



**Universidade de Brasília**  
**Departamento de Biologia Celular**  
**Pós-Graduação em Biologia Molecular**

**Efeito da alotetraploidização em espécies silvestres de  
*Arachis* e mapeamento de QTLs de resistência à ferrugem (*Puccinia  
arachidis* Speg.) em população F<sub>6</sub> de genoma B**

**Uiara Cavalcante Silva**

**Brasília-DF**  
**2015**

**Efeito da alotetraploidização em espécies silvestres de *Arachis* e mapeamento de QTLs de resistência à ferrugem (*Puccinia arachidis* Speg.) em população F<sub>6</sub> de genoma B**

**Uiara Cavalcante Silva**

Orientador: Robert Neil Gerard Miller

Co-orientador: David John Bertioli

Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Biologia Molecular.

**Brasília-DF**

**2015**

Trabalho realizado no Laboratório de Interação Planta-Praga III – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

**Banca Examinadora:**

Membro interno: Prof. Dr. Robert Neil Gerard Miller, Universidade de Brasília - UnB

Membro interno: Prof. Dr. Francisco José Lima Aragão, Universidade de Brasília – UnB e Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Membro externo: Dr. Márcio de Carvalho Moretzsohn, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Membro externo: Dr<sup>a</sup>. Gláucia Salles Cortopassi Buso, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Membro externo: Dr<sup>a</sup>. Larissa Arrais Guimarães, Bolsista Pós-Doutora do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

**Suplente:** Dr<sup>a</sup>. Adriana Regina Custódio, Bolsista Pós-Doutora do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

*Ao meu Deus pela sua imensa bondade e misericórdia; aos meus pais, Socorro e Hailton e aos meus tios Valdemir e Maria Rosa, por todo amor dedicado, ensinamentos e apoio incondicional.*

*Dedico*

# *Agradecimentos*

*A **DEUS**, razão de todas as minhas conquistas. Minha força, meu refúgio e fonte inesgotável de esperança!!! minha gratidão eterna!!!*

*Aos meus pais, Socorro e Hailton e minha avó Quitéria (in memorian), que sempre acreditaram em mim e mesmo nas adversidades, sempre estiveram ao meu lado (mesmo que a distância impedisse um afago), o amor sempre foi maior!*

*Ao meu irmão João Lopes, parceiro fiel e solidário em tudo. Amigo incondicional que sempre estará comigo...*

*A todos os meus familiares que sempre torceram por mim, em especial aos meus tios Valdeci e Maria Rosa, agradeço por todo apoio e amor que sempre recebi. O acolhimento e o exemplo de vocês me fizeram uma pessoa melhor. Aos meus primos Rose, Lena, Iliosmar, Meire e Claudemi, que me acolheram com tanto carinho. As palavras de encorajamento me fortaleceram bastante, muito obrigada!*

*A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior) pela concessão de bolsa de estudo durante o doutorado...*

*A todos os funcionários do programa de pós-graduação em Biologia Molecular da UnB, em especial ao coordenador Dr. Robert Miller, pela ajuda fundamental na conclusão do curso e à Ana, secretária, pelo apoio e disponibilidade.*

*Ao Prof. Dr. David Bertioli, orientador, que prontamente abriu as portas para eu fazer o doutorado, pela oportunidade e confiança depositada.*

*Em especial à Dr<sup>a</sup>. Soraya Bertioli, pelo apoio, carinho e conhecimento depositado nesse trabalho. Por todo estímulo e amizade, pela contribuição imprescindível e por todo desprendimento em sempre me ajudar, minha admiração e meus sinceros agradecimentos. Nossa parceria ao longo desses quatro anos foi muito valiosa, com certeza sem o seu apoio eu não teria chegado ao final.*

*Agradeço com grande satisfação ao Dr. Márcio Moretzsohn e à Dr<sup>a</sup>. Ana Cláudia Guerra, que foram imprescindíveis no desenvolvimento desse trabalho. Por todo conhecimento passado, pela paciência e valiosa contribuição... Muito obrigada!*

*Ao grupo de pesquisa em **Arachis**, Dr<sup>a</sup>. Ana Cláudia Guerra, Dr<sup>a</sup>. Soraya Bertioli, Dr<sup>a</sup>. Patrícia Guimarães, Dr<sup>a</sup>. Ana Brasileiro, Prof. Dr. David Bertioli e Dr. Márcio Moretzsohn, pelos ensinamentos e sugestões. E também aos analistas Leonardo Nunes e Rosana Falcão, por toda disponibilidade e auxílio todo esse tempo.*

*À estatística da Embrapa Cenargen, Joseane Padilha, por todo desprendimento em sempre me ajudar todas as vezes em que a procurei e por todo conhecimento transmitido, meu muito obrigada.*

*Ao Leandro Mesquita, que sempre cuidou com tanto carinho das minhas plantas e sempre esteve disposto a ajudar da melhor forma possível para a execução dos projetos. Muito obrigada!*

*Às minhas queridas amigas, Viviane, Lillian e Bruna Vidigal, com as quais vivi momentos de grande satisfação. Com vocês fui muito feliz!*

*Ao meu 'lindo' Robson Santos, namorado, amigo, companheiro... tão presente mesmo na distância, seu apoio foi e é fundamental... Te adoro!*

*Aos meus queridos amigos do LPPIII, Andressa, Amanda, Thaís, Paulinha, Natália, Dione, Victória, Raul, Ana Zotta, Bruna, Rafaela, Ana Luíza, Larissa Arrais e Christina; Aos amigos que passaram pelo laboratório e deixaram saudades, Karinne, Larissa Muniz, Raquel, Cinthia, Carolzinha, Juliana, Lígia, Gabriela, Igor, Iugo, Pedro e tantos outros...*

*Aos amigos da UnB/Embrapa, Brenda, Leonardo, Cristiane Andrade, Nahyanne, Abdul e Luciana Lacerda... obrigada pela amizade e carinho!*

*Aos membros da banca, pela valiosa contribuição e disponibilidade.*

*Aos que me ajudaram, mesmo que indiretamente, torcendo por mim, meus sinceros agradecimentos e que Deus os abençoe...*

**OBRIGADA!!!!**

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”*

*Marthin Luther King*

## Sumário

Índice de Figuras .....	11
Índice de Tabelas .....	16
Resumo .....	17
Abstract .....	18
Introdução Geral.....	19
Revisão Bibliográfica.....	21
Recursos Genéticos e Melhoramento .....	21
O amendoim ( <i>Arachis hypogaea</i> L.) .....	22
Gênero <i>Arachis</i> .....	26
Poliploidia e utilização de híbridos no melhoramento .....	28
Tolerância ao déficit hídrico .....	31
Nodulação .....	32
Resistência à ferrugem ( <i>Puccinia arachidis</i> Speg.) .....	33
Objetivos.....	35
Geral.....	35
Específicos .....	35
<b>Capítulo 1:</b> Caracterização do efeito da tetraploidização em caracteres morfológicos foliares, fisiológicos e respostas fitopatológicas de <i>Arachis</i> spp. ....	36
Introdução.....	36
Objetivos.....	39
Material e Métodos .....	40
Material vegetal, experimentos e condições de crescimento .....	40
Características gerais das plantas .....	40
Avaliação da estrutura morfológica da epiderme foliar .....	41
SCMR e SLA .....	44
Extração de clorofila A, clorofila B, A+B e carotenoides.....	44
Transpiração/área foliar (TR/AF) .....	45
Resposta fitopatológica ao fungo <i>Puccinia arachidis</i> Speg. ....	46
Análise estatística .....	47
Resultados.....	48
Características gerais das plantas .....	48



Avaliação da estrutura morfológica da epiderme foliar .....	54
SCMR (leitura do teor de clorofila) e SLA (área foliar específica) .....	63
Medidas de pigmentos foliares .....	70
Transpiração/área foliar (TR/AF) .....	78
Resposta fitopatológica ao fungo <i>Puccinia arachidis</i> .....	81
Discussão .....	84
Características gerais das plantas .....	84
Estruturas epidérmicas.....	85
Medidas de pigmentos foliares .....	86
Transpiração/área foliar (TR/AF) .....	87
Resposta fitopatológica ao fungo <i>Puccinia arachidis</i> Speg. ....	89
Conclusões.....	90
<b>Capítulo 2: Mapeamento de QTLs de resistência à ferrugem (<i>Puccinia arachidis</i> Speg.) em população F<sub>6</sub> de genoma B de <i>Arachis</i>.....</b>	<b>91</b>
Observação .....	91
Introdução.....	92
Objetivos.....	94
Material e Métodos.....	95
Material vegetal .....	95
Fenotipagem para ferrugem.....	95
Outras características agronômicas e de domesticação .....	96
Extração de DNA.....	96
Mapeamento genético e análise de QTLs .....	96
Resultados.....	98
Fenotipagem .....	98
Ferrugem.....	98
Outras características agronômicas e de domesticação .....	99
Construção do Mapa .....	100
Identificação de QTLs .....	103
QTLs para resistência à ferrugem.....	103
QTLs para outras características agronômicas e de domesticação .....	105

Discussão .....	106
Conclusões .....	110
Bibliografia .....	111
Anexo .....	126

## Índice de Figuras

- Figura 1. Procedimento de coleta, fixação e armazenagem do material para dissociação epidérmica de genótipos de *Arachis*. (A) Condições das plantas no momento da coleta; (B) modelos de corte nos folíolos de *Arachis* e (C) após fixação em solução de FAA (18:1:1), os fragmentos foliares foram mantidos em etanol 70%. ..... 42
- Figura 2. Método de dissociação de Franklin (1945), modificado por Berlyn e Miksche (1976) aplicado nos genótipos estudados em ambas as superfícies epidérmicas foliares: abaxial e adaxial. Em (A) destaque com seta vermelha para o fragmento foliar após despigmentação e processo de dissociação; (B) lâmina permanente montada em glicerol 100% com uma das superfícies epidérmicas foliares; (C) e (D) faces abaxial e adaxial, respectivamente, da epiderme foliar com setas indicando estômatos (vermelhas), tricomas (azuis) e células epidérmicas (verdes). ..... 42
- Figura 3. Esquema da placa tipo Elisa, utilizada para leitura e quantificação do conteúdo de pigmentos fotossintéticos: Clorofila a – CloA; Clorofila b – CloB; Clorofila total a+b – CloAB, além de carotenoides totais em diferentes diluições distribuídas nas colunas (diluição 1:0, colunas de 1-3; diluição 1:2, colunas 4-6 e diluição 1:10, colunas 7-9. Colunas 10-12, foram usadas com água para controle das amostras) e diferentes genótipos distribuídos nas linhas de A-H (silvestres, tetraploides sintéticos e cultivares). ..... 45
- Figura 4. Gráficos em BoxPlot para a variável Altura do Eixo Central para cinco conjuntos de alotetraploides sintéticos de *Arachis*. A) conjunto BatDur1 (sintético – BatDur1, parentais – Bat-K9484, Dur-V14167 e cultivares); B) conjunto BatSten1 (sintético - BatSten1, parentais – Bat-K9484, Sten-V10309 e cultivares); C) conjunto IpaDur1 (sintético – IpaDur1, parentais – Ipa-K30076, Dur-V14167 e cultivares); D) conjunto IpaVillo1 (sintético - IpaVillo1, parentais – Ipa-K30076, Villo-V12812 e cultivares); E) conjunto GregSten1 (sintético – GregSten1, parentais – Greg-V6389, Sten-V10309 e cultivares). Para todos os conjuntos, as cultivares utilizadas como controles foram: Ah-BR1, Ah-Caiapó, Ah-Runner e Ah-Tatu. .... 49
- Figura 5. Gráficos em BoxPlot para a variável Peso Seco da Parte Aérea (g) – PA para cinco conjuntos de sintéticos alotetraploides de *Arachis*. A) conjunto BatDur1 (sintético – BatDur1, parentais – Bat-K9484, Dur-V14167 e cultivares); B) conjunto BatSten1 (sintético - BatSten1, parentais – Bat-K9484, Sten-V10309 e cultivares); C) conjunto IpaDur1 (sintético – IpaDur1, parentais – Ipa-K30076, Dur-V14167 e cultivares); D) conjunto IpaVillo1 (sintético - IpaVillo1, parentais – Ipa-K30076, Villo-V12812 e cultivares); E) conjunto GregSten1 (sintético – GregSten1, parentais – Greg-V6389, Sten-V10309 e cultivares). Para todos os conjuntos, as cultivares utilizadas como controles foram: Ah-BR1, Ah-Caiapó, Ah-Runner e Ah-Tatu. .... 50
- Figura 6. Gráficos em BoxPlot para a variável peso seco da parte radicular (g) – PR para cinco conjuntos de sintéticos alotetraploides de *Arachis*. A) conjunto BatDur1 (sintético – BatDur1, parentais – Bat-K9484, Dur-V14167 e cultivares); B) conjunto BatSten1 (sintético - BatSten1, parentais – Bat-K9484, Sten-V10309 e cultivares); C) conjunto IpaDur1 (sintético – IpaDur1, parentais – Ipa-K30076, Dur-V14167 e cultivares); D) conjunto IpaVillo1 (sintético - IpaVillo1, parentais – Ipa-K30076, Villo-V12812 e cultivares); E) conjunto GregSten1 (sintético – GregSten1, parentais – Greg-V6389, Sten-

V10309 e cultivares). Para todos os conjuntos, as cultivares utilizadas como controles foram: Ah-BR1, Ah-Caiapó, Ah-Runner e Ah-Tatu. ....	51
Figura 7. Gráficos em BoxPlot para a variável área foliar total (TLA) para os seis conjuntos de tetraploides sintéticos de <i>Arachis</i> . A) conjunto BatDur1 (sintético – BatDur1, parentais – Bat-K9484, Dur-V14167 e cultivares); B) BatDur2 (sintético – BatDur2, parentais – Kat-K9484, Dur-SeSn2848 e cultivares); C) conjunto BatSten1 (sintético - BatSten1, parentais – Bat-K9484, Sten-V10309 e cultivares); D) conjunto GregSten1 (sintético – GregSten1, parentais – Greg-V6389, Sten-V10309 e cultivares); E) conjunto IpaDur1 (sintético – IpaDur1, parentais – Ipa-K30076, Dur-V14167 e cultivares); F) conjunto IpaVillo1 (sintético - IpaVillo1, parentais – Ipa-K30076, Villo-V12812 e cultivares). Para todos os conjuntos as cultivares utilizadas como controles foram: Ah-BR1, Ah-Caiapó, Ah-Runner e Ah-Tatu.....	52
Figura 8. Frequência de nódulos de rizóbios/grama de raiz para espécies silvestres de <i>Arachis</i> (barras azuis), tetraploides sintéticos (barras verdes) e cultivares de <i>Arachis hypogaea</i> (barras vermelhas) com médias e desvios. ....	53
Figura 9. Gráficos em Box Plot para avaliação do comprimento de estômatos da face abaxial para os seis conjuntos de tetraploides sintéticos de <i>Arachis</i> . A) conjunto BatDur1 (sintético – BatDur1, parentais – Bat-K9484, Dur-V14167 e cultivares); B) BatDur2 (sintético – BatDur2, parentais – Kat-K9484, Dur-SeSn2848 e cultivares); C) conjunto BatSten1 (sintético - BatSten1, parentais – Bat-K9484, Sten-V10309 e cultivares); D) conjunto GregSten1 (sintético – GregSten1, parentais – Greg-V6389, Sten-V10309 e cultivares); E) conjunto IpaDur1 (sintético – IpaDur1, parentais – Ipa-K30076, Dur-V14167 e cultivares); F) conjunto IpaVillo1 (sintético - IpaVillo1, parentais – Ipa-K30076, Villo-V12812 e cultivares). Para todos os conjuntos, as cultivares utilizadas como controles foram: Ah-Caiapó e Ah-Runner.....	55
Figura 10. Gráfico em Box Plot para avaliação da densidade de células epidérmicas (número de células/mm <sup>2</sup> ) da face abaxial para o conjunto do tetraploide sintético BatSten1 [sintético - (Bat-K9484 x Sten-v10309) <sup>4x</sup> , silvestres diploides - Bat-K9484, Sten-V10309 e cultivares – Ah-Caiapó e Ah-Runner, como controles). ....	56
Figura 11. Correlação de Pearson com significância (p) de 0,05% entre as variáveis Índice estomático (IE) e Densidade Estomática (DE – Número de estômatos/mm <sup>2</sup> ) para tetraploides sintéticos (A) e silvestres diploides (B). ....	57
Figura 12. Superfície abaxial do conjunto IpaDur1 capturados em microscópio Axiophot. (A) Silvestre diploide <i>Arachis ipaënsis</i> (Ipa-K30076) (B) silvestre diploide <i>A. duranensis</i> (Dur-V14167), (C) anfidiplóide sintético IpaDur1 e (D) alotetraploide natural <i>A. hypogaea</i> cv. Runner IAC-886. Destaque com barras vermelhas mostrando o comprimento de estômatos em µm. Escala de 100µm.....	58
Figura 13. Gráficos em Box Plot para características morfológicas foliares na superfície abaxial do conjunto IpaDur1: sintético IpaDur1 (Ix <sup>D</sup> ) - [K30076 x V14167] <sup>4x</sup> , parentais – <i>A. ipaënsis</i> (Ipa), <i>A. duranensis</i> (Dur) e cultivar Runner IAC-886 (Runner). (A) Densidade de células epidérmicas (número de células/mm <sup>2</sup> ), (B) densidade de tricomas (número de tricomas/mm <sup>2</sup> ) e (C) Densidade estomática (número de estômatos/mm <sup>2</sup> ). ....	59

Figura 14. Agrupamento para o conjunto IpaDur1, com tetraploide sintético - (Ix <sub>D</sub> ) [KG30076 x V14167] <sup>4x</sup> , parentais diploides – <i>A. duranensis</i> (Dur1), <i>A. ipaënsis</i> (Ipa) e cultivar – Runner IAC-886 (Runner), pelo método de clusterização por Silhouette para todas as características avaliadas na face abaxial. Comprimento de estômatos (Comp), Índice Estomático (IE), Densidade de estômatos (Est.mm <sup>2</sup> ), Densidade de células epidérmicas (Cel.mm <sup>2</sup> ) e Densidade de tricomas (Tric.mm <sup>2</sup> ). Com coeficiente de 0.91. ....	60
Figura 15. Análises de Componentes Principais (PCA) para diploides e tetraploides do conjunto IpaDur1 (Ipa-K30076, Dur-V14167, IpaDur1, Ah-Runner e Ah-Tatu), com todas as características estudadas na superfície abaxial foliar: Comprimento de estômatos (Comp), Índice Estomático (IE), Densidade de estômatos (Est.mm <sup>2</sup> ), Densidade de células epidérmicas (Cel.mm <sup>2</sup> ) e Densidade de tricomas (Tric.mm <sup>2</sup> ). Os genótipos silvestres estão identificados nas cores verde e amarelo e tetraploides sintéticos nas cores azul e roxo. ....	61
Figura 16. Análises de Componentes Principais (PCA) para diploides e tetraploides do conjunto IpaDur1 (Ipa-K30076, Dur-V14167, IpaDur1, Ah-Runner e Ah-Tatu), com todas as características estudadas na superfície adaxial foliar: Comprimento de estômatos (Comp), Índice Estomático (IE), Densidade de estômatos (Est.mm <sup>2</sup> ), Densidade de células epidérmicas (Cel.mm <sup>2</sup> ) e Densidade de tricomas (Tric.mm <sup>2</sup> ). Os tetraploides sintéticos estão identificados pela cor azul, cultivares pela cor verde (ambos tetraploides) e silvestres pela cor amarela (diploides). ....	62
Figura 17. Comparação de densidades de células epidérmicas (A) de tricomas (B) e estomáticas (C) entre as superfícies abaxial e adaxial. ....	63
Figura 18. Variação do teor de clorofila (SCMR) (A) e área foliar específica (SLA) (B) nas diferentes classes (cultivares, sintéticos e silvestres) de genótipos de <i>Arachis</i> spp analisados.....	64
Figura 19. Gráficos em Box Plot para a variável área foliar específica (SLA) para os seis conjuntos de tetraploides sintéticos de <i>Arachis</i> . A) conjunto BatDur1 (sintético – BatDur1, parentais – Bat-K9484, Dur-V14167 e cultivares); B) BatDur2 (sintético – BatDur2, parentais – Kat-K9484, Dur-SeSn2848 e cultivares); C) conjunto BatSten1 (sintético - BatSten1, parentais – Bat-K9484, Sten-V10309 e cultivares); D) conjunto GregSten1 (sintético – GregSten1, parentais – Greg-V6389, Sten-V10309 e cultivares); E) conjunto IpaDur1 (sintético – IpaDur1, parentais – Ipa-K30076, Dur-V14167 e cultivares); F) conjunto IpaVillo1 (sintético - IpaVillo1, parentais – Ipa-K30076, Villo-V12812 e cultivares). Para todos os conjuntos, as cultivares utilizadas como controles foram: Ah-BR1, Ah-Caiapó, Ah-Runner e AH-Tatu. ....	66
Figura 20. Gráficos em BoxPlot para a variável leitura do teor de clorofila (SCMR) para os seis conjuntos de tetraploides sintéticos de <i>Arachis</i> . A) conjunto BatDur1 (sintético – BatDur1, parentais – Bat-K9484, Dur-V14167 e cultivares); B) BatDur2 (sintético – BatDur2, parentais – Kat-K9484, Dur-SeSn2848 e cultivares); C) conjunto BatSten1 (sintético - BatSten1, parentais – Bat-K9484, Sten-V10309 e cultivares); D) conjunto GregSten1 (sintético – GregSten1, parentais – Greg-V6389, Sten-V10309 e cultivares); E) conjunto IpaDur1 (sintético – IpaDur1, parentais – Ipa-K30076, Dur-V14167 e cultivares); F) conjunto IpaVillo1 (sintético - IpaVillo1, parentais – Ipa-K30076, Villo-V12812 e cultivares). Para todos os conjuntos, as cultivares utilizadas como controles foram: Ah-BR1, Ah-Caiapó, Ah-Runner e AH-Tatu. ....	67

