploides e cultivares. (a) Montagem da folha destacada na placa de Petri, (b) folhas destacadas de um genótipo pronto para receber o inóculo de *P. arachidis*, (c) câmara de crescimento com iluminação e temperatura controladas para desenvolvimento do bioensaio, (d) coleta de esporos para produzir inóculo. .... 20
- Figura 7.** Obtenção do meristema radicular. (a) enraizamento do pecíolo, (b) fixação da metáfase, (c) secagem do meristema, (d) digestão da parede celular com enzimas. .... 22
- Figura 8.** Anomalia em folhas do híbrido *A. hypogaea* X [*A. batizocoi* K9484 X *A. stenosperma* V10309]<sup>4x</sup>, evidenciada pela presença de necrose foliar e ausência de pigmentação de clorofila. (a) Três primeiras semanas pós-germinação, (b) 4 a 5 semanas pós-germinação, (c) 7 a 8 semanas pós-germinação. (d) Após mais de 8 semanas da germinação, não se evidencia nenhuma anomalia nas folhas e o crescimento da planta é normal..... 27
- Figura 9.** Produção de sementes dos híbridos gerados por parentais da subsp. *fastigiata* (1 a 3) e subsp. *hypogaea* (4 a 6) cruzados com (1) [*A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* Sesn2848]<sup>4x</sup>, (2) *A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis*

V14167] <sup>4x</sup> , (3) [ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. stenosperma</i> V10309] <sup>4x</sup> , (4) [ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. duranensis</i> Sesn 2848] <sup>4x</sup> , (5) [ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. duranensis</i> V14167] <sup>4x</sup> e (6) [ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. stenosperma</i> V10309] <sup>4x</sup> .	29
<b>Figura 10.</b> Avaliação da produção de sementes dos híbridos F <sub>1</sub> oriundos dos cruzamentos das cultivares Runner, Havana, Caiapó, Senegal e BR 1 com alotetraploides sintéticos [ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. duranensis</i> V14167] <sup>4x</sup> , [ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. duranensis</i> SeSn2848] <sup>4x</sup> , [ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. stenosperma</i> V10309] <sup>4x</sup> , considerando a influência de cada cultivar no número total de sementes produzidas.....	29
<b>Figura 11.</b> Comparação da produção de sementes entre a subespécie <i>hypogaea</i> , em relação à subespécie <i>fastigiata</i> quando cruzadas com os alotetraploides [ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. duranensis</i> V14167] <sup>4x</sup> , [ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. duranensis</i> SeSn2848] <sup>4x</sup> , [ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. stenosperma</i> V10309] <sup>4x</sup> .....	30
<b>Figura 12.</b> Porcentagem de ginóforos produzidos por flor polinizada – comparação entre os alotetraploides sintéticos [ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. duranensis</i> V14167] <sup>4x</sup> (a), [ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. duranensis</i> SeSn2848] <sup>4x</sup> e [ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. stenosperma</i> V10309] <sup>4x</sup> utilizados como parentais masculinos em cruzamentos com cultivares do amendoim cultivado (Runner, BR 1, Senegal, Havana e Caiapó). .....	34
<b>Figura 13.</b> Porcentagem de ginóforos produzidos por flor polinizada – comparação entre as cultivares de <i>A. hypogaea</i> Runner, BR 1, Senegal, Havana e Caiapó quando utilizadas como parentais femininos em cruzamentos com alotetraploides sintéticos [ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. duranensis</i> V14167] <sup>4x</sup> , [ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. duranensis</i> SeSn 2848] <sup>4x</sup> e [ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. stenosperma</i> V10309] <sup>4x</sup> .....	34
<b>Figura 14.</b> Porcentagem de ginóforos produzidos por flor polinizada – comparação entre as subespécies de <i>A. hypogaea</i> : subespécies <i>hypogaea</i> (Runner e Caiapó) e <i>fastigiata</i> (BR 1, Senegal e Havana), quando utilizadas como parentais femininas em cruzamentos com alotetraploides [ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. duranensis</i> V14167] <sup>4x</sup> , [ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. duranensis</i> SeSn2848] <sup>4x</sup> e [ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. stenosperma</i> V10309] <sup>4x</sup> .letras iguais não difere no teste Tukey 5%.....	35
<b>Figura 15.</b> Porcentagem do número de sementes produzidas pelo número de flores polinizadas – comparação entre os alotetraploides [ <i>A. batizocoi</i> K9484x <i>A. duranensis</i> V14167] <sup>4x</sup> , [ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. duranensis</i> SeSn2848] <sup>4x</sup> e [ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. stenosperma</i> V10309] <sup>4x</sup> , quando cruzados com cultivares de <i>A. hypogaea</i> (Runner, BR1, Senegal, Havana e Caiapó). .....	36
<b>Figura 16.</b> Porcentagem de sementes produzidas por flores polinizadas – comparação entre as cultivares de <i>A. hypogaea</i> Runner, BR 1, Senegal, Havana e Caiapó quando utilizadas como parentais femininos em cruzamentos com alotetraploides sintéticos [ <i>A. batizocoi</i> K9484x <i>A. duranensis</i> V14167] <sup>4x</sup> , [ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. duranensis</i> SeSn2848] <sup>4x</sup> e [ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. stenosperma</i> V10309] <sup>4x</sup> .....	37

<b>Figura 17.</b> Porcentagem de sementes produzidas pelo número de flores polinizadas – comparação entre as subespécies de <i>A. hypogaea</i> : subespécies <i>hypogaea</i> (Runner e Caiapó) e <i>fastigiata</i> (BR 1, Senegal e Havana), quando utilizadas como parentais femininas em cruzamentos com os alotetraploides [ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. duranensis</i> V14167] <sup>4x</sup> , [ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. duranensis</i> SeSn2848] <sup>4x</sup> e [ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. stenosperma</i> V10309] <sup>4x</sup> .....	37
<b>Figura 18.</b> Porcentagem de sementes F <sub>2</sub> produzidas por planta F <sub>1</sub> fértil (cultivares x alotetraploides) – comparação entre os alotetraploides [ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. duranensis</i> V14167] <sup>4x</sup> , [ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. duranensis</i> SeSn2848] <sup>4x</sup> e [ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. stenosperma</i> V10309] <sup>4x</sup> , quando cruzados com cultivares de <i>A. hypogaea</i> (Runner, BR 1, Senegal, Havana e Caiapó) para gerar as plantas F <sub>1</sub> . .....	39
<b>Figura 19.</b> Porcentagem de sementes F <sub>2</sub> produzidas por planta F <sub>1</sub> fértil (cultivares x alotetraploides) - comparação entre as cultivares de <i>A. hypogaea</i> Runner, BR 1, Senegal, Havana e Caiapó, quando utilizadas como parentais femininos em cruzamentos com alotetraploides sintéticos [ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. duranensis</i> V14167] <sup>4x</sup> , [ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. duranensis</i> SeSn2848] <sup>4x</sup> e [ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. stenosperma</i> V10309] <sup>4x</sup> , para geração das plantas F <sub>1</sub> . .....	39
<b>Figura 20.</b> Porcentagem de sementes F <sub>2</sub> produzidas por planta F <sub>1</sub> fértil (cultivares x alotetraploides) - comparação entre as subespécies de <i>A. hypogaea</i> : subespécies <i>hypogaea</i> (Runner e Caiapó) e <i>fastigiata</i> (BR 1, Senegal e Havana), quando utilizadas como parentais femininos em cruzamentos com alotetraploides [ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. duranensis</i> V14167] <sup>4x</sup> , [ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. duranensis</i> SeSn2848] <sup>4x</sup> e [ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. stenosperma</i> V10309] <sup>4x</sup> . .....	40
<b>Figura 21.</b> Porcentagem de sementes F <sub>2</sub> produzidas por planta F <sub>1</sub> (cultivares x alotetraploides), considerando as férteis e inférteis - comparação entre os alotetraploides [ <i>A. batizocoi</i> K9484x <i>A. duranensis</i> V14167] <sup>4x</sup> , [ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. duranensis</i> SeSn2848] <sup>4x</sup> e [ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. stenosperma</i> V10309] <sup>4x</sup> , quando cruzados com cultivares de <i>A. hypogaea</i> (Runner, BR 1, Senegal, Havana e Caiapó) para gerar as plantas F <sub>1</sub> . .....	42
<b>Figura 22.</b> Porcentagem de sementes F <sub>2</sub> produzidas por planta F <sub>1</sub> (cultivares x alotetraploides), considerando as férteis e inférteis – comparação entre as cultivares de <i>A. hypogaea</i> Runner, BR 1, Senegal, Havana e Caiapó, quando utilizadas como parentais femininos em cruzamentos com alotetraploides sintéticos [ <i>A. batizocoi</i> K9484x <i>A. duranensis</i> V14167] <sup>4x</sup> , [ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. duranensis</i> SeSn2848] <sup>4x</sup> e [ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. stenosperma</i> V10309] <sup>4x</sup> , para geração das plantas F <sub>1</sub> . .....	42
<b>Figura 23.</b> Porcentagem de sementes F <sub>2</sub> produzidas por planta F <sub>1</sub> (cultivares x alotetraploides), considerando as férteis e inférteis - comparação entre as subespécies de <i>A. hypogaea</i> : subespécies <i>hypogaea</i> (Runner e Caiapó) e <i>fastigiata</i> (BR 1, Senegal e Havana), quando utilizadas como parentais femininos em cruzamentos com alotetraploides [ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A.</i>	

<i>duransensis</i> V14167] <sup>4x</sup> , [ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. duransensis</i> SeSn2848] <sup>4x</sup> e [ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. stenosperma</i> V10309] <sup>4x</sup> .....	43
<b>Figura 24.</b> Segunda folha expandida do eixo central de <i>A. gregoryi</i> V6389. Imagens para cálculo da área foliar. ....	44
<b>Figura 25.</b> Segunda folha expandida do eixo central de <i>A. stenosperma</i> V10309. Imagens para cálculo da área foliar. ....	45
<b>Figura 26.</b> Segunda folha expandida do eixo central do híbrido diploide [ <i>A. gregoryi</i> V6389 x <i>A. stenosperma</i> V10309].....	45
<b>Figura 27.</b> Segunda folha expandida do eixo central do alotetraploide [ <i>A. gregoryi</i> V6389 x <i>A. stenosperma</i> V10309] <sup>4x</sup> . ....	46
<b>Figura 28.</b> Tamanho, formato e padrão foliar de (a) <i>A. gregoryi</i> V6389, (b) <i>A. stenosperma</i> V10309, (c) [ <i>A. gregoryi</i> V6389 X <i>A. stenosperma</i> V10309] diploide e (d) o alotetraploide. ....	47
<b>Figura 29.</b> Comparação entre a área foliar de <i>A. stenosperma</i> V10309 (b), <i>A. gregoryi</i> V6389 (c), o híbrido diploide (HD) (c) e o anfidiplóide (tetra) (a). Genótipos seguidos pelas mesmas letras não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Kruskal-Wallis.....	48
<b>Figura 30.</b> Folhas destacadas em bioensaio para teste de resistência a <i>Puccinia arachidis</i> . (A espécie <i>A. ipaënsis</i> (acesso KG 30076), com pontos marrons distribuídos na porção abaxial dos folíolos, foi o único parental altamente suscetível. A área lesionada pode ser visualizada na figura juntamente com o valor da proporção de lesão por área foliar (l/af). As folhas 3 e 8 apodreceram antes da detecção dos sintomas por infecção fúngica. ....	49
<b>Figura 31.</b> Folhas destacadas do alotetraploide [ <i>A. ipaënsis</i> KG 30076 x <i>A. villosa</i> V12812] <sup>4x</sup> inoculadas com <i>P. arachidis</i> . Esse alotetraploide foi o único que se mostrou altamente suscetível à agressão fúngica. A área lesionada pode ser visualizada na figura e o valor da proporção de lesão por área foliar (l/af).....	50
<b>Figura 32.</b> Índice de lesão/Área foliar. Todos os acessos silvestres foram resistentes, com exceção de <i>A. ipaënsis</i> KG 30076. Todos os alotetraploides foram resistentes, com exceção do alotetraploide derivado de <i>A. ipaënsis</i> KG 30076. ....	51
<b>Figura 33.</b> Período de Incubação do inóculo do fungo <i>Puccinia arachidis</i> . Apenas os genótipos com sintomas em mais de três parcelas foram inseridos neste gráfico.....	52
<b>Figura 34.</b> Análise molecular de cpDNA, utilizando o marcador <i>trnL-trnF</i> (primers E e F). <i>Arachis ipaënsis</i> , <i>A. batizocoi</i> e <i>A. gregoryi</i> são doadores de pólen (pai), as outras espécies são as receptoras de pólen (mãe). Cada grupo separado por uma chave corresponde a um genitor materno em amarelo, genitor paterno em vermelho e híbrido diploide e tetraploide em preto.....	53
<b>Figura 35.</b> GISH mostrando cromossomos metafásicos de <i>Arachis</i> , corados com DAPI. (A) cromossomos de <i>A. hypogaea</i> (Seijo, 2007), com padrão genômico “AABB” (seta branca genoma “A” e seta vermelha genoma “B”. (B) cromossomos do híbrido F <sub>1</sub> ( <i>A. hypogaea</i> Senegal X [ <i>A. batizocoi</i> K9484 X <i>A.</i>	

*stenosperma* V10309]<sup>4x</sup>, mostrando padrões do genoma “A” e “K”, com bandas heterocromáticas presentes (seta branca) e do genoma “B”, com bandas heterocromáticas ausentes (seta vermelha)..... 54

**Figura 36.** Cromossomos do híbrido proveniente do cruzamento entre *A. hypogaea* (Senegal) e o alotetraploide [*A. batizocoi* K9484 X *A. stenosperma* V10309]<sup>4x</sup>, mostrando bandas heterocromáticas em cromossomos do genoma A (**a**) e K (**k**). Genoma B sem centrômero visível. .... 55

**Figura 37.** Cromossomos do híbrido proveniente do cruzamento entre *A. hypogaea* (Senegal) e o alotetraploide [*A. batizocoi* K9484 X *A. stenosperma* V10309]<sup>4x</sup>, identificados por banda heterocromática DAPI positiva na figura (A); presente em 20 pares de cromossomos do genoma A (letra “a” em verde); ausentes em 10 pares de cromossomos do genoma B (letra “b” em laranja) e presente em 9 pares do genoma K (letra “k” em laranja). Na figura (B) Diferenciação dos cromossomos do híbrido, contendo banda heterocromática DAPI positiva genoma “A” (seta verde), genoma “K” (seta laranja) e com ausência de bandas heterocromáticas positivas o genoma “B” (seta branca), por GISH. Hibridização de cromossomos do híbrido com sonda de DNA genômico de *A. duranensis* (genoma A) (verde) e com sonda de *A. batizocoi* (genoma K) (vermelha). .... 56

## II. Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Espécies da Secção <i>Arachis</i> .....	2
<b>Tabela 2.</b> Cruzamentos realizados, nome das espécies e respectivos acessos utilizados como genitores femininos e masculinos. <i>A. ipaënsis</i> e <i>A. gregoryi</i> genoma B, <i>A. batizocoi</i> genoma K e genitores masculinos de genoma A. ....	10
<b>Tabela 3.</b> Cruzamentos entre cinco cultivares (Runner, Caiapó, Senegal, Havana e BR1) com os alotetraploides produzidos neste trabalho.....	17
<b>Tabela 4.</b> Número total de híbridos diploides e tetraploides obtidos em cada cruzamento e número médio de sementes produzidas em cada cruzamento..	26
<b>Tabela 5.</b> Número de flores polinizadas, quantidade de ginóforos produzidos, ginóforos que germinaram e o tempo para cada ginóforo germinar. Dados obtidos dos cruzamentos de <i>A. hypogaea</i> (Runner, BR 1, Senegal, Havana e Caiapó) com alotetraploides sintéticos [ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. duranensis</i> V14167] <sup>4x</sup> , [ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. duranensis</i> SeSn2848] <sup>4x</sup> e [ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. stenosperma</i> V10309] <sup>4x</sup> . ....	31
<b>Tabela 6.</b> Comparação da área foliar nos diferentes genótipos.....	47

### III. Abreviaturas

DAPI - fluorescência azul (4-6- diamidino-2-phenylindole)

IAC - Instituto Agronômico de Campinas

IBA - Ácido indol-butírico

TE - Eficiência de transpiração

SLA - Área Foliar Especifica

SCMR - Chlorophyll Meter Reading

SPDA meter - medidor de quantidade de clorofila da folha

cpDNA - DNA de Cloroplasto

FISH - Hibridização *in situ* fluorescente

GISH - Hibridização *in situ* de genoma

BOD - Câmara Incubadora

dUTP - desoxiuridina trifosfato

SSR - Simple Sequence Repeats (sequência de repetição simples ou microssatélites)

Anticorpo anti-dig conjugado com FITC - anticorpo anti-digoxigenina conjugado com isotiocianato de fluoresceína

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

DNA - Ácido desoxirribonucleico

RNA - Acido ribonucleico

Kb - quilobases

p/v - Peso/volume

pb - Pares de base



PCR - Reação em cadeia da polimerase

pH - Potencial hidrogeniônico

RPM - Rotações por minuto

UV - Ultravioleta

V - Volume

v/v - Volume/volume

dNTP - Desoxirribonucleotídeos 5' – trifosfato

KCl - Cloreto de potássio

MgCl<sub>2</sub> - Cloreto de magnésio

mM - milimolar

## RESUMO

Registros arqueológicos indicam que o amendoim foi domesticado por índios há pelo menos 3.500 anos na América do Sul. O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) pertence à família Fabaceae, subfamília Faboidea. O gênero *Arachis* é composto por cerca de 80 espécies, todas endêmicas da América do Sul. O Brasil se destaca por reunir todas as seções e a maioria das espécies. As espécies silvestres, mais próximas ao amendoim cultivado são quase todas diploides e são classificadas em genomas A, B e D. O grupo de genoma B (B lato sensu) foi recentemente dividido em três subgrupos: B sensu stricto, F e K. O amendoim cultivado é um tetraploide, com dois componentes genômicos distintos, cada um com 10 pares de cromossomos, A e B. As espécies com genomas A e B lato sensu são de maior interesse na busca de genes úteis para introgressão, por possuírem genomas semelhantes aos do amendoim cultivado. A utilização de espécies selvagens como fonte de resistência a pragas e doenças tem mostrado ser uma promessa para muitas culturas. Neste trabalho, um número de espécies silvestres diploides com genomas A, B sensu stricto, K, alotetraploides e cultivares de amendoim foram testados quanto à resistência contra a ferrugem (*Puccinia arachidis*), uma das mais importantes doenças fúngicas do amendoim. Os bioensaios foram feitos usando a técnica da folha destacada. Com exceção das cultivares controles e de uma das espécies silvestres (*A. ipaënsis*), todos os outros genótipos avaliados mostraram-se resistentes. Os acessos *A. gregoryi* V6389, *A. duranensis* SeSn2848, *A. stenosperma* V10309, *A. duranensis* V14167, *A. villosa* V12812, foram os mais resistentes. Híbridos foram produzidos a fim de introgridir genes de resistência a doenças, das espécies silvestres para o amendoim cultivado. No entanto, a hibridação direta entre amendoim cultivado, que é um tetraploide, e as espécies silvestres diploides produz híbridos triploides estéreis. Para superar essa barreira de infertilidade, um esquema de hibridação conhecido como "a rota tetraploide" foi usado. Híbridos interespecíficos foram obtidos entre espécies de genomas A e B lato sensu. Foram feitos cruzamentos entre as espécies, utilizando combinações B x A. No total, 90 híbridos estéreis AB foram obtidos, e foi confirmada a hibridação pela utilização de marcadores moleculares. Estes híbridos AB eram estéreis. Estacas destes híbridos foram

tratadas com colchicina para induzir duplicação cromossômica e recuperar a fertilidade. O objetivo foi produzir um genoma tetraploide fértil que é sexualmente compatível com o amendoim cultivado. A restauração da fertilidade foi confirmada com o surgimento de uma estrutura, ginóforo (uma extensão do ovário fecundado), após a floração. No total, 75 plantas resultantes dos cruzamentos *A. ipaënsis* KG30076 x *A. villosa* V12812, *A. batizocoi* K9484 x *A. stenosperma* V10309, *A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* SeSn2848, *A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* V14167e *A. gregoryi* V6389 x *A. stenosperma* V10309, recuperaram a fertilidade e produziram 2259 sementes viáveis. A fim de confirmar que os híbridos tinham o número esperado de cromossomos, análise citogenética foi feita. Para a detecção de bandas cromossômicas heterocromáticas foi utilizado DAPI, que apresenta afinidade para os nucleotídeos adenosina e timina. O número tetraploide esperado com 40 cromossomos foi confirmado em uma quantidade representativa das combinações híbridas. Híbridos alotetraploides foram cruzados com cultivares das duas subespécies de *A. hypogaea*: *A. hypogaea* subsp. *hypogaea* (Runner e Caiapó) e *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* (BR1, Senegal e Havana). A fertilidade e a produção de sementes, a produção de ginóforos em relação ao número de flores polinizadas, o tempo decorrido entre a emergência do ginóforo e sua frutificação, e a produção total de ginóforos foram registrados, permitindo que as características de cruzabilidade dos genótipos fossem inferidas. Todas as combinações do cruzamento [amendoim cultivado x alotetraploides] produziram sementes F<sub>1</sub> viáveis, embora com fertilidades diferentes. A caracterização citogenética do híbrido resultante do cruzamento de *A. hypogaea* com o alotetraploides [*A. batizocoi* K9484 x *A. stenosperma* V10309]<sup>4x</sup> foi também realizada. Observações com DAPI e GISH confirmaram a presença de 40 cromossomos. Os cromossomos mostraram a hibridação esperada e padrões de bandas característicos do genoma B (banda heterocromática ausente) e dos genomas A e K (bandas heterocromáticas positivas de DAPI na região do centrômero), representando o cariótipo 2n=4x (2A + 1B + 1K). Os resultados obtidos são promissores e indicam o potencial de novas combinações alélicas das espécies silvestres a serem introgridas nas cultivares de *A. hypogaea*.

**Palavras-chave:** Espécies silvestres, *Arachis hypogaea*, cruzamentos interespecíficos, alotetraploide, introgressão de genes.

## ABSTRACT

Archeological registers indicate that the peanut was first domesticated by South American Indians about 3.500 years ago. The peanut (*Arachis hypogaea* L.) belongs to the family Fabaceae, subfamily Faboidea. The genus *Arachis* is composed by nearly 80 species, all endemic from South America. Brazil gathers all the sections and most of the species. The wild species, which are closer to the cultivated peanut, are classified in the A, B and D genomes and are almost all diploids. The group which contains the B genome (*B lato sensu*) was recently divided in three subgroups: *B sensu stricto*, F e K. The cultivated peanut is a tetraploid, with two different genomic components, each one with 10 pairs of chromosomes, A and B. The species with genomes A and *B lato sensu* are the ones of a greater interest in the search of useful genes for the introgression because their genomes are similar to the cultivated peanut ones. The use of wild species as a source of resistance to pests and diseases has been affirmed as a promise for many cultures. In this work, a number of diploid wild species with genomes A, *B sensu stricto*, K, allotetraploids and varieties of peanut were tested to the resistance to the rust (*Puccinia arachidis*), one of the most important diseases in the peanut. The biotests were made using the detached leaf technique. Excluding the control varieties and one of the wild species (*A. ipaënsis*), all the other analyzed genotypes were resistant. The accesses *A. gregoryi* V6389, *A. duranensis* SeSn2848, *A. stenosperma* V10309, *A. duranensis* V14167, *A. villosa* V12812, were the most resistant. Hybrids were produced to insert resistance to disease genes from the wild species to the cultivated peanut. However, the direct hybridization between cultivated peanut – a tetraploid – and the wild diploid species produce hybrids sterile triploids. To overcome this infertility barrier, a hibridization plan – known as “tetraploid route” – was used. Interspecific hybrids were obtained between species of genomes A and *B lato sensu*. Crossings were made between the species, using combinations B x A. In total, 90 sterile hybrids AB were obtained, and it was confirmed the hybridization by use of molecular markers. These hybrids AB were sterile. Poles of these hybrids were treated with colchicine to induce chromosomal duplication and regain the fertility. The objective was to produce a tetraploid fertile genome sexually compatible to the cultivated peanut. The

restoration of fertility was confirmed with the appearance of a structure – gynophore (an extension of the impregnated ovary) – after blooming. In total, 75 plants, originated from the crossings *A. ipaënsis* KG30076 x *A. villosa* V12812, *A. batizocoi* K9484 x *A. stenosperma* V10309, *A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* SeSn2848, *A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* V14167e *A. gregoryi* V6389 x *A. stenosperma* V10309, recovered the fertility and produced 2259 viable seeds. In order to confirm that the hybrids had the expected number of chromosomes, a cytogenetic analysis was made. To detect the heterochromatic chromosomal bands, DAPI was used, which indicates the affinity for the nucleotides adenosine and thymine. The expected number tetraploid with 40 chromosomes was confirmed in a representative number of the hybrid combinations. Alotetraploid hybrids were crossed with varieties of the two subspecies of *A. hypogaea*: *A. hypogaea* subsp. *hypogaea* (Runner e Caiapó) and *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* (BR1, Senegal e Havana). The fertility and the production of seeds, the production of gynophores in relation to the number of pollinated flowers, the elapsed time between the gynophore emergency and its fructification and the total production of gynophores were registered, allowing the deduction of the crossing characteristics of the genotypes. All the combinations of the crossing [cultivated peanut x alotetraploids] produced viable F<sub>1</sub> seeds, although with different fertilities. The cytogenetic characterization of the hybrid resultant to the crossing of *A. hypogaea* with the alotetraploids [*A. batizocoi* K9484 x *A. stenosperma* V10309]<sup>4x</sup> was also made. Observations with DAPI and GISH confirmed the presence of 40 chromosomes. The chromosomes showed the expected hybridization and patterns of bands characteristics from genome B (absent heterochromatic band) and from the genomes A and K (heterochromatic positive bands of DAPI in the centromere region), representing the karyotype 2n=4x (2A + 1B + 1K). The results obtained are promising and indicate the potential of new allelic combinations of wild species to be introduced in varieties of *A. hypogaea*.