Figura 21. Comparação entre leitura do teor de clorofila (SCMR) e área foliar específica (SLA) dos conjuntos de tetraploides sintéticos que apresentaram variação nos valores para SLA. Conjunto BatSten1 (sintético - BatSten1, parentais – Bat-K9484, Sten-V10309 e cultivares) (A e B); conjunto IpaDur1 (sintético – IpaDur1, parentais – Ipa-K30076, Dur-V14167 e cultivares) (C e D) e conjunto IpaVillo1 (sintético - IpaVillo1, parentais – Ipa-K30076, Villo-V12812 e cultivares). Para todos os conjuntos, as cultivares utilizadas como controles foram: Ah-BR1, Ah-Caiapó, Ah-Runner e AH-Tatu. ....	69
Figura 22. Comparação para a leitura do teor de clorofila (SCMR) entre todos os tetraploides sintéticos de <i>Arachis</i> (BatDur1, BatDur2, GregSten1, IpaDur1 e IpaVillo1) e cultivares de amendoim (Ah-BR1, Ah-Caiapó, Ah-Runner e Ah-Runner-1) utilizadas no experimento. ....	70
Figura 23. Comparação do teor de pigmentos fotossintéticos pelo método extrativo entre os tipos de genótipos de <i>Arachis</i> estudados – cultivados, sintéticos e silvestres. Teor de clorofila a (A), teor de clorofila b (B), teor de clorofila total a+b (C) e teor de carotenoides totais – xantofilas e β-caroteno (C) em $\mu\text{g.gMF}^{-1}$ . ....	71
Figura 24. Teor de pigmentos fotossintéticos para o conjunto IpaDur1 (sintético – IpaDur1, parentais diploides - Ipa-K30076, Dur1-V14167 e cultivares controles - <i>A. hypogaea</i> subsp. <i>fastigiata</i> cv BR1, <i>A. hypogaea</i> subsp. <i>hypogaea</i> cv Runner-IAC 886, e <i>A. hypogaea</i> subsp. <i>fastigiata</i> cv IAC-Tatu). Teor de clorofila a (A), teor de clorofila b (B), teor de clorofila total a+b (C) e teor de carotenoides totais (C). ....	72
Figura 25. Boxplot para teor de Clorofila A (a), clorofila B (b), clorofila total (c) e carotenoides (d) para o conjunto BatSten1. Os controles foram <i>A. hypogaea</i> subsp. <i>fastigiata</i> cv BR1, <i>A. hypogaea</i> subsp. <i>hypogaea</i> cv Runner-IAC 886, <i>A. hypogaea</i> subsp. <i>hypogaea</i> cv IAC-Caiapó e <i>A. hypogaea</i> subsp. <i>fastigiata</i> cv IAC-Tatu. ....	73
Figura 26. Boxplot para teor de Clorofila A, de todos os conjuntos dos tetraploides sintéticos. (A) BatDur1, (B) BatDur2, (C) Batsten1, (D) GregSten1, (E) IpaDur1 e (F) IpaVillo1. Os controles foram <i>A. hypogaea</i> subsp. <i>fastigiata</i> cv BR1, <i>A. hypogaea</i> subsp. <i>hypogaea</i> cv Runner-IAC 886, <i>A. hypogaea</i> subsp. <i>hypogaea</i> cv IAC-Caiapó e <i>A. hypogaea</i> subsp. <i>fastigiata</i> cv IAC-Tatu. ....	75
Figura 27. Comparação entre os teores de Clorofila total (a+b) e SCMR para os conjuntos Batxsten1 e IpaDur1. (A) Conteúdo de clorofila total (a+b) para o conjunto BatSten1, (B) Leitura do teor de clorofila (SCMR) para o conjunto BatSten1; (C) Conteúdo de clorofila total (a+b) para o conjunto IpaDur1 e (D) Leitura do teor de clorofila (SCMR) para o conjunto IpaDur1. Os controles foram <i>A. hypogaea</i> subsp. <i>fastigiata</i> cv BR1, <i>A. hypogaea</i> subsp. <i>hypogaea</i> cv Runner-IAC 886, <i>A. hypogaea</i> subsp. <i>hypogaea</i> cv IAC-Caiapó e <i>A. hypogaea</i> subsp. <i>fastigiata</i> cv IAC-Tatu. ....	76
Figura 28. <i>Heatmap</i> gerado a partir de valores de clorofilas a, b, a+b, carotenoides, SCMR, área foliar e área foliar total para espécies silvestres diploides, cultivares e tetraploides sintéticos de <i>Arachis</i> . O controle utilizado foi <i>A. hypogaea</i> subsp. <i>hypogaea</i> cv Runner-IAC 886 com duas repetições provenientes de análises diferentes. ....	77
Figura 29. Curva de transpiração (TR) por área foliar (AF) – TR/AF dos genótipos de <i>Arachis</i> (tetraploides sintéticos – linha vermelha, parentais silvestres diploides – linha azul e cultivares de <i>A. hypogaea</i> subsp. <i>fastigiata</i> e subsp. <i>hypogaea</i> – linha verde) analisados sob alto DPV – linha preta. ....	78

Figura 30. Curva de transpiração por área foliar (TR/AF) dos tetraploides sintéticos de <i>Arachis</i> analisados sob alto DPV (linha tracejada) com as cultivares Ah-Tatu e Ah-Runner como controles. .	79
Figura 31. Curva da relação da taxa de transpiração (TR) pela área foliar (AF) – TR/AF, dos conjuntos IpaVillo1 (K30076 x V12812) <sup>4x</sup> (A) e do conjunto BatSten1 (K9484 x V10309) <sup>4x</sup> e BatDur1 (K9484 x V14167) <sup>4x</sup> (C) com seus respectivos parentais e cultivares de <i>Arachis</i> analisados sob alto DPV. ....	80
Figura 32. Curva de transpiração (TR) das espécies silvestres diploides (parentais), analisados sob alto DPV (linha preta) com cultivar Ah-Tatu como controle. ....	81
Figura 33. Gráfico em BoxPlot para análise comparativa de suscetibilidade à ferrugem (causada pelo fungo <i>P. arachidis</i> ) do conjunto de dados IpaVillo1. Ipa (espécies <i>A. ipaënsis</i> acesso K30076 - parental materno), IpaVillo (tetraploide sintético), Runner ( <i>A. hypogaea</i> - cultivar controle) e Villo ( <i>A. villosa</i> acesso V12812 - parental paterno). ....	82
Figura 34. Correlação entre I/AF e período de incubação, segundo o modelo de regressão linear quadrático. ....	83
Figura 35. Distribuição de frequência das características de resistência à ferrugem. (A) Período de incubação e (B) Lesões esporuladas/área foliar (cm <sup>2</sup> ) em linhagens recombinantes (F <sub>6</sub> /F <sub>7</sub> RILs) derivadas de um cruzamento de <i>A. ipaënsis</i> KG30076 (Ai) com <i>A. magna</i> KG30097 (Am). Para os testes de ferrugem, <i>A. hypogaea</i> cv. Runner IAC 886 (R) foi o controle suscetível. ....	99
Figura 36. Distribuição de frequência das características agronômicas e de domesticação. (A) comprimento de pegs, (B) Constricção de vagem, (C) Produção de sementes e (D) Peso de 10 sementes em linhagens recombinantes (F <sub>6</sub> /F <sub>7</sub> RILs) derivadas de um cruzamento de <i>A. ipaënsis</i> KG30076 (Ai) com <i>A. magna</i> KG30097 (Am). Com exceção de constricção de vagem, todas as médias das características dos parentais foram significativamente diferentes (p <0,05). ....	99
Figura 37. Mapa genético de ligação do genoma B de <i>Arachis</i> obtido através da análise de 94 plantas F <sub>6</sub> , gerada a partir de um cruzamento entre <i>A. ipaënsis</i> K30076 e <i>A. magna</i> K30097 (Grupos de ligação B1 ao B10). Os números à esquerda de cada grupo são distâncias de mapa Kosambi (cM). Marcadores que amplificaram mais de um <i>locus</i> têm números _1 _2 depois do nome do marcador. QTLs são indicados como barras ao lado dos grupos de ligação. Cores/texturas são de acordo com as categorias: preto, resistência à ferrugem (T/LA, I/LA, S/LA e IncPer); branco, características de sementes (número de sementes e peso de sementes); texturizado, arquitetura da planta (altura o eixo central) e características de domesticação (comprimento de peg e constricção de vagem). ....	101
Figura 38. Gráfico de barras para contribuição alélica de <i>A. ipaënsis</i> (barras azuis) versus <i>A. magna</i> (barras laranja) às características associadas à resistência à ferrugem: índice de suscetibilidade (SI), número de lesões esporuladas/área foliar (SL/LA), número total de lesões/área foliar (TL/LA) e período de incubação (dias/20) (IncPer / 20). ....	105

## Índice de Tabelas

Tabela 1. Lista dos genótipos utilizados e seus respectivos genomas e índices de ploidia. ....	43
Tabela 2. Média $\pm$ Desvio Padrão para a I/AF e incubação. *Estatísticas baseadas no modelo linear generalizado, onde atribuiu-se distribuição Gamma para I/AF e distribuição Normal para Incubação.	82
Tabela 3. QTLs identificados para resistência a <i>Puccinia arachidis</i> e características agronômicas em uma população F <sub>6</sub> <i>A. ipaënsis</i> x <i>A. magna</i> .....	104



## Resumo

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é uma importante fonte de óleo e proteínas, amplamente utilizada no processamento de alimentos. Essa cultura apresenta reduzida variabilidade genética (quando são consideradas características de interesse agrônomo) e diferenças de ploidia quanto aos seus parentais silvestres. Um dos principais objetivos dos melhoristas é aumentar a resistência contra patógenos e aumentar a produtividade dos grãos. A ferrugem, causada pelo fungo *Puccinia arachidis* Speg. e o déficit hídrico, apresentam-se como um dos fatores limitantes da cultura. Para ampliar a variabilidade genética da cultura, as espécies silvestres podem ser utilizadas por serem consideradas fontes de resistência a doenças e de adaptação a diversos ambientes. A introdução de novas características por cruzamentos e a utilização de poliploides sintéticos é uma rota atrativa para superar limitações genéticas. Como as características podem mudar devido à poliploidia, foram utilizados seis tetraploides sintéticos que combinam espécies doadoras dos genomas A, B e K, que permite uma melhor compreensão dos efeitos da hibridização seguida da tetraploidização. Para isso, foram avaliadas as plantas diploides e tetraploides quanto às alterações na morfologia de estruturas foliares, características de pigmentos fotossintéticos, tolerância ao déficit hídrico por meio da taxa de transpiração/área foliar sob alto déficit de pressão de vapor (DPV) e as melhores combinações dos alotetraploides sintéticos para respostas fitopatológicas à ferrugem foliar, por meio da metodologia de folhas destacadas. Após a observação das melhores espécies para resistência à ferrugem, foram avaliados os parentais e segregantes da população de mapeamento para o genoma B de *Arachis* em dois bioensaios para 15 características (resistência à ferrugem e características de interesse agrônomo). Foram utilizados marcadores moleculares e mapas genéticos de ligação, que auxiliaram na caracterização de alelos desejáveis e não desejáveis por meio da identificação de QTLs (*Quantitative Trait loci*) ligados às características de interesse. De maneira geral, observou-se que a tetraploidização provocou aumento na área foliar total, na incidência de nódulos de rizóbio/grama de raiz, nas células estomáticas e no teor de pigmentos fotossintéticos, tanto por SCMR quanto pelo método extrativo de clorofilas. A análise de tolerância ao déficit hídrico sob alto DPV, mostrou que a tetraploidização provocou alterações quanto ao caráter observado nos diploides silvestres. Os tetraploides sintéticos apresentaram maior sensibilidade às variações de DPV e se aproximaram das cultivares de *A. hypogaea*. BatDur1 foi a combinação mais promissora com menores TR/AFs. Para análise de resposta ao fungo *P. arachidis*, o silvestre *A. ipaënsis* e os sintéticos IpaDur1 e IpaVillo1, foram os mais suscetíveis à ferrugem, sugerindo que a suscetibilidade foi derivada de *A. ipaënsis*. Para a população de mapeamento, construída a partir de *A. ipaënsis* e *A. magna*, foram identificados 13 QTLs para resistência à ferrugem, sendo um QTL de maior efeito identificado nos dois bioensaios e mapeado no grupo de ligação B08 próximo ao marcador Ah-280. Esse QTL explicou 5,8% a 59,3% de variação fenotípica para quatro características. Todos os QTLs identificados para resistência à ferrugem foram derivados de *A. magna*. Para características agrônomicas e de domesticação, foram identificados 25 QTLs nos diferentes anos de avaliação. Foram mapeados QTLs para duas características de domesticação (comprimento de peg e constricção da vagem) na mesma posição dos GL B01 e B04 e explicaram um total de 10,7% a 30,4% da variação fenotípica. Os alelos que aumentam os valores de características relacionadas à domesticação são derivados de ambos os parentais. No entanto, os alelos que aumentam o número de sementes foram doados pelo parental *A. ipaënsis*. A identificação de fontes e mecanismos de resistência à ferrugem, tolerância ao déficit hídrico e melhores características agrônomicas são pré-requisitos para o sucesso nos programas de melhoramento genético. Estes resultados constituem um importante recurso no programa de melhoramento do amendoim, no que se refere aos efeitos da tetraploidização e resistência à ferrugem.

Palavras-Chave: *Arachis*, tetraploides sintéticos, *Puccinia arachidis*, ferrugem, QTLs.

## Abstract

The peanut (*Arachis hypogaea* L.) is a major source of oil and protein widely used in food processing. This culture has reduced genetic variability (when it is considered traits of agronomic interest) and differences in ploidy ( $2n = 4x = 40$ ) as their wild parents. A major goal of plant breeders is to increase the resistance against pathogens and increase the productivity of grains. Rust caused by the fungus *Puccinia arachidis* Speg. and the drought are as one of the limiting factors of culture. Wild species can be used to increase the genetic variability of culture because they are considered disease resistance sources and to adapt to different environments. The introduction of new traits for crossings and the use of synthetic polyploids is an attractive route to overcome genetic limitations. As the characteristics may change due to the polyploidy, six synthetics tetraploids were used to combine the donor species genomes A, B and K. This allows better understand the effects of hybridization followed by tetraploidization. Therefore, the diploid plants and tetraploid were evaluated for changes the morphology of the leaf structures, photosynthetic pigments characteristics and tolerance to drought through transpiration rate/leaf area under high vapor pressure deficit (VPD). Moreover, the best combinations of synthetic allotetraploids for phytopathological responses to leaf rust were evaluated by the methodology of detached leaves. After that, the best species for resistance to rust were selected and evaluated with parental and segregants of the mapping population for the B genome of *Arachis* in two bioassays for 15 characteristics (resistance to rust and traits of agronomic interest). For this purpose, molecular markers and genetic linkage maps were used, which helped in the characterization of desirable and undesirable alleles through the identification of QTLs (quantitative trait loci) linked to the characteristics of interest. In general, it was observed that the tetraploidization increased the total leaf area, the incidence of *Rhizobium* nodules/gram of roots, the stomatal cells and the photosynthetic pigment content, evaluated by SCMR and by extractive method of chlorophyll. The analysis of tolerance to water stress at high VPD showed that tetraploidization caused changes when compared to wild diploids. Synthetic tetraploids showed greater sensitivity to changes in VPD and were close to the cultivated *A. hypogaea*. BatDur1 was the most promising combination with lower TR/AF. For analytical response to the fungus *P. arachidis*, the wild *A. ipaënsis* and IpaDur1 and IpaVillo1 synthetics were the most susceptible to rust, suggesting that susceptibility was derived from *A. ipaënsis*. For the mapping population constructed from *ipaënsis* A. and *A. magna*, 13 QTLs were identified for rust resistance. The major effect QTL was identified in both bioassays and mapped to linkage group B08 near the marker Ah-280. This QTL explained 5.8% to 59.3% of the phenotypic variation for four characteristics. All QTLs identified for rust resistance were derived from *A. magna*. For agronomic and domestication traits, 25 QTLs were identified in different years of assessment. QTLs for two characteristics of domestication (length peg and constriction pod) were mapped in the same position of GL B01 and B04 and explained a total of 10.7% to 30.4% of the phenotypic variation. The alleles that increase the characteristic values related to domestication are derived from both parents. However, the alleles which increase the number of seeds were donated by parental *A. ipaënsis*. The identification of sources and rust resistance mechanisms, tolerance to drought and better agronomic characteristics are prerequisites for success in breeding programs. Thus, these results provide an important resource in peanut breeding, in relation to purpose of tetraploidization and rust resistance.

Keywords: *Arachis*, synthetic tetraploid, *Puccinia arachidis*, rust, QTLs.

## Introdução Geral

A expansão geográfica e variações morfológicas distintas demonstradas em poliploides naturais (Soltis et al., 2007) sugerem que a multiplicação do genoma *per se* pode representar tanto uma vantagem evolutiva (Parisod et al., 2010), quanto um mecanismo importante na especiação da planta (Arrigo e Barker, 2012). Estudos demonstram que a poliploidia envolve muito mais do que a simples fusão de dois genomas; envolve todo um espectro de ajustes moleculares e fisiológicos (Adams e Wendel, 2005). Muitas vezes as diferenças observadas na morfologia, fisiologia e características de vida entre os poliploides e seus progenitores podem contribuir para o estabelecimento e sucesso das espécies poliploides em novas condições ecológicas (Ramsey e Schemske, 2002; Mayrose et al., 2010).

Plantas poliploides podem surgir via hibridização interespecífica, duplicação genômica (Lavania, 2013) ou gametas não reduzidos. De fato, a hibridação entre espécies ou entre populações divergentes leva à formação de novas combinações genótípicas e fenotípicas que podem permitir a colonização de novos nichos ecológicos (Mráz et al., 2011). Híbridos de plantas recém-formadas são frequentemente estabilizados por poliploidização (duplicação do genoma), o que atenua os problemas cromossômicos durante a meiose e, assim, evita a esterilidade (Abbott et al., 2010).

Uma das características mais marcantes dos poliploides é o gigantismo: aumento no tamanho celular. Especialmente nos alotetraploides, esse fato é geralmente atribuído à heterose. Além de alterações metabólicas celulares, os poliploides exibem uma série de alterações macroscópicas durante o desenvolvimento (Leitch e Leitch, 2008). Dimensões estomáticas, tais como comprimento e largura dos estômatos, são utilizadas como um indicador de poliploidia, já que geralmente as plantas tetraploides tendem a ter estômatos maiores que os de seus parentais diploides (Hodgson et al., 2010; Gantait et al., 2011).

O amendoim, *Arachis hypogaea* L., é uma leguminosa de importância mundial, cuja suscetibilidade a diversos fatores bióticos e abióticos limita a produtividade e qualidade das sementes (Devi et al., 2010). Devido ao fato dos parentes silvestres possuírem muitos alelos não encontrados no cultígeno e possuírem altos níveis de resistência às principais pragas e doenças, os torna com potencial uso para o melhoramento do amendoim (Ferguson et al., 2005; Leal-Bertioli et al., 2012).

O amendoim é frequentemente cultivado em condições de sequeiro, em solos com capacidade de retenção de água limitada (Devi et al., 2010). Para adaptar-se à seca, o amendoim possui os mecanismos de fuga e prevenção. Na fuga, as plantas antecipam seu período de floração e desenvolvimento para fugir da estação seca, já para prevenção, o

princípio baseia-se na absorção maior de água pelas raízes e redução da perda de água pelas raízes e folhas. Porém, a resposta de tolerância à seca não é simples, e envolve muitos genes, além da interação com o ambiente (Zhang et al., 2001).

A herança dos caracteres associados à tolerância ao déficit hídrico e a altas temperaturas é provável que seja geneticamente complexa, devido à interação de várias vias metabólicas, provocando alterações bioquímicas, fisiológicas, dentre outras.

Durante a evolução, as espécies silvestres têm se adaptado a diversos nichos ecológicos (Bertioli et al., 2011). Nesse sentido, estudos têm documentado que essas espécies apresentam alto grau de polimorfismo de DNA (Moretzsohn et al., 2009), além de fontes de resistência quanto à imunidade e resistência a manchas foliares e ferrugem (Subrahmanyam et al., 1985; Bertioli et al., 2003). Grandes esforços têm sido feitos para o desenvolvimento de ferramentas genéticas e genômicas em amendoim, como o desenvolvimento de populações de mapeamento, fenotipagem apropriada, marcadores moleculares, identificação de QTLs (*Quantitative Trait Loci*), e marcadores ligados a diversas características importantes (Hong et al., 2010; Holbrook et al., 2011; Sujay et al., 2012; Pandey et al., 2012; Varshney et al., 2013). Apesar de existirem QTLs de resistência à ferrugem em populações geradas a partir de cultivares (Khedikar et al., 2010), a genética para resistência à ferrugem ainda não foi completamente elucidada.

Este trabalho é composto por dois capítulos. O primeiro descreve algumas alterações provocadas pelo efeito da tetraploidização de *Arachis*, realizado com o objetivo de tornar genomas silvestres diploides compatíveis com o genoma de amendoim, disponibilizando assim, alelos para introgressão no amendoim cultivado. As avaliações realizadas foram: morfologia de estruturas foliares, comparação de constituintes fotossintéticos, características relacionadas à resposta ao déficit hídrico e respostas fitopatológicas à ferrugem do amendoim, causada pelo fungo *Puccinia arachidis*. O segundo capítulo detalha a construção de um mapa de ligação genética a partir de uma população de mapeamento constituída de espécies silvestres diploides (uma das quais foi utilizada para produzir um alotetraploide sintético, avaliado no capítulo 1), com respostas contrastantes ao fungo *P. arachidis*, para identificação de QTLs para resistência à ferrugem. Esta tese é parte de um projeto cujo objetivo final é a utilização de espécies silvestres de *Arachis* para o melhoramento do amendoim.

## Revisão Bibliográfica

### Recursos Genéticos e Melhoramento

Há muitas maneiras de utilizar os recursos genéticos de plantas em programas de melhoramento de culturas. Isso dependerá dos problemas que o melhorista está tentando resolver, dos recursos disponíveis, da biologia reprodutiva da cultura e da disponibilidade de coleções de recursos genéticos apropriados. O fato é que todos os programas de melhoramento dependem de recursos genéticos para fazer progressos na melhoria da produtividade e da resistência a doenças ou pragas (Bidinger, 1992).

Segundo Tanksley e McCouch (1997), o sucesso na utilização desses recursos para o melhoramento de plantas, pode ser alcançado a partir de parentes silvestres de plantas cultivadas, extremamente importantes como fontes de características não disponíveis nas espécies-alvo. Este caso é mais frequente com resistências a doenças e viroses, nas quais não existem resistências conhecidas nas espécies cultivadas (Bidinger, 1992). Ao longo das últimas décadas, a utilização da diversidade de germoplasma exótico ou silvestre aumentou, levando ao uso mais intenso desse material no melhoramento (Gepts e Papa, 2003; Ferguson et al., 2005; Burow et al., 2009; Leal-bertioli et al., 2014).