**Keywords:** wild species, *Arachis hypogaea*, interspecific crosses, alotetraploid, introgression of genes

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. O gênero *Arachis*

Por volta de 10 mil anos atrás, o homem deixou de ser nômade e passou a dominar o cultivo de algumas plantas, dando início às atividades agrícolas (Flannery, 1973). Registros arqueológicos indicam que o amendoim foi domesticado por índios há pelo menos 3.500 anos na América do Sul (Singh e Simpson, 1994). Achados históricos de mais de 3700 anos indicam que este gênero teve grande importância na dieta pré-colombiana (Hammons, 1994), e ainda hoje, espécies deste gênero são cultivadas por populações indígenas (citar a referência). Frutos de *Arachis duranensis* e *A. magna* encontrados em vestígios arqueológicos de Casma, no litoral do Peru (Stalker & Simpson, 1995) remonta a idéia de que muitas espécies podem ter sido levadas às áreas fora de seu local de ocorrência natural.

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) pertence à família Fabaceae, subfamília Faboidea, gênero *Arachis*. Este gênero é composto por cerca de 80 espécies, todas endêmicas da América do Sul, as quais foram divididas em nove seções taxonômicas, com base em caracteres morfológicos, viabilidade de cruzamentos e distribuição geográfica. A seção *Arachis*, à qual pertence o amendoim cultivado, é composta por 31 espécies (Krapovickas e Gregory, 1994; Valls & Simpson, 2005) e é a que mais apresenta caracteres evolutivos recentes (Valls, 2005; Valls & Simpson, 2005). O Brasil se destaca por reunir todas as seções e a maioria das espécies.

## 1.2. Espécies Silvestres

As espécies da seção *Arachis* (Tabela 1) são identificadas como diploides, possuindo dois conjuntos cromossômicos ( $2n=2x=20$  e  $2n=2x=18$ ), com exceção de *Arachis hypogaea* e *Arachis monticola* que são tetraploides ( $2n=2x=40$ ). Até pouco tempo, a seção *Arachis* revelava a presença de três genomas distintos, denominados de genoma A, B e D. O genoma A é caracterizado por ter um par de cromossomos de tamanho bem reduzido e (Husted, 1936; Seijo *et al.*, 2004), diferenciando assim do genoma B que não

possui o par pequeno de cromossomos. Um terceiro genoma, D, é caracterizado por ter seis pares de cromossomos subtelocêntricos (Stalker, 1991). Recentemente, Robledo & Seijo (2010) postularam que o grupo de genoma B deveria ser dividido em grupos *B sensu stricto*, F e K, com base em diferenças no mapeamento de locos de rDNA e na detecção de heterocromatina.

**Tabela 1.** Espécies da Secção *Arachis*

<b>Espécie</b>	<b>Genoma</b>	<b>Autor</b>
<i>A. batizocoi</i>	K	Krapov. & W.C. Gregory
<i>A. benensis</i>	B	Krapov., W.C. Gregory & C.E. Simpson
<i>A. cardenasii</i>	A	Krapov. & W.C. Gregory
<i>A. correntina</i>	A	(Burkart) Krapov. & W.C. Gregory
<i>A. cruziana</i>	K	Krapov., W.C. Gregory & C.E. Simpson
<i>A. decora</i>	-	Krapov., W.C. Gregory & Valls
<i>A. diogoi</i>	A	Hoehne
<i>A. duranensis</i>	A	Krapov. & W.C. Gregory
<i>A. glandulifera</i>	D	Stalker
<i>A. gregoryi</i>	B	C.E. Simpson, Krapov. & Valls
<i>A. helodes</i>	A	Mart. ex A. Chev.
<i>A. herzogii</i>	A	Krapov., W.C. Gregory & C.E. Simpson
<i>A. hoehnei</i>	B	Krapov. & W.C. Gregory
<i>A. hypogaea</i>	AB	Linnaeus.
<i>A. ipaënsis</i>	B	Krapov., W.C. Gregory & C.E. Simpson
<i>A. kempff-mercadoi</i>	A	Krapov. & W.C. Gregory
<i>A. krapovickasii</i>	K	C.E. Simpson, D.E. Williams, Valls & I.G. Vargas
<i>A. kuhlmannii</i>	A	Krapov. & W.C. Gregory
<i>A. linearifolia</i>	A	Valls, Krapov. & C.E. Simpson
<i>A. magna</i>	B	Krapov., W.C. Gregory & C.E. Simpson
<i>A. microsperma</i>	A	Krapov., W.C. Gregory & Valls



---

<i>A. monticola</i>	AB	Krapov. & Rigoni
<i>A. palustris</i>	-	Krapov., W.C. Gregory & Valls
<i>A. praecox</i>	-	Krapov., W.C. Gregory & Valls
<i>A. schininii</i>	A	Krapov., Valls & C.E. Simpson
<i>A. simpsonii</i>	A	Krapov. & W.C. Gregory
<i>A. stenosperma</i>	A	Krapov. & W.C. Gregory
<i>A. trinitensis</i>	A	Krapov. & W.C. Gregory
<i>A. valida</i>	B	Krapov. & W.C. Gregory
<i>A. villosa</i>	A	Benth
<i>A. williamsii</i>	B	Krapov. and W.C. Gregory

---

*Arachis monticola* possui genoma tipo “AABB”, com número de cromossomos igual a  $2n=40$ , é a única espécie silvestre tetraploide da seção *Arachis*, originada pela hibridização de duas espécies diploides, uma de genoma A e uma de B (Mallikarjuna *et al.*, 2004).

Estudos citogenéticos alinhados com dados de cruzamentos interespecíficos indicam que existe grande possibilidade de que *A. ipaënsis* e *A. duranensis* sejam os possíveis genitores de *A. hypogaea*, sendo *A. duranensis* o doador do genoma A e *A. ipaënsis*, do genoma B de *A. hypogaea* (Kochert *et al.*, 1996; Seijo *et al.*, 2004; Fávero *et al.*, 2006).

### 1.3. Espécie Cultivada

Existe uma expectativa na agricultura mundial em atender a uma das metas das Nações Unidas que é o combate à fome (Wenkel, 2009), e culturas como soja, milho, trigo, amendoim e outras provavelmente são importantes nesse propósito. O amendoim, de interesse internacional na produção de óleo, bem como na alimentação direta, constitui uma das principais fontes de vitaminas e proteínas para países em desenvolvimento (Savage & Keenan, 1994).

O amendoim pode ser utilizado de diversas formas, como óleo comestível, doces, pastas, confeitos e *in natura*. Apresenta elevada quantidade de calorias, cerca de 600 calorias em cada 100g, superadas apenas por nozes, gorduras e óleos vegetais; sua digestibilidade é boa, não diferenciando o alimento *in natura* dos processados (Taco, 2006; Tasso Junior, 2004). Com os grãos possuindo cerca de 50% de óleo, 25% de proteínas e 20% de carboidratos (Ahmed & Young, 1982), revelam um potencial como fonte de energia, tanto na alimentação como na geração de combustível renovável. O rejeito resultante da produção de óleo, juntamente com a parte aérea, são usados como ração animal. Outra importância é a capacidade de capturar e fixar o nitrogênio do ar por meio de associação simbiótica com a bactéria *Rhizobium* e promover maior fertilização do solo (Leal-Bertioli *et al.*, 2004).

A produção mundial de grãos de amendoim com casca em 2008 foi de 38 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2010). Embora com quase toda a produção consumida internamente, a China lidera a produção mundial (37,5%). Índia (18,7%) e a Nigéria (10,2%) vêm a seguir, sendo que o Brasil, com menos de 1%, contribui com pouco mais de 252,3 mil toneladas de amendoim (CONAB, 2011).

*Arachis hypogaea* é a única espécie do gênero cultivada em larga escala. Seu ciclo é anual, seu porte pode ser ereto com aproximadamente 60 cm de altura ou prostrada com 30 cm. Seu fenótipo difere substancialmente das espécies silvestres da seção *Arachis* (Burow *et al.*, 2008). Plantas de *A. hypogaea* têm geralmente maior biomassa, maior porte, folhas e frutos. Este aumento também é o reflexo do maior tamanho das células, denominado de “efeito gigas”, tornando-as muito maiores que as de seus genitores silvestres (Acquaah, 2007).

### **1.3.1. Tolerância A Estresses Bióticos**

A origem do amendoim cultivado, que pode ter ocorrido a partir de um único ou poucos eventos de poliploidização, tornou esta espécie sexualmente isolada dos seus parentes diploides e com a base genética estreita. A seleção artificial baseada em produtividade também pode ter levado à perda de genes

importantes, incluindo os de resistência a doenças (Dwivedi *et al.*, 2001, Bertioli *et al.*, 2005).

As manchas foliares causadas por fungos são as principais doenças da cultura do amendoim, sendo que no Brasil destacam-se: *Cercospora arachidicola* (mancha castanha), *Cercosporidium personatum* (mancha preta) e *Phoma arachidicola* (mancha barrenta). De forma esporádica, a ferrugem (*Puccinia arachidis*), com danos não tão expressivos, exceto quando ocorre em alguns locais com ambiente favorável ao crescimento fúngico, ou seja, com alta umidade e temperatura elevada (Tasso Junior, 2004).

O ácaro rajado (*Tetranychus urticae*), e o ácaro verde (*Mononychus planki*), ácaro vermelho (*Tetranychus evansi*), pulgão verde (*Myzus persicae*), lagarta rosca (*Agrotis ipsilon*), lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*), lagarta elasmó (*Elasmopalpus lignosellus*), lagarta-do-pescoço-vermelho (*Stegasta bosquella*), tripes-dos-folíolos (*Enneothrips flavens*) e a larva alfinete (*Diabrotica speciosa*) são alguns exemplos de pragas que estão fortemente envolvidas no baixo desenvolvimento das plantas e conseqüentemente reduzindo a produção de grãos (Tasso Junior, 2004; Embrapa Algodão, 2006).

Grandes prejuízos de importância econômica ocorrem nos plantios de amendoim, desde as fases iniciais até a colheita, tudo isto devido a pouca resistência aos principais agentes patogênicos (Nóbile *et al.*, 2008; Bertioli *et al.*, 2004). Tais pragas e doenças combinadas podem levar a uma perda na produção de amendoim de até 70% (Subrahmanyam, 1985), justificando, assim, a introgressão de genes de resistência encontrados nas espécies diploides da seção *Arachis*, no amendoim cultivado (Holbrook & Stalker, 2003).

#### **1.4. – Utilização de Germoplasma Silvestre no Melhoramento do Amendoim Cultivado**

A utilização de espécies silvestres de *Arachis* como fonte de resistência às importantes doenças e pragas tem se mostrado muito promissora em programas de melhoramento. Algumas espécies demonstram resistência a três fungos foliares importantes (*Cercospora arachidicola*, *Cercosporidium*

*personatum* e *Puccinia arachidis*) e também a nematoides *Meloidogyne* ssp. (Leal-Bertioli, 2004, Fávero *et al.*, 2004; Bertioli *et al.*, 2011).

Alguns trabalhos de introgressão de genes silvestres em cultivares mostraram-se bastante positivos. Simpson e colaboradores (1993) realizaram cruzamentos interespecíficos entre espécies silvestres da seção *Arachis* e obtiveram o alotetraploide TxAG-6, que foi originado do cruzamento de três espécies: *A. cardenasii* (GKP-10017, PI 262141) e *A. diogeni* (GKP-10602, PI 276235), ambas do genoma “A”, e a espécie outrora considerada com possuidora de genoma “B”, *A. batizocoi* (K-9484, PI 298639), resultando em um híbrido estéril que posteriormente foi tetraploidizado. TxAG-6 foi cruzado com *A. hypogaea*, gerando plantas com resistência a nematoides e doenças fúngicas (Simpson *et al.*, 1993, Simpson *et al.*, 2001, Simpson *et al.*, 2003).

Simpson (2001) realizou vários trabalhos em que são produzidos alotetraploides para introgressão de genes silvestres em variedades do amendoim e relata outros trabalhos que foram realizados há algum tempo, por volta de 1940. Entretanto somente em 1970 e 1975 foram lançadas as primeiras cultivares de amendoim com hibridação interespecífica, por Hammons (1970) e Simpson & Smith (1975). Outro trabalho, feito por Simpson & Starr (2001), resultou na criação da cultivar de amendoim chamada COAN, obtida a partir de retrocruzamentos (RC5) de *A. hypogaea* cv. Florunner como parental recorrente, com TxAG-6, como parental doador. Essa cultivar possui resistência ao nematoide-das-galhas (*Meloidogyne arenaria*), porém é bastante suscetível ao TSWV (Tomato spotted wilt virus). Outra cultivar lançada na Estação Experimental de Agricultura do Texas em 2002, com o nome de NemaTAM é resultante do mesmo cruzamento para a obtenção de COAN, e foi obtida a partir de seleção de plantas na geração RC7. Além de possuir resistência ao nematoide-das-galhas, essa cultivar apresenta maior potencial de rendimento do que a COAN, mas continua sendo suscetível ao TSWV (Starr *et al.*, 2002; Simpson *et al.*, 2003). Em 2008, foi lançada a cultivar Tifguard pelo USDA (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos), que possui resistência tanto ao nematoide-das-galhas, como ao TSWV, que afeta fortemente as cultivares COAN e NemaTAM (Holbrook *et al.*, 2008).

## 1.5. Herança de Cloroplasto

Ao longo do tempo, alterações evolutivas diferenciaram os cloroplastos das plantas atuais, dos seus ancestrais. Ainda assim, as sequências de DNA do cloroplasto (cpDNA) são relativamente bem conservadas, proporcionando oportunidade para estudos da história evolutiva das plantas (Clegg *et al.*, 1993), a partir do uso de oligonucleotídeos sintéticos que se ligam a essas regiões conservadas do cpDNA.

Geralmente, nas angiospermas ocorre herança de cloroplasto materno, e paterna ,(Ennos, 1994). Registros mostram que algumas espécies de angiospermas possuem herança paterna de cloroplasto (Shore. & Triassi 1998); Smith,1989; Muschner, 2005). Previamente, em algumas investigações feitas em um cruzamento interespecífico de *A. ipaënsis* x *A. duranensis*, verificou-se a herança de cloroplasto paterno (Bertioli, comunicação pessoal).

## 2. OBJETIVOS

Os objetivos gerais deste trabalho foram:

1. Produção de alotetraploides sintéticos a partir de espécies silvestres de *Arachis* como ferramenta para introgressão de caracteres desejáveis no amendoim.
2. Caracterização molecular, fitopatológica e citogenética de alotetraploides sintéticos.
3. Avaliação da cruzabilidade de alotetraploides com o amendoim cultivado.

### Objetivos específicos

1. Produzir alotetraploides sintéticos a partir de espécies silvestres de *Arachis*.
2. Realizar testes de cruzabilidade de alotetraploide sintéticos com o amendoim cultivado.

3. Caracterizar morfológicamente folhas dos alotetraploides e parentais diploides.
4. Caracterizar alotetraploides e parentais diploides com marcadores microssatélites.
5. Caracterizar citogeneticamente um híbrido do cruzamento entre um alotetraploide e uma cultivar de *A. hypogaea*.
6. Investigar a herança de cloroplasto em híbridos.
7. Avaliar alotetraploides e parentais diploides para resistência à doença fúngica causada por *Puccinia arachidis*.

### **3. HIPÓTESES CIENTÍFICAS**

1. Diferentes alotetraploides obtidos a partir de espécies silvestres de *Arachis* têm diferentes níveis de cruzabilidade com a espécie cultivada.
2. Embora *A. batizocoi* (genoma K) possua linha evolutiva distinta dos genomas A e B de *A. hypogaea*, pode ser efetivamente utilizada como um doador de genoma B em cruzamentos interespecíficos para introgressão de genes silvestres no amendoim cultivado.
3. Plantas obtidas pelo cruzamento do amendoim com espécies silvestres de *Arachis* resistentes a doenças foliares também possuem maiores níveis de resistência a essas doenças.
4. A herança de DNA de cloroplasto em *Arachis* é paterna em cruzamentos interespecíficos.

### **4. METODOLOGIA**

#### **4.1. Material Vegetal**

As atividades aqui descritas foram realizadas no Horto Botânico da Universidade Católica de Brasília. As plântulas germinadas foram transplantadas para vasos plásticos de aproximadamente cinco litros de substrato fértil, contendo: três partes de solo vermelho (latossolo), duas partes de areia lavada e 200g de NPK (4-30-16) e mantidas em casas de vegetação com temperatura e umidade ambientes.

Os acessos silvestres utilizados foram obtidos no Banco Ativo de Germoplasma de *Arachis* da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Tabela 2). Foram escolhidas algumas espécies da secção *Arachis* para hibridização, por terem características relevantes para programas de melhoramento genético do amendoim, como descrito abaixo:

- *A. batizocoi*, acesso K9484 - é doadora do genoma K para um alotetraploide sintético já publicado (Simpson *et al.*, 1993; Burow *et al.*, 2001).
- *A. magna* KG30097 - espécie filogeneticamente próxima ao provável doador do genoma B de *A. hypogaea*, *A. ipaënsis* (Bechara *et al.*, 2010; Friend *et al.*, 2010; Moretzsohn *et al.*, artigo em preparação). Acesso parental da população de referência de genoma B de *Arachis* (Moretzsohn *et al.*, 2009).
- *A. correntina* GKP9548 e *A. villosa* V12812 duas das espécies filogeneticamente próximas ao provável progenitor do genoma A de *A. hypogaea*, *A. duranensis* (M.C. Moretzsohn, comunicação pessoal).
- *A. stenosperma* V10309 - espécie filogeneticamente próxima ao provável progenitor do genoma A de *A. hypogaea*, *A. duranensis*, e acesso resistente ao nematoide-das-galhas e doenças fúngicas (Proite *et al.*, 2007, Leal-Bertioli *et al.*, 2010).
- *A. gregoryi* V6389 – espécie filogeneticamente próxima ao progenitor de *A. hypogaea*, *A. ipaënsis* (M.C. Moretzsohn, comunicação pessoal).

#### **4.1.1. Cruzamentos dos Parentais e Obtenção dos Híbridos**

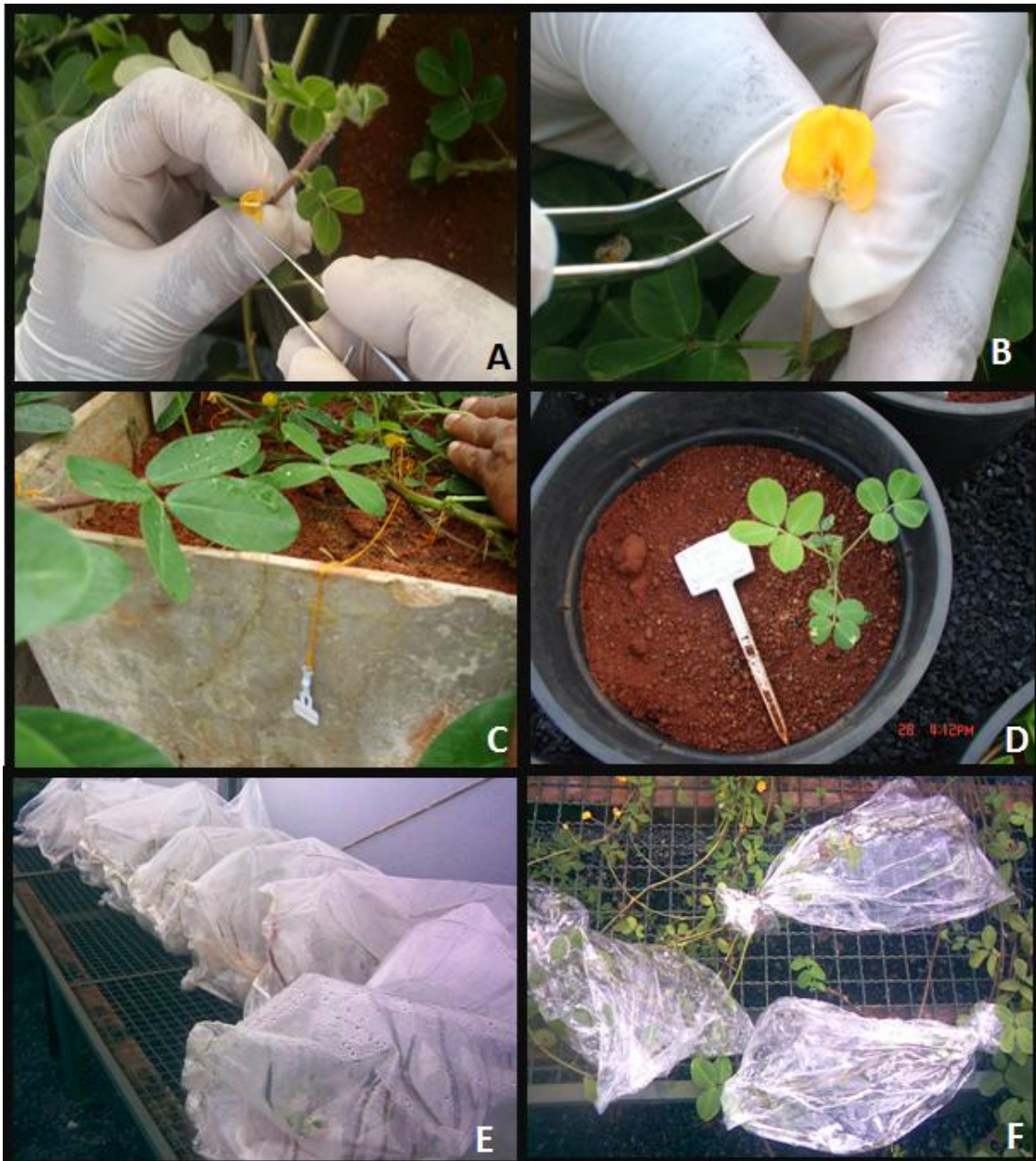
Para obtenção de híbridos interespecíficos, foram realizados cruzamentos, conforme as combinações entre genoma A e genomas B ou K. Para cada cruzamento, foram utilizadas três plantas como genitor feminino e uma planta como genitor masculino (Tabela 2). Os cruzamentos foram realizados como descrito por Simpson (1991). Diariamente, após as 17h, foram realizadas emascações em quatro flores em todos os genitores femininos, para evitar autopolinização. Foram escolhidos botões florais bem desenvolvidos e que provavelmente abririam no dia seguinte, para a realização da emascação. As flores restantes foram eliminadas. Na manhã seguinte,

entre as 8h e 10h, momento de maior fertilidade do pólen, foram feitas polinizações das flores emasculadas com o pólen das flores dos genitores masculinos e marcadas com um barbante preso no entrenó adjacente à inflorescência. A estação de cruzamentos durou cinco meses (entre outubro e fevereiro), período de maior fertilidade, conforme o ciclo das plantas. Os passos para a obtenção dos híbridos interespecíficos deste cruzamento podem ser visualizados na figura 1.

**Tabela 2.** Cruzamentos realizados, nome das espécies e respectivos acessos utilizados como genitores femininos e masculinos. *A. ipaënsis* e *A. gregoryi* genoma B, *A. batizocoi* genoma K e genitores masculinos de genoma A.

Genitor feminino		Genitor masculino
<i>A. ipaënsis</i> KG30076	X	<i>A. correntina</i> KG 9548
	X	<i>A. villosa</i> V12812
<i>A. gregoryi</i> V6389	X	<i>A. stenosperma</i> V10309
<i>A. batizocoi</i> K9484	X	<i>A. villosa</i> V12812
	X	<i>A. correntina</i> KG9548
	X	<i>A. duranensis</i> V14167
	X	<i>A. stenosperma</i> V10309
	X	<i>A. stenosperma</i> V13828
	X	<i>A. stenosperma</i> V7762





**Figura 1.** Cruzamento dos parentais silvestres; obtenção do híbrido tetraploide. (A) Coleta de pólen da planta doadora; (B) Flor emasculada preparada para receber o pólen; (C) etiqueta de marcação da flor polinizada; (D) planta jovem hibridizada, diploide, oriunda de cruzamento; (E) estacas de híbridos diploides submetidas ao tratamento com colchicina; (F) pontas de ramos de híbridos diploides submetidas ao tratamento com colchicina.

## 4.2 Identificações de Híbridos

Evidências da hibridação consistiam do surgimento de características morfológicas, típicas de plantas hibridadas, nas folhas das plantas jovens e também em suas flores, como por exemplo: folha com necroses, apoptose

foliar, ausência de pigmentação (clorofila) em algumas folhas e coloração das pétalas, característica herdada do genitor paterno.

Além disso, sementes provenientes dos cruzamentos foram colocadas para germinar e plantas híbridas foram identificadas por meio de caracterização molecular com marcadores microssatélites. Essas análises foram realizadas no Laboratório de Genética Vegetal, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

#### **4.2.1. Extração de DNA**

DNA genômico foi extraído de folhas jovens de acordo com o método descrito por Ferreira e Grattapaglia (1998), com algumas modificações (anexo 1). A quantificação do DNA nas amostras foi feita por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio, comparando-se a fluorescência com diferentes padrões de DNA fago  $\lambda$ . As amostras de DNA foram diluídas a uma concentração de uso de 2,5ng/ $\mu$ l.