O interesse global sobre a perda de valiosos recursos genéticos tem estimulado novos programas para a conservação de recursos genéticos de plantas, especialmente na última década, com o desenvolvimento de várias estratégias de conservação (Paunescu, 2009). As estratégias incluem conservação *ex situ* (gestão de bancos genéticos), conservação e manejo em campo (monitoração e proteção dos agro-ecossistemas) e conservação *in situ* (monitoramento e proteção dos ecossistemas naturais) (Merritt e Dixon, 2011), combinando caracterização morfológica, agronômica, citogenética e molecular da diversidade genética. Essa diversidade é essencial para o melhoramento da produtividade agrícola, sustentabilidade e qualidade nutricional de culturas em face das mudanças climáticas, pragas e doenças (McCouch et al., 2012). Coletivamente, há mais de 7 milhões de acessos de germoplasma de plantas armazenados nos 1750 bancos genéticos nacionais e internacionais (FAO, 2010).

Desbloquear o potencial das coleções de germoplasma de culturas, no entanto, requer um entendimento da quantidade e distribuição da variação genética contida dentro delas, para viabilizar estratégias para a conservação, coleta e para aumentar a utilização de recursos genéticos vegetais (Mandel et al., 2011).

## O amendoim (*Arachis hypogaea* L.)

Entre as plantas cultivadas de base genética restrita, encontra-se o amendoim, da espécie *Arachis hypogaea* L. (Fabaceae). Esse cultígeno difere da maioria das outras espécies da seção *Arachis* pelo nível de ploidia e é isolado reprodutivamente dos putativos genitores (Burow et al., 2009), além de possuir características morfológicas mais derivadas (Bertioli et al., 2009). *Arachis hypogaea* e *A. monticola* são tetraploides ( $2n = 4x = 40$ ), sendo esta última, a única espécie silvestre tetraploide conhecida da seção *Arachis*, considerada estreitamente relacionada com o amendoim (Krapovickas e Gregory, 1994; Burow et al., 2009).

Como tantas outras culturas, o amendoim se tornou mais importante em outras regiões do mundo, longe de seu centro de origem, a América do Sul (Bertioli et al., 2011). O amendoim é uma das leguminosas mais importantes economicamente e a quinta oleaginosa mais cultivada no mundo (Li et al., 2013; Agrochart, 2015). É amplamente cultivada em mais de 100 países, especialmente no sudeste dos Estados Unidos e em países como China, Índia, além de países da América do Sul e África, com dois terços da produção mundial proveniente de áreas de sequeiro, tropicais e sub-tropicais (Gautami et al., 2012b; Feng et al., 2012).

A produção mundial na safra 2013/2014 foi de 39,8 milhões de toneladas de amendoim com casca, com previsão de redução em 2,14% para 2014/2015 (Agrochart, 2015). Essa redução na cultura pode ser atribuída tanto a mudanças climáticas, como às doenças fúngicas foliares, que constituem fatores limitantes para a produtividade do amendoim, além de seu controle químico elevar os custos de produção (Santos et al., 2011). Os principais países produtores são China, Índia, Nigéria e Estados Unidos, respectivamente, e desses países, apenas os Estados Unidos apresentam previsão de aumento na produção para a safra 2014/2015 (Agrochart, 2015).

No cenário brasileiro, segundo os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a estimativa de fevereiro/2015 é de variação percentual positiva na estimativa de produção em relação ao ano anterior. Apesar da redução na área plantada e da produção no Brasil em 2014, afetadas pelo clima excessivamente seco e quente, a estimativa para produtividade de amendoim total é de aproximadamente 16% maior, em relação ao ano anterior (Conab, 2014). O estado de São Paulo é o principal produtor de amendoim do país, devendo responder por 89,8%, do total colhido em 2015 (IBGE, 2015 – LSPA\_2).

Com relação ao tipo agrícola, o amendoim tem sido classificado em diferentes grupos e os principais são Valência, Spanish e Virgínia (Paik-Ro et al., 1992). Dentre as principais

cultivares plantadas no Brasil, destaca-se a cultivar Tatu (tipo Valência), de ciclo curto (90-110 dias), hábito de crescimento ereto e moderado potencial produtivo (Godoy et al., 1999). A cultivar BR-1, também pertence ao tipo Valência, possui porte ereto, moderadamente tolerante às cercosporioses (Embrapa, 2009). Além dessas cultivares, IAC-Caiapó e Runner IAC-886 (tipos Virgínia), apresentam alto potencial produtivo e arquitetura de planta mais adequada para a colheita mecanizada (Erismann et al., 2006). Exibem como vantagens, a maior produtividade em relação à cultivar Tatu, porém Runner IAC 886 apresenta-se como suscetível à mancha-preta (*Cercosporidium personatum*) (Santos et al., 2013) e IAC-Caiapó como moderadamente resistente, com resistência parcial e múltipla às doenças foliares mancha-preta, mancha-castanha (*Cercospora arachidicola*), verrugose (*Sphaceloma arachidis*), mancha-barrenta (*Phoma arachidicola*) e ferrugem (*Puccinia arachidis*) (Godoy et al., 1999).

O amendoim possui grande importância nutricional e vem sendo consumido cru pelo homem desde a pré-história (Freitas et al., 2003). Por ser uma fonte importante de óleo e proteína, além dos seus benefícios à saúde e versatilidade, o amendoim e seus derivados são amplamente utilizados no processamento de alimentos (Holbrook e Stalker, 2003; Fu et al., 2010; Jiang et al., 2014). Suas sementes contêm cerca de 40-60% de óleo, 20-40% de proteínas e 10-20% de carboidratos, além de elevado valor nutricional, possuindo vitamina E, niacina, cálcio, fósforo, magnésio, zinco, ferro, riboflavina, tiamina e potássio. O amendoim é usado principalmente para o consumo direto, na indústria de confeitaria, como óleo vegetal no cozimento e também como fonte de proteína alimentar na indústria animal. Os múltiplos usos do amendoim fazem dele uma excelente cultura comercial para uso doméstico, bem como no comércio internacional (Pandey et al., 2012).

Um dos principais objetivos dos melhoristas de amendoim é aumentar a produtividade dos grãos, direta e indiretamente influenciada por características agronômicas (Gomes e Lopes, 2005). E esse aumento na produtividade está associado a maiores investimentos em pesquisa no melhoramento genético do amendoim (Dwivedi et al., 2007). Além disso, grandes quantidades de agrotóxicos têm sido aplicadas na cultura nos últimos anos para controlar doenças e insetos.

O principal problema dos produtores de amendoim no Brasil e no mundo é o ataque de doenças fúngicas, como a mancha barrenta (*Phoma arachidicola* Marasas), mancha castanha (*Cercospora arachidicola* Hori), mancha preta (*Passalora personata* ou *Cercosporidium personatum* (Berk e Curt.) Deighton), ferrugem (*Puccinia arachidis* Speg), verrugose (*Sphaceloma arachidis* Bitancourt e Jekins), que podem causar prejuízos à cultura na ordem de 70% da produção quando não controladas (Fávero et al., 2009). Além desses fungos, o amendoim é uma das culturas hospedeiras mais suscetíveis à invasão de *Aspergillus flavus* Link ex Fries e conseqüentemente à produção de aflatoxina antes e após

a colheita (Liang et al., 2006). Há ainda o agente causador das galhas, o nematoide *Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood raças 1 e 2 [root-knot nematode (RKN)] (Chu et al., 2007), embora outras duas espécies também comprometam a cultura, *M. hapla* Chitwood e *M. javanica* (Treub) Chitwood (Nagy et al., 2010).

Além desses fatores, a alta salinidade e o déficit hídrico são muito limitantes à produção do amendoim. Cultivado basicamente por agricultores com poucos recursos, o amendoim é amplamente cultivado nos trópicos semi-áridos sem muito investimento na cultura. Esses ambientes geralmente apresentam baixa precipitação de chuvas e altas temperaturas, limitando a produtividade e qualidade de sementes (Devi et al., 2010; Leal-Bertioli et al., 2012).

Sabe-se que alguns componentes do amendoim podem trazer benefícios à saúde, como por exemplo, o ácido oleico, que tem um papel especial no metabolismo de lipídios no corpo humano, e pode reduzir o nível de colesterol 'nocivo' (lipoproteína de baixa densidade, LDL), manter o nível do colesterol 'útil' (lipoproteína de alta densidade, HDL), e retardar a aterosclerose (Yu et al., 2008). Além disso, a alta relação de ácidos oleico:linoleico (O:L) é uma característica muito desejada pela indústria de amendoim porque confere estabilidade oxidativa elevada para o óleo com menor suscetibilidade à rancificação e aumenta a durabilidade dos produtos (Wang et al., 2010). Nos últimos anos, os melhoristas vêm buscando e investindo na produção de variedades alto-oleicas, ou seja, grãos com alto teor de ácido oleico (mais de 75% de ácido oleico e menos de 25% de ácido linoleico) e relação O:L maior que 10 (Moore e Knauff, 1989; Chu et al., 2011).

No entanto, o elevado consumo de amendoim e seus derivados no processamento de alimentos tem provocado o aumento no número de relatos de reações alérgicas, uma das mais sérias alergias alimentares, além disso, estão cada vez mais graves e comuns, podendo ser fatais (Fu et al., 2010). O amendoim contém, pelo menos, onze proteínas potencialmente alergênicas, de acordo com a União Internacional de Sociedades de Imunologia (IUIS). Ara h1, uma vicilina, Ara h2, a albumina 2S, e Ara h3, a legumina, são os principais alérgenos de amendoim (Bublin et al., 2013). A redução das concentrações desses alérgenos no amendoim, juntamente com incentivo aos produtores, resultaria em produtos mais saudáveis (Osuji et al., 2012).

Toda essa problemática associada aos benefícios já comprovados do amendoim aumentou o interesse dos pesquisadores em buscar estratégias e novas ferramentas para o desenvolvimento de variedades resistentes, para atender às necessidades dos produtores e consumidores.

O amendoim (*A. hypogaea*) originou-se do cruzamento de dois diploides silvestres, provavelmente *A. duranensis* (genoma A) e *A. ipaënsis* (genoma B), que produziu um híbrido estéril, cuja fertilidade foi recuperada com uma espontânea duplicação



cromossômica, de caráter muito raro (Seijo et al., 2007). O tetraploide resultante ( $2n = 4x = 40$  cromossomos) apesar do vigor híbrido se distanciou geneticamente dos parentes silvestres em decorrência da diferença entre níveis de ploidia, de maneira que todas as raças de amendoim cultivado, derivam provavelmente de uma ou poucas plantas. O hábito geocárpico do amendoim é uma característica que influencia na dispersão e na estrutura de populações. A dispersão de sementes pode ocorrer por ação antrópica (indígenas), por vias zoofílicas (por exemplo, aves e/ou roedores) e/ou pela água, por meio de dispersão fluvial nas enchentes, o que justificaria sua distribuição geográfica (Kockert et al., 1991; Krapovickas e Gregory, 1994).

O intenso processo de domesticação, possivelmente resultou na progressiva restrição da base genética conhecida como gargalo genético (*genetic bottleneck*), com perdas consideráveis de alelos de resistências a doenças, limitando os avanços nos programas de melhoramento (Foncéka et al., 2009; Mallikarjuna et al., 2011; Khera et al., 2013). As espécies silvestres do *pool* gênico de *Arachis* podem ser utilizadas para ampliar a diversidade genética das cultivares, com a introgressão de novos alelos, importantes para características agrônômicas e para estudos de genética e genômica (Dwivedi, et al., 2007), pois são muito diversas, devido aos diferentes habitats e conhecidamente resistentes a vários estresses bióticos e abióticos, como déficit hídrico e manchas foliares (Subrahmanyam et al., 1985; Simpson e Starr, 2001; Leal-bertioli et al., 2012).

No entanto, apesar de apresentarem valiosa resistência a doenças, também têm muitos alelos que não são agronomicamente adaptados, que conferem, por exemplo, sementes pequenas e hábito de crescimento prostrado, que dificultam a colheita. O baixo nível de polimorfismo na espécie cultivada tem dificultado a aplicação de abordagens moleculares no melhoramento genético do amendoim (Foncéka et al., 2009). A utilização de ferramentas biotecnológicas, como marcadores moleculares e mapas genéticos de ligação, são pré-requisitos para o melhoramento molecular de qualquer cultivar (Varshney et al., 2009), pois auxilia na caracterização de alelos desejáveis por meio da identificação de QTLs (*Quantitative Trait loci*). Os marcadores moleculares ligados aos QTLs de interesse podem ser utilizados para auxiliar na seleção e introgressão de características desejáveis e na eliminação de plantas com alelos não desejáveis via seleção assistida por marcadores (MAS). Além disso, uma fenotipagem precisa de características é um dos fatores primordiais nas estratégias de detecção de QTL (Kheddikar et al., 2010).

Os parentes silvestres são uma importante fonte de genes para resistência a estresses bióticos e abióticos que afetam as espécies cultivadas (Leal-Bertioli et al., 2009). A introgressão de genes de espécies selvagens só é possível por meio de complexos cruzamentos genéticos ou pela transformação genética (Hajjar e Hodgkin, 2007). Até o momento, os poucos casos de introgressão de genes de espécies selvagens em *A.*

*hypogaea* para a produção de cultivares comerciais de amendoim, revelaram grande sucesso (Simpson e Starr, 2001; Simpson et al., 2003).

## **Gênero *Arachis***

As leguminosas (*Fabaceae*) compreendem uma das famílias mais importantes das angiospermas. Com aproximadamente 700 gêneros e 20000 espécies, as leguminosas são a terceira maior família de plantas superiores e a segunda mais presente na agricultura, com origem aproximada há 65-70 milhões de anos (Doyle e Luckow, 2003; Lewis et al., 2005).

O gênero *Arachis* L. pertence à família das leguminosas e compreende 81 espécies descritas ( $2n = 2x = 18$ ,  $2n = 2x = 20$ , e  $2n = 4x = 40$ ) com genomas do tipo A, B, C, D, E, F, G, K, R e T, distribuídas em nove seções taxonômicas: *Arachis*, *Caulorrhizae*, *Erectoides*, *Extranervosae*, *Heteranthae*, *Procumbentes*, *Rhizomatosae*, *Triectoides* e *Triseminatae*, baseadas na morfologia, distribuição geográfica e compatibilidade de cruzamento (Stalker, 1991; Krapovickas e Gregory, 1994; Valls e Simpson, 2005; Robledo e Seijo, 2010; Valls et al., 2013; Silvestri et al., 2014). Dessas espécies, 65 ocorrem no Brasil, 15 na Bolívia, 12 no Paraguai, sete na Argentina e duas no Uruguai (Valls e Simpson, 2005). O Brasil possui a maior diversidade de espécies do gênero, com representantes das nove seções taxonômicas (Krapovickas e Gregory, 1994). Os membros do gênero *Arachis* são nativos da América do Sul e consistem em um grupo diverso de táxons geralmente autógamos e sempre geocárpicos (Robledo e Seijo, 2010). Depositadas abaixo da superfície do solo, as sementes de *Arachis* apresentam proteção contra muitas pragas e predadores, com condições favoráveis para a germinação. No entanto, as sementes podem não ser eficientemente dispersas em condições naturais. Mais raramente, as sementes podem ser depositadas mais longe pelo curso da água, erosão do solo ou animais (inclusive o homem). (Moretzsohn et al., 2013). Entre as espécies do gênero, as incluídas na seção *Arachis* são consideradas como as mais derivadas, diversas e numerosas (Krapovickas e Gregory, 1994).

A distribuição da seção *Arachis* se estende a partir das colinas da Cordilheira dos Andes na Bolívia e norte da Argentina à costa atlântica do Brasil e das nascentes dos rios Mamoré e Guaporé, no norte da Bolívia e rio Tocantins no Brasil Central, ao litoral norte do Rio de La Plata, no Uruguai (Robledo e Seijo, 2010). A seção *Arachis* possui a maior distribuição entre os países sul-americanos (Brasil, Argentina, Bolívia, Paraguai e Uruguai). Isso inclui o amendoim cultivado (*Arachis hypogaea* L.) e 31 espécies silvestres conhecidas (Krapovickas e Gregory, 1994; Valls e Simpson, 2005).

A maioria das espécies da seção *Arachis* é diploide ( $2n=2x=20$ ), três são aneuploides ( $2n=2x=18$ ), *A. decora*, *A. palustris* e *A. praecox* e duas espécies, *A. hypogaea* e *A. monticola*, tetraploides ( $2n=4x=40$ ) com genoma do tipo AB (Krapovickas e Gregory, 1994; Valls e Simpson, 2005, Silvestri et al., 2014). Baseados em compatibilidade de cruzamento e características cromossômicas, diferentes genomas foram designados para seção *Arachis* A, B, D, F, K e G. A maioria das espécies apresenta simetria cariotípica e foram atribuídas aos genomas A ou B (Stalker, 1991; Robledo e Seijo, 2010; Silvestri et al., 2014).

O grupo do genoma A é o mais numeroso e consiste de 16 espécies diploides silvestres, com número básico de cromossomos  $x=10$ , morfologicamente semelhantes, com compatibilidade de cruzamento, gerando híbridos férteis, pareamento cromossômico e estrutura cariotípica regular (Peñaloza e Valls, 1997). As espécies representantes desse genoma são caracterizadas pela presença de um pequeno par cromossômico, os cromossomos "A". Esses cromossomos têm a metade do tamanho dos demais e apresentam um padrão diferencial de condensação durante a prometáfase, além de uma grande banda heterocromática na região centromérica (Seijo et al., 2004). Em geral, as espécies com genoma A são cariotipicamente homogêneas, com padrões semelhantes de distribuição da heterocromatina (Robledo e Seijo, 2010).

As demais espécies com cariótipos simétricos têm sido tradicionalmente atribuídas ao grupo de genoma "B" (ou genoma não-A) porque não apresentam os "cromossomos A". Estas espécies são mais diversificadas em suas fórmulas cromossômicas e padrões de heterocromatina (Seijo et al., 2004). Recentemente, dois novos tipos de genomas (F e K) foram descritos para algumas das espécies anteriormente consideradas no grupo de genoma B, baseados em FISH (*Fluorescent In situ Hybridization*), mapeamento de loci DNA ribossômico (rDNA) e detecção de heterocromatina (Robledo e Seijo, 2010). As espécies *A. benensis* e *A. trinitensis* agora são classificadas como tendo um genoma F, e *A. batizocoi*, *A. cruziana* e *A. krapovickasii*, um tipo de genoma K. Estes dois genomas têm bandas centroméricas na maioria dos cromossomos, diferindo umas das outras na quantidade e distribuição de heterocromatina (Moretzsohn et al., 2013).

Em geral, todas as espécies de genoma "A" podem produzir híbridos interespecíficos com espécies portadoras do mesmo genoma com viabilidade acima dos 25% (Krapovickas e Gregory, 1994). Entretanto, o híbrido *A. stenosperma* x *A. duranensis* apresentou viabilidade polínica de 20% (dados não publicados). Já as espécies incluídas no genoma "B", morfologicamente diversas, além de habitarem diferentes regiões ecológicas, o grau de fertilidade de seus híbridos interespecíficos varia desde completamente estéril (com menos de 10% de viabilidade polínica) para quase completamente fértil (Krapovickas e Gregory, 1994; Valls e Simpson, 2005).

## Poliploidia e utilização de híbridos no melhoramento

Poliploidia é a presença de dois ou mais conjuntos de cromossomos homólogos de um mesmo genoma (autopoliploide) ou diferentes genomas (alotetraploide) em suas células somáticas (Comai, 2005; Chen, 2010). A poliploidia é bastante comum em plantas, sugerindo um processo importante e estratégico na adaptação, especiação e evolução do genoma (Foncéka et al., 2012a; Chao et al., 2013). Nas plantas, a poliploidia é mais frequente entre as angiospermas, estimada entre 47% e 70% de poliploides (Ramsey e Schemske, 1998).

Segundo Bondada et al. (2000), as folhas são fisiologicamente mais ativas, com maiores valores para fotossíntese, condutância estomática e transpiração. Para diferentes níveis de ploidia, Beck e colaboradores (2003), observaram que existe uma relação inversa entre a frequência de estômatos e o nível de ploidia. Em adição às características estomáticas, outras características como o número de epidérmica células e tricomas, desempenham um importante papel nos processos de trocas gasosas. A densidade de estômatos e células epidérmicas são importantes para determinar o tamanho e aparência estomática, como também o complexo estomático (Bondada et al., 2000). Para isso faz-se necessário calcular o índice estomático,  $IE = [NE/(NC+NE) \times 100]$ , que leva em consideração o número de células epidérmicas (NC) e número de estômatos (NE) determinados nas observações.

Enquanto algumas combinações intergenômicas mostram incompatibilidade híbrida e redução da adaptabilidade, outras mostram aumento do vigor. Dessa maneira, uma melhor compreensão dos mecanismos de poliploidia e vigor híbrido que ditam a origem do híbrido, ajudará na manipulação dessas plantas formadas por hibridação de diferentes estirpes, variedades ou espécies (Chen, 2010; Kenan-Eichler et al., 2011). Além disso, é de grande importância também a sobrevivência do poliploide para manutenção e perpetuação do híbrido, sendo, portanto, de interesse particular quando se tenta compreender as oportunidades e gargalos da especiação (Kenan-Eichler et al., 2011). Entre as vantagens pertinentes aos poliploides, estão a heterose, que fornece mais vigor que os parentais, e a redundância gênica, que protege os poliploides de efeitos deletérios e mutações (Comai, 2005).

Um autopoliploide é formado por uma duplicação do genoma dentro da mesma espécie, já um alopoliploide é derivado de hibridação entre diferentes espécies, seguido por duplicação cromossômica ou fusão de gametas não reduzidos entre espécies (Ranney, 2006; Madlung e Wendel, 2013). Tetraploides, podem ser auto ou alotetraploides. Em alotetraploides, o pareamento cromossômico ocorre principalmente entre cromossomos homólogos e raramente entre cromossomos homeólogos derivados de diferentes espécies.

Quanto maior a distância genética entre os progenitores, menor a probabilidade de que os híbridos interespecíficos alotetraploides sejam formados, e a probabilidade de pareamento cromossômico homeólogo reduz (Jackson e Chen, 2010). Por exemplo, em algodão alotetraploide, os progenitores divergiram há 7-8 milhões de anos e os genes evoluíram de forma independente em relação aos progenitores (Liu et al., 2001). Já em *Brassica napus*, os progenitores *B. rapa* e *B. oleracea* divergiram há 3,5 milhões de anos e estão intimamente relacionados. Como resultado, numerosos rearranjos cromossômicos são documentados em alotetraploides de *Brassica* ressintetizados (Gaeta et al., 2007).

De acordo com Madlung e Wendel (2013), o que McClintock propôs em 1984, quando definiu o termo “choque genômico” como surgimento de alterações estruturais no genoma (translocações, inversões, deficiências, duplicações), em resposta à hibridação, vem sendo repetidamente validado nas últimas décadas por diversos autores em muitos sistemas alotetraploides. Sendo assim, um alotetraploide é considerado um “híbrido interespecífico duplicado”, e as espécies definidas de acordo com o seu grau de isolamento pré e/ou pós zigótico (Ramsey e Schemske, 1998). Isso pode ocasionar um gargalo genético, como também levar a permanente fixação de heterozigose e vigor híbrido como, por exemplo, trigo (*Triticum aestivum*), canola (*Brassica napus*), algodão (*Gossypium hirsutum*) e amendoim (*Arachis hypogaea*) (Chen, 2010).

No caso do amendoim, a ocorrência do evento de hibridação seguida de duplicação genômica, levou ao surgimento e isolamento reprodutivo da espécie alotetraploide *A. hypogaea* (Burow et al., 2001). Esse distanciamento, associado à autofecundação, criou um gargalo genético severo, com perda de alelos importantes contidos no *pool* gênico primário. Esse evento resultou em uma cultura com baixa variabilidade genética, que limita avanços nos estudos de genética e progressos no melhoramento.

O conhecimento da variação genética de acessos de amendoim é importante para a sua utilização eficiente em programas de melhoramento genético, para estudos sobre a evolução das culturas, e para fins de conservação (Moretzsohn et al., 2004). A introdução de novas características por cruzamentos é uma rota atrativa para superar limitações genéticas e introdução de características melhoradas na cultura.

Existem alguns obstáculos devido às plantas silvestres não serem agronomicamente adequadas. Vários ciclos de retrocruzamento geralmente são necessários para eliminar genes/alelos indesejáveis dos genitores silvestres. E mesmo assim, alelos silvestres com efeitos pleiotrópicos e com arraste de ligação, podem reduzir o desempenho agrônomico da descendência a partir do cruzamento de cultivar × silvestre (Leal-Bertioli et al., 2012). A variabilidade observada nas espécies silvestres segue na mesma linha de tetraploides sintéticos e híbridos diploides. Como observado em experimentos com anfidiplóides e autotetraploides a partir do uso de colchicina no ICRISAT, onde notou-se que híbridos F1

entre *A. batizocoi* e *A. cardenasii* apresentaram poucas flores e curto período de florescimento; e híbridos de *A. magna* com *A. duranensis* ou vice-versa com hábito de crescimento arbustivo, não observado em quaisquer outras combinações utilizadas (Malikarjuna et al., 2011).

A utilização direta de parentes silvestres diploides em cruzamentos compatíveis com o amendoim para ampliar a base genética e introduzir características agronomicamente úteis, não é um processo fácil, devido às diferenças de ploidia. As pesquisas com a utilização de híbridos de espécies de *Arachis* iniciou com os trabalhos de Simpson e colaboradores (1993), com o desenvolvimento do anfidiplóide TxAG-6 derivado do cruzamento entre um híbrido diploide (parental masculino), decorrente de duas espécies de genoma A, dentre elas *A. cardenasii* acesso GKP 10017 e a espécie *A. batizocoi*, acesso K9484 (parental feminino). O híbrido triploide estéril resultante foi posteriormente duplicado com colchicina, originando um anfidiplóide fértil, denominado TxAG-6 com notada resistência a doenças e extensivamente utilizado nos programas de retrocruzamento de amendoim.

Nessa mesma linha de pesquisa, para simular a formação do amendoim, Fávero (2004; Fávero et al., 2006) realizou cruzamentos entre espécies diploides de genomas A, B e K e gerou híbridos estéreis, que foram tetraploidizados para serem cruzados e retrocruzados com *A. hypogaea* a fim de recuperar os caracteres do cultígeno. Posteriormente, Santos (2012) gerou a partir de diferentes cruzamentos de espécies silvestres de *Arachis*, novos tetraploides sintéticos para combinar os putativos doadores dos genomas A e B, além de outras espécies com diferentes genomas. Essas combinações poderão constituir uma população variável de tetraploides de amendoim, sugerindo uma nova fonte de *A. hypogaea* (Mallikarjuna et al., 2011).

A utilização de sucessivos cruzamentos e utilização de híbridos no melhoramento do amendoim permitiu o desenvolvimento da primeira cultivar portadora de resistência a nematoide da raiz, denominada COAN. Essa cultivar foi desenvolvida a partir da identificação e transferência de segmentos de resistência da espécie silvestre de amendoim, *A. cardenasii*. Logo depois, foram desenvolvidas as cultivares nemaTAM e Tifguard (Nagy et al., 2010). Para obtê-las, cruzou-se cultivares de *A. hypogaea* com um anfidiplóide, denominado TxAG-6, obtido a partir do cruzamento de *A. diogeni*, *A. cardenasii* e *A. batizocoi* (Simpson et al., 1993; Simpson e Starr, 2001; Simpson et al., 2003). Recentemente, novos tetraploides sintéticos foram desenvolvidos a partir do cruzamento da espécie *A. batizocoi* acesso K9484, com genoma K, com dois acessos, V14167 e SeSn2848, da espécie *A. duranensis* e com a espécie *A. stenosperma*, acesso V10309. Seus respectivos híbridos, foram então denominados de BatDur1, BatDur2 e BatSten1, respectivamente (Leal-Bertioli et al., 2014).

## **Tolerância ao déficit hídrico**

A seca é provavelmente o fator ambiental mais importante que afeta adversamente o crescimento e desenvolvimento das plantas. O efeito da seca nas plantas tem sido estudado por muitos anos e alterações induzidas pelo suprimento insuficiente de água têm sido analisadas tanto em populações, planta/planta, quanto bioquímica e molecularmente (Benesová et al., 2012).

As plantas possuem diversas estratégias para lidar com condições de seca prolongada. O fenômeno de tolerância à seca é complexo e poligênico, baseado em várias características herdadas, como por exemplo, o uso eficiente de água e conservação, além de mecanismos de tolerância à desidratação celular (Manjulatha et al., 2014). Em função disso, estudos em diferentes culturas para tolerância à seca têm sido desenvolvidos, como em caupi (Belko et al., 2012), milho (Benesová et al., 2012), soja (Silvente et al., 2012) e amendoim (Hamidou et al., 2011; Leal-Bertioli et al., 2012), entre outros.

Um dos principais mecanismos de defesa da planta contra o déficit hídrico é a diminuição da transpiração causada pelo fechamento parcial ou completo dos estômatos, frente à baixa disponibilidade de água. Porém, o fechamento de estômatos afeta não apenas a transpiração, mas também outros processos, como a absorção de CO<sub>2</sub> pelas folhas, que está intimamente ligado ao controle de perda de água dos estômatos (Benesová et al., 2012; Songsri et al., 2013).

A distribuição das raízes, a densidade de comprimento radicular, maior área foliar específica (SLA) e maior concentração de clorofila têm sido úteis para a seleção de características mais adequadas a condições de seca (Upadhyaya et al., 2011; Songsri et al., 2013).

Como a poliploidia altera bioquimicamente e também influencia na eficiência fotoquímica da planta, é interessante conhecer o status dos pigmentos fotossintéticos (clorofila A, clorofila B, clorofila total e carotenoides totais) nos genótipos. Além das análises já citadas, a leitura do conteúdo de clorofila pelo medidor SPAD (SCMR) reflete o teor de clorofila por unidade de área foliar. Genótipos com altos valores de SCMR e baixos valores de SLA, sugerem uso eficiente de água, podendo ser utilizados nos programas de melhoramento (Nigam e Aruna, 2008). A comparação com a quantificação de pigmentos fotossintéticos pode ajudar a corroborar os resultados iniciais de SCMR.

Outra característica putativa é a limitação da taxa de transpiração sob alto DPV (déficit de pressão de vapor atmosférico) (Devi e Sinclair, 2011), corroborada em experimentos com genótipos tolerantes de feijão caupi sob condições de seca e sob alto DPV (Belko et al., 2012). O amendoim é tolerante a condições de déficit hídrico, mas secas prolongadas e recursos limitados de água, restringem a produção sustentável da cultura,

geram estresse na planta e, conseqüente, causam perdas de qualidade e produtividade (como redução no número e tamanho das sementes, baixo conteúdo de óleo, composição de ácidos graxos dentre outras) (Kottapalli et al., 2013). Estima-se que a seca seja responsável por perdas no valor de 500 milhões de dólares na produção anual de amendoim (Sun et al., 2013).

Avanços na genômica oferecem ferramentas para o melhoramento assistido por meio da identificação e introgressão de regiões genômicas associadas com tolerância à seca para o desenvolvimento de cultivares mais tolerantes, usando seleção assistida por marcadores (SAM) (Varshney et al., 2009; Ravi, et al., 2011). No entanto, a abordagem tradicional no melhoramento do amendoim para tolerância à seca tem sido lenta, devido à raridade de alelos para esse caráter no germoplasma da cultura (Bhatnagar-Mathur et al., 2007; Sun et al., 2013). O estudo de espécies silvestres de *Arachis* poderá fornecer características relacionadas a melhores respostas para condições de seca, com possibilidades de introgressão para o material cultivado (Sun et al., 2013). Uma rota promissora para a introgressão de características é a utilização de alotetraploides sintéticos a partir de espécies previamente selecionadas para características de interesse. Esses tetraploides sintéticos são usados para superar as barreiras reprodutivas, além de permitirem a análise em todo o genoma da transmissão da cromatina entre os silvestres e a espécie cultivada (Foncéka, et al., 2009).

Visando ao desenvolvimento de cultivares tolerantes, os programas de melhoramento têm aplicado durante os últimos anos, diversas estratégias para isolar fatores envolvidos em respostas à seca e a outros fatores de estresses bióticos e abióticos. Quanto à tolerância à seca, a busca de genes tem sido importante para a agricultura moderna, que requer a identificação e validação de genes candidatos (Pruthvi et al., 2013). Além disso, nos últimos anos, muitos genes que conferem resistência à seca foram introgrididos em cultivares, como por exemplo os genes do fator de transcrição da conjunto DREB/CBF, úteis no desenvolvimento de cultivares importantes (Sun et al., 2013) como o amendoim, com plantas transgênicas, que expressam proteínas *DREB1A* conduzidas pelo promotor rd29A de *A. thaliana* (Bhatnagar-Mathur et al., 2007).

## **Nodulação**

A simbiose entre leguminosas e bactérias do solo, chamadas *Rhizobium*, é uma das mais importantes interações benéficas planta-micróbio (Yokota e Hayashi, 2011) e se distinguem pela característica de formação de estruturas denominadas nódulos no sistema radicular da planta. Dentro dos nódulos, bacterioides diferenciados fixam nitrogênio atmosférico a formas reduzidas, que são incorporadas pela planta (Bogino et al., 2010). O



processo simbiótico de fixação de nitrogênio é um caminho 'natural' para fornecer nitrogênio às culturas. Um importante gênero de rizóbio que nodula o amendoim é *Bradyrhizobium* sp.. Esta bactéria nodula o amendoim em ambientes naturais de todo o mundo (Taurian et al., 2006).

Nem todas as leguminosas apresentam a simbiose com nódulos da raiz. As leguminosas mais comuns, soja, ervilha, feijão, dentre outras, que são todas plantas cultivadas, pertencem ao subconjunto Papilionoideae, em que 90% das espécies apresentam nodulação (Yokota e Hayashi, 2011) e além dessas culturas, destaca-se o amendoim. Embora a simbiose seja benéfica para o crescimento da planta hospedeira no suprimento de nitrogênio, a formação de nódulos excessiva pode ser prejudicial, uma vez que rizóbios fixadores de nitrogênio nos nódulos consomem uma quantidade considerável de carbono fixado pela fotossíntese. Para lidar com este problema, leguminosas utilizam uma regulação por *feedback* negativo para a formação de nódulos (Yokota e Hayashi, 2011).

As raízes das plantas liberam continuamente flavonoides que se acumulam na rizosfera e constituem os primeiros sinais. Dependendo do hospedeiro e da bactéria, esses componentes servem como sinais, ativando a proteína regulatória de transcrição bacteriana NodD, que por sua vez induz outros genes de nodulação (Fabra et al., 2010). Os produtos desses genes estão envolvidos na síntese e secreção dos principais sinais de nodulação de rizóbios, chamados fatores Nod (NF). Os fatores Nod causam alterações morfológicas nos pêlos radiculares em leguminosas e levam à infecção, nodulação e fixação simbiótica de nitrogênio (Fabra et al., 2010).

O aumento da salinidade do solo representa um dos principais entraves para a agricultura em terras áridas e semi-áridas, onde a deficiência de nitrogênio mineral também é uma característica frequente dos solos. A fixação do nitrogênio biológico por leguminosas pode constituir uma alternativa econômica, competitiva e sustentável para adubação química (nitrogênio mineral) para o cultivo de amendoim em áreas sob condições de salinidade moderada (El-Akhal et al., 2013).

### **Resistência à ferrugem (*Puccinia arachidis* Speg.)**

A ferrugem, causada pelo fungo *Puccinia arachidis* Speg. e a mancha-preta, causada pelo *Phaeoisariopsis personata* Ber. e MA Curtis, são doenças do amendoim economicamente muito importantes, podendo causar juntas perdas de 50-70% na produção da cultura, quando não controladas (Subrahmanyam et al., 1985; Holbrook, et al., 2011).

*Puccinia arachidis* produz pústulas alaranjadas (uredínio) na superfície abaxial dos folíolos que ao se romperem expõem urediniósporos na cor castanho-avermelhada. Essas estruturas são favorecidas por temperaturas entre 20-28°C, alta umidade relativa deixando

as folhas úmidas (Kelly et al., 2012) e provocam rapidamente a necrose e o ressecamento das folhas, que tendem a permanecer ligadas à planta, aumentando a perpetuação do patógeno, infecção e severidade da doença (Mehan et al., 1994). Além das perdas na produtividade, a ferrugem pode diminuir a qualidade das vagens e sementes, reduzindo o tamanho e teor de óleo das sementes, podendo afetar a produtividade (Khedikar et al., 2010; Tashildar et al., 2012).

Embora essa doença possa ser controlada por fungicidas, a adoção de cultivares resistentes é considerada a melhor abordagem para controlar estas doenças. Para isso, estudos de resistência a manchas foliares e ferrugem sugerem que a resistência a essas doenças é poligênica, complexa e, provavelmente controlada por genes recessivos (Dwivedi et al., 2002; Mace et al., 2006; Leal-Bertioli et al., 2010). A identificação de fontes e mecanismos de resistência à ferrugem se tornam pré-requisitos para o sucesso nos programas de melhoramento genético (Dwivedi et al., 2002).

O conhecimento da variação genética é importante para a sua utilização eficiente em programas de melhoramento genético, estudos sobre a evolução das culturas e para fins de conservação (Moretzsohn et al., 2004). Esse fato tem aumentado o interesse na busca por resistência tanto no *pool* gênico de *A. hypogaea* (Dwivedi et al., 2002) como no *pool* gênico secundário do gênero (Foncéka et al., 2009) com o desenvolvimento de populações de mapeamento para diferentes características de interesse e indentificação de locus de característica quantitativa (QTL).

A segregação obtida a partir da fenotipagem e caracterização dessas populações proporciona o desenvolvimento de mapas de ligação, sobretudo por marcadores microsatélites ou SSR, os quais permitem que informações de diferentes mapas sejam acumuladas, ajudando a confirmar a ordem das ligações e fornecendo informações sobre a evolução do genoma de espécies relacionadas (Moretzsohn et al., 2009). Embora já existissem marcadores identificados, como RAPD (J71300 e J71350) e SSR (pPGPseq4A05 e gi56931710) ligados a um gene que confere resistência à ferrugem no amendoim (Mondal et al., 2007; Mondal et al., 2012), o primeiro grande QTL de resistência à ferrugem foi relatado associado ao marcador dominante IPAHM 103 (Khedikar et al., 2010) e posteriormente com saturação da região novos marcadores codominantes (GM2079, GM1536, GM2301) foram associados e confirmaram com maior acurácia o efeito desse QTL em linhagens de amendoim cultivado (82.20% PV), podendo ser usados na seleção assistida por marcadores (Sujay et al., 2012; Yeri et al., 2014; Varshney et al., 2014).

## Objetivos

### Geral

Avaliar as características morfológicas foliares, agronômicas, fisiológicas e fitopatológicas de espécies silvestres, tetraploides sintéticos e cultivares de *Arachis* e identificar regiões genômicas que codificam para características de interesse agrônomo.

### Específicos

- Avaliar o efeito da tetraploidização em espécies de *Arachis* quanto ao número e tamanho de estômatos, células epidérmicas e tricomas nas epidermes foliares;
- Investigar, por meio de descritores agronômicos, a influência da ploidia na arquitetura das plantas;
- Avaliar o efeito da tetraploidização em características relacionadas à tolerância à seca e eficiência fotossintética: condutância estomática, SLA, SCMR e pigmentos foliares;
- Identificar genótipos com características potenciais de tolerância à seca passíveis de uso no melhoramento genético do amendoim;
- Avaliar tetraploides sintéticos e parentais diploides para resistência à ferrugem (causada pelo fungo *Puccinia arachidis*);
- Selecionar as melhores combinações entre os tetraploides sintéticos para resistência à ferrugem;
- Identificar, a partir de uma população de mapeamento F<sub>6</sub> para o genoma B, QTLs de resistência à ferrugem.

# Capítulo 1: Caracterização do efeito da tetraploidização em caracteres morfológicos foliares, fisiológicos e respostas fitopatológicas de *Arachis* spp.

## Introdução

Acredita-se que a poliploidia forneça vantagens distintas ao desenvolvimento de características agronomicamente importantes, pois, além da multiplicação do genoma já ser uma vantagem evolucionária, confere aos poliploides maiores taxas de sobrevivência e adaptação no estabelecimento inicial de populações (Beest et al., 2012). Há a percepção geral de que a elevação no nível de ploidia aumenta a taxa de crescimento e a biomassa nos híbridos, além de alterar o modo reprodutivo, levando a uma vantagem competitiva sobre os parentais diploides (Comai, 2005).

O aumento do tamanho celular em poliploides afeta diferencialmente atividades enzimáticas e é frequentemente acompanhado por alterações na morfologia, fenologia e fisiologia (Hao et al., 2013) e/ou na ecologia em uma ou poucas gerações, gerando indivíduos que podem lidar com alterações ambientais e até superar seus parentais (Mayrose et al., 2010). A ideia de que poliploides podem ser mais tolerantes em condições de estresse (seca, frio, calor e condições de baixo conteúdo nutricional) que seus genitores, pode ser uma consequência das alterações genômicas após a poliploidização (Visser e Molofsky, 2015).

Além de alterações metabólicas em nível celular, os poliploides exibem uma série de alterações macroscópicas em crescimento e desenvolvimento (Hergaty et al., 2013). A análise da densidade de células epidérmicas, índice estomático (IE), tamanho dos estômatos e densidade de tricomas de folhas auxilia na melhor compreensão das diferenças no comportamento fisiológico. Normalmente, os poliploides exibem estômatos maiores, em menor densidade, com menor potencial osmótico, epiderme foliar mais espessa (Hao et al., 2013), maior altura do eixo central (AEC), maior número de folhas e de ramos laterais (Zahedi et al., 2014).

A poliploidia provoca gargalos genéticos, isolamento reprodutivo e especiação (Hegarty et al., 2013). Devido à diferença de ploidia, a espécie *A. hypogaea* tornou-se reprodutivamente isolada dos seus parentais diploides, provocando o estreitamento da base genética ao longo da evolução e a perda de alelos importantes para a agricultura (Leal-Bertioli et al., 2012). São encontrados níveis baixos de resistência no *pool* gênico primário, porém, o *pool* gênico secundário que compreende espécies silvestres diploides da seção

*Arachis*, representa uma importante fonte de novos alelos (Foncéka et al., 2012a). Assim, estudos para caracterização de genótipos silvestres têm sido conduzidos buscando fontes de resistência aos diferentes estresses. Portanto, é possível que espécies silvestres contenham genes que possam conferir melhor desempenho em condições limitantes de água (Leal-Bertioli et al., 2012). Para fornecer melhores características relacionadas com tolerância à seca, a introgressão via alotetraploides sintéticos é um caminho promissor (Foncéka et al., 2009) e constitui uma ferramenta poderosa por disponibilizar alelos importantes de espécies silvestres para o melhoramento do amendoim (Leal-Bertioli et al., 2012). A seca é um dos principais fatores limitantes na produção da agricultura (Zong et al., 2013), a resposta da planta à seca é muito complexa e o grau de tolerância varia entre as diferentes espécies e genótipos. Como as características podem mudar devido à tetraploidização, é necessário avaliar as plantas diploides e tetraploides.

Plantas cultivadas em áreas propensas à seca podem ter vários mecanismos adaptativos eficientes que facilitam a sobrevivência sob condições de estresse (Pruthvi et al., 2013). A ocorrência de alterações morfológicas e fisiológicas pode levar a alguma adaptação para a tolerância (Nautiyal et al., 2008), provocando nas plantas o desenvolvimento de mecanismos de escape, prevenção, ou tolerância para minimizar a exposição ao estresse e restabelecer o crescimento e a produtividade (Dang et al., 2013).

Diferentes critérios têm sido utilizados para a seleção de amendoins tolerantes à seca. Plantas que apresentam mecanismos de escape terão características de maturação e florescimento precoces. Como mecanismos de prevenção, podem apresentar camadas de ceras mais espessas, maior quantidade de pêlos, sistema radicular maior ou mais profundo (Jongrungrklanga et al., 2011), características fisiológicas, uso eficiente da água, maior conteúdo relativo de água, baixa área foliar específica (SLA), além de alto potencial osmótico e mecanismo de tolerância que envolve a indução de genes do sistema de proteção de plantas para sobrevivência, que podem limitar a produtividade (Dang et al., 2013).

Seguindo o modelo proposto por Passioura, em 1977, para trigo, a variação da produtividade de amendoim sob condições limitadas de água, pode ser atribuída a três componentes: taxa de transpiração (TR), eficiência de transpiração (TE) (matéria seca produzida por unidade de tempo) e a relação do peso de vagens totalmente secas (Passioura e Angus, 2010). No entanto, é difícil medir a TE, por ser uma característica fisiologicamente complexa. Alguns estudos indicam que a área foliar específica (SLA) e a leitura de clorofila da planta com SPAD (SCMR), que são fáceis de medir, são altamente correlacionadas com TE, além de apresentarem considerável variação genética no amendoim (Nigam e Aruna, 2008).

Assim, a capacidade de sustentar o desenvolvimento e o crescimento sob déficit hídrico é importante para as cultivares comerciais (Devi e Sinclair, 2011), uma vez que a seca causa perdas acima de 6,7 milhões de toneladas na produção anual de amendoim no mundo (Devi et al., 2010). Além disso, a descoberta de que genótipos com baixo SLA têm maior capacidade fotossintética por unidade de área foliar, fortaleceu ainda mais a ideia de usar baixa SLA como critério de seleção para melhorar a TE em amendoim (Krishnamurthy et al., 2007). A perda de produtividade, devido aos estresses causados pela seca, pode ser parcialmente resolvida com variedades mais adaptadas às condições limitantes de água (Ravi et al., 2011).