#### **4.2.2. PCR dos locos SSR**

Para a confirmação de híbridos, foi utilizado um primer que apresenta polimorfismo entre os parentais utilizados. As PCRs (reações de polimerase em cadeia) foram realizadas em volume de 13  $\mu$ L, contendo tampão de PCR 1X (Tris-HCl 10mM pH 8,3; KCl 50mM, MgCl<sub>2</sub> 2,0 mM), 0,2 mM de cada dNTP, uma unidade de *Taq* DNA polimerase (Phoneutria), 1 ng/ $\mu$ L de BSA purificado, 5 pmol do primer Ah-041 (Ah-041-For: 5'-CGCCACAAGATTAACAAGCACC-3', Ah-041-Rev: 5'- GCTGGGATCATTGTAGGGAAGG-3') (Moretzsohn *et al.*, 2004) e 10 ng de DNA genômico. As amplificações foram realizadas em termociclador ABI 9700 (Applied Biosystems, EUA), com as seguintes condições: 96°C por 2 min (1 ciclo), 94°C por 1 min, 60°C por 1 min, 72°C por 1 min (30 ciclos), e 72°C por 7 min (1 ciclo). Os fragmentos amplificados foram visualizados em géis de poliacrilamida a 5%, corados com solução de nitrato de prata 0,2%, conforme Creste *et al.* (2001).

### **4.3. Tetraploidização dos Híbridos Diploides**

Para duplicação cromossômica, foi utilizado o protocolo descrito por Simpson (1991), com modificações descritas abaixo (seção 4.3.1). Este procedimento foi realizado no laboratório do Horto Botânico no Campus I da Universidade Católica de Brasília. Foram feitas aproximadamente dez estacas por genótipo híbrido, com 15-20 cm, cortadas no internódio e retirando suas folhas, deixando apenas o ápice caulinar com as folhas adjacentes.

As estacas foram colocadas em tubos de ensaio e imersas em solução de colchicina (Sigma) a 0,2% na parte apical das estacas em aproximadamente 8-10 cm. Os tubos de ensaio foram vedados com filme plástico de PVC e incubados entre 28 e 30°C e luz fluorescente por aproximadamente 10 h.

As estacas foram lavadas em água corrente por 20 min e cortadas em bisel na parte basal. No corte, foi feita uma pulverização com o fitohormônio enraizador ácido indolbutírico (AIB).

As estacas foram plantadas em copos plásticos com substrato (mistura de areia, terra de subsolo e fertilizante, na proporção de 70% de areia, 30% de solo do tipo latossolo) e colocadas em bandejas. Para cada bandeja com aproximadamente 2 litros de substrato, foram adicionados 50 g do fertilizante N-P-K com a formulação 4-30-16 e incubadas a 30°C para enraizamento.

Ao fim de aproximadamente um mês, as estacas com folhas novas e vigorosas foram removidas para confirmação da presença de raízes e em seguida, plantadas em caixas de 20 l. O substrato usado continha 60% de areia lavada de textura média, 40% de subsolo do tipo latossolo e 450 g do fertilizante N-P-K com a formulação 4-30-16, para cada 0,3m<sup>3</sup> de substrato preparado (figura 2).



Figura 2. Obtenção de alotetraploides sintéticos, (a) estacas submetidas ao tratamento com colchicina (0,2%), (b) estacas tratadas em brotamento (c) estacas tratadas em substrato definitivo e (d) brotamento lateral de um possível tetraploide.

#### 4.3.1 Adequação de Protocolos para Duplicação Cromossômica

Visando aperfeiçoar o processo de duplicação de cromossomos com colchicina, foram testadas algumas adaptações ao protocolo descrito por Simpson (1991).

Na primeira modificação testada, o tecido vegetal não foi destacado da planta a ser duplicada, ou seja, as pontas das ramas do híbrido diploide foram submetidas ao tratamento de duplicação cromossômica, sem serem destacadas da planta, permanecendo imersas na solução de colchicina em tubos de ensaio, dentro da câmara de crescimento a uma temperatura em torno de 25°C. Após o período de 10 h, as pontas das ramas foram lavadas em água corrente por 15 min. e acondicionadas dentro de uma sacola plástica contendo aproximadamente 5 ml de água. As pontas das ramas permaneceram nessas condições por oito dias em casa de vegetação a uma temperatura que não excedia os 30°C (Figura 3 a-d).



**Figura 3.** Protocolo de duplicação de cromossomos com tratamento usando colchicina. (a) pontas das ramas não destacadas tratadas com colchicina, (b) podas das folhas para indução de brotamento (c) ponta da rama com brotação (d) ponta da rama com o ginóforo.

A segunda modificação consistiu em cortar a estaca deixando em uma de suas extremidades o ápice de crescimento e submergindo-a totalmente na solução de colchicina 0,2%, pelo mesmo período e mesmas condições da primeira modificação (figura 4 a-d). As estacas foram lavadas em água corrente, plantadas em areia lavada de textura média e mantidas dentro de um saco plástico até o enraizamento. Quando as folhas surgiram, foram transferidas para um substrato que continha 60% de areia lavada de textura média, 40% de subsolo do tipo latossolo e 450 g do fertilizante N-P-K com a formulação 4-30-16, para cada 0,3m<sup>3</sup> de substrato preparado.



**Figura 4.** Passos para duplicação dos cromossomos utilizando a técnica de total imersão das estacas em solução de colchicina 0,2%. (a) estacas com o ápice de crescimento em uma das extremidades; (b) união das estacas com barbantes; (c,d) total imersão das estacas na solução.

#### **4.4. Cruzabilidade entre Alotetraploides sintéticos e *A. hypogaea***

Cinco grupos de cultivares de *A. hypogaea* foram utilizados como genitores maternos: *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* var. *fastigiata* cv. BR 1, *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* var. *fastigiata* cv 55-437 (Senegal), *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* var. *fastigiata* cv. BRS Havana, *A. hypogaea* subsp. *hypogaea* var. *hypogaea* cv. IAC-Caiapó e *A. hypogaea* subsp. *hypogaea* var. *hypogaea* cv. Runner IAC 886. Como plantas paternas doadoras de pólen, foram usados os alotetraploides sintéticos obtidos na seção 4.3. Os cruzamentos ocorreram como descritos na Tabela 3. Foi realizado um total de 15 combinações de cruzamentos, cada cultivar com 9 plantas e cada alotetraploide cruzava com três plantas de amendoim. Para cada cruzamento foram contados as flores polinizadas, os ginóforos produzidos, ginóforos que frutificaram e o tempo para as sementes germinarem.

As emascações foram feitas das 16 às 17 h e as polinizações na manhã seguinte, das 8 às 10 h. Foram emasculadas cinco flores de cada genitor materno e para a identificação das flores emasculadas, foram colocadas etiquetas contendo indicações sobre o cruzamento realizado, presas ao internódio abaixo da inflorescência. Foram realizados alguns testes estatísticos para interpretação dos resultados. Para tanto, foi feito o teste de normalidade de Shapiro-Wilk e quando se detectava que havia distribuição normal, realizava-se em seguida o teste Tukey para avaliar a magnitude das diferenças entre as médias dos genótipos comparados. Quando não havia distribuição normal realizava-se o teste Kruskal-Wallis para avaliar o tamanho das diferenças entre as médias dos genótipos comparados.

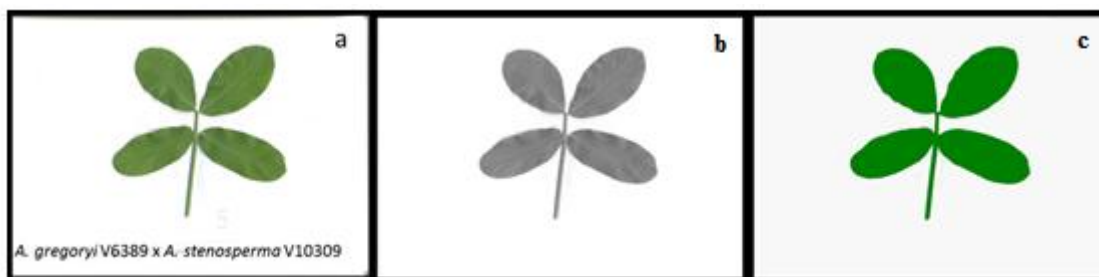
Foram feitas comparações de médias para saber se havia diferenças estatísticas entre os genótipos estudados, em relação à suscetibilidade a ferrugem, à área foliar e a vários parâmetros de fertilidade.

**Tabela 3.** Cruzamentos entre cinco cultivares (Runner, Caiapó, Senegal, Havana e BR1) com os alotetraploides produzidos neste trabalho.

<b>Cruzamentos</b>	
<b><i>A. hypogaea</i>/Genitor materno</b>	<b>Alotetraploides/Genitor paterno</b>
cv. Runner IAC 886 (9)	[ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. duranensis</i> V14167] <sup>4x</sup> [ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. duranensis</i> SeSn 2848] <sup>4x</sup> [ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. stenosperma</i> V10309] <sup>4x</sup>
cv. IAC-Caiapó (9)	[ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. duranensis</i> V14167] <sup>4x</sup> [ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. duranensis</i> SeSn 2848] <sup>4x</sup> [ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. stenosperma</i> V10309] <sup>4x</sup>
cv. 55-437 Senegal (9)	[ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. duranensis</i> V14167] <sup>4x</sup> [ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. duranensis</i> SeSn 2848] <sup>4x</sup> [ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. stenosperma</i> V10309] <sup>4x</sup>
cv. BRS Havana (9)	[ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. duranensis</i> V14167] <sup>4x</sup> [ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. duranensis</i> SeSn 2848] <sup>4x</sup> [ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. stenosperma</i> V10309] <sup>4x</sup>
cv. BR 1 (9)	[ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. duranensis</i> V14167] <sup>4x</sup> [ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. duranensis</i> SeSn 2848] <sup>4x</sup> [ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. stenosperma</i> V10309] <sup>4x</sup>

#### 4.5. Determinação da Área Foliar de Alotetraploides e Parentais Diploides

Essa análise foi conduzida no laboratório do Horto Botânico da Universidade Católica de Brasília. Sob as mesmas condições de temperatura, umidade e nutrição, foi coletada a segunda folha expandida do eixo central do híbrido [*A. gregoryi* V6389 x *A. stenosperma* V10309] diploide e tetraploide e dos parentais silvestres. As áreas de cinco folhas por genótipo foram analisadas. Todas as folhas foram escaneadas e as imagens obtidas foram convertidas para escala de cinza e posteriormente toda a folha foi preenchida com a cor verde. As imagens foram analisadas pelo programa computacional QUANT-1.0.1p, que reconhece o limbo foliar e, utilizando a referência da cor verde presente na imagem, calcula a área da folha (figura 5). Para a análise estatística, percebeu-se que os dados não apresentaram distribuição normal após aplicar o teste Tukey. Neste caso, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis para ranqueamento de médias.



**Figura 5.** Preparação da folha para determinação da área foliar. A imagem da folha obtida (a) foi convertida para escala de cinza (b), em seguida para cor verde (c) e analisada pelo programa computacional QUANT®, o qual reconhece o limbo foliar.

#### 4.6. Teste de Resistência ao Fungo Patogênico *Puccinia arachidis*

Para este experimento de resistência ao fungo foi utilizada a técnica de folhas destacadas, desenvolvida por Moraes & Salgado (1984). Esta técnica consiste em testar o fungo em folhas destacadas em placas de Petri com alta umidade.

A umidade nas placas de Petri era mantida por uma camada de algodão coberta por papel-filtro. Uma lâmina histológica era utilizada para suspender os folíolos acima da água (figura 6 a.b). As folhas das plantas testadas (*A.*



*ipaënsis* KG30076, *A. correntina* KG 9548, *A. villosa* V12812, *A. gregoryi* V6389, *A. stenosperma* V10309, *A. batizocoi* K9484, *A. villosa* V12812, *A. duranensis* V14167, *A. stenosperma* V13828, *A. stenosperma* V7762, [*A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* V14167]<sup>4x</sup>, [*A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* SeSn 2848]<sup>4x</sup>, [*A. batizocoi* K9484 x *A. stenosperma* V10309]<sup>4x</sup>) e híbridos F<sub>1</sub> do cruzamento das cultivares com os alotetraplóides na seção 4.4 foram coletadas, lavadas e acondicionadas em placas de Petri com a face abaxial voltada para cima. Um chumaço de algodão úmido foi colocado na ponta do pecíolo para evitar dessecação (figura 6. a.b). Todas estas etapas foram feitas no mesmo dia. Somente a inoculação do fungo foi feita no dia seguinte em função do tempo.

Para testar a resistência de genótipos diferentes à ferrugem, esporos do fungo *Puccinia arachidis* foram coletados de pústulas de plantas de *A. hypogaea* contaminadas naturalmente em casa de vegetação no Horto Botânico da Universidade Católica de Brasília (DF). Os esporos foram raspados das pústulas com o auxílio de um estilete e colocados em uma solução de Tween 20 a 0,5% à concentração de 100.000 esporos por ml. A contagem dos esporos foi feita em câmara de Neubauer. A inoculação dos esporos nas folhas foi feita com pincelamento da suspensão na face abaxial de cada folha dentro da placa de Petri, de forma que fosse molhada sem escorrer (figura 6. d). As placas foram fechadas com plásticos para o controle da umidade e mantidas em caixas de papelão para escurecimento do ambiente nas primeiras 48 horas.

Para cada genótipo, foram realizadas oito repetições, ou seja, oito folhas coletadas aleatoriamente de cada grupo. Essas placas foram espalhadas em estantes de forma aleatória e mantidas em um ambiente controlado com temperatura de 23-25°C e fotoperíodo de 12h de luz e 12 horas de escuro (figura 6. c).

As avaliações foram feitas entre 12 e 25 dias após inoculação. Foram observados o período de incubação, o número de lesões e a área lesionada (mm<sup>2</sup>) por área foliar total (mm<sup>2</sup>). Neste trabalho, foram feitos testes estatísticos

que complementam as análises. Para todos as análises seguiu-se dos seguintes procedimentos

Foram feitas comparações de médias para saber se havia diferenças estatísticas entre os genótipos estudados em relação à suscetibilidade a ferrugem.



**Figura 6.** Bioensaio para teste de resistência ao fungo *P. arachidis* nos parentais, alotetraploides e cultivares. (a) Montagem da folha destacada na placa de Petri, (b) folhas destacadas de um genótipo pronto para receber o inóculo de *P. arachidis*, (c) câmara de crescimento com iluminação e temperatura controladas para desenvolvimento do bioensaio, (d) coleta de esporos para produzir inóculo.

#### 4.7. Herança do DNA de Cloroplasto

A herança do DNA de cloroplasto (cpDNA) foi analisada em híbridos diploides e alotetraploides e seus parentais silvestres diploides.

A extração do DNA para análises de cloroplastos das plantas envolvidas nos cruzamentos (tabela 2) seguiu o mesmo protocolo de extração de DNA nuclear (anexo 1).

A amplificação do DNA foi realizada em reações de 13 µl, contendo 0.15 µM de cada oligonucleotídeo, 0,20 µM de cada dNTP, tampão de PCR 1X (10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>), 0,20 mg/ml de BSA, 1,5 unidade de *Taq* DNA polimerase (Phorontia, Brasil), e 2,5 ng de DNA. As condições: 96°C por 2 minutos (1 ciclo), 94°C por 1', 60°C por 1', 72°C por 2' (a cada ciclo acrescenta-se 5") (35 ciclos) e 72°C por 10' (1 ciclo). Para o marcador *trnL-trnF* (Taberlet *et al.*, 1991), os primers "E" (GGTTCAAGTCCCTCTATCCC) e "F" (ATTTGAACTGGTGACACGAG) foram utilizados para amplificação do espaçador intergenômico. Os produtos de PCR foram visualizados e analisados por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida 5% corado com nitrato de prata 0,2% (Creste *et al.*, 2001).

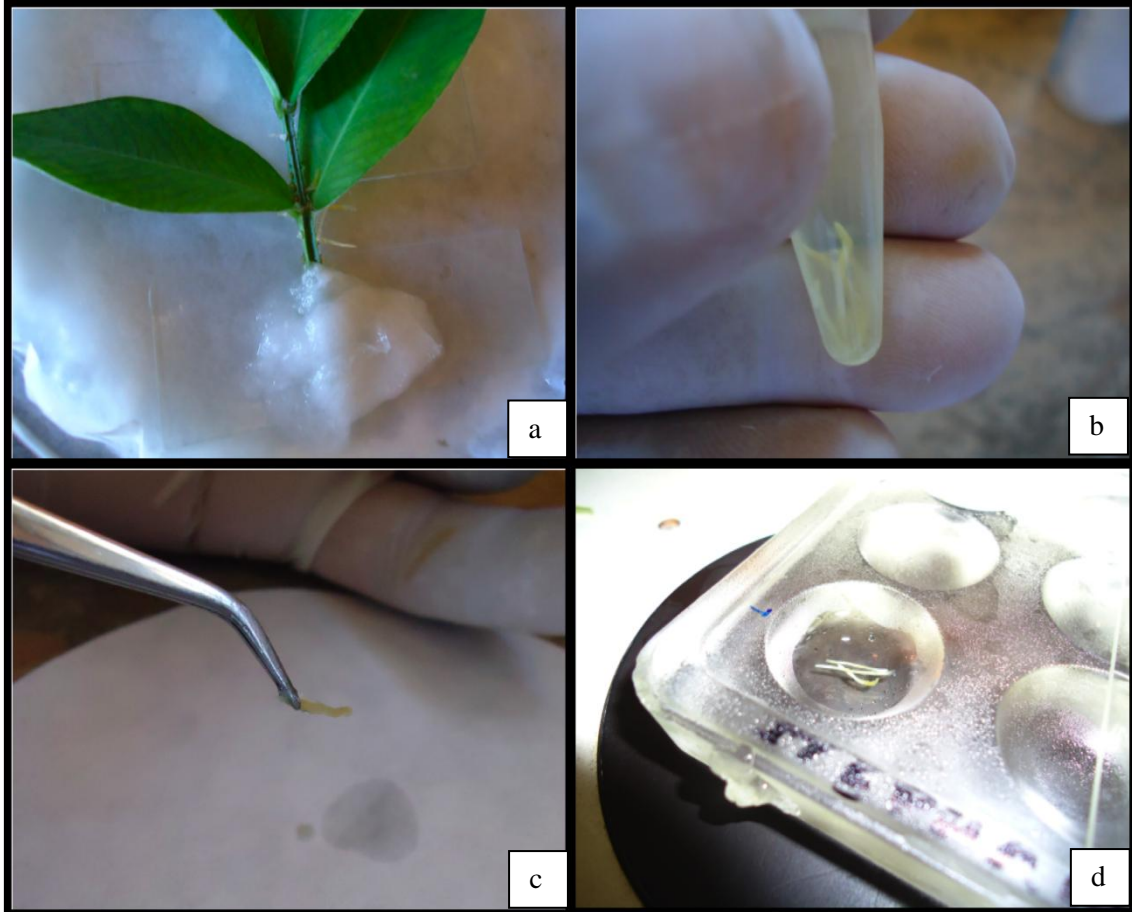
#### 4.8. Análises Citogenéticas

Os cromossomos de híbridos de cruzamentos de *A. hypogaea* com alotetraploides tiveram sua origem (genoma A, B ou K) caracterizada por meio da observação da presença de banda heterocromática DAPI positiva na região centromérica (genoma A e K) ou ausente (genoma B) em cromossomos metafásicos. Para distinção de cromossomos com presença de banda heterocromática DAPI positiva do genoma A ou K, foi utilizada a técnica de GISH (hibridização in situ genômica).

Porções de meristema radicular (5mm) retirados a partir de enraizamento de pecíolos foliares incubados em placas de Petri preparadas com algodão e papel de germinação para manter a alta umidade mantidas a 25°C (figura 7. a) foram obtidas para análises citogenéticas. Os meristemas radiculares foram tratados por 3 h com solução de 2 mM de 8-hidroxiquinoleína para inibição da divisão mitótica na fase de metáfase. As amostras foram fixadas em solução de álcool absoluto: ácido acético (3:2, v/v) por uma hora, no gelo, outra hora após troca por nova solução de fixação e mais uma hora com nova solução fixadora em temperatura ambiente. As amostras foram armazenadas -20°C (figura 7. b).

Para a preparação das lâminas contendo cromossomos metafásicos, os meristemas fixados foram tratados com tampão (4 mM de ácido cítrico, citrato

de sódio 6 mM, pH 4,8) contendo 2% de celulase Onozuka R10 (Merck) e 20% de pectinase (Sigma) por 30 min a 37°C (figura 7 c.d).



**Figura 7.** Obtenção do meristema radicular. (a) enraizamento do pecíolo, (b) fixação da metáfase, (c) secagem do meristema, (d) digestão da parede celular com enzimas.

As células do meristema radicular foram isoladas por espalhamento em uma gota de ácido acético 45% sobre uma lâmina histológica com auxílio de uma agulha de relojoeiro, movimentando a amostra no microscópio estereoscópico. Após espalhamento, as lâminas foram colocadas a 45°C por 1 min. em uma placa adaptada em um termociclador (Maluszynska & Heslop-Harrison 1993). As lâminas foram lavadas com solução de ácido acético a 60%, secas a temperatura ambiente e avaliadas em microscópio de fase quanto a sua qualidade (quantidade de metáfases, conjunto completo de cromossomos, espalhamento adequado, ausência de restos citoplasmáticos) e armazenadas a

4°C até sua utilização.

Para detecção de bandas heterocromáticas, foi utilizado DAPI (4'-6-diamino-2-fenilindol) que apresenta afinidade a nucleotídeos A-T do DNA. Parte das lâminas foi tratada com solução de 4 µg/ml de DAPI por 10 min em condição escura, o excesso removido e as lâminas montadas com meio de montagem anti-desvanecimento. As lâminas foram observadas em microscópio de epifluorescência Zeiss Axiophot (Carl Zeiss, Germany) usando filtro para DAPI. Fotodocumentação foi realizada com filmes de impressão a cores Kodak Ultra ISO 400, digitalizadas e editadas usando o software Adobe Photoshop (Microsoft).

Para GISH, foram confeccionadas sondas de DNA a partir do DNA genômico de *A. duranensis* (genoma A) e de *A. ipaënsis* (genoma B) utilizando o kit de *Nick Translation* (Roche) e digoxigenina-11-dUTP ou biotina-11-dUTP (Roche).

As lâminas contendo metáfases para GISH foram pré-tratadas com RNase A, pepsina e ácido clorídrico e posteriormente fixadas com formaldeído. A hibridização, lavagens e detecção de sítios de hibridização foram realizadas segundo Schwarzacher e Heslop-Harrison (2000). Cada sonda de DNA (100 ng/ml para FISH e 65 ng/mL para GISH) desnaturada por 10 min a 90°C foi adicionada à solução de hibridização contendo formamida 50% (v/v), sulfato de dextrana 10% (v/v), 0,125 mM de EDTA, 0,125% (w/v) de SDS, e 1 µg de DNA de esperma de salmão.

O DNA dos cromossomos-alvo e a solução de hibridização contendo a sonda foram desnaturados por 10 min a 81,5°C. As lâminas hibridizadas por 16 h a 37°C. Foram lavadas em solução com aproximadamente 85% de stringência. Sítios de hibridização foram detectados utilizando anticorpo anti-digoxigenina conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (para sondas com digoxigenina) ou estreptavidina conjugada com Cy3 (para sondas com biotina) e por ultimo, os cromossomos foram corados pelo DAPI e, lâminas montadas conforme descrito acima. Observação em microscópio epifluorescente usando filtros para FITC, CY3 e DAPI e fotodocumentação foram realizadas conforme descrito acima.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Hibridização e Duplicação Cromossômica

Os cruzamentos realizados entre as espécies silvestres resultaram em 90 plantas híbridas (tabela 4), confirmadas por meio de análises moleculares. Algumas características de incompatibilidade foram detectadas nas primeiras folhas que iam surgindo tais como, necrose e ausência de pigmentação de clorofila nas folhas (figura 8.a-d). Entretanto, aproximadamente 20 dias após a germinação, as folhas foram perdendo as características de anomalias genéticas, por motivos ainda não conhecidos.

O cruzamento *A. batizocoi* K9484 x *A. villosa* V12812 mostrou-se inviável pelas anomalias apresentadas. As sementes produzidas e germinadas geraram plantas que após perderem as folhas, morriam em algumas semanas. Em outros trabalhos, este cruzamento gerou certo grau de dificuldade para obtenção de híbridos e híbridos férteis (Fávero, 2004; Stalker, 1991). Isso sugere que nesta combinação possa haver incompatibilidade cromossômica ou gênica entre os genomas diferentes, causando silenciamento gênico, reestruturação cromossômica, ação de transposons ou novos padrões de expressão gênica de difícil determinação.

Por meio das estacas retiradas dos híbridos diploides tetraploidizados, 75 plantas foram obtidas dos cruzamentos e estas produziram 2259 sementes viáveis (Tabela 4). A tetraploidização foi deduzida com a presença de ginóforo, um prolongamento do ovário fertilizado que surge na axila dos ramos tetraploidizados, confirmando assim restauração da fertilidade (figura. 2.d). Estes alotetraplóides apresentaram crescimento vigoroso, com folhas e ramos seguindo padrões presentes em seus parentais, porém com aumento considerável do tamanho dos seus órgãos, provavelmente devido ao aumento de tamanho das células e espaços intercelulares (Acquaah, 2007).