Robledo e Seijo (2010) destacam que importantes características como tolerância à seca e diferentes intervalos de ciclos de vida, são encontradas nos silvestres passíveis de uso nos programas de introgressão do amendoim. Para facilitar a introgressão e cruzamento com *A. hypogaea* anfidiplóides sintéticos têm sido produzidos (Simpson et al., 1993; Fávero, 2004; Santos, 2012). Entretanto, como observado anteriormente, a tetraploidização pode modificar características anatômicas e fisiológicas, observadas nas espécies diploides (Leal-Bertioli et al., 2012). Essas características quando relacionadas com tolerância à seca, interferem nas respostas adaptativas da cultura aos estresses abióticos. Portanto, a utilização de híbridos tetraploides ou anfidiplóides é uma alternativa para estudar os efeitos dessas características após a tetraploidização no cultígeno. Porém, essas observações foram feitas para apenas um genótipo (Leal Bertioli et al., 2012), sendo necessário avaliar em outras combinações genótípicas para melhor elucidar os efeitos da poliploidia nesses caracteres.

Dentre os fatores bióticos, existem as doenças fúngicas foliares. A ferrugem (causada pelo fungo *Puccinia arachidis* Speg.) e a mancha-preta (causada pelo *Phaeoisariopsis personata* Ber. e MA Curtis), são doenças do amendoim e economicamente muito importantes, podendo causar juntas, perdas de 50-70% na produção da cultura (Holbrook et al., 2011; Subrahmanyam et al., 1985).

O fungo *P. arachidis* produz uredínios que ao se romperem expõem os urediniósporos (Subrahmanyam et al., 1985). Essas estruturas provocam rapidamente a necrose e o ressecamento das folhas infectadas, resultando em grandes perdas de produtividade, particularmente quando a cultura também é atacada por outros patógenos foliares (Mehan et al., 1994). Os mecanismos de resistência a *P. arachidis* incluem o aumento no tempo entre inoculação e erupção das pústulas e redução na frequência da infecção (Subrahmanyam et al., 1982; Mehan et al., 1994).

Devido à sua importância econômica, tem sido dada maior atenção ao desenvolvimento de medidas de controle químico. No entanto, essas medidas não só aumentam o custo de produção, como também aumentam o risco para segurança alimentar

e poluição ambiental. Por isso, o principal objetivo dos programas de melhoramento do amendoim tem sido o desenvolvimento de cultivares resistentes e/ou tolerantes (Mondal et al., 2012a). Para isso, estudos de resistência a manchas foliares e ferrugem sugerem que a resistência à essa doença é poligênica, complexa e, provavelmente controlada por genes recessivos (Dwivedi et al., 2002; Mace et al., 2006; Leal-Bertioli et al., 2010). A identificação de fontes e mecanismos de resistência à ferrugem são pré-requisitos para o sucesso nos programas de melhoramento genético (Dwivedi et al., 2002). Recentes avanços na genômica de culturas facilitam a identificação de marcadores moleculares associados com características alvo, podendo ser utilizados para selecionar linhagens superiores em programas de melhoramento (Varshney et al., 2014).

Neste sentido, projetos de pré-melhoramento no Brasil têm buscado identificar espécies ou acessos de *Arachis* resistentes às principais pragas da cultura, realizar cruzamentos entre espécies resistentes de diferentes genomas, duplicar cromossomos de híbridos diploides estéreis obtendo-se os tetraploides sintéticos que podem ser cruzados com o amendoim. Os programas de pré-melhoramento da cultura visam à geração de populações de plantas com características agronômicas similares ao amendoim e também com genes que expressem resistência, identificados em espécies silvestres.

## Objetivos

- Avaliar o efeito da tetraploidização em espécies de *Arachis* quanto ao número e tamanho de estômatos, células epidérmicas e tricomas nas epidermes foliares;
- Investigar, por meio de descritores agronômicos, a influência da ploidia na arquitetura das plantas;
- Avaliar o efeito da tetraploidização em características relacionadas à tolerância à seca e eficiência fotossintética: condutância estomática, SLA, SCMR e pigmentos foliares;
- Identificar genótipos com características potenciais de tolerância à seca passíveis de uso no melhoramento genético do amendoim;

## Material e Métodos

### Material vegetal, experimentos e condições de crescimento

Foram usadas diferentes espécies silvestres e tetraploides sintéticos de *Arachis*, e estes comparados com cultivares de amendoim (Tabela 1). Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, sob condições controladas. As sementes foram germinadas em papel germitex, com 1,5% de Ethrel (2-chloroethylphosphonic acid) para quebrar a dormência e 1:2 de Thiram® e água, para prevenir contaminação fúngica. Após 24h acondicionadas em câmara de germinação a 24°C, as sementes foram transferidas para vasos de 14cm de diâmetro e solo tratado com Furadan 48h antes do plantio, o qual previne contra danos causados por pragas provenientes do solo.

Uma vez que diferentes tipos de genótipos crescem em ritmos diferentes, eles foram plantados em épocas diferentes: os genótipos silvestres, que apresentam crescimento mais lento, foram os primeiros a serem plantados; após duas semanas foram plantados os tetraploides sintéticos, e, após quatro semanas, foram plantados os genótipos cultivados.

Foram analisadas: 1) alterações na arquitetura geral das plantas: Altura do eixo central, área foliar total (TLA), área foliar específica (SLA), número de nódulos/grama de raiz (NOD), peso seco da parte aérea (PA) e peso seco da parte radicular (PR); 2) alterações nas estruturas morfológicas foliares: dimensões e densidade de células epidérmicas, tricomas e células-guarda dos estômatos, nas faces abaxial e adaxial da epiderme foliar das amostras; 3) alterações fisiológicas: valores de SCMR (*SPAD chlorophyll meter reading*), teores de clorofilas A, B, A+B e carotenoides totais e taxa de transpiração por área foliar (medida indireta de condutância estomática) sob diferentes DPVs (déficit de pressão de vapor); e 4) efeito de resposta fitopatológica: sendo avaliada a resposta para tamanho e número de lesões à infecção causada pelo fungo *Puccinia arachidis*, causador da ferrugem foliar.

### Características gerais das plantas

Para caracterização das plantas, as avaliações foram feitas em plantas adultas após três meses de germinação, sob irrigação em casa de vegetação e dez repetições de cada genótipo. Foram feitas as seguintes avaliações:

- Altura do eixo central (EC)
- Área foliar total (TLA)



- Frequência de nodulação/grama de raiz (NOD)
- Peso seco da parte aérea (PA)
- Peso seco da parte radicular (PR)

A altura do eixo central foi medida utilizando régua milimetrada. Para determinação da área foliar total, todas as folhas foram destacadas, escaneadas (com resolução de 300dpi) e as imagens foram analisadas com o auxílio do software Quant®1.0.1 (Vale et al., 2001) para calcular a área foliar total da planta em cm<sup>2</sup>. A medida da área foliar por planta foi o somatório da área de todas as folhas da planta.

Para determinação da nodulação/grama de raiz e do peso seco, novas sementes foram plantadas. Quando bem estabelecidas, as plantas tiveram suas partes aérea (PA) e radicular (PR) lavadas e soltas. A parte radicular foi lavada em água corrente e foram contados os nódulos de cada raiz. As partes separadas foram acondicionadas em estufa a 80°C por 72h. Após a secagem, foram determinados os pesos secos de cada parte em balança analítica de precisão. Os valores de peso seco foram utilizados para estimar a razão da frequência de nódulos/grama de raiz para cada genótipo.

#### Avaliação da estrutura morfológica da epiderme foliar

Foi estudada a organização morfológica da epiderme foliar de sete espécies diploides, seis alotetraploides sintéticos e quatro cultivares de amendoim (Tabela 1).

Para dissociação de estruturas epidérmicas foliares, foi utilizado o terço médio de dois folíolos direitos do 3º ou 4º nó de folhas adultas, expandidas e viáveis, de quatro indivíduos de cada genótipo. As amostras foram coletadas e fixadas em solução de etanol 70% : ácido acético : formaldeído (18:1:1, v/v) (FAA) a 4°C por 24h. Foram então incubadas em etanol 70%, até completa despigmentação do material (Figura 1).

Para análise da epiderme, utilizou-se o método modificado de dissociação de Franklin (1945), por meio do uso de peróxido de hidrogênio 30% e ácido acético glacial (1:1, v/v) a 45°C por 72h (Berlyn e Miksche, 1976). As dissociações epidérmicas foram montadas em glicerol 100%, observadas em microscópio Zeiss Axiophot Keiss, e as imagens obtidas com o auxílio do software AxioVision. Os caracteres avaliados foram: Índice estomático ( $IE = \frac{n^\circ \text{ de estômatos}}{n^\circ \text{ de estômatos} + n^\circ \text{ de células epidérmicas}} \times 100$ ), densidade de células epidérmicas (número de células/mm<sup>2</sup>), densidade de tricomas (número de tricomas/mm<sup>2</sup>), dimensões (µm) e densidade de estômatos (número de estômatos/mm<sup>2</sup>).

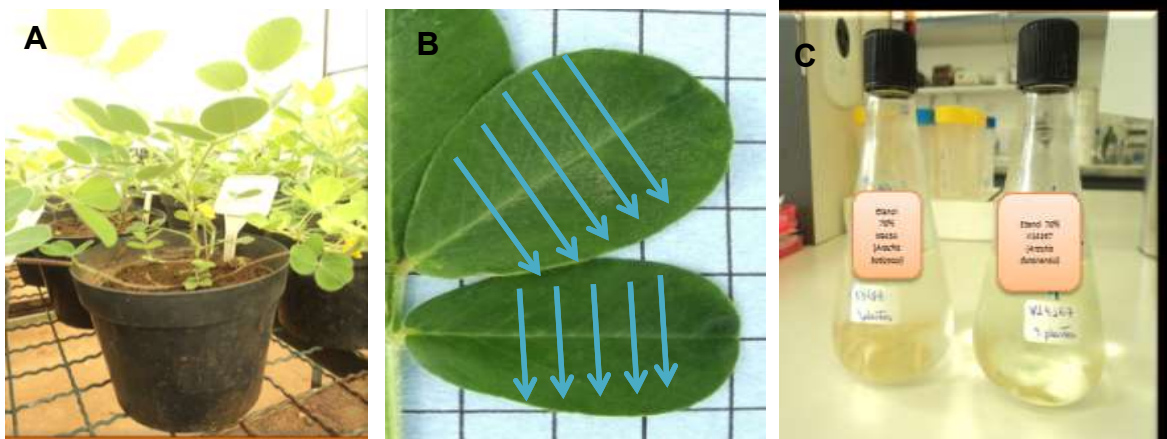


Figura 1. Procedimento de coleta, fixação e armazenagem do material para dissociação epidérmica de genótipos de *Arachis*. (A) Condições das plantas no momento da coleta; (B) modelos de corte nos folíolos de *Arachis* e (C) após fixação em solução de FAA (18:1:1), os fragmentos foliares foram mantidos em etanol 70%.

Todos os caracteres foram avaliados nas faces abaxial e adaxial. Foram realizadas 24 leituras por genótipo, cobrindo uma área total de 4,59mm<sup>2</sup> por genótipo (Figura 2).

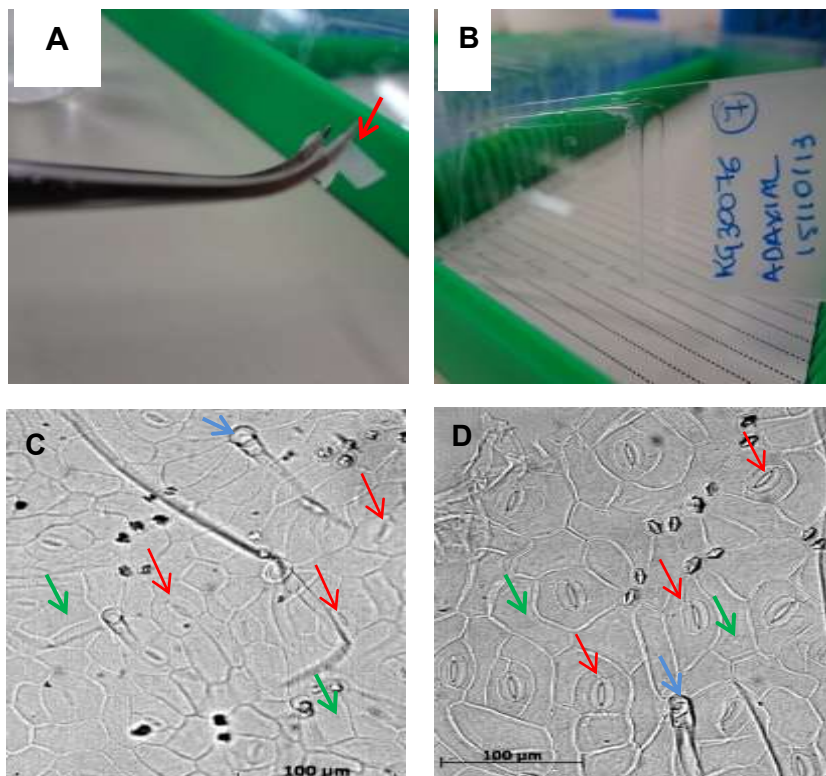


Figura 2. Método de dissociação de Franklin (1945), modificado por Berlyn e Miksche (1976) aplicado nos genótipos estudados em ambas as superfícies epidérmicas foliares: abaxial e adaxial. Em (A) destaque com seta vermelha para o fragmento foliar após despigmentação e processo de dissociação; (B) lâmina permanente montada em glicerol 100% com uma das superfícies epidérmicas foliares; (C) e (D) faces abaxial e adaxial, respectivamente, da epiderme foliar com setas indicando estômatos (vermelhas), tricomas (azuis) e células epidérmicas (verdes).

Tabela 1. Lista dos genótipos utilizados e seus respectivos genomas e índices de ploidia.

	<b>Espécie</b>	<b>Acesso/Cultivar</b>	<b>Identificação</b>	<b>Ploidia</b>	<b>Fórmula Genômica</b>	<b>Origem/Local de Produção</b>
<b>Parentais Silvestres</b>	<i>A. batizocoi</i> Krapov. & W.C. Gregory	K9484	Bat-K9484	2n=2x=20	KK	Parape/Bolívia
	<i>A. stenosperma</i> Krapov. & W.C. Gregory	V10309	Sten-V10309	2n=2x=20	AA	Mato Grosso/Brasil
	<i>A. duranensis</i> Krapov. & W.C. Gregory	V14167	Dur-V14167	2n=2x=20	AA	Salta/Argentina
	<i>A. duranensis</i> Krapov. & W.C. Gregory	SeSn 2848	Dur-SeSn2848	2n=2x=20	AA	Salta/argentina
	<i>A. villosa</i> Benth	V12812	Villo-V12812	2n=2x=20	AA	Bella Unión/Uruguay
	<i>A. ipaënsis</i> Krapov., W.C. Gregory & C.E. Simpson	K30076	Ipa-K30076	2n=2x=20	BB	Gran Chaco/Bolívia
	<i>A. gregoryi</i> C.E. Simpson, Krapov. & Valls	V6389	Greg-V6389	2n=2x=20	BB	Mato Grosso/Brasil
	<i>A. magna</i> Krapov., W.C. Gregory & C.E. Simpson	KG30097	Mag-KG30097	2n=2x=20	BB	Santa Cruz/Bolívia
<b>Tetraploides Sintéticos</b>	<i>(A. batizocoi x A. stenosperma)</i> <sup>4x</sup>	<i>(K9484xV10309)</i> <sup>4x</sup>	Batsten	2n=4x=40	KKAA	UCB* - Brasília/Brasil
	<i>(A. batizocoi x A. duranensis SeSn2848)</i> <sup>4x</sup>	<i>(K9484xSeSn2848)</i> <sup>4x</sup>	BatDur2	2n=4x=40	KKAA	UCB* - Brasília/Brasil
	<i>(A. batizocoi x A. duranensis)</i> <sup>4x</sup>	<i>(K9484xV14167)</i> <sup>4x</sup>	BatDur1	2n=4x=40	KKAA	UCB* - Brasília/Brasil
	<i>(A. ipaënsis x A. duranensis)</i> <sup>4x</sup>	<i>(KG30076xV14167)</i> <sup>4x</sup>	IpaDur1	2n=4x=40	BBAA	UCB* - Brasília/Brasil
	<i>(A. ipaënsis x A. villosa)</i> <sup>4x</sup>	<i>(KG30076xV12812)</i> <sup>4x</sup>	IpaVillo1	2n=4x=40	BBAA	UCB* - Brasília/Brasil
	<i>(A. gregoryi x A. stenosperma)</i> <sup>4x</sup>	<i>(V6389xV10309)</i> <sup>4x</sup>	GregSten1	2n=4x=40	BBAA	UCB* - Brasília/Brasil
<b>Cultivares</b>	<i>A. hypogaea</i> subsp. <i>fastigiata</i>	IAC Tatu-ST	Ah-Tatu	2n=4x=40	AABB	UCB* - Brasília/Brasil
	<i>A. hypogaea</i> subsp. <i>hypogaea</i>	IAC Runner 886	Ah-Runner	2n=4x=40	AABB	Campinas/São Paulo
	<i>A. hypogaea</i> subsp. <i>hypogaea</i>	Caiapó	Ah-Caiapó	2n=4x=40	AABB	Campinas/São Paulo
	<i>A. hypogaea</i> subsp. <i>fastigiata</i>	BR-1	Ah-Br1	2n=4x=40	AABB	Campinas/São Paulo

\*Universidade Católica de Brasília

## SCMR e SLA

As leituras de SCMR (*Soil Plant Analysis Development chlorophyll meter readings*) foi feita com o SPAD (*Stability of soil plant analytical development - Konica Minolta Sensing, Inc., Japan*) em plantas com três meses de idade. Foram registradas quatro medidas realizadas em cada folíolo da segunda folha completamente expandida de quatro folhas do eixo central e/ou lateral em oito repetições por genótipo e feitas as médias aritméticas. Apenas as plantas saudáveis foram avaliadas, e foi tomado cuidado para evitar nervuras e áreas afetadas por insetos ou deficiência nutricional.

Para medir SLA (área foliar específica), as folhas avaliadas para SCMR foram embebidas em água por pelo menos 2 horas para atingirem completo turgor. Em seguida, as folhas foram escaneadas e a área foliar foi calculada utilizando o software Quant®. Para estimar o peso seco, as folhas foram mantidas em estufa a 80°C durante 72h e, em seguida pesadas. A área foliar específica (SLA) foi estimada como a razão da área foliar e o peso seco expressa em cm<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>.

Ambas as medições SCMR e SLA foram feitas a partir de folhas de plantas irrigadas.

## Extração de clorofila A, clorofila B, A+B e carotenoides

Para medir a quantidade de pigmento de clorofila e carotenoides por unidade de área foliar, seguiu-se o protocolo descrito por Coate et al. (2012) com modificações. Foram homogeneizados três discos congelados de 1cm de diâmetro de folhas frescas, separadamente, utilizando um pistilo de plástico em nitrogênio líquido em tubos de 1,5mL, depois misturados em vórtex com 500µL de acetona 80% fria, e em seguida acondicionados a 4°C *over night* no escuro. Na manhã seguinte, cada tubo foi agitado em vórtex novamente para expor quaisquer pigmentos precipitados para a solução de acetona, depois foi centrifugado a 18000×g durante 15 minutos a 4°C. Foram realizadas leituras em três diferentes diluições: 1:0, 1:2 e 1:10, num volume de 100µL por amostra, além de triplicata de branco/controle para cada genótipo. As amostras foram montadas em placas tipo Elisa para leitura com absorvância medida em 663nm, 647nm e 470nm, utilizando um espectrofotômetro e espectrofluorômetro para leitura de placas e cubetas - fluorescência uv/vis absorvância (SpectraMax M2e multi-mode microplate reader, Molecular Device) (Figura 3).

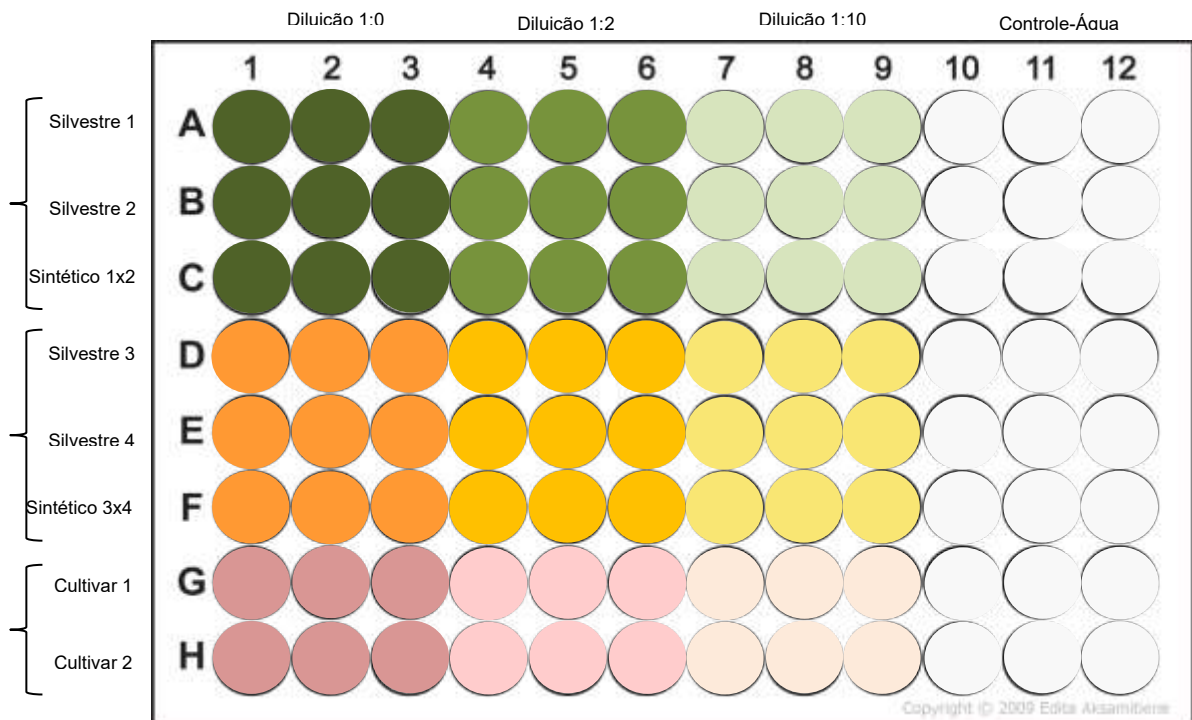


Figura 3. Esquema da placa tipo Elisa, utilizada para leitura e quantificação do conteúdo de pigmentos fotossintéticos: Clorofila a – CloA; Clorofila b – CloB; Clorofila total a+b – CloAB, além de carotenoides totais em diferentes diluições distribuídas nas colunas (diluição 1:0, colunas de 1-3; diluição 1:2, colunas 4-6 e diluição 1:10, colunas 7-9. Colunas 10-12, foram usadas com água para controle das amostras) e diferentes genótipos distribuídos nas linhas de A-H (silvestres, tetraploides sintéticos e cultivares).