Com o primeiro protocolo para duplicação cromossômica, adaptado de Simpson (1991), foram obtidas quatro plantas tetraploidizadas de 30 pontas de

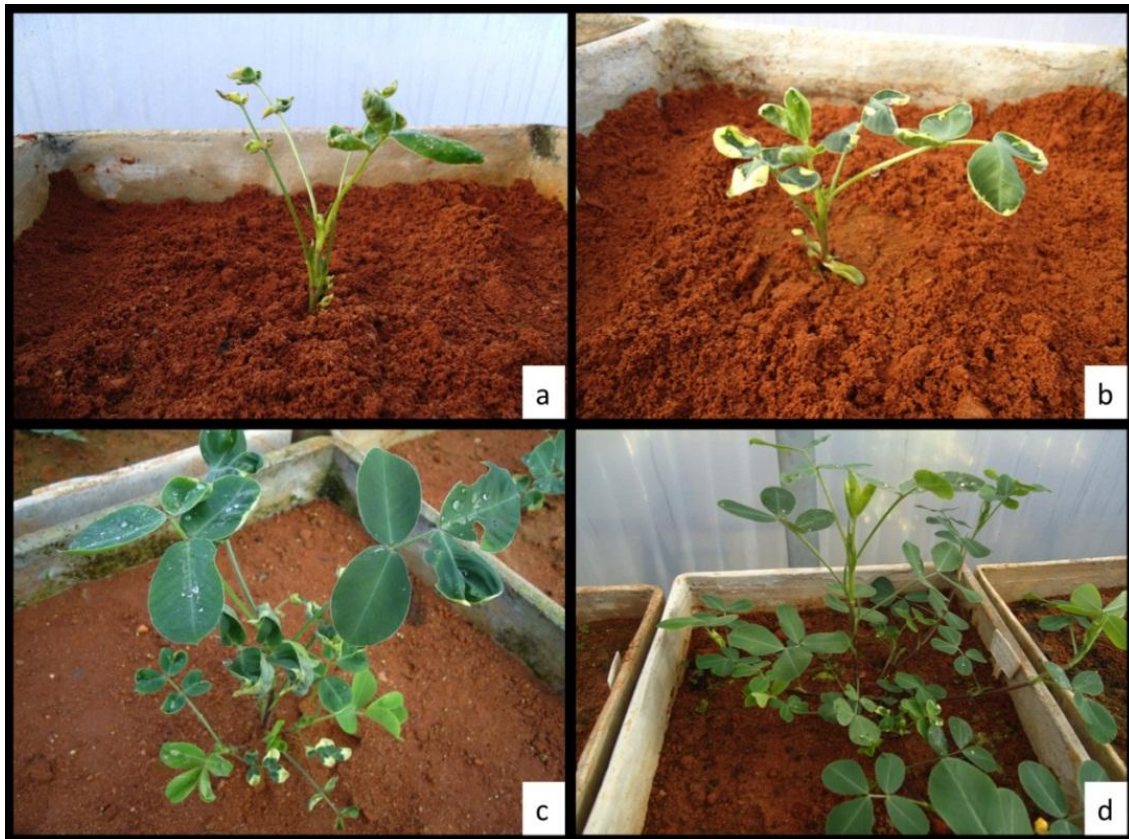
ramas submetidas ao tratamento com colchicina, correspondendo a 13% de sucesso.

Já com o segundo protocolo, o qual submete toda a superfície da estaca ao tratamento com colchicina, das 15 estacas diploides tratadas foram obtidas cinco estacas tetraploidizadas, resultando em um excelente aproveitamento de 33%. Entende-se que, ao submeter toda a superfície da estaca ao tratamento com colchicina, aumenta-se a área de tecido vegetal exposta à solução e, conseqüentemente, aumenta-se também o número de regiões meristemáticas contendo células em processo de divisão celular e, portanto mais suscetíveis à ação da colchicina e duplicação cromossômica. Embora Fávero (2004) cite que não há possibilidade de obter raízes de regiões de estacas expostas à solução de colchicina, neste trabalho foi verificado o sucesso do enraizamento de regiões assim tratadas.

**Tabela 4.** Número total de híbridos diploides e tetraploides obtidos em cada cruzamento e número médio de sementes produzidas em cada cruzamento.

Híbridos diploides	Nº de híbridos diploides	Nº de alotetraploides	Total de sementes
<i>A. ipaënsis</i> KG30076 x <i>A. villosa</i> V12812	5	4	288
<i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. stenosperma</i> V10309	9	31	356
<i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. duranensis</i> SeSn2848	8	12	520
<i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. duranensis</i> V14167	12	23	684
<i>A. gregoryi</i> V6389 x <i>A. stenosperma</i> V10309	5	5	411
<i>A. ipaënsis</i> KG30076 X <i>A. correntina</i> GP9548	13	0	0
<i>A. batizocoi</i> K9484 X <i>A. stenosperma</i> V7762	7	0	0
<i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. correntina</i> GP9548	18	0	0
<i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. villosa</i> V12812	4	0	0
<i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. stenosperma</i> V13828	9	0	0
<b>Total</b>	<b>90</b>	<b>75</b>	<b>2259</b>





**Figura 8.** Anomalia em folhas do híbrido *A. hypogaea* X [*A. batizocoi* K9484 X *A. stenosperma* V10309]<sup>4x</sup>, evidenciada pela presença de necrose foliar e ausência de pigmentação de clorofila. (a) Três primeiras semanas pós-germinação, (b) 4 a 5 semanas pós-germinação, (c) 7 a 8 semanas pós-germinação. (d) Após mais de 8 semanas da germinação, não se evidencia nenhuma anomalia nas folhas e o crescimento da planta é normal.

## 5.2. Cruzabilidade entre Alotetraploides Sintéticos com *A. hypogaea*

As cultivares utilizadas neste trabalho representam as duas subespécies de *A. hypogaea*: *A. hypogaea* subsp. *hypogaea* (Runner IAC 886 e IAC-Caiapó) e *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* (BR 1, Senegal e BRS Havana).

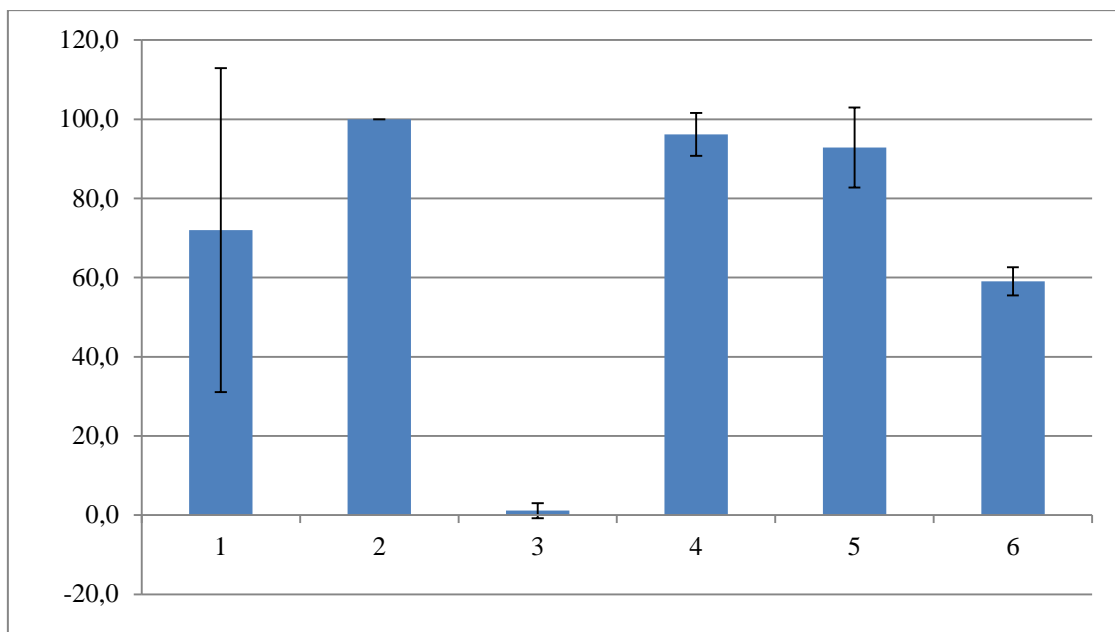
Os resultados de cruzabilidade entre cultivares de *A. hypogaea* e alotetraploides sintéticos estão descritos na Tabela 5. Algumas variáveis, tais como: fertilidade e produção de sementes, produção de ginóforos em relação ao número de flores polinizadas, tempo decorrido do surgimento do ginóforo até a frutificação, a quantidade total de ginóforos no período e a ocorrência dos ginóforos indicaram que, em geral, o sucesso dos cruzamentos foi alto, mostrando que cruzamentos entre cultivares de amendoim (Runner IAC 886, IAC-Caiapó, BR 1, Senegal e BRS Havana) e os alotetraploides sintéticos [*A.*

*batizocoi* K9484 x *A. duranensis* V14167]<sup>4x</sup>, [*A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* SeSn 2848]<sup>4x</sup>, [*A. batizocoi* K9484 x *A. stenosperma* V10309]<sup>4x</sup> são bastante promissores, especialmente com Runner e Caiapó (representantes da subespécie *hypogaea*).

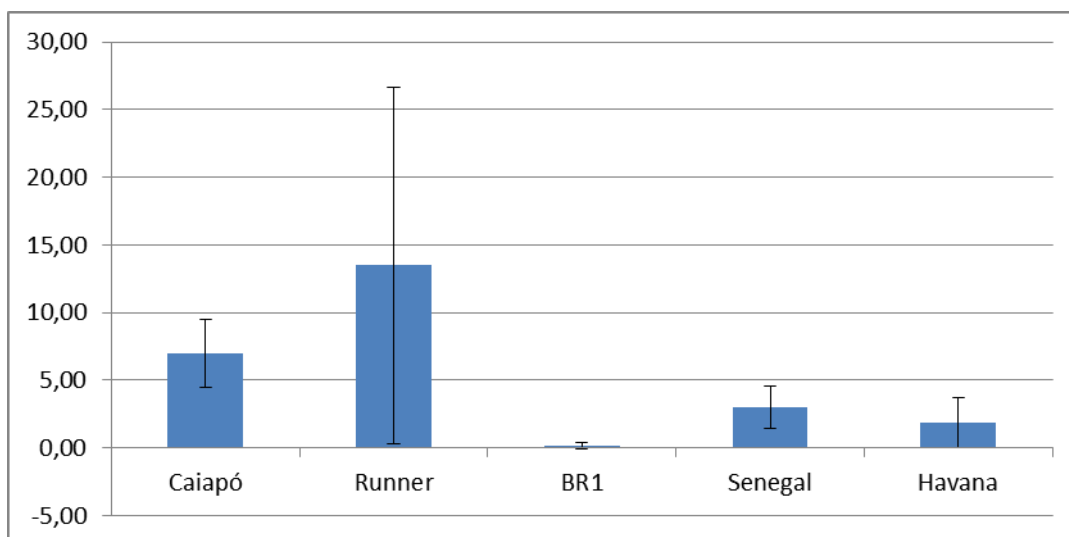
O número de sementes produzido pelos híbridos F<sub>1</sub> entre cultivares e alotetraploides variou significativamente: Runner e Caiapó (representantes da subespécie *hypogaea*) tiveram as maiores produtividades, enquanto Senegal, Havana e BR1 (representantes da subespécie *fastigiata*), as taxas mais baixas (Figura 9). Os alotetraploides em que *A. duranensis* é um dos parentais, mostraram-se mais férteis que os outros alotetraploides, principalmente quando combinado com *A hypogaea* subsp. *hypogaea*.

De 3.319 flores polinizadas em 15 genótipos maternos, 233 ginóforos foram gerados, ou seja, 7% de sucesso de fertilização. Dos 233 ginóforos gerados, 135 chegaram ao estágio de frutificação, produzindo 204 sementes (tabela 5).

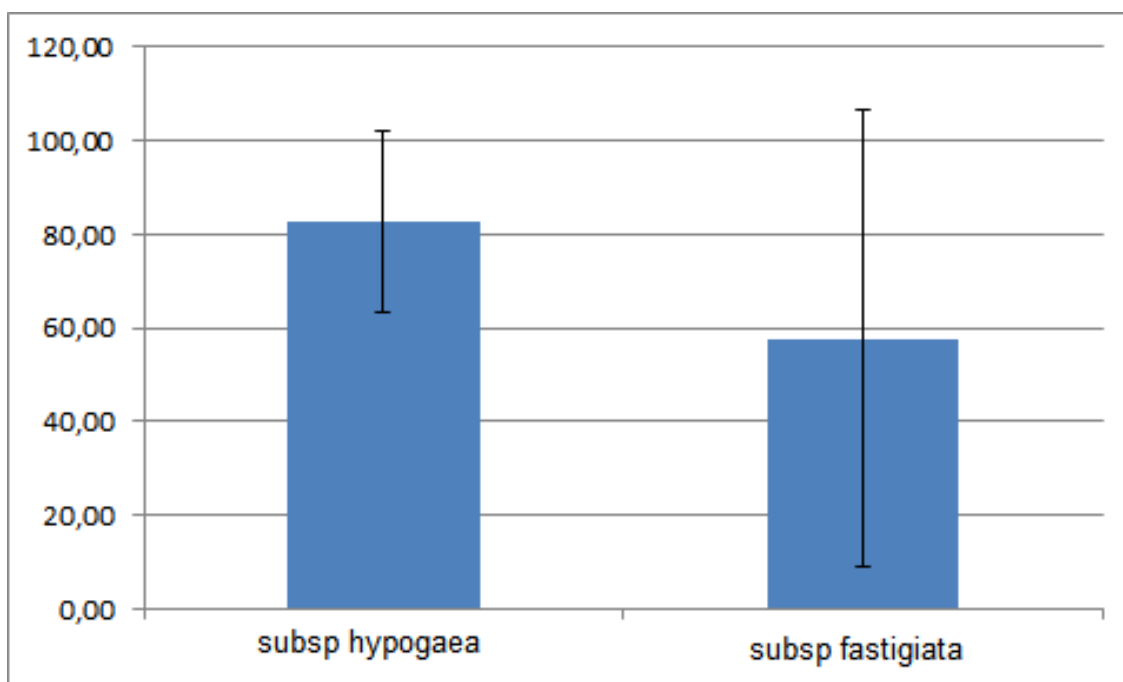
Ao utilizar a variável produção de sementes entre as duas subespécies, foi possível perceber que a subsp. *hypogaea* é superior à subsp. *fastigiata*, apesar de o desvio padrão ter ficado alto na subsp *hypogaea* (figuras 9, 10 e 11).



**Figura 9.** Produção de sementes dos híbridos gerados por parentais da subsp. *fastigiata* (1 a 3) e subsp. *hypogaea* (4 a 6) cruzados com (1) [*A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* Sesn2848]<sup>4x</sup>, (2) [*A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* V14167]<sup>4x</sup>, (3) [*A. batizocoi* K9484 x *A. stenosperma* V10309]<sup>4x</sup>, (4) [*A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* Sesn 2848]<sup>4x</sup>, (5) [*A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* V14167]<sup>4x</sup> e (6) [*A. batizocoi* K9484 x *A. stenosperma* V10309]<sup>4x</sup>.



**Figura 10.** Avaliação da produção de sementes dos híbridos F<sub>1</sub> oriundos dos cruzamentos das cultivares Runner, Havana, Caiapó, Senegal e BR 1 com alotetraploides sintéticos [*A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* V14167]<sup>4x</sup>, [*A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* SeSn2848]<sup>4x</sup>, [*A. batizocoi* K9484 x *A. stenosperma* V10309]<sup>4x</sup>, considerando a influência de cada cultivar no número total de sementes produzidas.



**Figura 11.** Comparação da produção de sementes entre a subespécie *hypogaea*, em relação à subespécie *fastigiata* quando cruzadas com os alotetraploides [*A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* V14167]<sup>4x</sup>, [*A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* SeSn2848]<sup>4x</sup>, [*A. batizocoi* K9484 x *A. stenosperma* V10309]<sup>4x</sup>.

**Tabela 5.** Número de flores polinizadas, quantidade de ginóforos produzidos, ginóforos que germinaram e o tempo para cada ginóforo germinar. Dados obtidos dos cruzamentos de *A. hypogaea* (Runner, BR 1, Senegal, Havana e Caiapó) com alotetraploides sintéticos [*A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* V14167]<sup>4x</sup>, [*A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* SeSn2848]<sup>4x</sup> e [*A. batizocoi* K9484 x *A. stenosperma* V10309]<sup>4x</sup>.

Cruzamentos		Nº flores polinizadas	Quantidade de ginóforos produzidos	Nº de ginóforos que produziram sementes	Tempo em dias da polinização até germinação	Nº de F <sub>1</sub> (cultivar x alotetraploide)
	[ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. duranensis</i> V14167] <sup>4x</sup>	245	8	4	107,75	4
<i>A. hypogaea</i> Runner	[ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. duranensis</i> SeSn 2848] <sup>4x</sup>	264	13	9	102,77	11
	[ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. stenosperma</i> V10309] <sup>4x</sup>	169	14	7	97,71	12
	[ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. duranensis</i> V14167] <sup>4x</sup>	292	24	8	106,37	7
<i>A. hypogaea</i> Caiapó	[ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. duranensis</i> SeSn 2848] <sup>4x</sup>	255	17	9	122,44	14
	[ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. stenosperma</i> V10309] <sup>4x</sup>	166	18	10	107,3	22
<i>A. hypogaea</i> Senegal	[ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. duranensis</i> V14167] <sup>4x</sup>	313	15	7	86,85	11
	[ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. duranensis</i> SeSn]	277	22	16	93,68	20

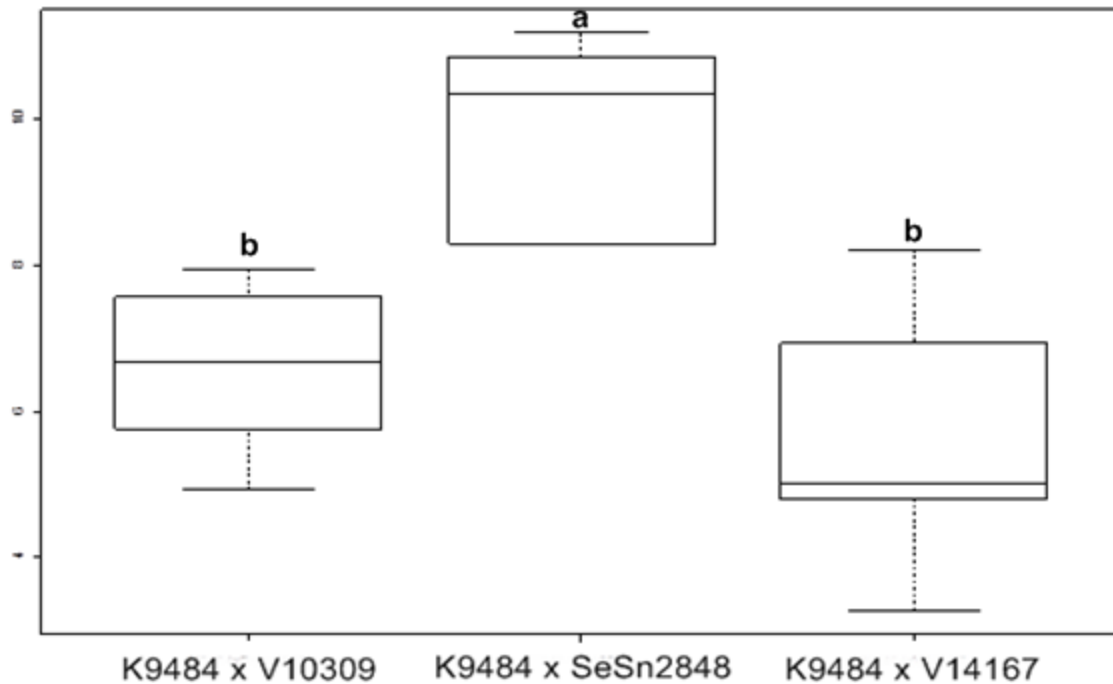
		2848] <sup>4x</sup>					
		[ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. stenosperma</i> V10309] <sup>4x</sup>	217	18	13	85,75	31
		[ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. duranensis</i> V14167] <sup>4x</sup>	202	14	7	81,28	10
<i>A. hypogaea</i> Havana		[ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. duranensis</i> SeSn 2848] <sup>4x</sup>	185	14	10	100,5	14
		[ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. stenosperma</i> V10309] <sup>4x</sup>	145	15	12	84,45	18
		[ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. duranensis</i> V14167] <sup>4x</sup>	220	11	7	76,71	7
<i>A. hypogaea</i> BR1		[ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. duranensis</i> SeSn 2848] <sup>4x</sup>	208	12	7	82,71	7
		[ <i>A. batizocoi</i> K9484 x <i>A. stenosperma</i> V10309] <sup>4x</sup>	161	18	9	83,66	25
<b>Total</b>			<b>3319</b>	<b>233</b>	<b>135</b>		<b>213</b>

### 5.2.1. Porcentagem de Ginóforos Produzidos por Flor Polinizada

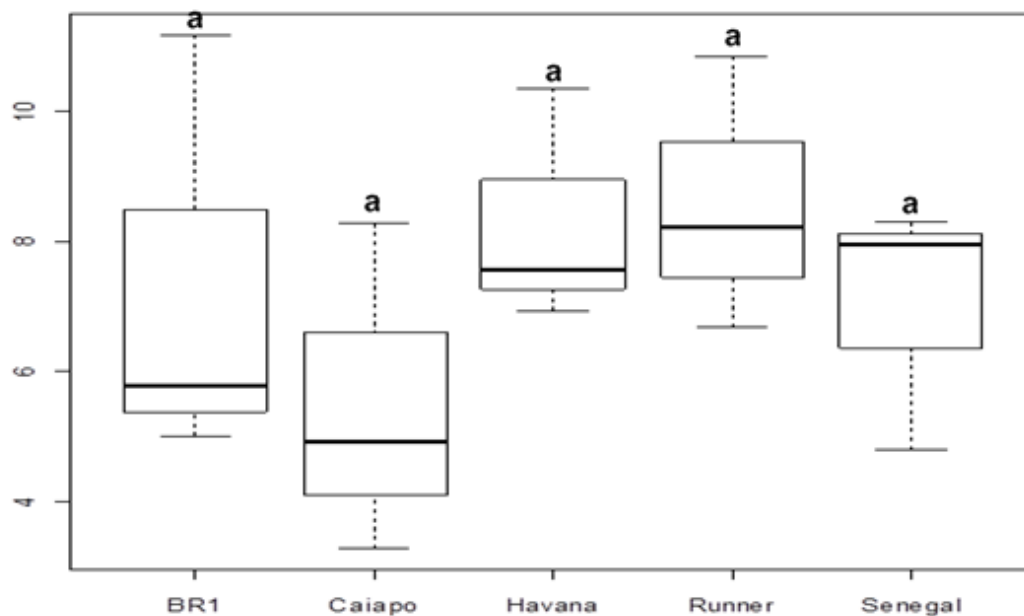
Inicialmente, foram analisadas as porcentagens de polinizações que produziram ginóforos em cruzamentos entre as cultivares de amendoim e os alotetraploides. Uma vez que as emascações e polinizações foram feitas utilizando os mesmos procedimentos, na mesma estufa e no mesmo período, a comparação destas porcentagens pode ser considerada uma das indicações de fertilidade dos diferentes genótipos. As cultivares de amendoim foram utilizadas como parentais femininos, e os alotetraploides como parentais masculinos.

A porcentagem de polinizações que deram origem aos ginóforos foi significativamente maior para [*A. batizocoi* K9484 x *A. stenosperma* V10309]<sup>4x</sup> do que para [*A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* V14167]<sup>4x</sup> e [*A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* SeSn2848]<sup>4x</sup>. O percentual para [*A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* SeSn 2848]<sup>4x</sup> foi maior do que para [*A. batizocoi* K94845 x *A. duranensis* V14167]<sup>4x</sup>, mas a diferença não foi significativa (Figura 12).

Ao comparar as cultivares (Runner, BR 1, Senegal, Havana e Caiapó), as porcentagens de polinizações que deram origem aos ginóforos mostraram-se similares para todas elas. Destaque para Runner, que apresentou a porcentagem mais alta e Caiapó, que apresentou um índice mais baixo, porém estatisticamente são todas similares (Figura 13). Da mesma forma, a porcentagem de ginóforos produzidos por flor polinizada tendeu a ser muito similar entre as subespécies de *A. hypogaea* (Figura 14).

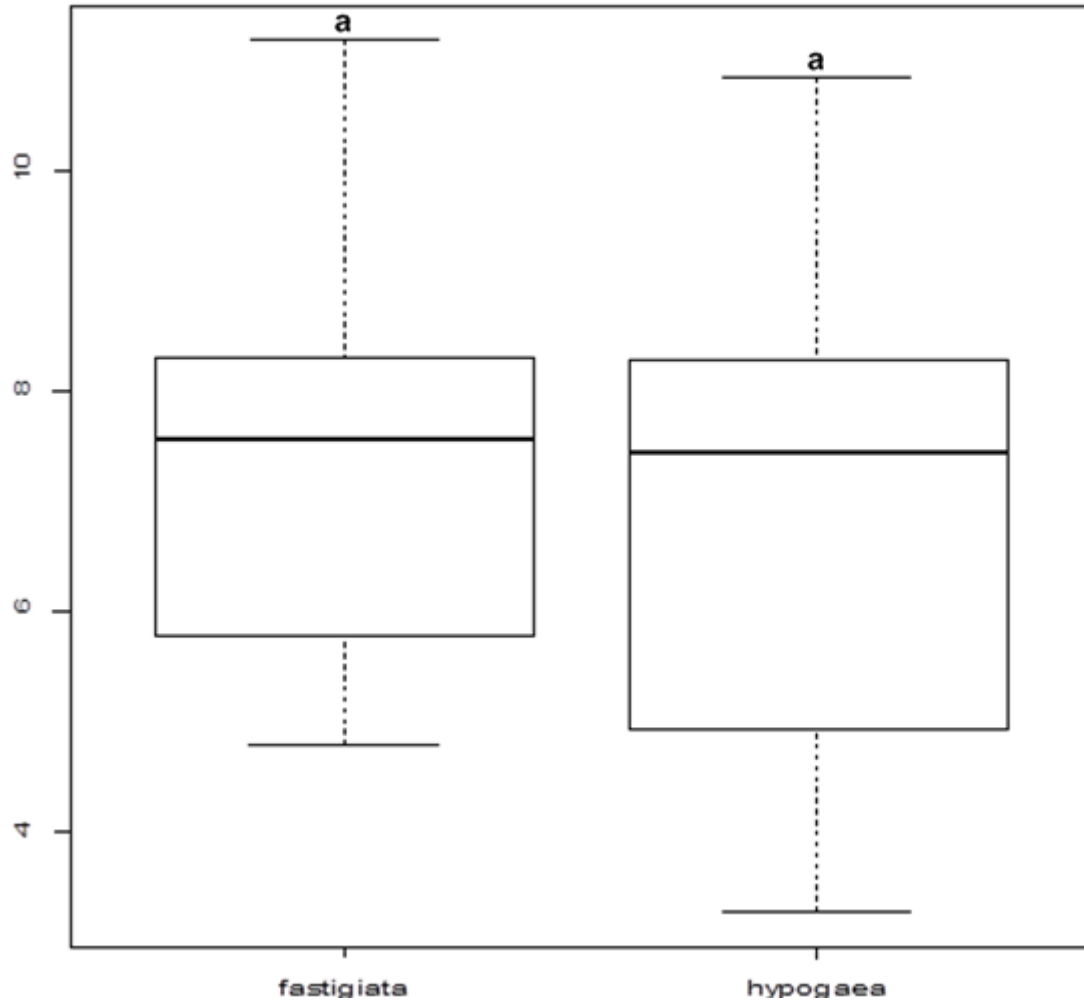


**Figura 12.** Porcentagem de ginóforos produzidos por flor polinizada – comparação entre os alotetraploides sintéticos [*A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* V14167]<sup>4x</sup> (a), [*A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* SeSn2848]<sup>4x</sup> e [*A. batizocoi* K9484 x *A. stenosperma* V10309]<sup>4x</sup> utilizados como parentais masculinos em cruzamentos com cultivares do amendoim cultivado (Runner, BR 1, Senegal, Havana e Caiapó).