As fórmulas de Lichtenthaler (1987) foram utilizadas para estimar as concentrações [ $\mu\text{g/mL}$ ] de clorofilas a e b, individualmente, bem como a clorofila total (a + b), como seguem as fórmulas, Clorofila a (CloA): ( $\mu\text{g.gMF}^{-1}$ ) = [(12,25.A663) – (2,79.A647)] . V (volume da amostra utilizado); Clorofila b (CloB): ( $\mu\text{g.gMF}^{-1}$ ) = [(21,50.A647) – (5,10.A663)] . V; Clorofila a+b (CloAB): ( $\mu\text{g.gMF}^{-1}$ ) = (7,15.A663) + (18,71.A647) . V; e para carotenoides totais (Cx+c: xantofilas e  $\beta$ -caroteno), utilizada a fórmula descrita em Minocha et al. (2009), onde: Cx+c= [(1000.A470) - (1,8.CloA) - (85,02.CloB)/198] . V.

### Transpiração/área foliar (TR/AF)

Como medida indireta de condutância estomática, foi avaliada a transpiração por área foliar (TR/AF) em alto PDV (pressão de déficit de vapor). Foram avaliados seis tetraploides sintéticos, genitores, e cultivares de amendoim. Para esse experimento, seguimos a metodologia descrita por Belko et al. (2012) com algumas modificações. As plantas foram avaliadas em casa de vegetação. Para cada genótipo, foram utilizadas oito repetições. Um dia antes do experimento os potes foram completamente irrigados, permitindo a drenagem para atingirem a capacidade de campo. Após a drenagem total da

água, os potes foram envolvidos por sacos plásticos em torno do caule da planta, para prevenir a evaporação de água pela superfície do solo durante o experimento.

A transpiração foi estimada gravimetricamente. Os potes foram pesados em balança de precisão, entre as 7h e 19h, com intervalo de 1h sob diferentes déficits de pressão de vapor (DPV). O tempo de transpiração da planta ( $TR$ ,  $gH_2O \text{ planta}^{-1} \times h^{-1}$ ) foi calculado como  $TR=(P_n - P_{n+1})$ , Onde  $P$  é o peso dos potes gravados nos tempos consecutivos. Ao final do experimento, após a última pesagem, as plantas foram reidratadas em condições de campo e no dia seguinte, separadas as folhas do caule e escaneadas, para estimar a área foliar total de cada planta, pelo software Quant e estimar a transpiração por unidade de área foliar ( $TR$ ,  $gH_2O \text{ g}^{-1} \times \text{foliar } P \times h^{-1}$ ) para se obter uma estimativa da razão  $TR/AF$  entre os genótipos.

O DPV atmosférico foi calculado usando a temperatura do ar e umidade relativa, gravados por sensores posicionados na casa de vegetação. Onde,  $DPV=((100-RH)/100 \times VP_{sat})$  e  $UR(\%)$  é a umidade relativa e  $VP_{sat}$  é a pressão de vapor saturada (kPa) retiradas a partir de uma tabela de temperatura do ar e dados de UR.

#### Resposta fitopatológica ao fungo *Puccinia arachidis* Speg.

A fenotipagem para resistência a *P. arachidis* (ferrugem) foi realizada com seis tetraploides sintéticos, genitores, além de cultivares como controles suscetíveis. Foram realizados bioensaios seguindo a metodologia de folhas destacadas descrita por Moraes e Salgado (1982). Esta técnica baseia-se em folhas de amendoim envolvidas em algodão umedecido no pecíolo mantidas em uma placa de Petri para, assim, permanecerem vivos os tecidos e o metabolismo por um longo período.

O inóculo foi proveniente de folhas de *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* cultivar Tatu, suscetível, plantada em casas de vegetação na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. A partir desse inóculo, foi feita uma suspensão de esporos, na concentração de  $10^5/mL$  em Tween 20 [0.5%]. Essa suspensão foi inoculada na superfície abaxial das folhas e acondicionadas em câmara de crescimento, numa temperatura de 26-28°C com fotoperíodo de 10h de luz e 14h de escuro. Durante as primeiras 48h, as placas foram seladas com parafilme para aclimação do complexo planta/patógeno. Foram utilizadas oito repetições (folha/placa) de cada genótipo e a avaliação do bioensaio ocorreu no 25º dia após a inoculação (DAI), levando em consideração o período de incubação, número de lesões e área lesionada ( $mm^2$ ) por área foliar total ( $mm^2$ ).

O índice de suscetibilidade foi calculado usando a escala de Savary et al. (1989), com as seguintes modificações: Índice era o número de lesões vezes um número que refletia o tamanho da lesão/reação.  $I = \int (s*n)/LA$ , em que  $s$ =o tamanho da lesão (1 = lesão

necrótica abortado, 2 a 6 = rompido, pústulas esporuladas, variando entre 0,5 - 3 mm de diâmetro),  $n$  = número de lesões de um determinado tamanho, LA = área foliar ( $\text{mm}^2$ ). A esporulação foi avaliada com o auxílio de um microscópio estereoscópico. A área foliar foi calculada utilizando o software Quant ® (Vale et al., 2001).

### Análise estatística

A análise dos dados foi realizada no programa estatístico *R*. Primeiramente, a análise dos dados teve por objetivo normalizar as avaliações por meio de análises descritivas (mediana, quartil inferior e quartil superior). Na sequência da análise estatística, foi feita a comparação dos grupos/conjuntos (parentais, tetraploides sintéticos e cultivares). Para uma avaliação da qualidade dos agrupamentos obtidos foi utilizado o coeficiente de Silhueta, em inglês silhouette, proposto por (Rousseeuw, 1987), que subsidia na escolha de um número ótimo de grupos e permite visualizar graficamente os agrupamentos. É uma medida que combina coesão e separação dos objetos. Também foi usado o teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis (Venables e Smith, 2014). Esse teste é usado quando os dados não satisfazem as condições requeridas para uma ANOVA paramétrica (Zar, 1999), como observado na análise em questão. Para melhorar a compreensão dos dados, foi atribuída ao teste de Kruskal-Wallis a correção de Bonferroni, aplicável em qualquer situação onde se deseje efetuar vários testes de hipóteses/intervalos de confiança e pretende controlar o nível de significância/grau de confiança global.

Assim, esse teste é utilizado na comparação de três ou mais amostras independentes. Ele nos indica se há diferença entre pelo menos duas delas. Logo, é indicado quando as amostras não provêm de populações com distribuição normal, ou quando as variâncias são muito heterogêneas. Assim, os dados não precisam ser distribuídos normalmente, mas as distribuições das amostras devem ser semelhantes entre si (Levin, 1985; Fowler e Cohen, 1990). Essa análise foi realizada para todas as variáveis nos seis conjuntos de anfidiplóides testados e em todas as análises o nível de significância adotado foi de 0,05.

## Resultados

### Características gerais das plantas

Foi observada uma alteração para todos os alotetraploides sintéticos, nas características gerais. Amendoim tem arquitetura “em leque (ramos alternados)” e as espécies silvestres diploides usadas nesse trabalho, possuem hábito de crescimento rasteiro. Todos os tetraploides sintéticos apresentaram a mesma arquitetura que seus parentais diploides, porém apresentaram maiores valores que os parentais diploides para eixo principal e para a maior parte das cultivares de amendoim. O peso seco da parte aérea (PA) e peso seco radicular (PR) também foram, geralmente, mais elevados nos alotetraploides que nos seus parentais diploides (Figuras 5 e 6). Para o caráter peso seco da parte aérea - PA (g), dentre os tetraploides sintéticos, BatDur1 e GregSten1 [K9484 x V14167]<sup>4x</sup> e [V6389 x V10309]<sup>4x</sup> respectivamente, foram os que tiveram valores maiores, sem diferenças significativas quanto às cultivares Ah-Runner e Ah-Caiapó (Figura 5A e 5E) na análise dentro de cada conjunto.

O peso seco da parte radicular (g) – PR, mostrou que dentre os sintéticos, GregSten1 apresentou o maior peso seco, comparável com os das cultivares (Figura 6E). Já o sintético BatSten1, diferente da maioria dos sintéticos, não apresentou valores maiores que seus parentais. Para esse caráter, seus valores foram mais similares das cultivares Ah-BR1 e Ah-Tatu, sem nenhuma diferença estatística quanto ao seu parental masculino Sten-V10309 (Figura 6B).

Para área foliar total (cm<sup>2</sup>) – TLA, com exceção dos sintéticos BatDur2 e IpaVillo1, que foram similares aos parentais (Figuras 7B e 7F), os demais apresentaram uma área foliar total muito similar às cultivares (Figura 7).



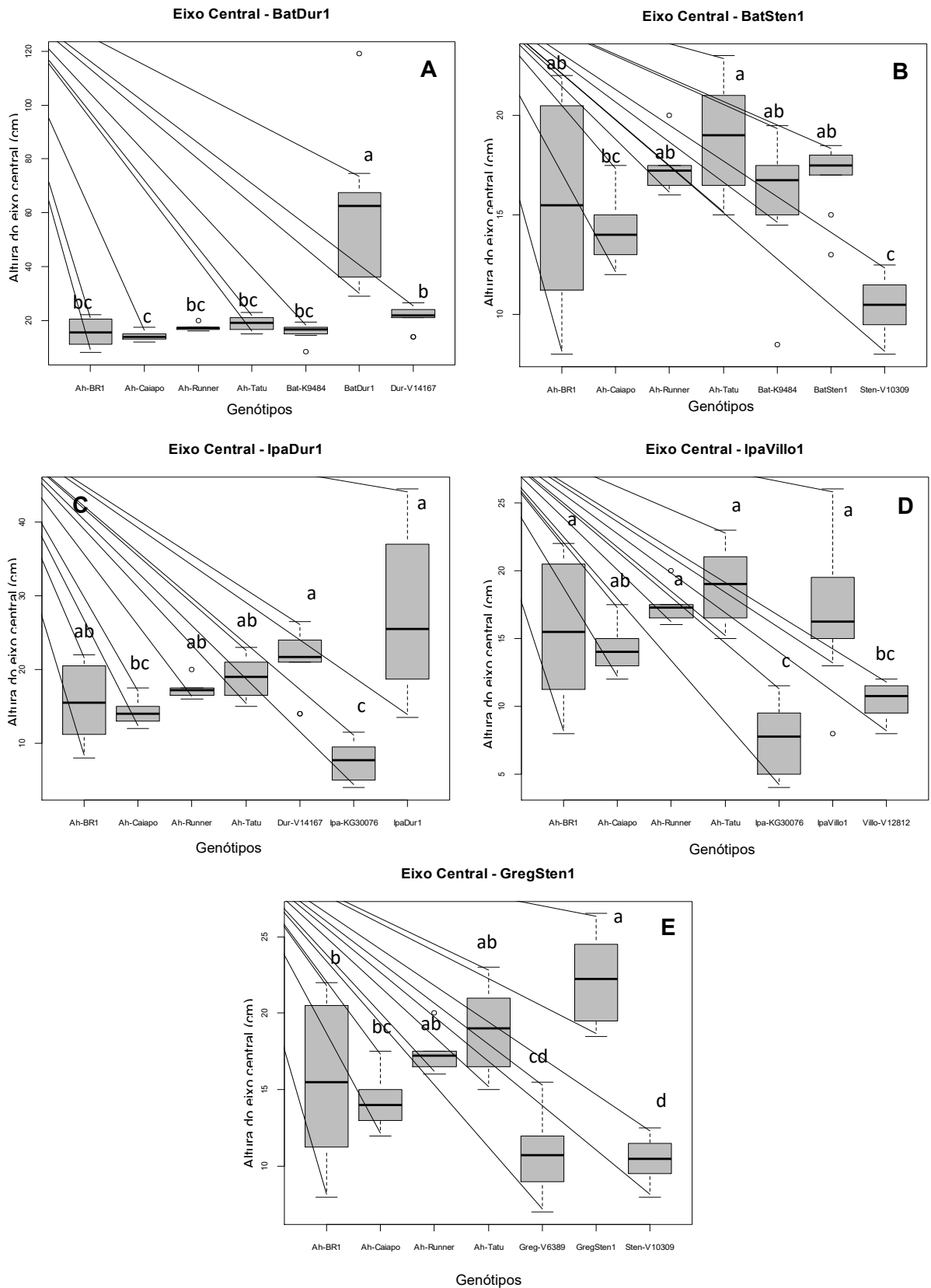


Figura 4. Gráficos em BoxPlot para a variável Altura do Eixo Central para cinco conjuntos de alotetraploides sintéticos de *Arachis*. A) conjunto BatDur1 (sintético – BatDur1, parentais – Bat-K9484, Dur-V14167 e cultivares); B) conjunto BatSten1 (sintético - BatSten1, parentais – Bat-K9484,

Sten-V10309 e cultivares); C) conjunto IpaDur1 (sintético – IpaDur1, parentais – Ipa-K30076, Dur-V14167 e cultivares); D) conjunto IpaVillo1 (sintético - IpaVillo1, parentais – Ipa-K30076, Villo-V12812 e cultivares); E) conjunto GregSten1 (sintético – GregSten1, parentais – Greg-V6389, Sten-V10309 e cultivares). Para todos os conjuntos, as cultivares utilizadas como controles foram: Ah-BR1, Ah-Caiapó, Ah-Runner e Ah-Tatu.

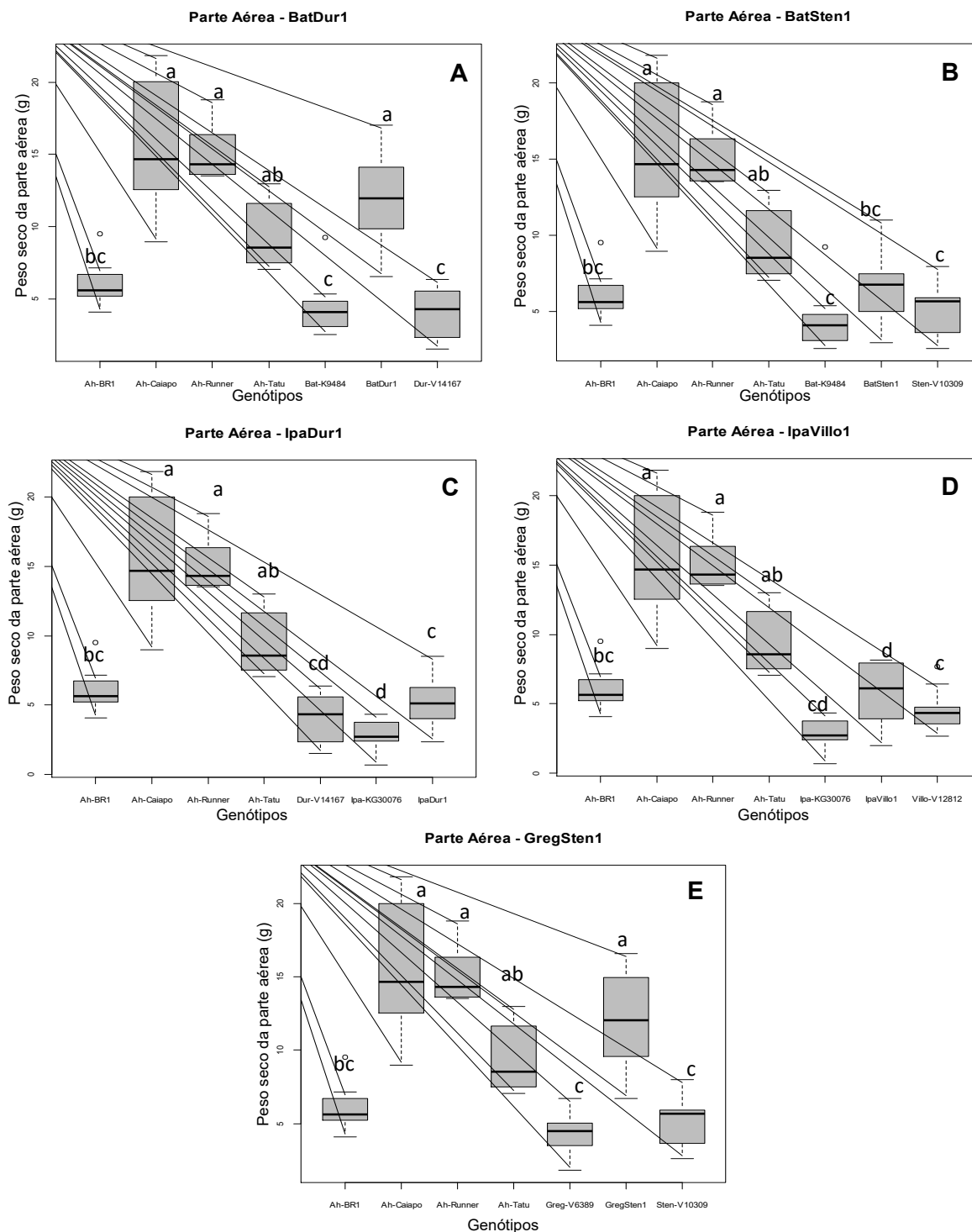


Figura 5. Gráficos em BoxPlot para a variável Peso Seco da Parte Aérea (g) – PA para cinco conjuntos de sintéticos alotetraploides de *Arachis*. A) conjunto BatDur1 (sintético – BatDur1, parentais – Bat-K9484, Dur-V14167 e cultivares); B) conjunto BatSten1 (sintético - BatSten1, parentais – Bat-

K9484, Sten-V10309 e cultivares); C) conjunto IpaDur1 (sintético – IpaDur1, parentais – Ipa-K30076, Dur-V14167 e cultivares); D) conjunto IpaVillo1 (sintético - IpaVillo1, parentais – Ipa-K30076, Villo-V12812 e cultivares); E) conjunto GregSten1 (sintético – GregSten1, parentais – Greg-V6389, Sten-V10309 e cultivares). Para todos os conjuntos, as cultivares utilizadas como controles foram: Ah-BR1, Ah-Caiapó, Ah-Runner e Ah-Tatu.

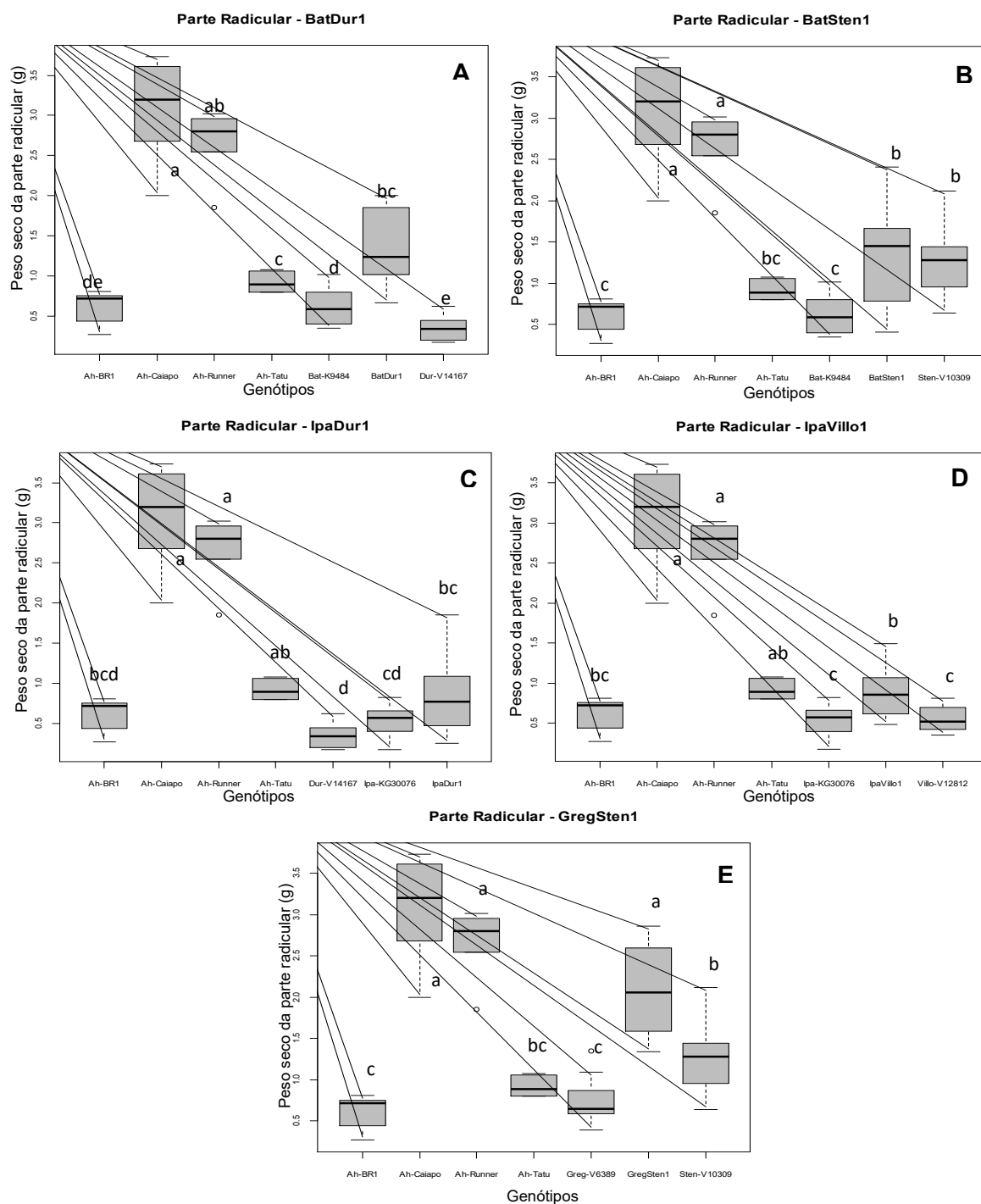


Figura 6. Gráficos em BoxPlot para a variável peso seco da parte radicular (g) – PR para cinco conjuntos de sintéticos alotetraploides de *Arachis*. A) conjunto BatDur1 (sintético – BatDur1, parentais – Bat-K9484, Dur-V14167 e cultivares); B) conjunto BatSten1 (sintético - BatSten1, parentais – Bat-K9484, Sten-V10309 e cultivares); C) conjunto IpaDur1 (sintético – IpaDur1, parentais – Ipa-K30076, Dur-V14167 e cultivares); D) conjunto IpaVillo1 (sintético - IpaVillo1, parentais – Ipa-K30076, Villo-V12812 e cultivares); E) conjunto GregSten1 (sintético – GregSten1, parentais – Greg-V6389, Sten-V10309 e cultivares). Para todos os conjuntos, as cultivares utilizadas como controles foram: Ah-BR1, Ah-Caiapó, Ah-Runner e Ah-Tatu.

V12812 e cultivares); E) conjunto GregSten1 (sintético – GregSten1, parentais – Greg-V6389, Sten-V10309 e cultivares). Para todos os conjuntos, as cultivares utilizadas como controles foram: Ah-BR1, Ah-Caiapó, Ah-Runner e Ah-Tatu.

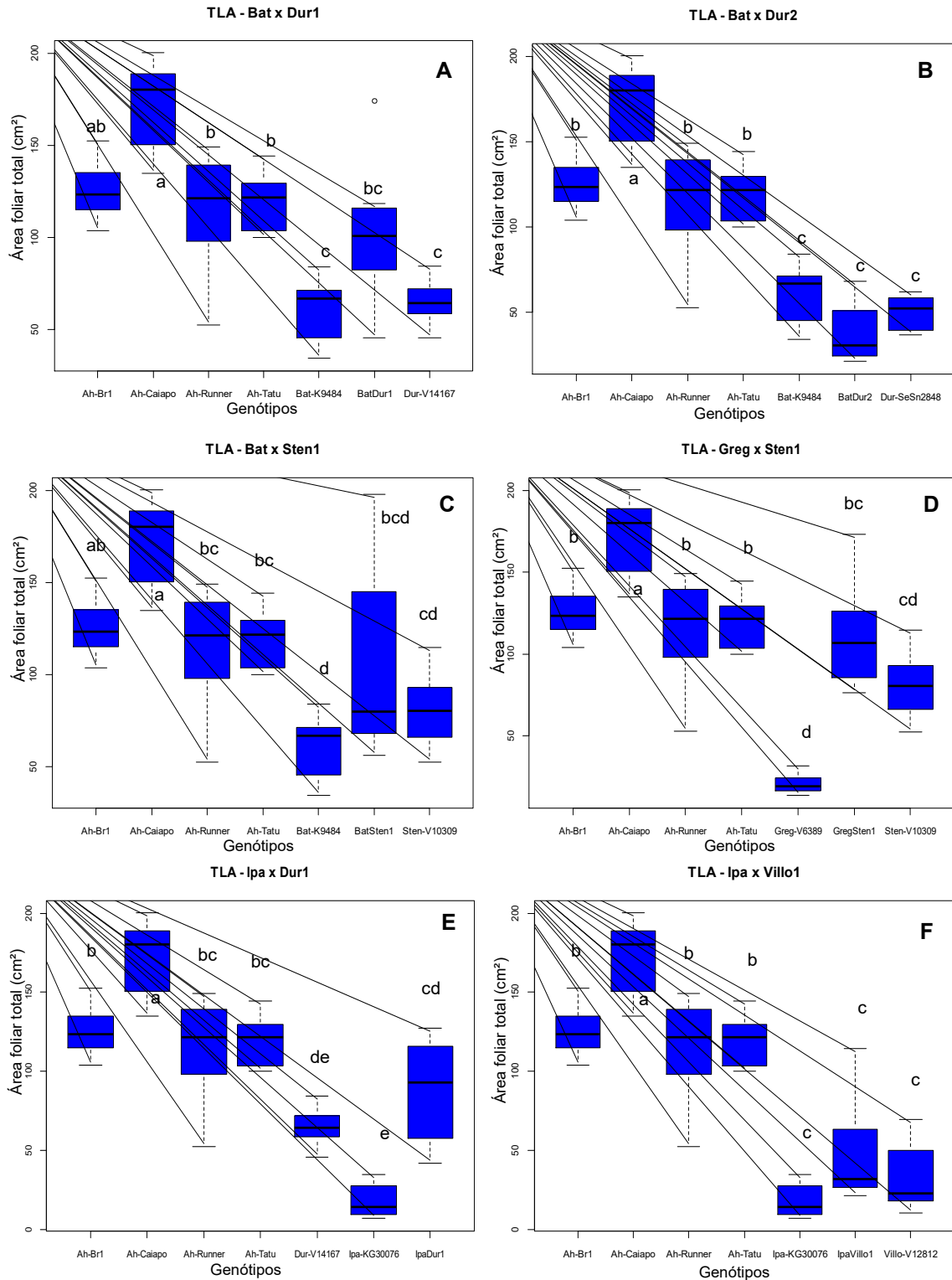


Figura 7. Gráficos em BoxPlot para a variável área foliar total (TLA) para os seis conjuntos de tetraploides sintéticos de *Arachis*. A) conjunto BatDur1 (sintético – BatDur1, parentais – Bat-K9484,

Dur-V14167 e cultivares); B) BatDur2 (sintético – BatDur2, parentais – Kat-K9484, Dur-SeSn2848 e cultivares); C) conjunto BatSten1 (sintético - BatSten1, parentais – Bat-K9484, Sten-V10309 e cultivares); D) conjunto GregSten1 (sintético – GregSten1, parentais – Greg-V6389, Sten-V10309 e cultivares); E) conjunto IpaDur1 (sintético – IpaDur1, parentais – Ipa-K30076, Dur-V14167 e cultivares); F) conjunto IpaVillo1 (sintético - IpaVillo1, parentais – Ipa-K30076, Villo-V12812 e cultivares). Para todos os conjuntos as cultivares utilizadas como controles foram: Ah-BR1, Ah-Caiapó, Ah-Runner e Ah-Tatu.

Para o caráter nodulação/grama de raiz (NOD), a tendência seguiu as demais variáveis estudadas. Os sintéticos apresentaram características mais direcionadas para os genótipos cultivados. Para esse caráter, os sintéticos IpaDur1 e BatDur1, foram os mais próximos das cultivares e os acessos de *A. duranensis* Dur1-V14167 e Dur2-SeSn2848, foram os silvestres com maior frequência de nódulos em condições locais (Figura 8).

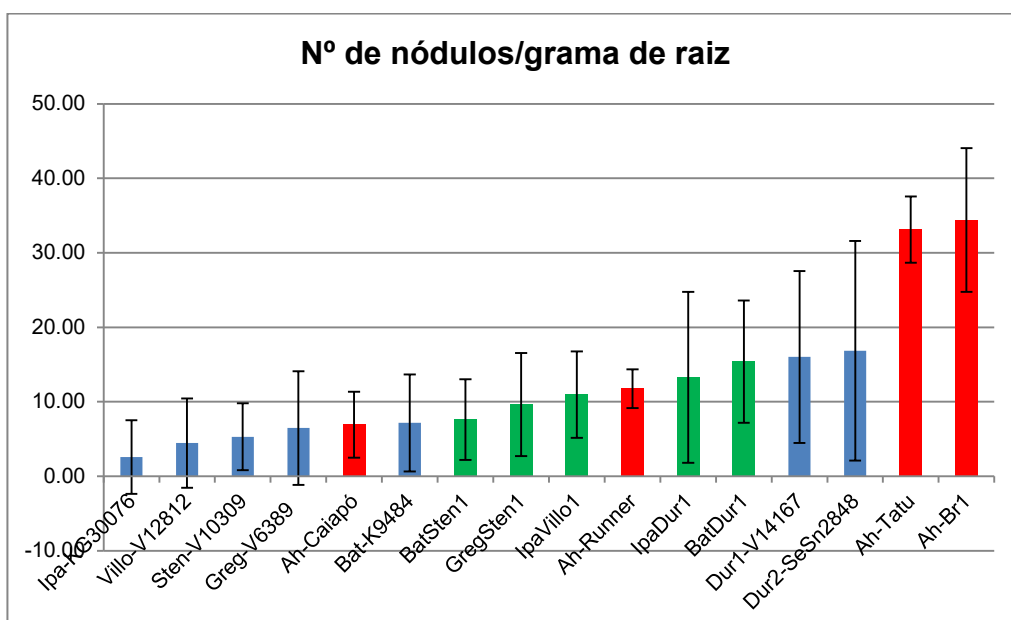


Figura 8. Frequência de nódulos de rizóbios/grama de raiz para espécies silvestres de *Arachis* (barras azuis), tetraploides sintéticos (barras verdes) e cultivares de *Arachis hypogaea* (barras vermelhas) com médias e desvios.

## Avaliação da estrutura morfológica da epiderme foliar

Foram observadas alterações em todos os alotetraploides sintéticos. Para a face abaxial, percebeu-se que a variável comprimento de estômatos foi uma das mais informativas e que melhor refletiu a diferença entre genótipos, sendo a maior responsável pela separação dos genótipos em diploides e tetraploides (Figura 9).

As dimensões estomáticas foram semelhantes em ambas as superfícies foliares de todos os genótipos, mas foram levemente maiores na superfície abaxial. As dimensões estomáticas aumentaram após a tetraploidização induzida em todos os genótipos avaliados. Conseqüentemente, em todos os casos de tetraploides induzidos a densidade de estômatos foi menor do que os parentais diploides e de todos os genótipos de amendoim.

A tetraploidização também alterou o tamanho de células epidérmicas: todos os tetraploides induzidos apresentaram células epidérmicas maiores (e conseqüentemente com menor densidade) do que seus parentais diploides. A exceção a esse caráter foi o sintético BatSten1 na face abaxial. (Figura 10).

Os valores de índice estomático (IE) abaxial foram geralmente mais baixos para diploides do que para os cultivados e apresentaram pouca variação entre genótipos com o mesmo nível de ploidia. Os IEs para tetraploides sintéticos foram os menores em todos os casos estudados, bem como para o caráter densidade de tricomas (número de tricomas/mm<sup>2</sup>), com pouca variação nos tetraploides sintéticos.

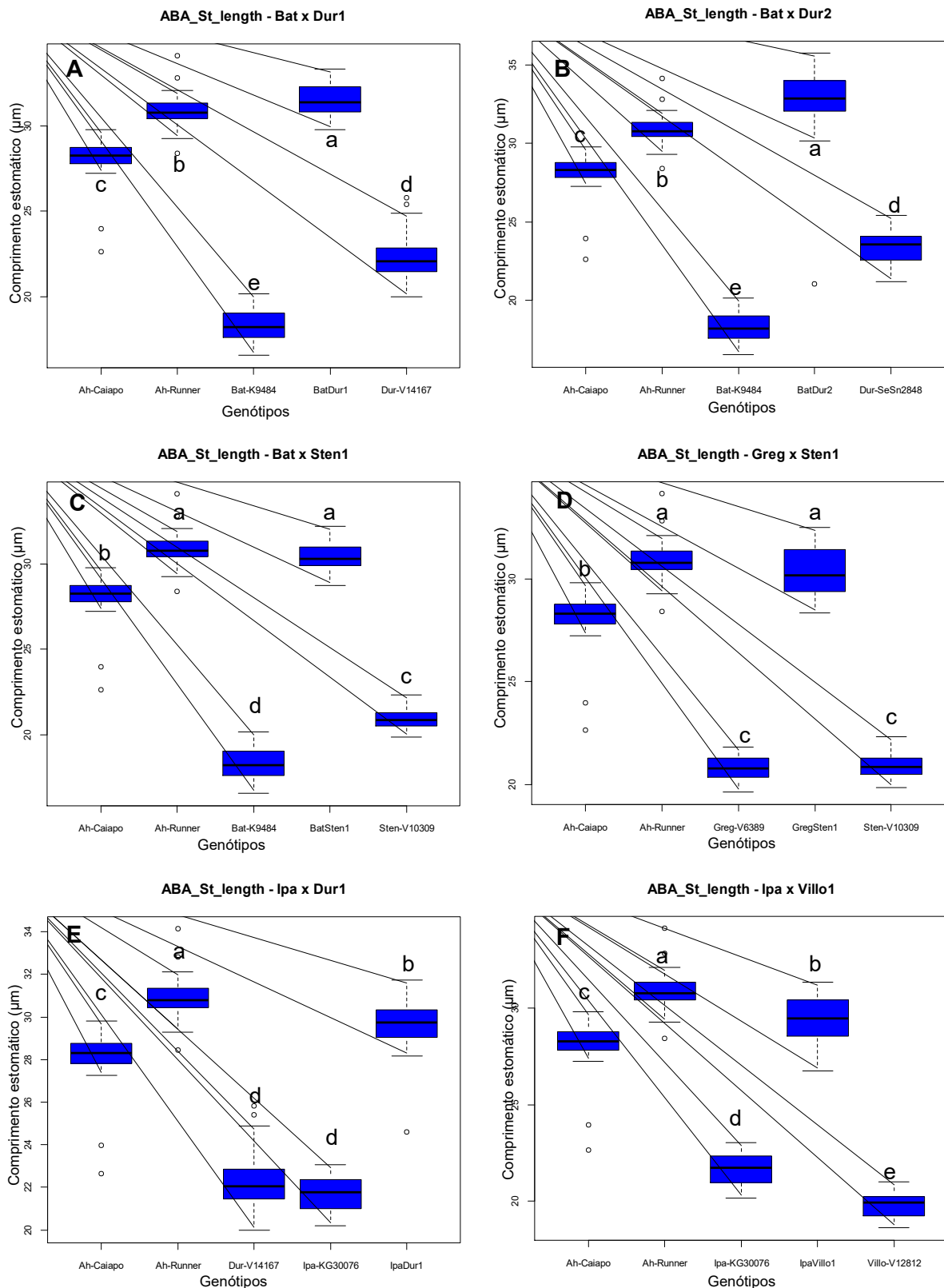


Figura 9. Gráficos em Box Plot para avaliação do comprimento de estômatos da face abaxial para os seis conjuntos de tetraploides sintéticos de *Arachis*. A) conjunto BatDur1 (sintético – BatDur1, parentais – Bat-K9484, Dur-V14167 e cultivares); B) BatDur2 (sintético – BatDur2, parentais – Bat-K9484, Dur-SeSn2848 e cultivares); C) conjunto BatSten1 (sintético - BatSten1, parentais – Bat-K9484, Sten-V10309 e cultivares); D) conjunto GregSten1 (sintético – GregSten1, parentais – Greg-

V6389, Sten-V10309 e cultivares); E) conjunto IpaDur1 (sintético – IpaDur1, parentais – Ipa-K30076, Dur-V14167 e cultivares); F) conjunto IpaVillo1 (sintético - IpaVillo1, parentais – Ipa-K30076, Villo-V12812 e cultivares). Para todos os conjuntos, as cultivares utilizadas como controles foram: Ah-Caiapó e Ah-Runner.

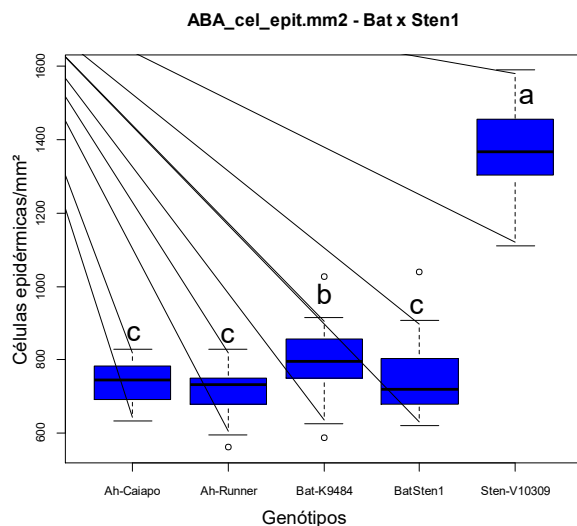


Figura 10. Gráfico em Box Plot para avaliação da densidade de células epidérmicas (número de células/mm<sup>2</sup>) da face abaxial para o conjunto do tetraploide sintético BatSten1 [sintético - (Bat-K9484 x Sten-v10309)<sup>4x</sup>, silvestres diploides - Bat-K9484, Sten-V10309 e cultivares – Ah-Caiapó e Ah-Runner, como controles).

Considerando a influência da densidade estomática (DE) na variação do índice estomático (IE), a correlação de Pearson entre essas duas variáveis mostrou-se positiva e fortemente correlacionadas com  $R^2=0,6136$  ( $p=0,05\%$ ) para os tetraploides sintéticos (Figura 11A) e  $R^2=0,4896$  ( $p=0,05\%$ ) para os silvestres diploides (Figura 11B). A correlação entre essas duas variáveis - (IE) x (DE), mostra que para o índice estomático, 61% e 49% da variação observada nos sintéticos e silvestres, respectivamente, são explicadas pela densidade estomática.

Os resultados mostram que a poliploidia provocou aumento das estruturas, evento conhecido como “gigantismo”, tornando esses componentes, tais como estômatos, células epidérmicas e até mesmo tricomas, maiores que dos parentais e muito semelhantes ao padrão da cultivar Ah-Runner (Figura 12).

Densidade de tricomas foi maior na superfície abaxial de todos os genótipos. Nenhuma correlação clara foi observada entre ploidia e densidade de tricomas, porém grande variação foi encontrada entre as espécies diploides ( $0,90 \pm 2,29/\text{mm}^2$  em Dur-V14167 na face adaxial para  $39,21 \pm 8,10/\text{mm}^2$  em Sten-V10309 na face abaxial), mas não houve variação significativa entre cultivares de amendoim. Principalmente os tetraploides sintéticos apresentaram valores de densidade de tricomas semelhantes a um dos pais,



geralmente o parental materno; no entanto na superfície abaxial, GregSten1, IpaDur1 e IpaVillo1 apresentaram densidades de tricomas significativamente menores do que qualquer um dos pais e mais semelhantes ao amendoim cultivado.

Para a maioria das características morfológicas analisadas na face abaxial, quando avaliados para o conjunto de genótipos individualmente (parental 1, parental 2, sintético e cultivar), tais como densidades de células epidérmicas, densidade de tricomas e densidade estomática, os tetraploides sintéticos diferiram de seus parentais diploides, aproximando-se do genótipo tetraploide cultivado (*A. hypogaea*). Como observado nos gráficos em Boxplot para IpaDur1 (Figura 13). Este comportamento se aplica para os demais conjuntos.

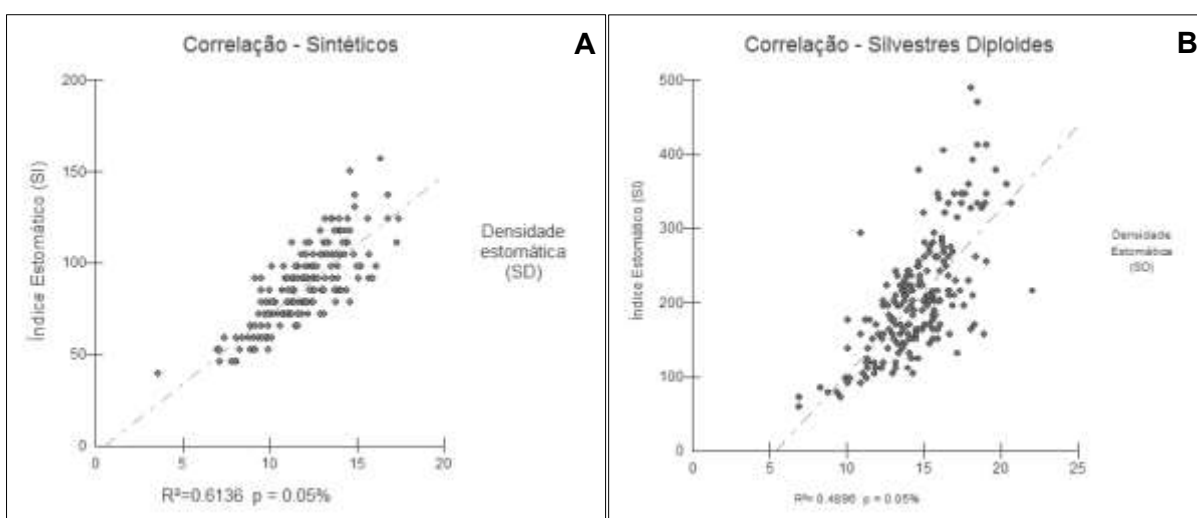


Figura 11. Correlação de Pearson com significância (p) de 0,05% entre as variáveis Índice estomático (IE) e Densidade Estomática (DE – Número de estômatos/mm<sup>2</sup>) para tetraploides sintéticos (A) e silvestres diploides (B).

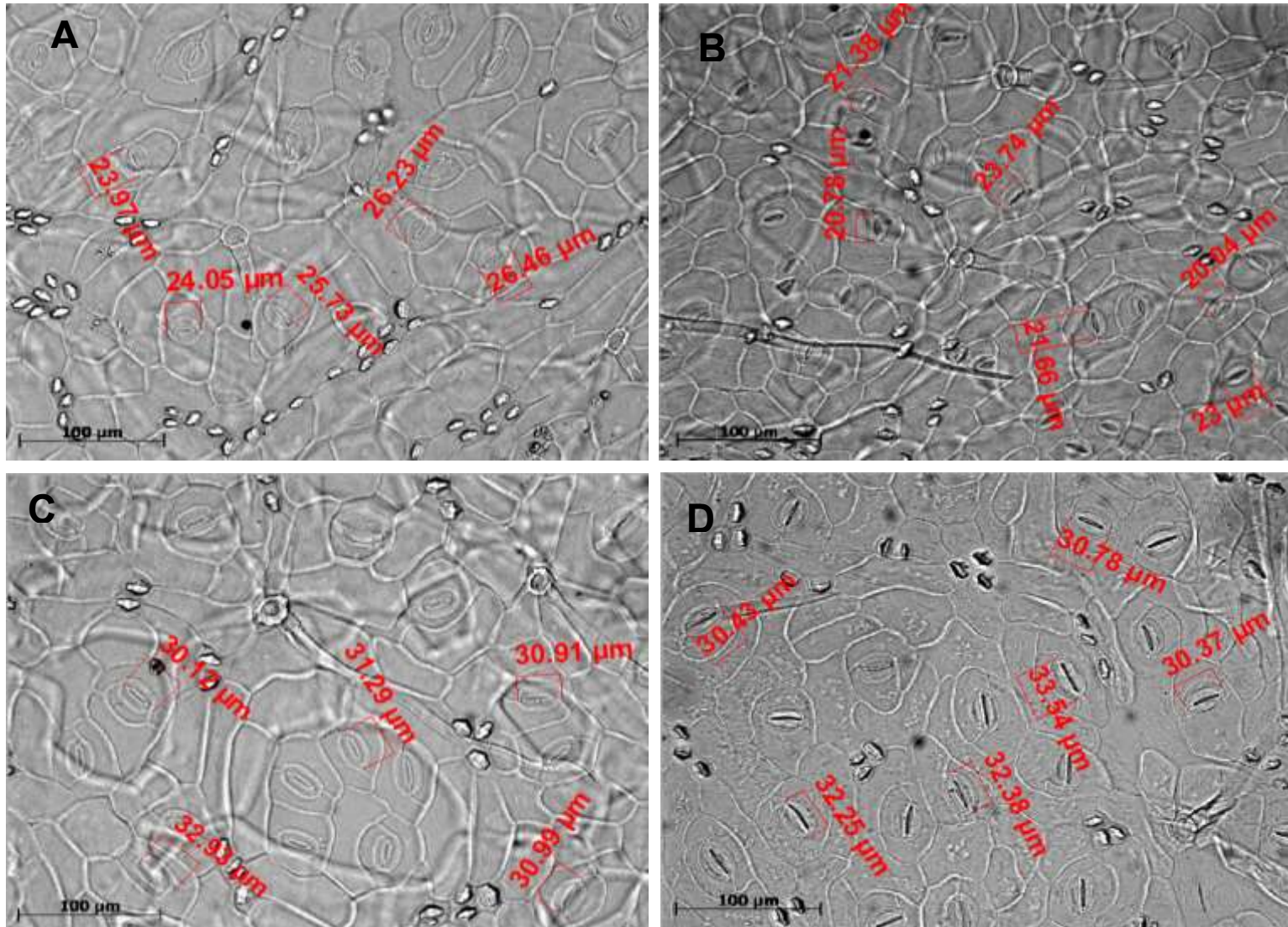


Figura 12. Superfície abaxial do conjunto IpaDur1 capturados em microscópio Axiophot. (A) Silvestre diploide *Arachis ipaënsis* (Ipa-K30076) (B) silvestre diploide *A. duranensis* (Dur-V14167), (C) anfidiplóide sintético IpaDur1 e (D) alotetraploide natural *A. hypogaea* cv. Runner IAC-886. Destaque com barras vermelhas mostrando o comprimento de estômatos em  $\mu\text{m}$ . Escala de  $100\mu\text{m}$ .