**Figura 13.** Porcentagem de ginóforos produzidos por flor polinizada – comparação entre os cultivares de *A. hypoeaea* Runner, BR 1, Senegal, Havana e Caiapó quando utilizadas como parentais femininos em cruzamentos com alotetraploides sintéticos [*A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* V14167]<sup>4x</sup>, [*A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* SeSn 2848]<sup>4x</sup> e [*A. batizocoi* K9484 x *A. stenosperma* V10309]<sup>4x</sup>.





**Figura 14.** Porcentagem de ginóforos produzidos por flor polinizada – comparação entre as subespécies de *A. hypogaea*: subespécies *hypogaea* (Runner e Caiapó) e *fastigiata* (BR 1, Senegal e Havana), quando utilizadas como parentais femininas em cruzamentos com alotetraploides [*A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* V14167]<sup>4x</sup>, [*A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* SeSn2848]<sup>4x</sup> e [*A. batizocoi* K9484 x *A. stenosperma* V10309]<sup>4x</sup>. letras iguais não difere no teste Tukey 5%.

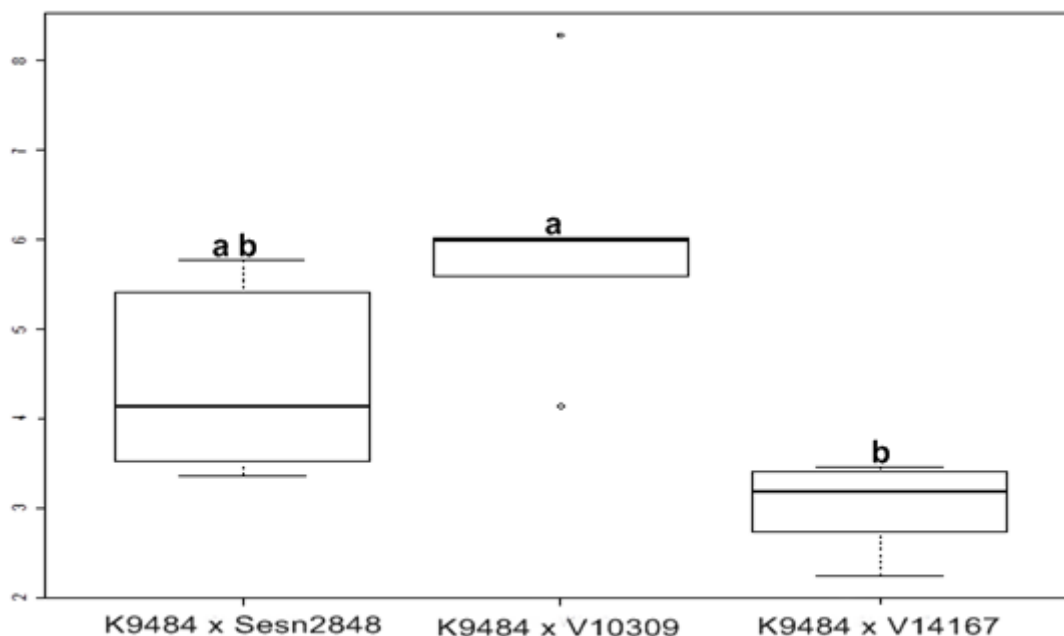
### 5.2.2. Porcentagem de Sementes Produzidas pelo Número de Flores Polinizadas

As porcentagens de sementes produzidas nos cruzamentos entre cultivares de amendoim (Runner, BR 1, Senegal, Havana e Caiapó) e os alotetraploides [*A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* V14167]<sup>4x</sup>, [*A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* SeSn2848]<sup>4x</sup> e [*A. batizocoi* K9484 x *A. stenosperma* V10309]<sup>4x</sup>, foram analisadas, em comparação com o número de flores polinizadas. Esta análise ocorreu dentro dos mesmos procedimentos, na

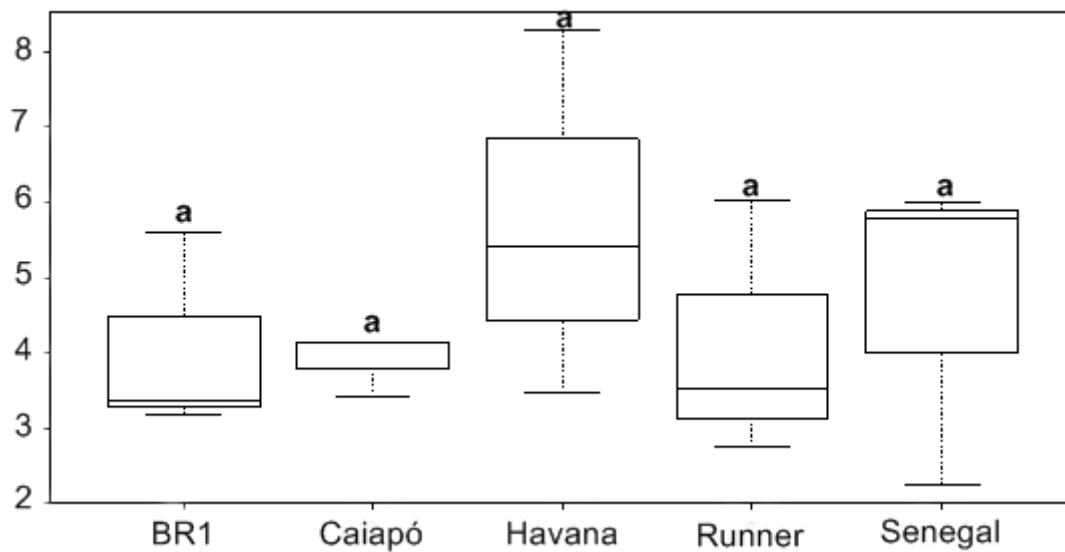
mesma estufa e no mesmo período, e a comparação destas porcentagens também pode ser considerada uma das indicações de fertilidade dos diferentes genótipos. As cultivares de amendoim foram utilizadas como parentais femininos, e os alotetraploides como parentais masculinos.

As maiores porcentagens foram observadas para [*A. batizocoi* K9484 x *A. stenosperma* V10309]<sup>4x</sup> e as menores, para [*A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* V14167]<sup>4x</sup>. Embora *A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* SeSn2848]<sup>4x</sup> mostre-se diferente de [*A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* V14167]<sup>4x</sup> na figura, não há como diferenciá-los estatisticamente (figura 15).

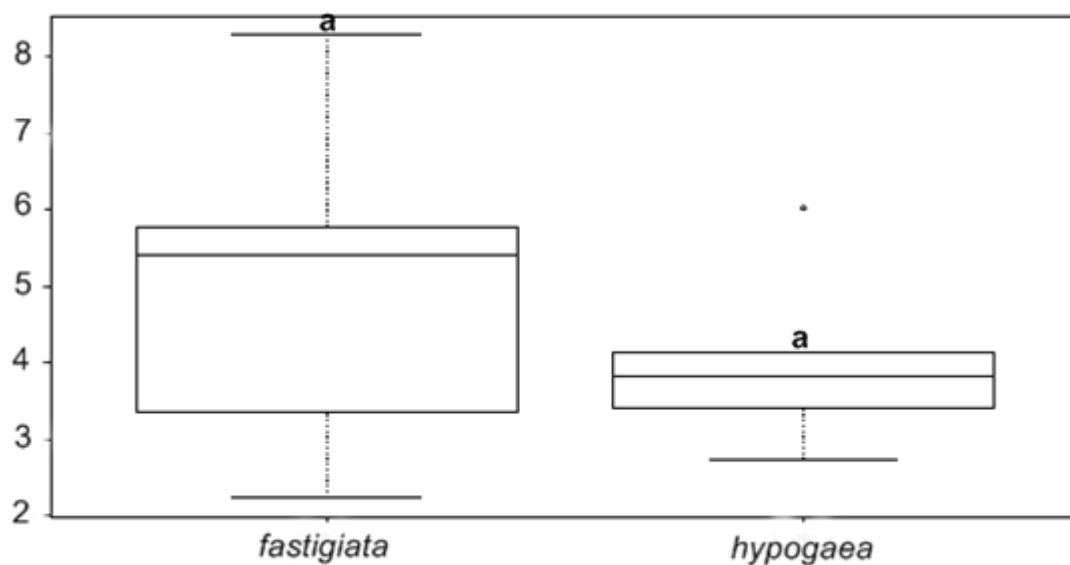
Ao comparar a produção das sementes pelo total de flores polinizadas, considerando as cinco cultivares como possíveis doadoras de genes que influenciam nas características de produtividade, percebe-se que não há diferença entre as cultivares analisadas (figura 16). Semelhantemente, ao fazer a comparação agrupando as variedades de *A. hypogaea* em subespécies, estas também não apresentaram diferenças estatísticas (figura 17).



**Figura 15.** Porcentagem do número de sementes produzidas pelo número de flores polinizadas – comparação entre os alotetraploides [*A. batizocoi* K9484x *A. duranensis* V14167]<sup>4x</sup>, [*A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* SeSn2848]<sup>4x</sup> e [*A. batizocoi* K9484 x *A. stenosperma* V10309]<sup>4x</sup>, quando cruzados com cultivares de *A. hypogaea* (Runner, BR1, Senegal, Havana e Caiapó).



**Figura 16.** Porcentagem de sementes produzidas por flores polinizadas – comparação entre as cultivares de *A. hypogaea* Runner, BR 1, Senegal, Havana e Caiapó quando utilizadas como parentais femininos em cruzamentos com alotetraploides sintéticos [*A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* V14167]<sup>4x</sup>, [*A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* SeSn2848]<sup>4x</sup> e [*A. batizocoi* K9484 x *A. stenosperma* V10309]<sup>4x</sup>.



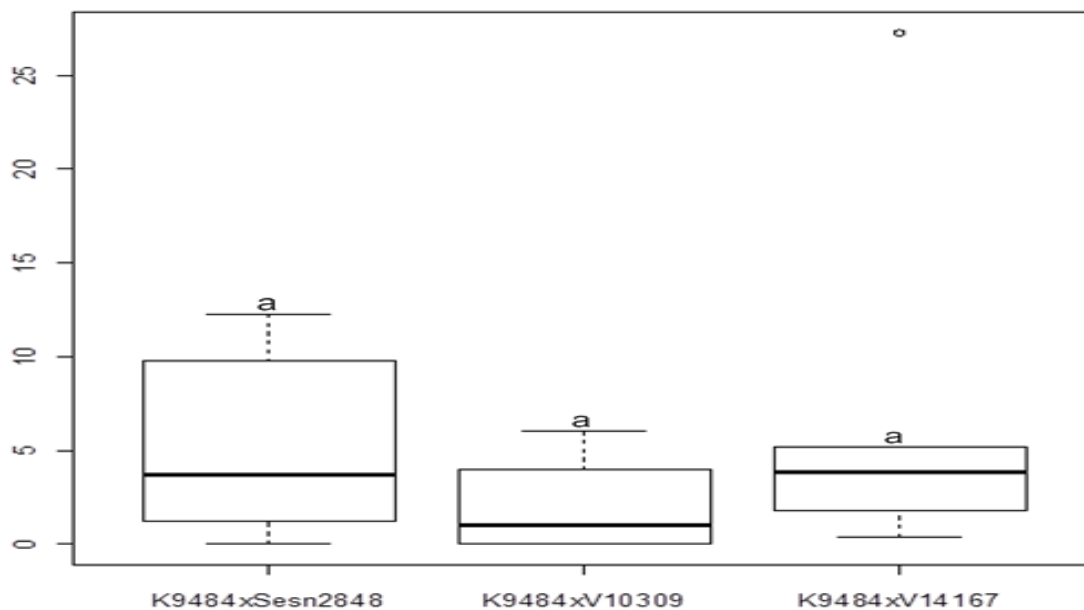
**Figura 17.** Porcentagem de sementes produzidas pelo número de flores polinizadas – comparação entre as subspecies de *A. hypogaea*: subspecies *hypogaea* (Runner e Caiapó) e *fastigiata* (BR 1, Senegal e Havana), quando utilizadas como parentais femininas em cruzamentos com os alotetraploides [*A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* V14167]<sup>4x</sup>, [*A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* SeSn2848]<sup>4x</sup> e [*A. batizocoi* K9484 x *A. stenosperma* V10309]<sup>4x</sup>.

### 5.2.3. Número de Sementes F<sub>2</sub> Produzidas por Planta F<sub>1</sub> Fértil em Cruzamentos Cultivar X Alotetraploide.

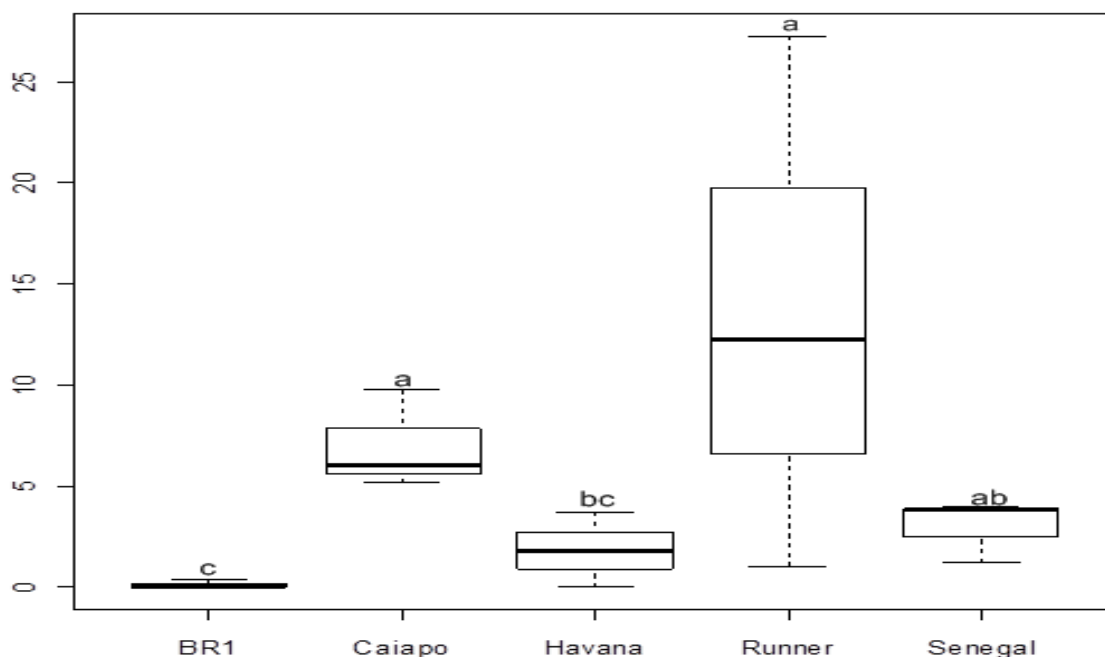
Foi avaliado o número de sementes F<sub>2</sub> produzidas pelas plantas F<sub>1</sub>, oriundas de cruzamentos cultivares x alotetraploides. A produção de sementes foi alcançada dentro dos mesmos procedimentos, na mesma estufa e no mesmo período, portanto, a comparação destas porcentagens pode ser considerada uma das indicações de fertilidade dos diferentes genótipos. As cultivares de amendoim foram utilizadas como parentais femininos, e os F<sub>1</sub> como parentais masculinos.

As porcentagens de sementes F<sub>2</sub> considerando os três alotetraploides foram similares (figura 18). Por outro lado, ao comparar as cultivares, observando os mesmos parâmetros, Runner, Caiapó e Senegal apresentaram as maiores produções de sementes e BR 1, o menor valor registrado (figura 19). Esses dados estão em conformidade com a análise mostrada no gráfico da figura 10, em que as variedades Caiapó e Runner apresentaram maiores índices de produção de sementes em relação às outras variedades estudadas.

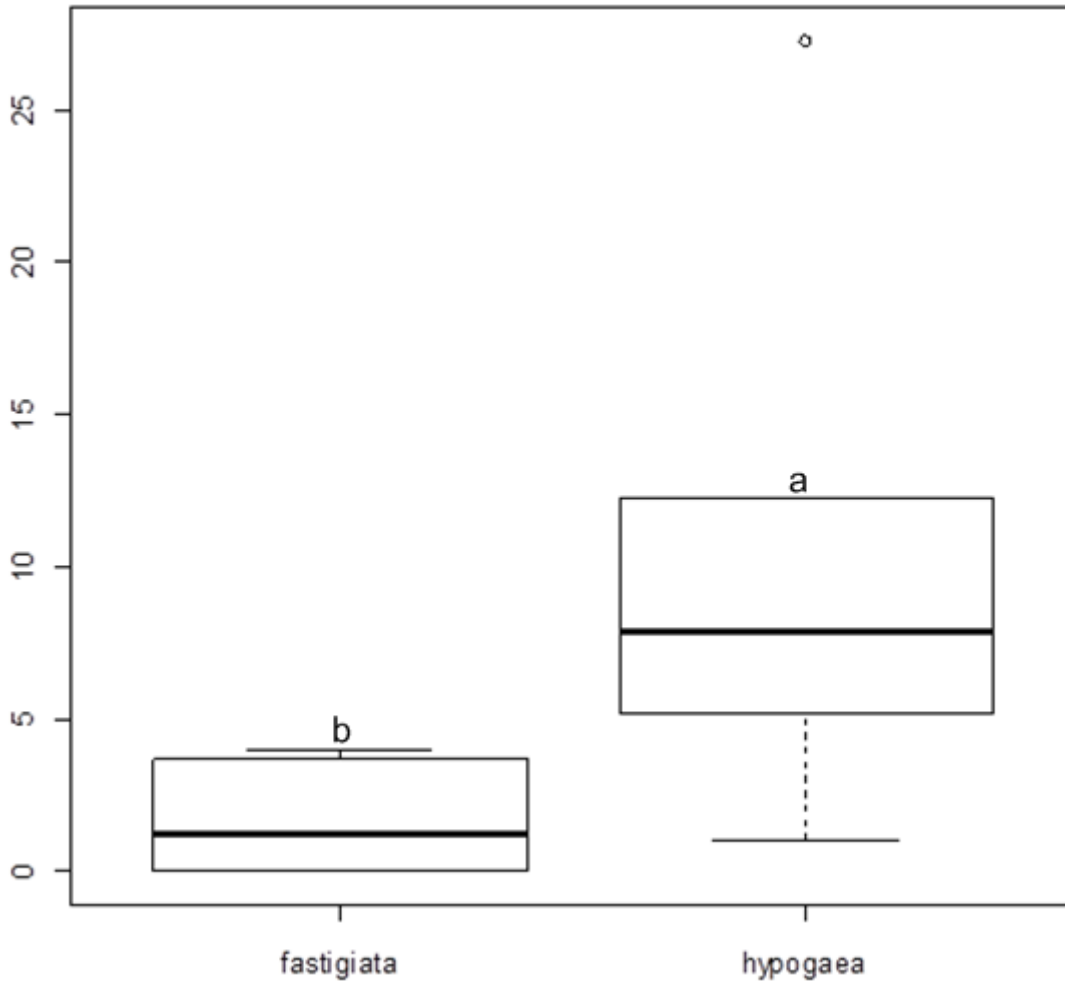
Ao analisar a produtividade de sementes das subespécies de *A. hypogaea*, a subespécie *hypogaea* tendeu a ser mais produtiva do que a subespécie *fastigiata* (figura 20). Esses resultados, alinhados com outros, indicam que híbridos F<sub>1</sub> produzidos entre os alotetraploides e a subespécie *hypogaea* mostraram-se viáveis para uso em programas de melhoramento genético.



**Figura 18.** Porcentagem de sementes  $F_2$  produzidas por planta  $F_1$  fértil (cultivares x alotetraploides) – comparação entre os alotetraploides [*A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* V14167]<sup>4x</sup>, [*A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* SeSn2848]<sup>4x</sup> e [*A. batizocoi* K9484 x *A. stenosperma*V10309]<sup>4x</sup>, quando cruzados com cultivares de *A. hypogaea* (Runner, BR 1, Senegal, Havana e Caiapó) para gerar as plantas  $F_1$ .



**Figura 19.** Porcentagem de sementes  $F_2$  produzidas por planta  $F_1$  fértil (cultivares x alotetraploides) - comparação entre as cultivares de *A. hypogaea* Runner, BR 1, Senegal, Havana e Caiapó, quando utilizadas como parentais femininos em cruzamentos com alotetraploides sintéticos [*A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* V14167]<sup>4x</sup>, [*A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* SeSn2848]<sup>4x</sup> e [*A. batizocoi* K9484 x *A. stenosperma* V10309]<sup>4x</sup>, para geração das plantas  $F_1$ .



**Figura 20.** Porcentagem de sementes  $F_2$  produzidas por planta  $F_1$  fértil (cultivares x alotetraploides) - comparação entre as subespécies de *A. hypogaea*: subespécies *hypogaea* (Runner e Caiapó) e *fastigiata* (BR 1, Senegal e Havana), quando utilizadas como parentais femininos em cruzamentos com alotetraploides [*A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* V14167]<sup>4x</sup>, [*A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* SeSn2848]<sup>4x</sup> e [*A. batizocoi* K9484 x *A. stenosperma* V10309]<sup>4x</sup>.

#### 5.2.4. Número de Sementes $F_2$ Produzidas Considerando as Plantas $F_1$ Férteis e Inférteis.

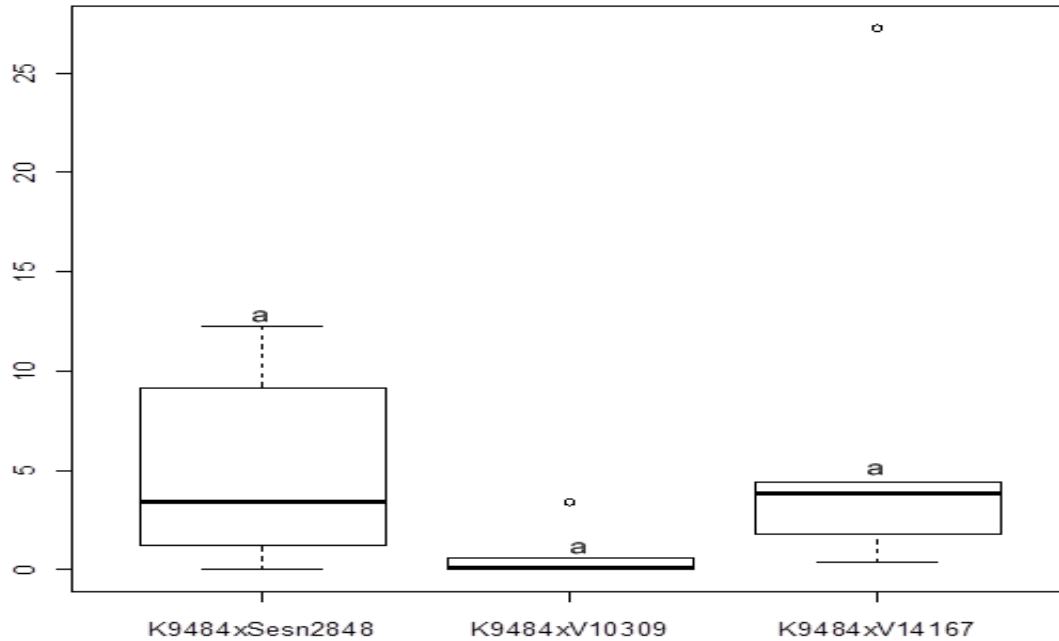
Para essa análise foi avaliado o número de sementes  $F_2$  produzidas, em comparação com o número de flores polinizadas, levando em consideração todas as plantas férteis e não férteis  $F_1$  dos cruzamentos entre as cinco cultivares e os três alotetraploides. A produção de sementes foi obtida por autopolinização, dentro das mesmas condições de ambiente, na mesma estufa

e no mesmo período. Portanto, a comparação dessas porcentagens pode ser considerada uma das indicações de fertilidade dos diferentes genótipos.

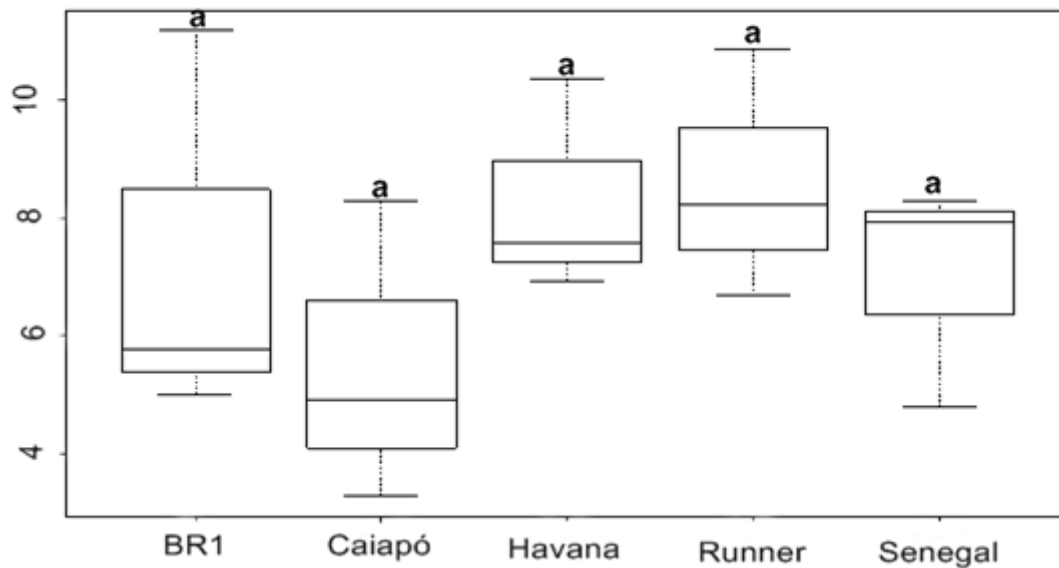
Ao comparar a produção de sementes  $F_2$  em todo o grupo das plantas  $F_1$  (férteis e não férteis), os três alotetraploides demonstraram similaridades na produção de sementes em relação ao número de flores polinizadas (figura 21). É possível observar que “outliers” (observação que se apresenta distante das demais observações) aparecem no alotetraploide *A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* SeSn2848 porém, sem interferir na interpretação do gráfico.

Na figura 22 é possível perceber que não há diferença entre as médias de produção de sementes  $F_2$  de todas as plantas  $F_1$  (férteis e inférteis), ao considerar as cultivares. Dessa forma pode-se entender que, essas variedades de amendoim não influenciaram a quantidade de sementes  $F_2$  produzidas por planta  $F_1$ .

Ao analisar as cinco cultivares de *A. hypogaea*, agrupadas por subespécie, a subespécie *hypogaea* apresentou média de produção de sementes  $F_2$  maior do que a subespécie *fastigiata* (figura 23). O número de plantas inférteis ocorreu mais no grupo da subespécie *fastigiata*, contribuindo para que a média de sementes caísse consideravelmente, tornando-a menos produtiva do que a subespécie *hypogaea*

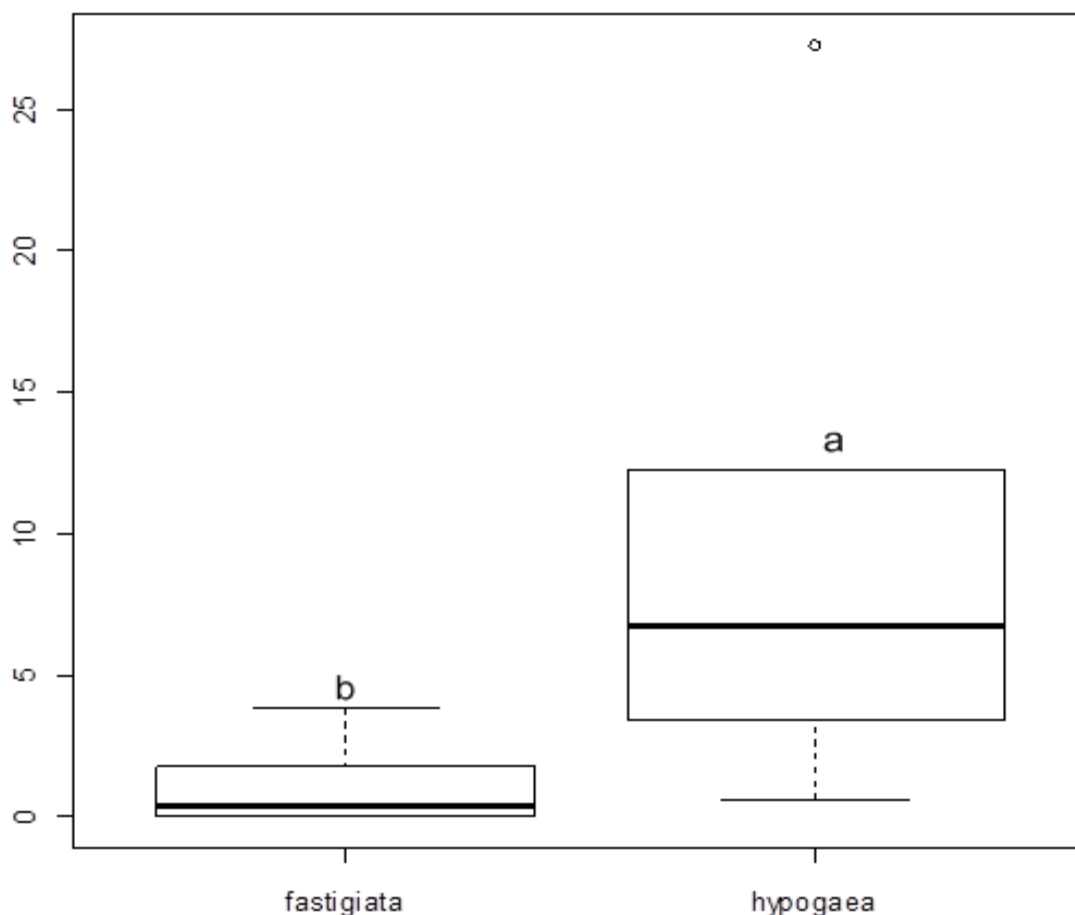


**Figura 21.** Porcentagem de sementes F<sub>2</sub> produzidas por planta F<sub>1</sub> (cultivares x alotetraploides), considerando as férteis e inférteis - comparação entre os alotetraploides [*A. batizocoi* K9484x *A. duranensis* V14167]<sup>4x</sup>, [*A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* SeSn2848]<sup>4x</sup> e [*A. batizocoi* K9484 x *A. stenosperma* V10309]<sup>4x</sup>, quando cruzados com cultivares de *A. hypogaea* (Runner, BR 1, Senegal, Havana e Caiapó) para gerar as plantas F<sub>1</sub>.



**Figura 22.** Porcentagem de sementes F<sub>2</sub> produzidas por planta F<sub>1</sub> (cultivares x alotetraploides), considerando as férteis e inférteis – comparação entre as cultivares de *A. hypogaea* Runner, BR 1, Senegal, Havana e Caiapó, quando utilizadas como parentais femininos em cruzamentos com alotetraploides sintéticos [*A. batizocoi* K9484x *A. duranensis* V14167]<sup>4x</sup>, [*A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* SeSn2848]<sup>4x</sup> e [*A. batizocoi* K9484 x *A. stenosperma* V10309]<sup>4x</sup>, para geração das plantas F<sub>1</sub>.





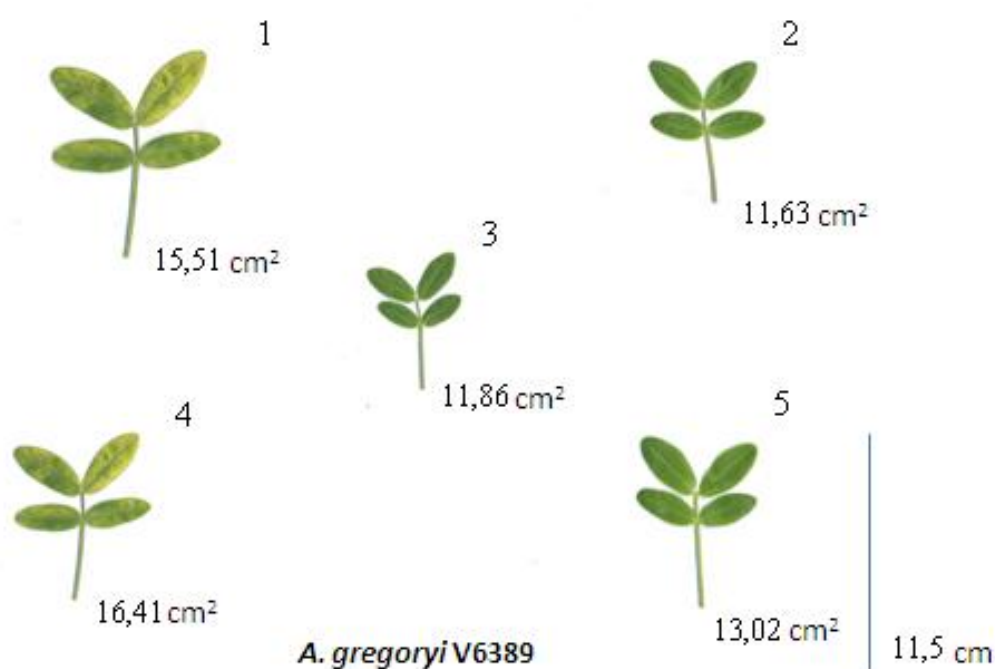
**Figura 23.** Porcentagem de sementes  $F_2$  produzidas por planta  $F_1$  (cultivares x alotetraploides), considerando as férteis e inférteis - comparação entre as subespécies de *A. hypogaea*: subespécies *hypogaea* (Runner e Caiapó) e *fastigiata* (BR 1, Senegal e Havana), quando utilizadas como parentais femininos em cruzamentos com alotetraploides [*A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* V14167]<sup>4x</sup>, [*A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* SeSn2848]<sup>4x</sup> e [*A. batizocoi* K9484 x *A. stenosperma* V10309]<sup>4x</sup>.

### 5.3. Análise da Área Foliar de um Alotetraploide e seus Parentais Diploides

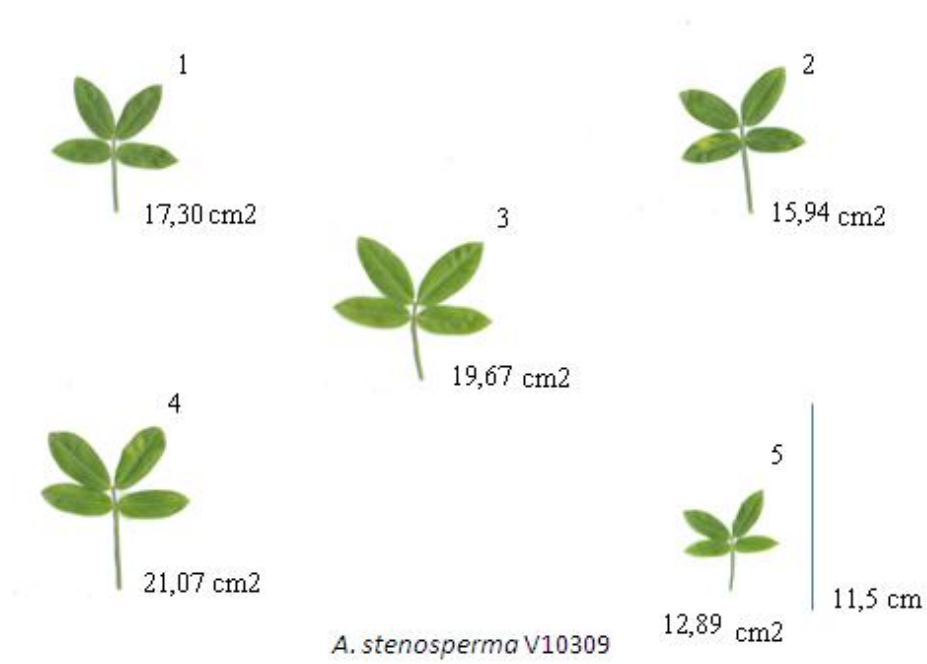
Observações e avaliações quantitativas indicaram alterações nas plantas oriundas dos cruzamentos interespecíficos. O formato das folhas dos híbridos diploides mostrou ser uma combinação dos fenótipos dos genitores, sem grandes alterações em suas dimensões (tabela 6 e figuras 24-28). Porém, quando os híbridos tetraploidizados foram analisados, mudanças fenotípicas nas folhas, ramos, flor e folha, tanto no formato como aumento vegetativo e em alguns casos, aumento no volume das sementes foram observados.

Os cinco alotetraploides obtidos neste trabalho apresentaram um aumento de tamanho de suas partes vegetativas e um crescimento vigoroso, que para alguns autores é denominado de "efeito gigas", ou seja, ocorre um gigantismo nos tecidos. Este efeito pode ser explicado pelo aumento do tamanho das células e a expansão dos espaços intercelulares, resultando em um maior crescimento dos tecidos e órgãos da planta (Accquar, 2007; Dewey, 1980; Schifino-Wittmann *et al.*, 2004).

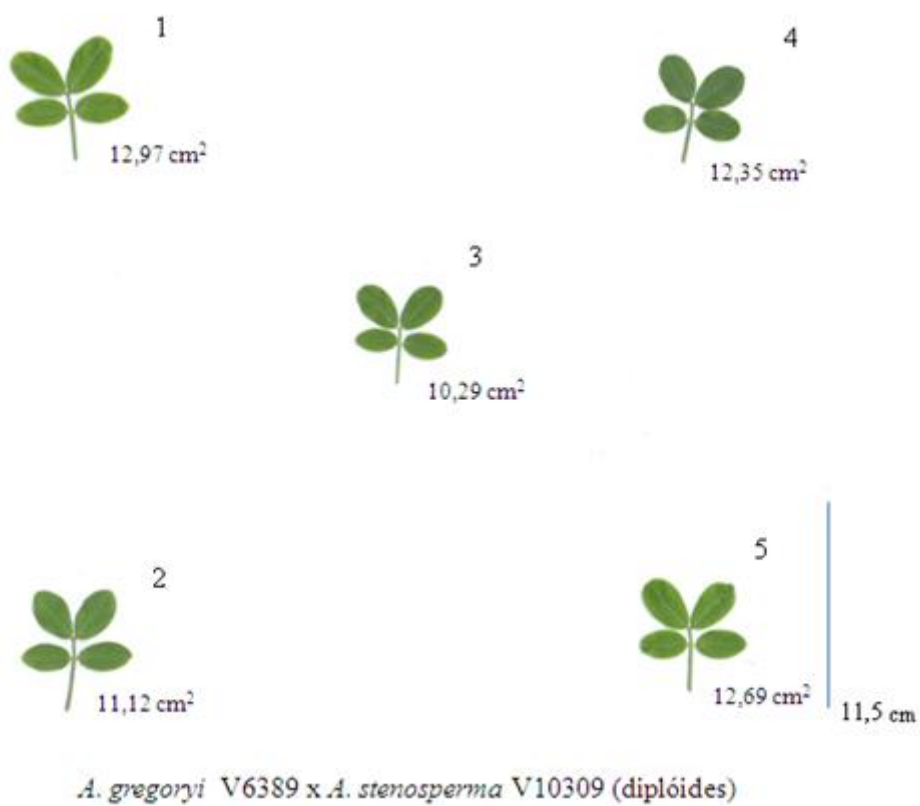
O vigor destes alotetraploides e descendentes ( $F_1$ ) quando cruzados com cultivares, é muito superior a cada um dos seus genitores ou à média deles (figura 27) (Ronzelli, 1996).



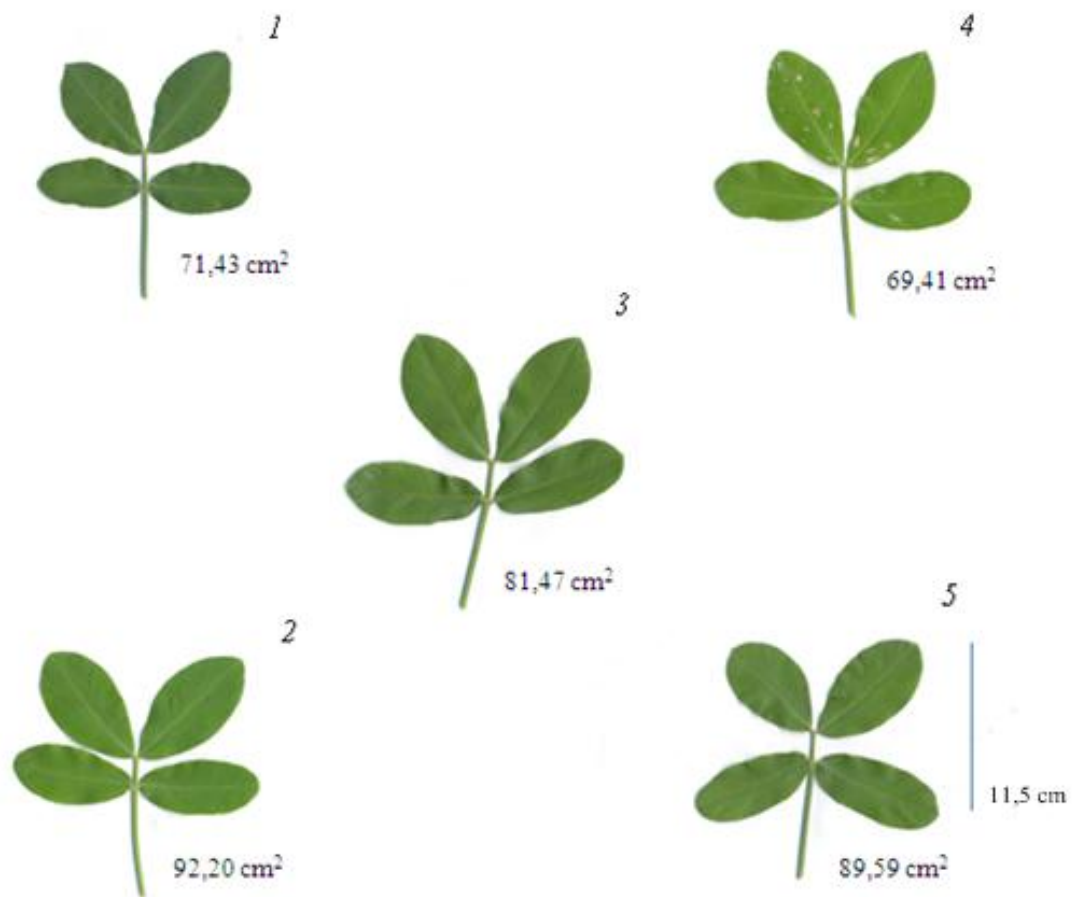
**Figura 24.** Segunda folha expandida do eixo central de *A. gregoryi* V6389. Imagens para cálculo da área foliar.



**Figura 25.** Segunda folha expandida do eixo central de *A. stenosperma* V10309. Imagens para cálculo da área foliar.

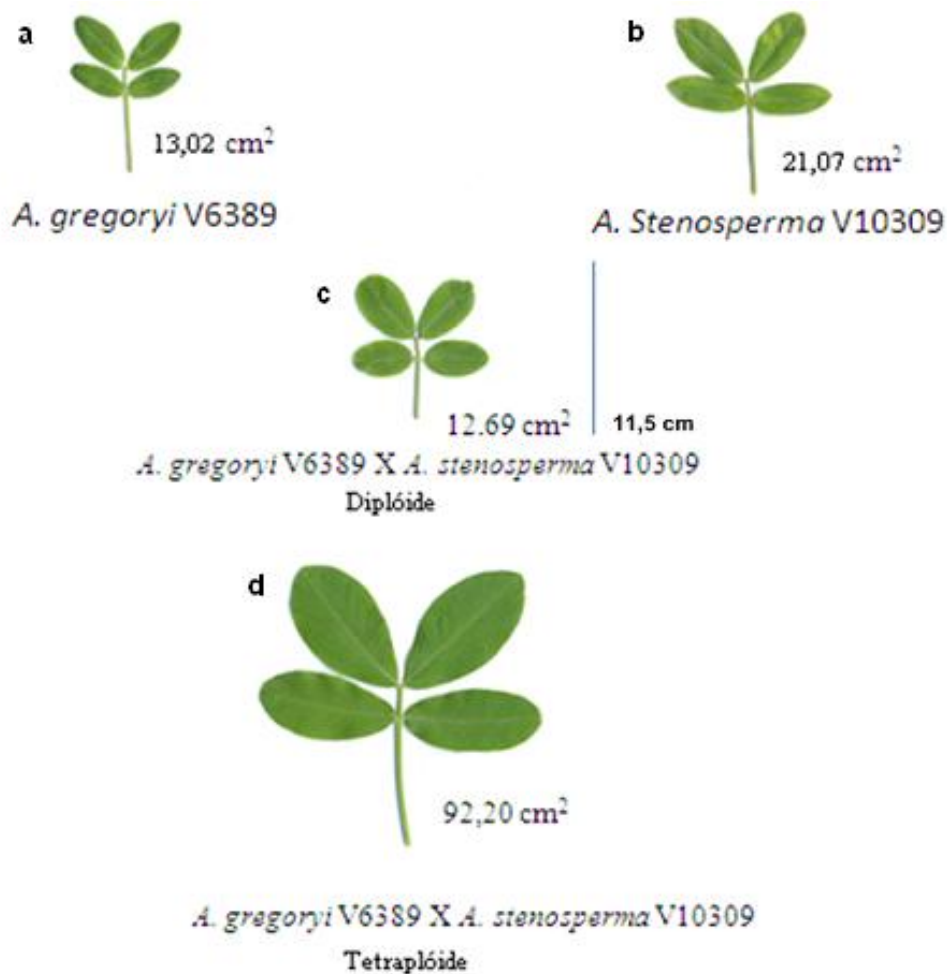


**Figura 26.** Segunda folha expandida do eixo central do híbrido diploide [*A. gregoryi* V6389 x *A. stenosperma* V10309].



*A. gregoryi* V6389 x *A. stenosperma* V10309 (tetraplóides)

**Figura 27.** Segunda folha expandida do eixo central do alotetraploide [*A. gregoryi* V6389 x *A. stenosperma* V10309]<sup>4x</sup>.

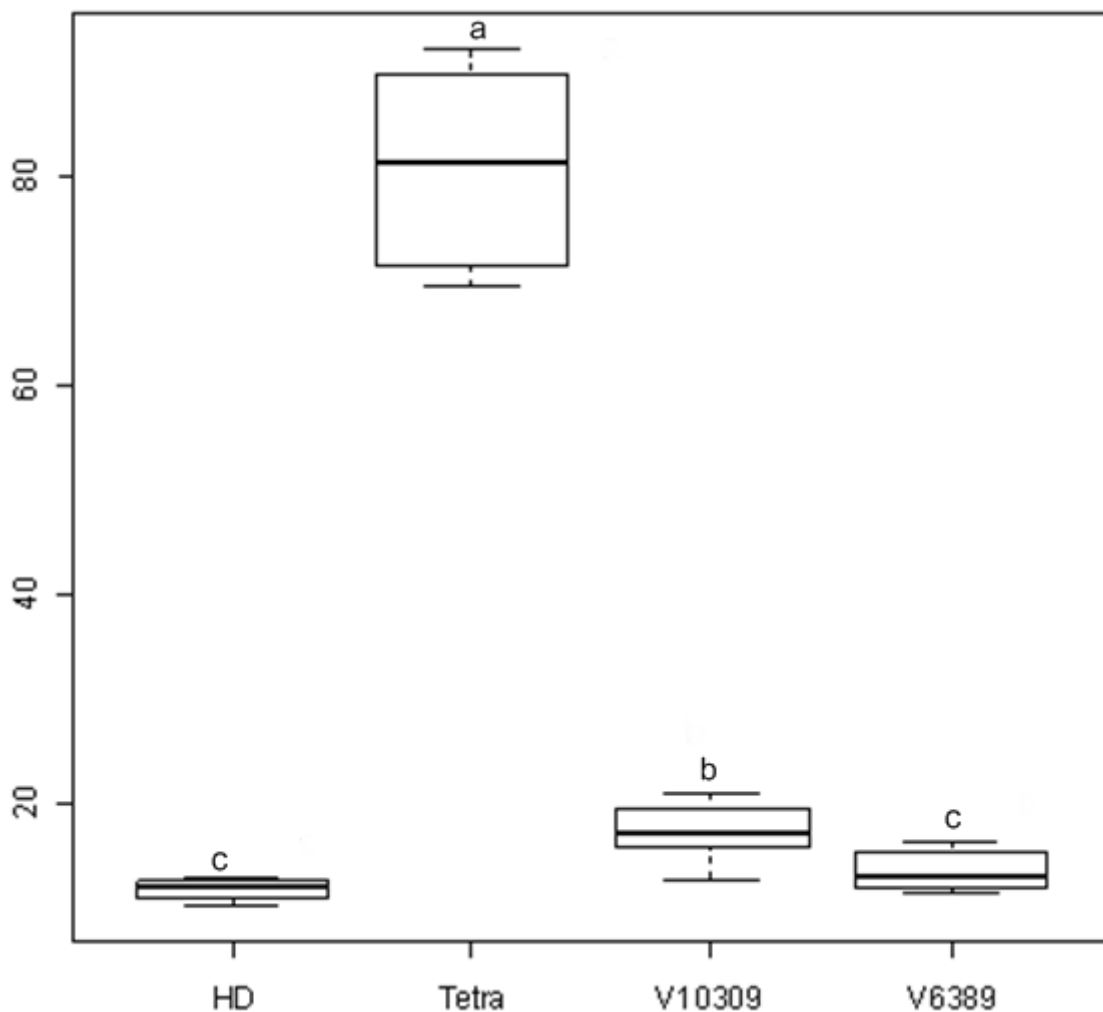


**Figura 28.** Tamanho, formato e padrão foliar de (a) *A. gregoryi* V6389, (b) *A. stenosperma* V10309, (c) [*A. gregoryi* V6389 X *A. stenosperma* V10309] diploide e (d) o alotetraploide.

**Tabela 6.** Comparação da área foliar nos diferentes genótipos.

Genótipo	Número de folhas	Média da área foliar (cm <sup>2</sup> )	Menor valor da área foliar (cm <sup>2</sup> )	Maior valor da área foliar (cm <sup>2</sup> )
Amostra completa	20	30,945	10,291	92,203
<i>A. gregoryi</i> V6389	5	13,690	11,633	16,418
<i>A. stenosperma</i> V10309	5	17,380	12,900	21,079
[ <i>A. gregoryi</i> V6389 x <i>A. stenosperma</i> V10309]	5	11,888	10,291	12,972
[ <i>A. gregoryi</i> V6389 x <i>A. stenosperma</i> V10309] <sup>4x</sup>	5	80,823	69,415	92,203

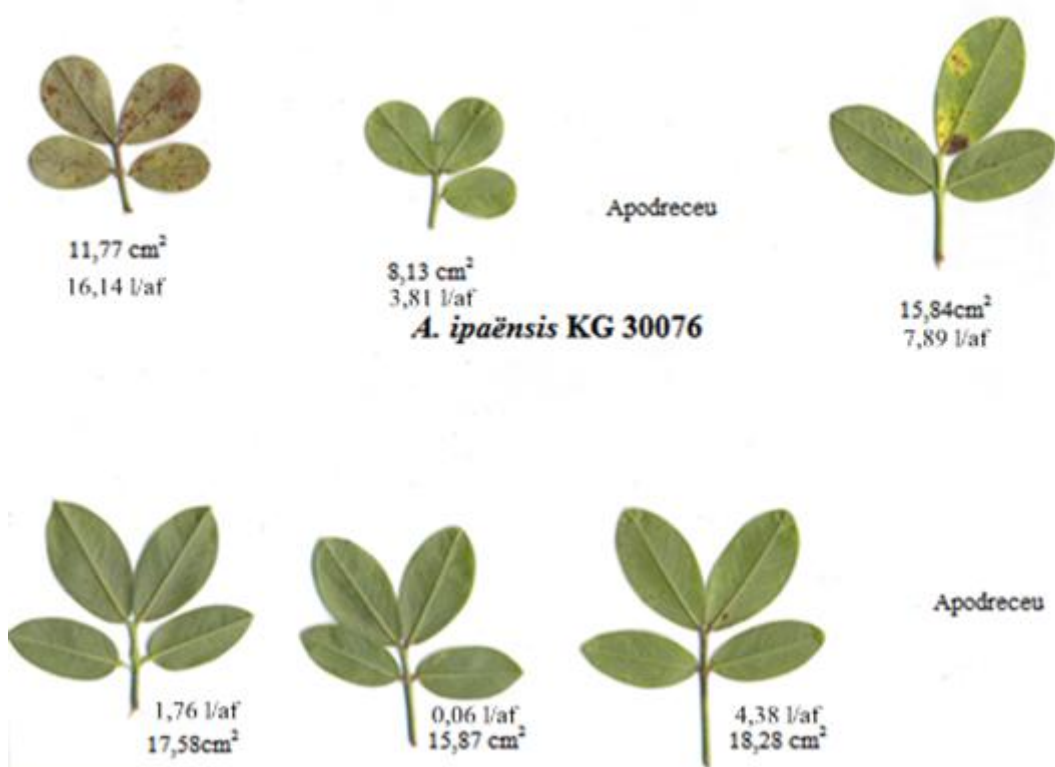
Os dados de médias de área foliar não apresentaram uma distribuição normal. Por isso, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis para ranqueamento de médias (figura 29). O alotetraploide (tetra) apresentou maior área foliar, o híbrido diploide e *A. gregoryi* V6389 obtiveram as mesmas e as menores áreas foliares. Nitidamente pode ser observado o maior vigor das plantas que tiveram seus cromossomos duplicados. Essas características podem ser observadas em toda a planta.



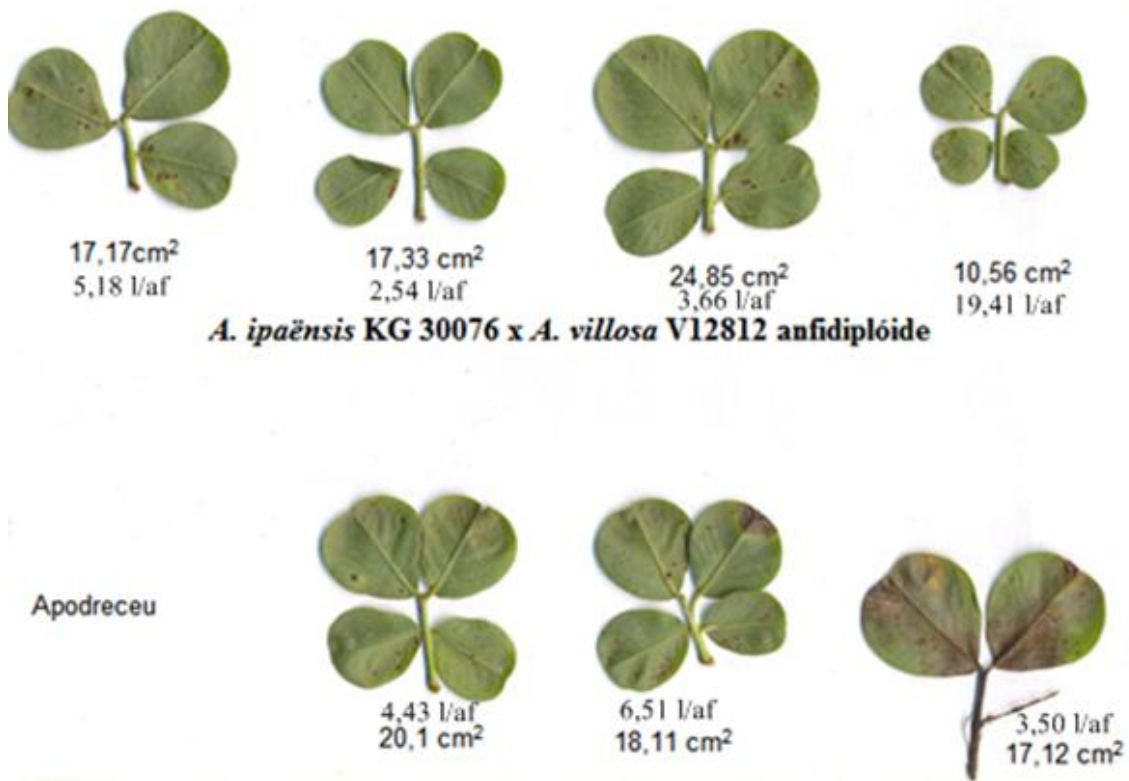
**Figura 29.** Comparação entre a área foliar de *A. stenosperma* V10309 (b), *A. gregoryi* V6389 (c), o híbrido diploide (HD) (c) e o anfidiplóide (tetra) (a). Genótipos seguidos pelas mesmas letras não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Kruskal-Wallis.

#### 5.4. Análise Fitopatológica (ver subrahmanyam 1993 e favero tese)

Neste experimento foi testada a resistência dos alotetraplóides, seus parentais silvestres e F<sub>1</sub> do cruzamento dos alotetraplóides com as cultivares. Entre os parentais silvestres, *A. ipaënsis* mostrou ser suscetível ao fungo *Puccinia arachidis* baseado na área foliar afetada (figura 30), enquanto os alotetraploides mostraram-se resistentes. O híbrido *A. ipaënsis* KG30076 x *A. villosa* V12812 foi o único que se mostrou suscetível, inclusive mais do que o controle positivo, a cultivar Runner (figura 31), apesar da variação indicada pelo desvio padrão (figura 32). Os F<sub>1s</sub> do cruzamento dos alotetraplóides com as cultivares mostraram-se resistentes ao fungo estudado, por não possuir homogeneidade genotípica, não foram inseridos na figura 32.

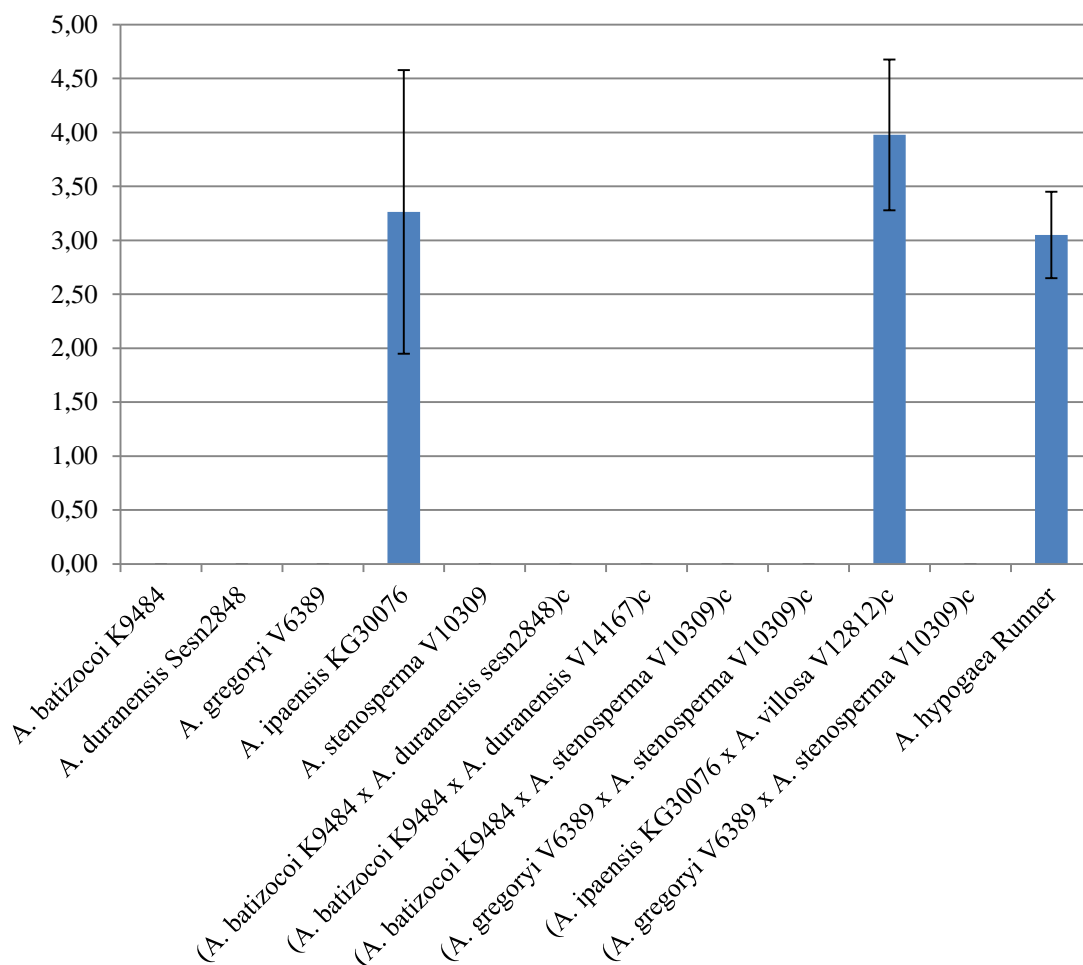


**Figura 30.** Folhas destacadas em bioensaio para teste de resistência a *Puccinia arachidis*. (A espécie *A. ipaënsis* (acesso KG 30076), com pontos marrons distribuídos na porção abaxial dos folíolos, foi o único parental altamente suscetível. A área lesionada pode ser visualizada na figura juntamente com o valor da proporção de lesão por área foliar (l/af). As folhas 3 e 8 apodreceram antes da detecção dos sintomas por infecção fúngica.



**Figura 31.** Folhas destacadas do alotetraploide [*A. ipaënsis* KG 30076 x *A. villosa* V12812]<sup>4x</sup> inoculadas com *P. arachidis*. Esse alotetraploide foi o único que se mostrou altamente suscetível à agressão fúngica. A área lesionada pode ser visualizada na figura e o valor da proporção de lesão por área foliar (l/af).



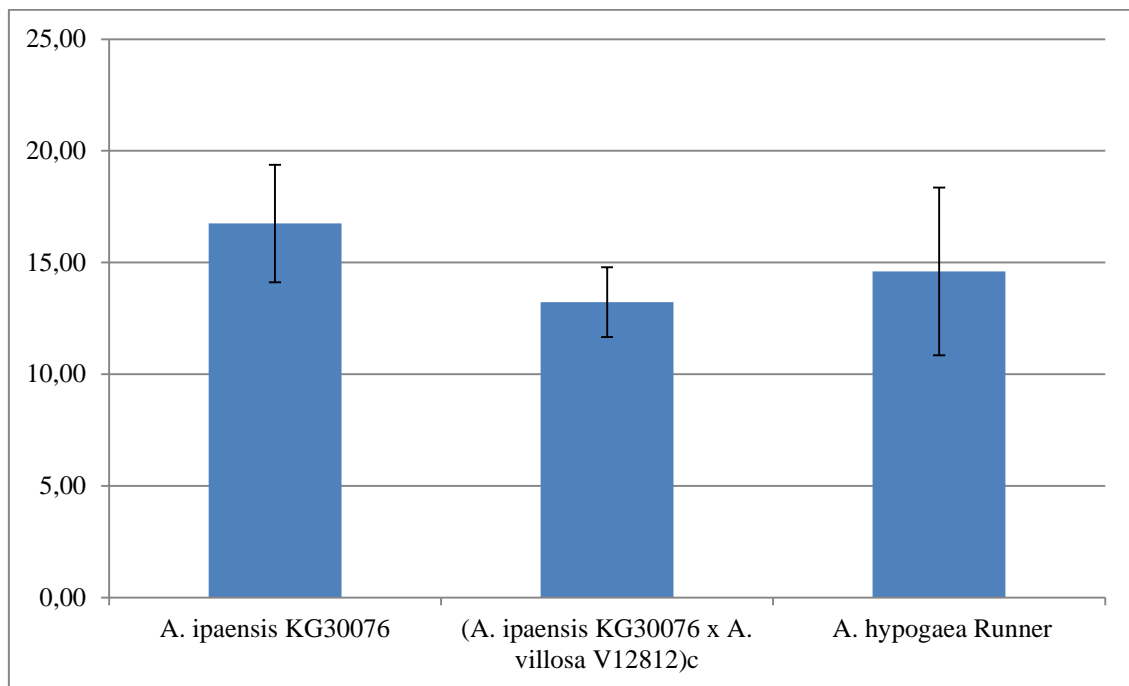


**Figura 32.** Índice de lesão/Área foliar. Todos os acessos silvestres foram resistentes, com exceção de *A. ipaënsis* KG 30076. Todos os alotetraploides foram resistentes, com exceção do alotetraploide derivado de *A. ipaënsis* KG 30076.

Os acessos *A. duranensis* V14167 e *A. villosa* V12812 não entraram no gráfico 32, porque apenas uma parcela de cada apresentou sintomas. Para estes, não é possível colocar barra de erro. De dezesseis amostras de *A. duranensis* V14167, apenas uma apresentou sintomas moderados ( $1,58\text{mm}^2$ ), com período de incubação de 19 dias e de doze amostras de *A. villosa* V12812, apenas uma apresentou sintomas moderados ( $0,60\text{mm}^2$ ), com período de incubação de 21 dias.

O tempo para o crescimento fúngico e detecção de sintomas nas folhas destacadas variou de acordo com a suscetibilidade do genótipo ao patógeno, entretanto, com baixíssima diferença entre os genótipos suscetíveis (figura 33). O genótipo *A. ipaënsis* é suscetível a *P. arachidis*. Essa espécie é doadora do

genoma B para o alotetraploide [*A. ipaënsis* KG30076 x *A. villosa* V12812]<sup>4x</sup> e para *A. hypogaea* (Seijo *et al.*, 2004; Freitas *et al.*, 2007) também suscetíveis, sugerindo que a suscetibilidade ao fungo *P. arachidis* foi adquirida pela contribuição gênica da espécie *A. ipaënsis*.

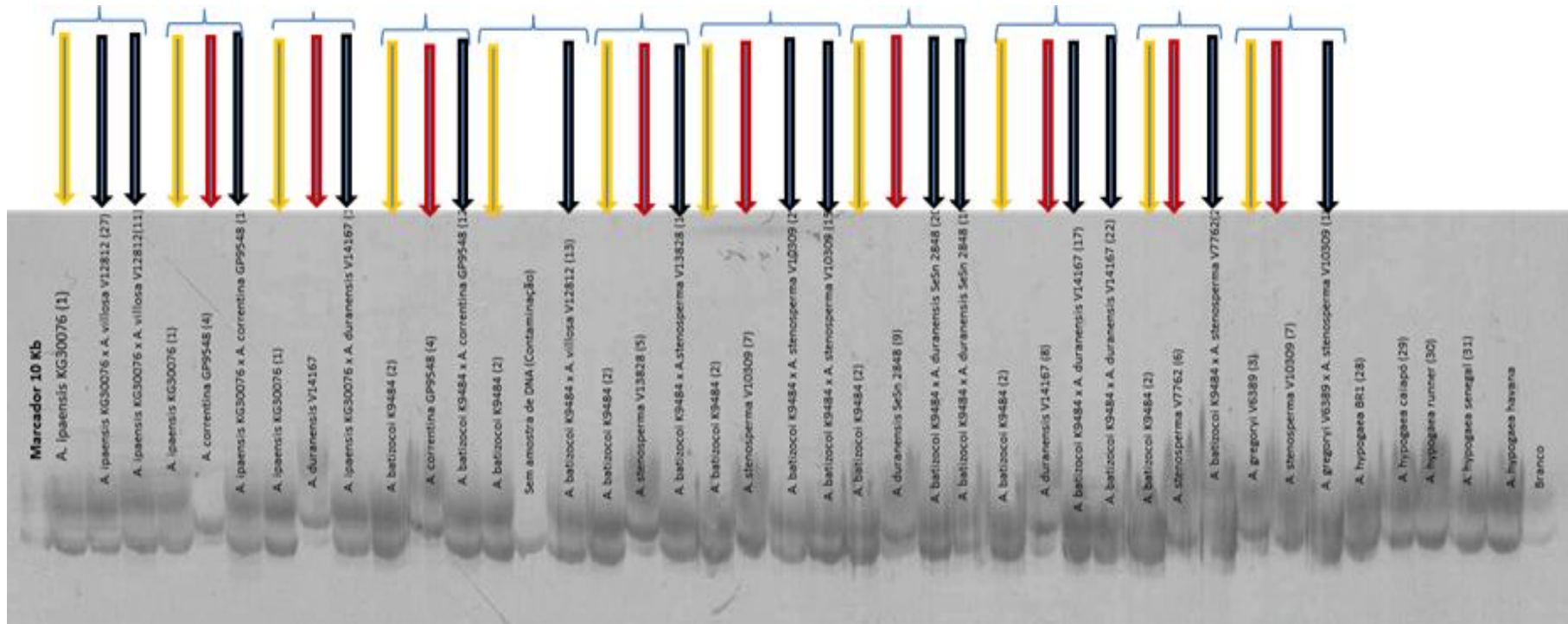


**Figura 33.** Período de Incubação do inóculo do fungo *Puccinia arachidis*. Apenas os genótipos com sintomas em mais de três parcelas foram inseridos neste gráfico.

Os demais alotetraploides mostraram-se resistentes à ação patogênica de *P. arachidis*. Esses alotetraploides podem ser utilizados para transferência de genes de resistência a esse fungo para cultivares de amendoim, como demonstrado por Simpson (1993), em um dos seus trabalhos de introgressão de genes silvestres no amendoim.

## 5.5. Herança do DNA de Cloroplasto

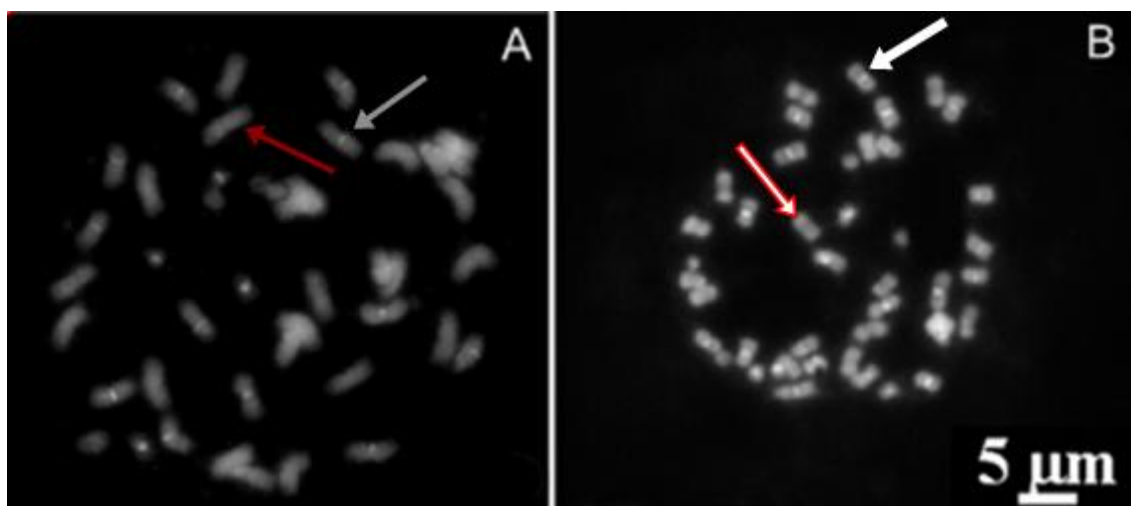
Esse trabalho também teve como objetivo investigar o tipo de herança de DNA de cloroplasto em cruzamentos interespecíficos de *Arachis*. Usando o marcador *trnL-trnF* e eletroforese em gel de poliácridamida, foi verificado que a herança de cpDNA é materna nas espécies de *Arachis* envolvidas neste trabalho, não diferenciando da maioria das angiospermas (figura 34).



**Figura 34.** Análise molecular de cpDNA, utilizando o marcador *trnL-trnF*(primers E e F). *Arachis ipaënsis*, *A. batizocoi* e *A. gregoryi* são doadores de pólen (pai), as outras espécies são as receptoras de pólen (mãe). Cada grupo separado por uma chave corresponde a um genitor materno em amarelo, genitor paterno em vermelho e híbrido diploide e tetraploide em preto.

## 5.6. Análises Citogenéticas

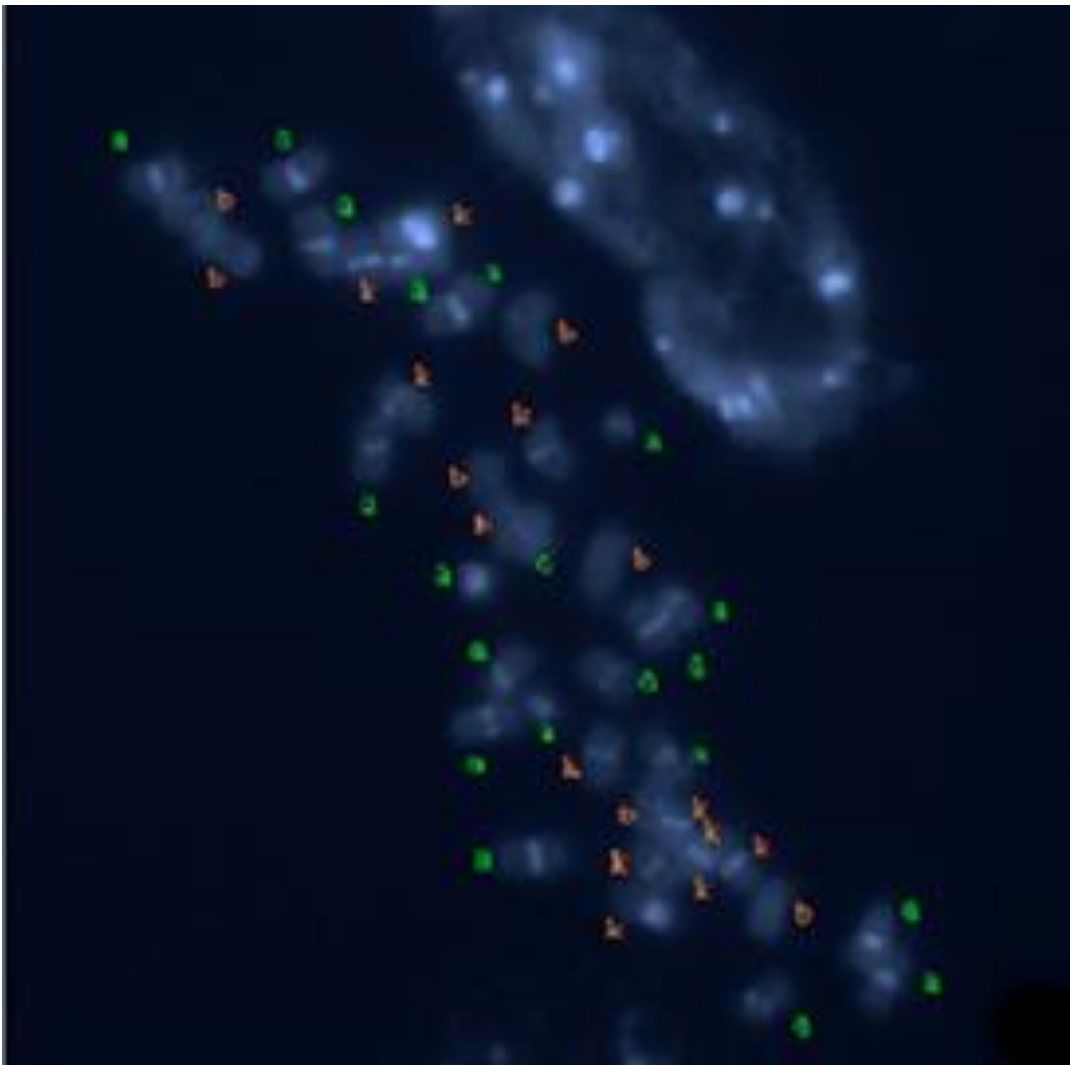
Por meio da análise de microscopia de fluorescência dos cromossomos metafásicos foi possível visualizar os 40 cromossomos de *A. hypogaea*, dos quais 20 são do genoma B, com bandas heterocromáticas ausentes e 20 do genoma A, com bandas heterocromáticas presentes (figura 35 A) e do híbrido resultante do cruzamento de *A. hypogaea* com o alotetraploide [*A. batizocoi* x *A. stenosperma*]<sup>4x</sup>, dos quais 10 cromossomos são típicos do genoma B (banda heterocromática ausente), 10 do genoma K (banda heterocromática DAPI positiva na região centromérica) e 20 do genoma A, sendo  $2n = 4x (2A + 1B + 1K)$  (figura 35 B).



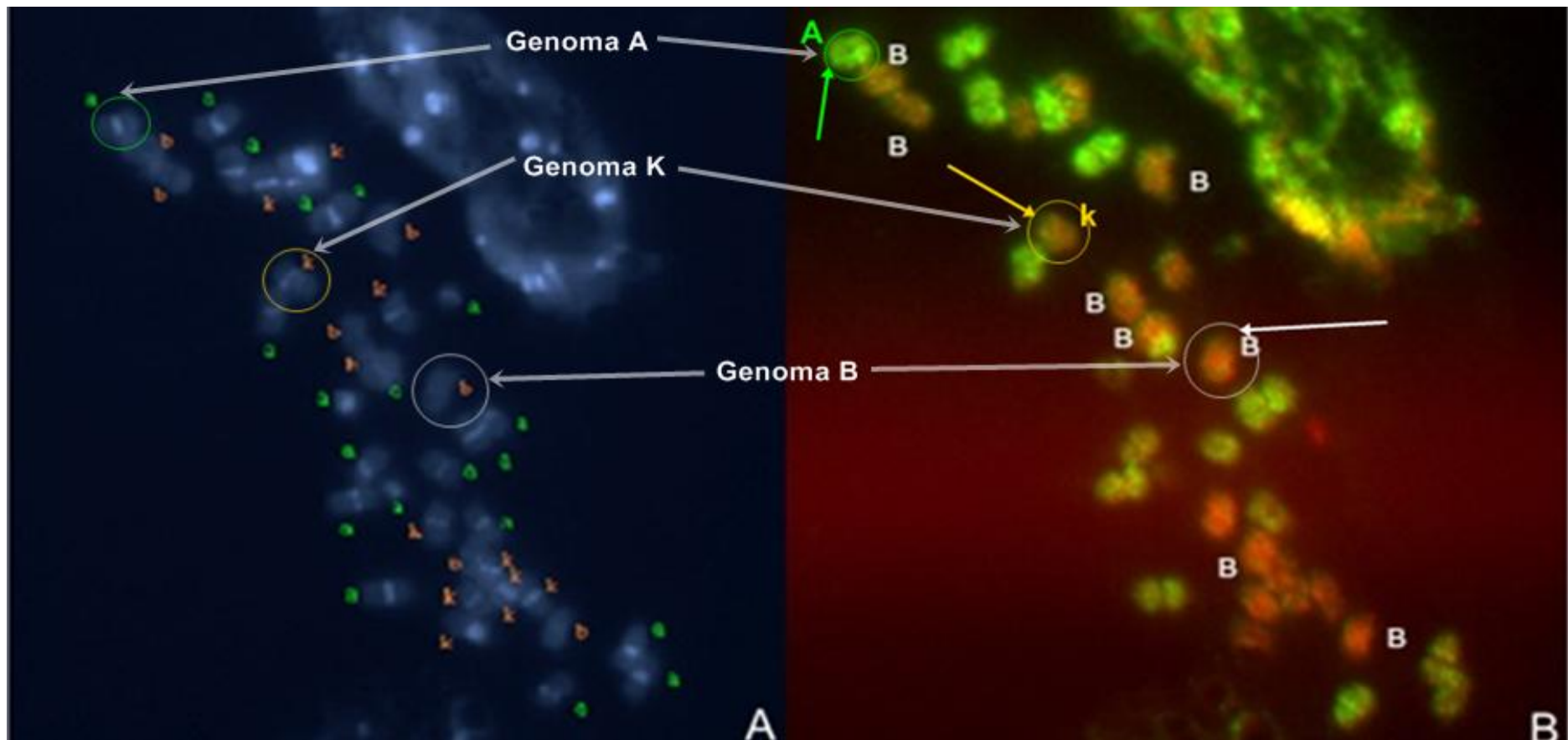
**Figura 35.** GISH mostrando cromossomos metafásicos de *Arachis*, corados com DAPI. (A) cromossomos de *A. hypogaea* (Seijo, 2007), com padrão genômico “AABB” (seta branca genoma “A” e seta vermelha genoma “B”). (B) cromossomos do híbrido F<sub>1</sub> (*A. hypogaea* Senegal X [*A. batizocoi* K9484 X *A. stenosperma* V10309]<sup>4x</sup>), mostrando padrões do genoma “A” e “K”, com bandas heterocromáticas presentes (seta branca) e do genoma “B”, com bandas heterocromáticas ausentes (seta vermelha).

No híbrido do cruzamento *A. hypogaea* x [*A. batizocoi* K9484 X *A. stenosperma* V10309]<sup>4x</sup> foram identificadas bandas heterocromáticas DAPI positivas em aproximadamente 29 cromossomos (figura 36). Essa observação sugere a presença de outro genoma similar ao genoma A (que possui banda heterocromática DAPI positiva), já que o esperado seriam somente 20 cromossomos com bandas heterocromáticas presentes: 10 oriundos do

genoma A de *A. hypogaea* e 10 cromossomos oriundos do alotetraploide vindo de *A. stenosperma* (genoma A). Os outros 9 cromossomos com bandas heterocromáticas são originários do genoma K de *A. batizocoi*, conforme mostrado por GISH (figura 37). Apesar de seu DNA possuir complementaridade com sondas compatíveis com o genoma B, esse híbrido apresenta bandas heterocromáticas positivas. Esses dados corroboram que o genoma de *A. batizocoi* difere dos genomas A e B descritos para *Arachis* e, em acordo com Seijo (2007), é designado de genoma K (figura 37 A-B).



**Figura 36.** Cromossomos do híbrido proveniente do cruzamento entre *A. hypogaea* (Senegal) e o alotetraploide [*A. batizocoi* K9484 X *A. stenosperma* V10309]<sup>4x</sup>, mostrando bandas heterocromáticas em cromossomos do genoma A (a) e K (k). Genoma B sem centrômero visível.



**Figura 37.** Cromossomos do híbrido proveniente do cruzamento entre *A. hypogaea* (Senegal) e o alotetraploide [*A. batizocoi* K9484 X *A. stenosperma* V10309]<sup>4x</sup>, identificados por banda heterocromática DAPI positiva na figura (A); presente em 20 pares de cromossomos do genoma A (letra “a” em verde); ausentes em 10 pares de cromossomos do genoma B (letra “b” em laranja) e presente em 9 pares do genoma K (letra “k” em laranja). Na figura (B) Diferenciação dos cromossomos do híbrido, contendo banda heterocromática DAPI positiva genoma “A” (seta verde), genoma “K” (seta laranja) e com ausência de bandas heterocromáticas positivas o genoma “B” (seta branca), por GISH. Hibridização de cromossomos do híbrido com sonda de DNA genômico de *A. duranensis* (genoma A) (verde) e com sonda de *A. batizocoi* (genoma K) (vermelha).

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos são promissores no que tange à obtenção de novas combinações alélicas a partir de espécies silvestres, assim como sua possibilidade de introgressão de genes úteis no amendoim cultivado.

Espécies silvestres sendo diploides estão impedidas de cruzarem com as espécies tetraploides (amendoim). Para tanto, a quebra da barreira de ploidia com a produção dos alotetraplóides é um importante passo para o melhoramento da cultura do amendoim por meio da introgressão de genes úteis.

As espécies silvestres testadas apresentaram alta resistência ao fungo *Puccinia arachidis*, com exceção de *A. ipaënsis*, que se mostrou suscetível ao fungo estudado.

A cruzabilidade entre cultivares de *A. hypogaea* e os alotetraploides produzidos neste trabalho é bastante promissora para a continuidade da utilização destes genótipos em programas de melhoramento genético.

Embora os resultados não sejam conclusivos para inferir que não há herança paterna de cloroplastos em híbridos interespecíficos da seção *Arachis*, estes resultados sugerem que, para os híbridos avaliados neste trabalho, não há herança paterna plastidial, contrariando a hipótese outrora defendida neste trabalho.

Análises citogenéticas confirmaram que o genoma de *A. batizocoi*, outrora denominado genoma B é diferenciado dos genomas A e B de *A. hypogaea*.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACQUAHH, G. Principles of Plant Genetics and Breeding. Blackwiss Publishing. **Malden**, USA., pp.: 214-222, 2007.
- AHMED, E. H.; YOUNG C. T. Composition, nutrition, and flavor of peanuts. p. 655–688. In H. E. Pattee and C. T. Young (eds.), Peanut science and technology. **Am. Peanut Res. Educ. Soc.** Yoakum, TX., 1982.
- BERTIOLI, S. C. M. L.; GUEDES, L.; GUIMARÃES, P. M.; FÁVERO, A. P. Isolamento de sequências de *Arachis stenosperma* em resposta à infecção de *Puccinia arachidis* e *Cercosporidium personatum* por cDNA-AFLP. Brasília: Embrapa, (**Boletim Técnico Série EMBRAPA**), 2005.
- BECHARA M. D; MORETZSOHN M. C.; Palmieri D. A.; MONTEIRO J. P.; BACCI Jr. M.; MARTINS Jr. J.; VALLS J. F. M.; LOPES C. R.; GIMENES M. A. Phylogenetic relationships in genus *Arachis* based on ITS and 5.8S rDNA sequences. **BMC Plant Biology** 2010, **10**:255.
- BENDEZU, I. F.; STARR, J. L. Mechanism of Resistance to *Meloidogyne arenaria* in the Peanut Cultivar COAN. **Journal of Nematology**. Mar, 35(1) 115-118. 2003.
- BERTIOLI, D.J.;SEIJO, G.;FREITAS, F.O.;VALLS, J.F.M.;LEAL-BERTIOLI , S.C.M.;MORETZSOHN, M.C. An overview of peanut and its wild relatives. **Plant Genetic Resources** 9:134-149, 2011.
- BUROW M. D.; SIMPSON C. E.; STARR J. L.; PATERSON A. H. Transmission genetics of chromatin from a synthetic amphidiploid to cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.): broadening the genepool of a monophyletic polyploid species. **Genetics** 159:823–837, 2001.
- BUROW, M.D.;SELVARAJ, M. G.; UPADHYAYA, H.; OZIAS-AKINS, P.; GUO, B., BERTIOLI; J. D.; BERTIOLI, S. C. M. L.; MORETZSOHN. M. C.;



GUIMARÃES, P. M. Genomics of peanut, a major source of oil and protein. **Peanut Genomics**.p.1-20, 2008.

CLEGG, MICHAEL T.; CUMMINGS, MICHAEL P.; DURBIN, MARY L. Chloroplast gene sequences and the study of plant evolution.**Department of Botany and Plant Sciences, University of California**.v.90, p. 363-367, 1993.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento, 2011. Disponível em <http://www.conab.gov.br/>. Acesso em 10 jul 2006.

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

DEWEY, D.R. Some applications and misapplications of induced polyploidy to plant breeding. In: LEWIS, W.H.**Polyploidy: biological relevance**. New York: Plenum..p. 445 -469, 1980.

DWIVEDI, S. L.; GURTU, S.; CHANDRA S.; YUEJIN, W.; NIGAM, S. N. Assessment of genetic diversity among selected groundnut germplasm. 1: RAPD analysis. **Plant Bredd** 120:345-349, 2001.

EMBRAPA ALGODÃO: **Sistemas de Produção**, Nº 7 ISSN 1678-8710 Versão Eletrônica Dez/2006. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Amendoim/CultivodoAmendoim/pragas.html>>. Acesso em: 18 nov. 2011.

ENNOS R. A. Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations.**Institute of Ecology and Resource Management, University of Edinburgh**.P.250—259, 1994.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations; relatório do ano de 2010. Disponível em <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Acesso em 09 Fev. 2011.

FÁVERO, A. P. **Cruzabilidade entre espécies silvestres de *Arachis* visando à introgressão de genes de resistência a doenças no amendoim cultivado**. Piracicaba. 165p, 2004. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’, Universidade de São Paulo.

MUSCHNER, V. C. **Filogenia Molecular, taxas evolutivas, tempo de divergência e herança organelar em *Passiflora* L. (Passifloraceae)**. Porto Alegre. 162p., 2005. Tese (Doutorado) – Instituto de Bioceências- Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

FÁVERO A. P, SIMPSON C. E, VALLS J. F. M, VELLO N. A: Study of the evolution of cultivated peanut through crossability studies among *Arachis ipaënsis*, *A.duranensis*, and *A.hypogaea*. **Crop Science**. 46(4):1546-1552. 2006.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética. **Brasília**,.121-121p. 1998.

FLANNERY, K. V. The origins of agriculture. **Ann. Rev. of Anthropic**, 2:271-310, 1973.

FREITAS, F. O.; MORETZSOHN, M. C.; VALLS, J. F. Genetic variability of Brazilian Indian Landraces of *Arachis hypogaea* L. **Genet Mol Res**. Sep 30;6 (3): 675-84 2007.

HAMMONS, R. O. Registration of Spancross peanuts (Reg. No. 3).**Crop Sci**. 10:459–460. 1970

- FRIEND, S. A.; QUANDT, D.; TALLURY, S. P.; STALKER, H. T.; HILU, K. W. Species, genomes, and section relationships in the genus *Arachis* (Fabaceae): a molecular phylogeny. **Plant Syst Evol.** **290**:185–199. 2010.
- HOLBROOK, C. C.; STALKER, H. T. Peanut breeding and genetic resources. **Plant Breed.Rev.**22, 297-356, 2003.
- HOLBROOK, C.C.; TIMPER, P.; CULBREATH, A.K. and KVIEN, C.K. Registration of 'Tifguard' peanut. **Journal of Plant Registration**, vol. 2, no. 2, p. 92-94. 2008.
- HUSTED, L. Cytological studies on the peanut, *Arachis*. II. Chromosome number, morphology and behavior, and their application to the problem of the origin of the cultivated forms. **Cytologia**, v.7, p.396-422, 1936.
- KOCHERT, G.; STALKER, H. T.; GIMENES, M.; GALGARO, S. L.; LOPES, C. R. & MOORE, K. RFLP and cytological evidence on the origin and evolution of allotetraploid domesticated peanut, *Arachis hypogaea* (Leguminosae). **Amer. J. Bot.** 83, 1282-1291, 1996.
- KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, W. C. Taxonomiadel género *Arachis* (Leguminosae). **Bonplandia**, v.8, p.1-186, 1994.
- LEAL-BERTIOLI, S. C. M.; GUIMARÃES, P. M.; FÁVERO, A. P.; MORETZSOHN, M. C.; PROITE, K. & BERTIOLI, D. J. Amendoim selvagem: uma fonte de resistência a pragas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. Dezembro 2004. Site: [www.biotecnologia.com.br](http://www.biotecnologia.com.br). 2004.
- LEAL-BERTIOLI, S.C.M, FARIAS, M. P.SILVA, P.I.T, GUIMARAES, P. M, BRASILEIRO, A. C.M, BERTIOLI, D. J. and de Araujo A. C. G. Ultrastructure of the initial interaction of *Puccinia arachidis* and *Cercosporidium personatum* with leaves of *Arachishypogaea* and *Arachis stenosperma*. **Journal of Phytopathology**. 2010.

- MALUSZYNSKA J, HESLOP-HARRISON, P. Physical mapping of rDNA loci in *Brassica* species. **Genome** 36:774–781, 1993.
- MALLIKARJUNA, N.; PANDE, S.; ADHAV, D. R. J.; SASTRI, D. C.; RAO, J. N., Introgression of disease resistance genes from *Arachiskempff-mercado* into cultivated groundnut. **Plant Breeding** 123 (6), 573–576 doi:10.1111/j.1439-0523.2004.01036.x. 2004.
- MORAES, S.A.; SALGADO, C.L. Utilização da técnica de folhas destacadas de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) para inoculações com *Cercosporaarachidicola* Hori e *Cercospora personata* (Bert. & Curt.) Ell. & Ev. **Summa Phytopathologica**, v.8, p.39-55. 1984.
- MORETZSOHN, M.C.; HOPKINS, M.S.; MITCHELL, S.E.; KRESOVICH, S.; VALLS, J.F.M.; FERREIRA, M.E. Genetic diversity of peanut (*Arachis hypogaea* L.) and its wild relatives based on the analysis of hypervariable regions of the genome. **BMC Plant Biology**, v.4, 2004. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/4/11>. Acesso em: 10 jul. 2007.
- MORETZSOHN, M. C.; BARBOSA, A. V. G.; ALVES-FREITAS, D. M. T.; TEIXEIRA, C.; LEAL-BERTIOLI, S. C. M.; GUIMARÃES, P. M.; PEREIRA, R. W.; LOPES, C. R.; CAVALLARI, M. M.; VALLS, J. F. M.; BERTIOLI, D. J.; GIMENES, M. A. A linkage map for the B-genome of *Arachis* (Fabaceae) and its synteny to the A-genome. **BMC Plant Biology** 9: 40, 2009.
- PROITE, K.; LEAL-BERTIOLI, S. C.; BERTIOLI, D. J.; MORETZSOHN, M. C.; DA SILVA, F. R.; MARTINS, N. F. GUIMARAES, P. M. ESTs from a wild *Arachis* species for gene discovery and marker development. **BMC Plant Biology**; 7:7. doi: 10.1186/1471-2229-7-7, 2007.
- ROBLEDO, G.; SEIJO, G. Species relationships among the wild B genome of *Arachis* species (section *Arachis*) based on FISH mapping of rDNA loci and heterochromatin detection: a new proposal for genome

arrangement. **Theoretical and Applied Genetics** 121 (6):1033-1046. 2010.

RONZELLI J. P. **Melhoramento genético de plantas**. Curitiba : P.Ronzelli Junior, 219p, 1996.

SAVAGE, G.P.; KEENAN, J.I. The composition and nutritive value of groundnut kernels. In: SMARTT, J. (ed.). **The groundnut crop: a scientific basis for improvement**. Londres: Chapman and Hall, p.173-213, 1994.

SEIJO, J.G.; LAVIA, G. I.; FERNÁNDEZ, A.; KRAPOVICKAS, A.; DUCASSE, D. & MOSCONE, E. A. Physical mapping of the 5S and 18S–25S RNA genes by FISH as evidence that *A. duranensis* and *A. ipaënsis* are the wild diploid progenitors of *A. hypogaea* (Leguminosae). **Am. J. Bot.** 91, 1294-1303, 2004.

SEIJO G. J.; LAVIA G. I.; FERNANDEZ A.; KRAPOVICKAS A.; DUCASSE, E.; BERTIOLI D. J.; MOSCONE, D. E. A. Genomic relationships between the cultivated peanut (*Arachis hypogaea* – Leguminosae) and its close relatives revealed by double GISH. **Am. J. Bot.**, vol. 94, p.1963-1971, 2007.

SCHIFINO-WITTMANN, MARIA T. Poliploidia e seu Impacto na Origem E Evolução das Plantas Silvestres e Cultivadas. R. bras. **Agrociência**, v.10, n. 2, p. 151-157, abr-jun, 2004

SCHWARZACHER T.; HESLOP-HARRISON J.S. Practical in situ hybridization. **BIOS Scientific** Limited, 2000.

SHORE, J. S. & TRIASSI, M. Paternally biased cpDNA inheritance in *Turnera ulmifolia* (Turneraceae). **Am. J. Bot.** 85:328-332, 1998.

SMITH, S. E. Influence of Parental Genotype on Plastid Inheritance in *Medicago sativa* **J.Hered.** 80(3): 214-217, 1989.

- SINGH, A. K.; SIMPSON, C. E. Biosystematics and genetic resources. In: J Smartt (eds.). *The groundnut crop: a scientific basis for improvement*. London: Chapman and Hall. p. 96-1371, 1994.
- SIMPSON, C. E.; SMITH, O. D. Registration of Tamnut 74 peanut. **Crop Sci.** 15:603-604, 1975.
- SIMPSON, C. E. Pathways for Introgression of Pest Resistance into *Arachis hypogaea* L. **Peanut Science**: January, Vol. 18, n. 1, pp. 22-26. 1991.
- SIMPSON C.E.; STARR J.L.; NELSON S. C.; WOODARD K. E.; SMITH O. D. Registration of TxAG6 and TxAG7 peanut germplasm. **Crop Science** 33: 1418, 1993.
- SIMPSON, C.E. Use of wild *Arachis* species/introgression of genes into *A. hypogaea*. **Peanut Science**, v.28, n.2, p.114-116, 2001.
- SIMPSON, C. E, STARR, J.L. Registration of 'COAN' peanut. **Crop Science** 41:918, 2001.
- SIMPSON, C. E.; STARR, J. L.; CHURCH, G. T.; BURROW, M. D.; PATERSON, A. H. Registration of NemaTAM peanut. **Crop Science** 43:1561, 2003.
- SUBRAHMANYAM, P.; GHANEKAR, A.M.; NOLT, B.L.; REDDY, D.V.R.; McDONALD, D. Resistance to groundnut diseases in wild *Arachis* species In: **Proceedings of International Workshop on Cytogenetics of Arachis**, ICRISAT, India, Patancheru, 1985.
- STALKER, H.T.A. New species in section *Arachis* of peanuts with D genome. **American Journal of Botany**, v.78, p.630-637, 1991.

STALKER, H. T.; SIMPSON, C. E. Germplasm resources in *Arachis*. In: PATTEE, H. E.: Stillwater: ALKER, H. T. (Ed.) **Advances in peanut science**. APRES, 1995. Chapter 2, p. 14-53.

TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS - TACO - NEPA/UNICAMP, Versão II, 2. ed., Campinas, SP: **NEPA-UNICAMP**, 113p. 2006.

TABERLET, P.; GIELLY, L.; PATOU, G.; Bouvet, J. Universal primers for amplification of three noncoding regions of chloroplast DNA. *Pl. Mol. Biol.* 17: 1105-1109. 1991.

TASSO J, L. C.; Cultura do amendoim. In: MARQUES, O.M.; NOGUEIRA, G. A. (Eds) **Pragas do Amendoim**. São Paulo: UNESP: Edi. Jaboticabal, p.1-220, 2004.

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

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

WENKEL, R.; **Um projeto ambicioso: as metas do milênio da ONU**. [online] Disponível na Internet via WWW. URL:<http://www.dw-world.de/dw/article/0,,1707149,00.htm>. Arquivo consultado em 15 de novembro de 2009.

## 8. ANEXO I

### EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO - *ARACHIS* (Nº1)

(Ferreira & Grattapaglia, 1998 modificado)

- 1) Macerar 200 mg de tecido (de preferência de tecido novo e fresco) com N<sub>2</sub> líquido.
- 2) Num tubo de microcentrífuga de 2 mL, adicionar 700  $\mu$ L do **Tampão 2x CTAB** e mais 2  $\mu$ L de 2-mercaptoetanol por mL do tampão (e incubar em banho-maria a 60°C durante 60 minutos).
- 3) Adicionar 1 volume (700  $\mu$ L) de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e misturar até que se forme uma emulsão.
- 4) Centrifugar a 14.000 rpm por 5 minutos e transferir a fase aquosa para dois tubos de microcentrífuga novos de 1,5 mL (+/- 300  $\mu$ L/tubo).
- 5) Adicionar 3 volumes (900  $\mu$ L) do **Tampão de Precipitação CTAB** e agitar lentamente. Centrifugar a 13.200 rpm por 1,5 minutos.
- 6) Descartar cuidadosamente o sobrenadante. O pellet com o DNA deverá estar aderido ao fundo do tubo.
- 7) Ressuspender o DNA dos dois tubos do passo 4 com 600  $\mu$ L de 1,2 M NaCl (300  $\mu$ L em cada tubo) e transferir os 600  $\mu$ L para um único tubo de 2 mL.
- 8) Centrifugar a 12.000 rpm por 5 minutos e transferir o sobrenadante para novo tubo.
- 9) Precipitar o DNA com 1 mL de Etanol 100% e misturar gentilmente.
- 10) Centrifugar por 2 minutos a 13.200 rpm e descartar o sobrenadante, com cuidado.
- 11) Lavar o pellet com 500  $\mu$ L de etanol 70% e centrifugar a 13.200 rpm por 1,5 minuto. Descartar o sobrenadante e repetir a lavagem. Dar um *spin* e secar o pellet.



12) Ressuspender o DNA em 100  $\mu$ L de TE + RNase (1mg/mL) e incubar a 37°C por 60 minutos.

**TAMPÃO 2x CTAB**

- 2% CTAB
- 100 mM Tris-HCl (pH 8,0)
- 20 mM de EDTA (pH 8,0)
- 1,4 M NaCl
- 1% PVP 40

**TAMPÃO DE PRECIPITAÇÃO CTAB**

- 1% CTAB
- 50 mM Tris-HCl (pH 8,0)
- 20 mM de EDTA (pH 8,0)