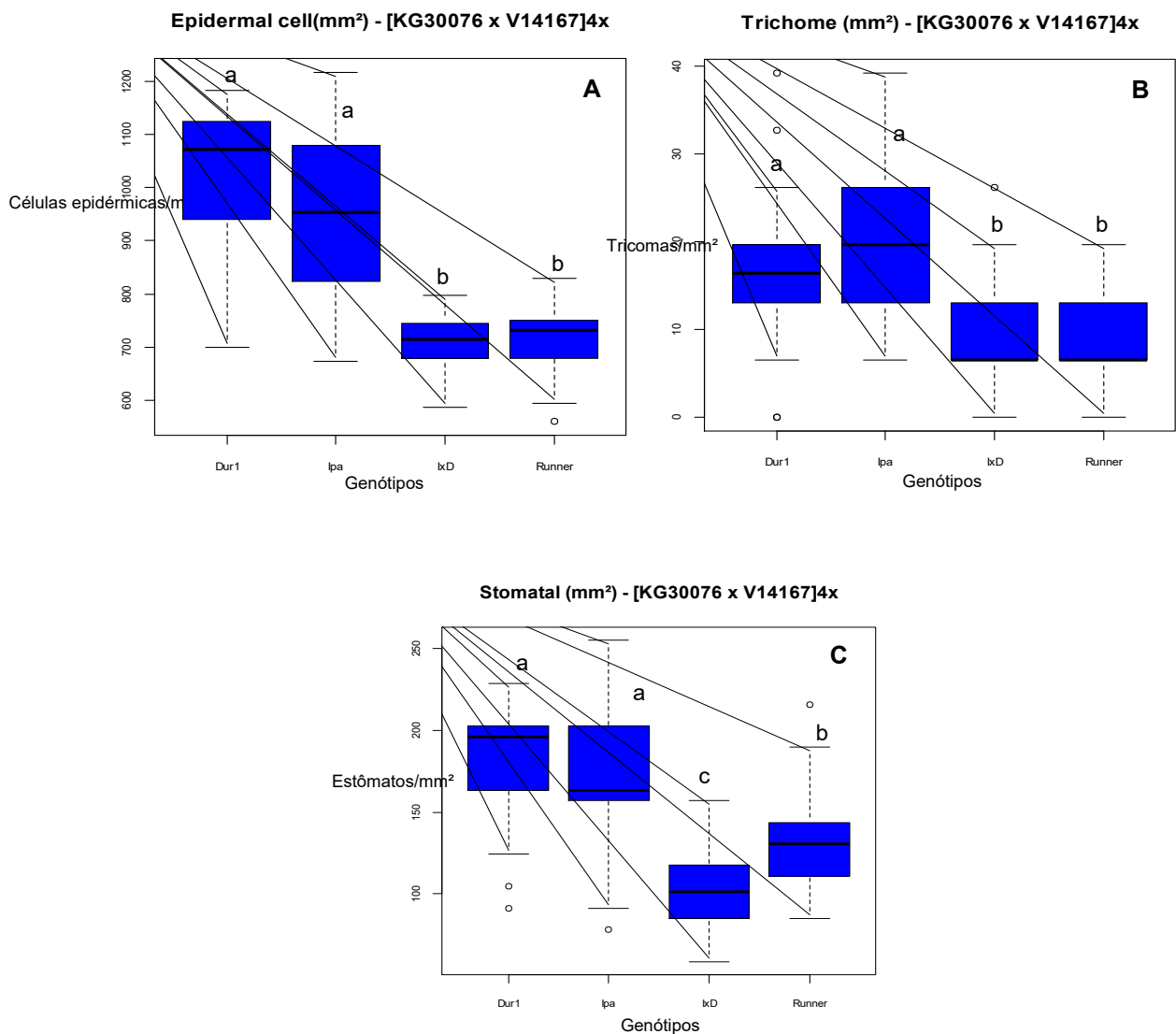


Figura 13. Gráficos em Box Plot para características morfológicas foliares na superfície abaxial do conjunto IpaDur1: sintético IpaDur1 (IxD) - [K30076 x V14167]<sup>4x</sup>, parentais – *A. ipaënsis* (Ipa), *A. duranensis* (Dur) e cultivar Runner IAC-886 (Runner). (A) Densidade de células epidérmicas (número de células/mm<sup>2</sup>), (B) densidade de tricomas (número de tricomas/mm<sup>2</sup>) e (C) Densidade estomática (número de estômatos/mm<sup>2</sup>).

O Coeficiente Silhouette baseia-se na ideia de quanto um objeto é similar aos demais membros do seu grupo, e de quanto este mesmo objeto é distante de outro grupo. Nesse sentido, a clusterização para caracteres abaxiais confirmou os resultados vistos anteriormente. Como exemplo, o sintético IpaDur1 [KG30076 x V14167]<sup>4x</sup>, prováveis parentais do amendoim, mostra a tendência observada para todos os conjuntos. Formação de dois grupos relacionados com o nível de ploidia: diploides (parentais) e tetraploides (híbridos) (Figura 14).

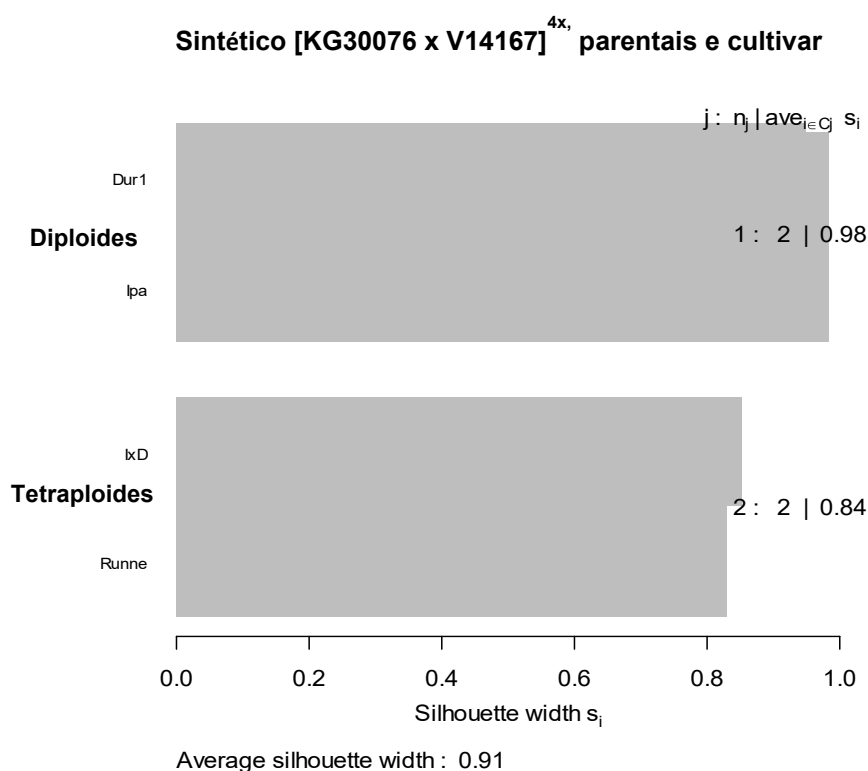


Figura 14. Agrupamento para o conjunto IpaDur1, com tetraploide sintético - (IxD) [KG30076 x V14167]<sup>4x</sup>, parentais diploides – *A. duranensis* (Dur1), *A. ipaënsis* (Ipa) e cultivar – Runner IAC-886 (Runner), pelo método de clusterização por Silhouette para todas as características avaliadas na face abaxial. Comprimento de estômatos (Comp), Índice Estomático (IE), Densidade de estômatos (Est.mm<sup>2</sup>), Densidade de células epidérmicas (Cel.mm<sup>2</sup>) e Densidade de tricomas (Tric.mm<sup>2</sup>). Com coeficiente de 0.91.

Dentre as diferenças observadas na morfologia de estruturas foliares entre diploides silvestres, tetraploides sintéticos e as cultivares estudadas, os tetraploides sintéticos foram mais semelhantes aos cultivados, ambos com genomas tetraploides. De acordo com a análise de componentes principais (PCA), todas as características analisadas na face abaxial para o conjunto IpaDur1 (Figura 15), separaram os genótipos em dois grupos relacionados ao nível de ploidia. Essas análises se aplicam aos demais conjuntos estudados.

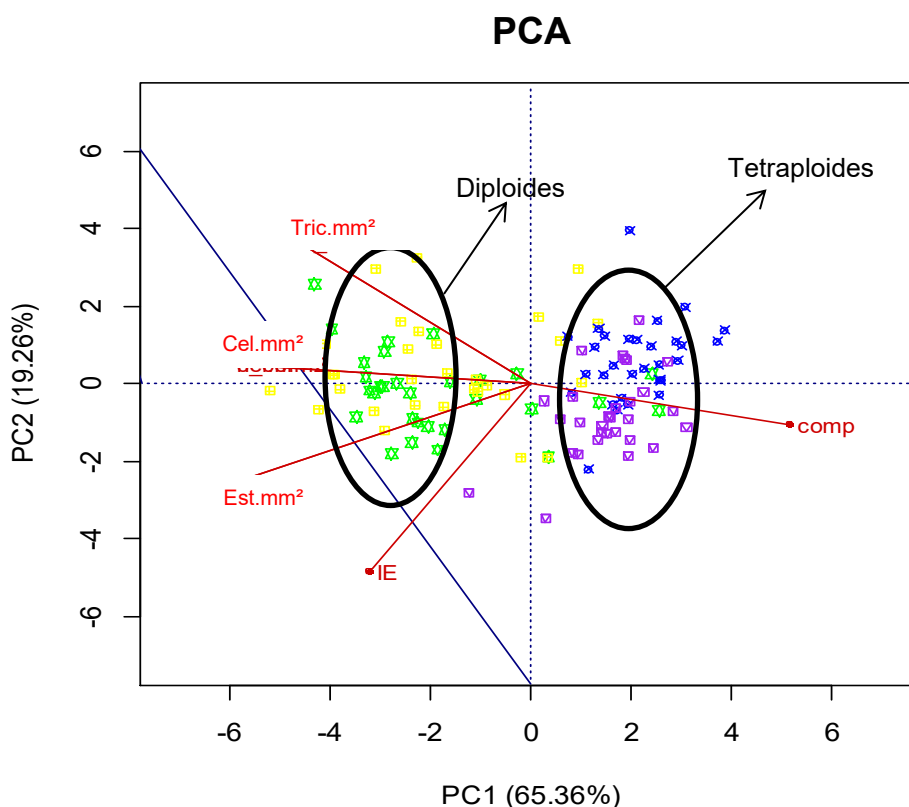


Figura 15. Análises de Componentes Principais (PCA) para diploides e tetraploides do conjunto IpaDur1 (Ipa-K30076, Dur-V14167, IpaDur1, Ah-Runner e Ah-Tatu), com todas as características estudadas na superfície abaxial foliar: Comprimento de estômatos (Comp), Índice Estomático (IE), Densidade de estômatos (Est.mm<sup>2</sup>), Densidade de células epidérmicas (Cel.mm<sup>2</sup>) e Densidade de tricomas (Tric.mm<sup>2</sup>). Os genótipos silvestres estão identificados nas cores verde e amarelo e tetraploides sintéticos nas cores azul e roxo.

Para os caracteres morfológicos na face adaxial dos folíolos, também se aplicou análise estatística multivariada, pela análise dos componentes principais (PCA). Foi possível identificar os genótipos silvestres, cultivares e tetraploides sintéticos, bem como separá-los de acordo com o nível de ploidia (tetraploides e diploides) com base em padrões específicos de variabilidade, contribuindo com a identificação da divergência genética contida nos genótipos, que tiveram 84% da variação total explicada pelos componentes principais (Figura 16).

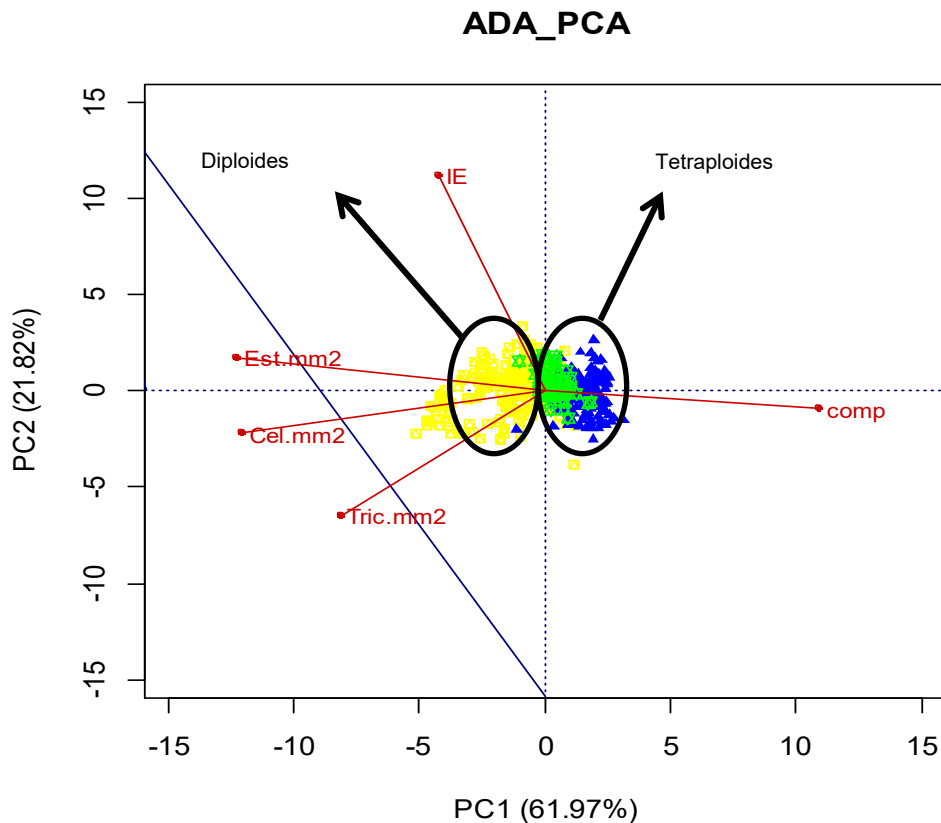


Figura 16. Análises de Componentes Principais (PCA) para diploides e tetraploides do conjunto IpaDur1 (Ipa-K30076, Dur-V14167, IpaDur1, Ah-Runner e Ah-Tatu), com todas as características estudadas na superfície adaxial foliar: Comprimento de estômatos (Comp), Índice Estomático (IE), Densidade de estômatos (Est.mm<sup>2</sup>), Densidade de células epidérmicas (Cel.mm<sup>2</sup>) e Densidade de tricomas (Tric.mm<sup>2</sup>). Os tetraploides sintéticos estão identificados pela cor azul, cultivares pela cor verde (ambos tetraploides) e silvestres pela cor amarela (diploides).

Para as análises realizadas na face adaxial (PCA e Kruskal-Wallis), houve uma tendência de agrupamento por nível de ploidia, como observada na face abaxial, mas também uma tendência para o tipo do genótipo: silvestre, cultivar e sintético. Além disso, percebemos que para a densidade das estruturas foliares, células epidérmicas e tricomas, a incidência na superfície adaxial foi muito menor que na superfície abaxial (Figuras 17A e 17B), exceto para densidade estomática (DE), a qual foi maior na face adaxial para todos os genótipos, com exceção de IpaDur1, Ipa-K30076 e Villo-V12812 (Figura 17C).

Para a densidade de tricomas, as espécies *A. villosa* e *A. stenosperma*, acessos Villo-V12812 e Sten-V10309, respectivamente, foram as que apresentaram maior número de tricomas em ambas as superfícies foliares (Figura 17B). Considerando que essa estrutura está diretamente relacionada com alguns estresses, Gonzáles et al. (2008) apontam que fatores como seca e herbivorismo afetam diretamente o aumento da densidade de tricomas foliares.

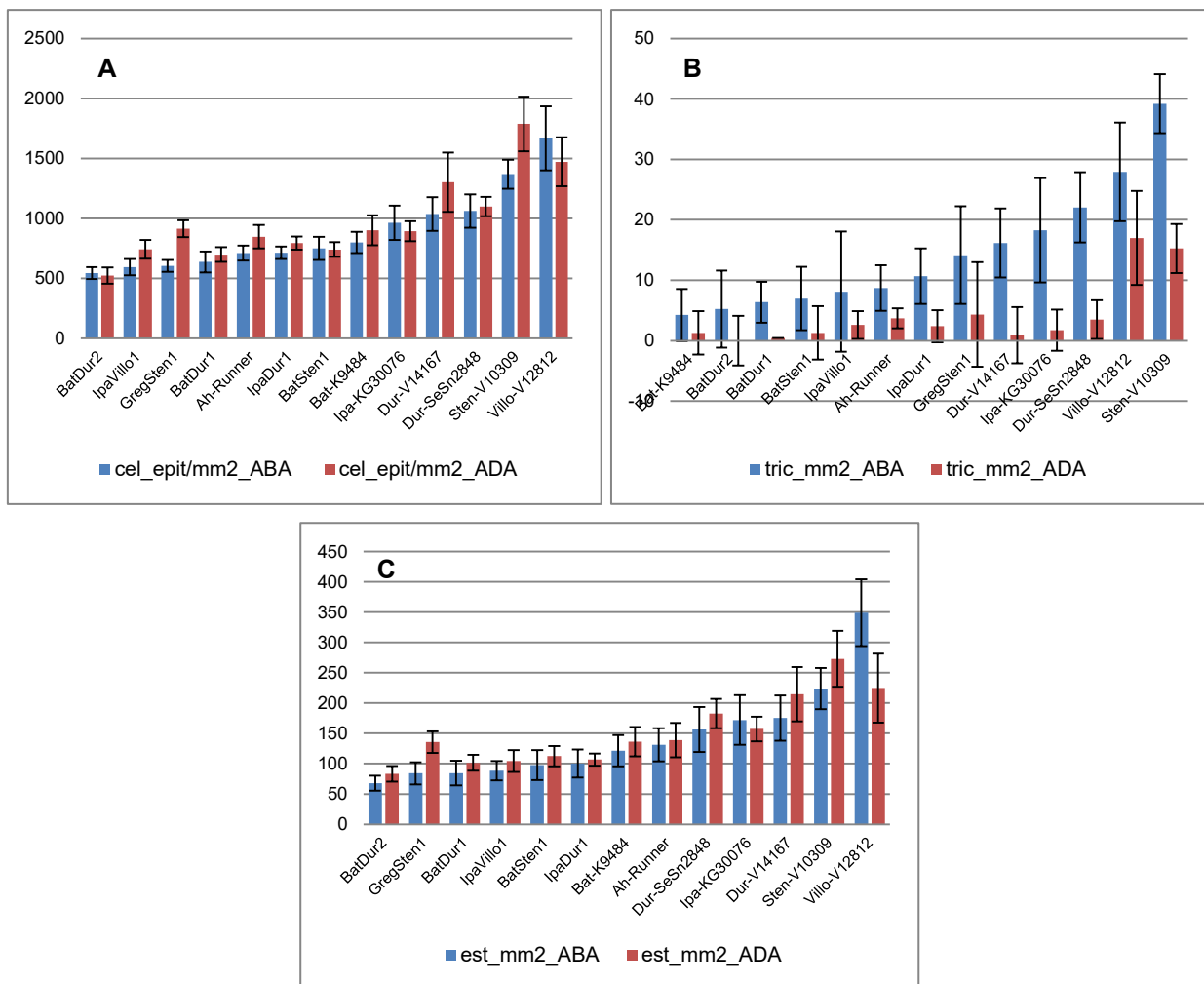


Figura 17. Comparação de densidades de células epidérmicas (A) de tricomas (B) e estomáticas (C) entre as superfícies abaxial e adaxial.

Para o índice estomático (IE), não foi possível observar nenhuma formação nítida de grupos, pois houve pouca variação entre os genótipos (silvestre, cultivar e sintético) sem nenhuma correlação com o efeito da tetraploidização, com exceção de IpaDur1, que teve o IE reduzido. Mas podemos destacar que, para essa variável, os sintéticos apresentaram os menores valores entre os tipos de genótipos estudados.

### SCMR (leitura do teor de clorofila) e SLA (área foliar específica)

Quando analisados de acordo com o tipo do genótipo – silvestre, sintético e cultivar, os valores de SCMR para os sintéticos em todos os casos foram maiores que qualquer um dos parentais (Figuras 18 e 20), ficando de maneira geral mais próximos dos cultivados,



enquanto que para os diploides silvestres, os valores foram menores. No entanto, para a área foliar específica (SLA) não houve variação estatística quando avaliados pelo tipo de genótipo – cultivar, sintético e silvestre (Figura 18), bem como, de maneira geral, quando avaliados em conjuntos (parentais, sintético e cultivar) (Figura 19).

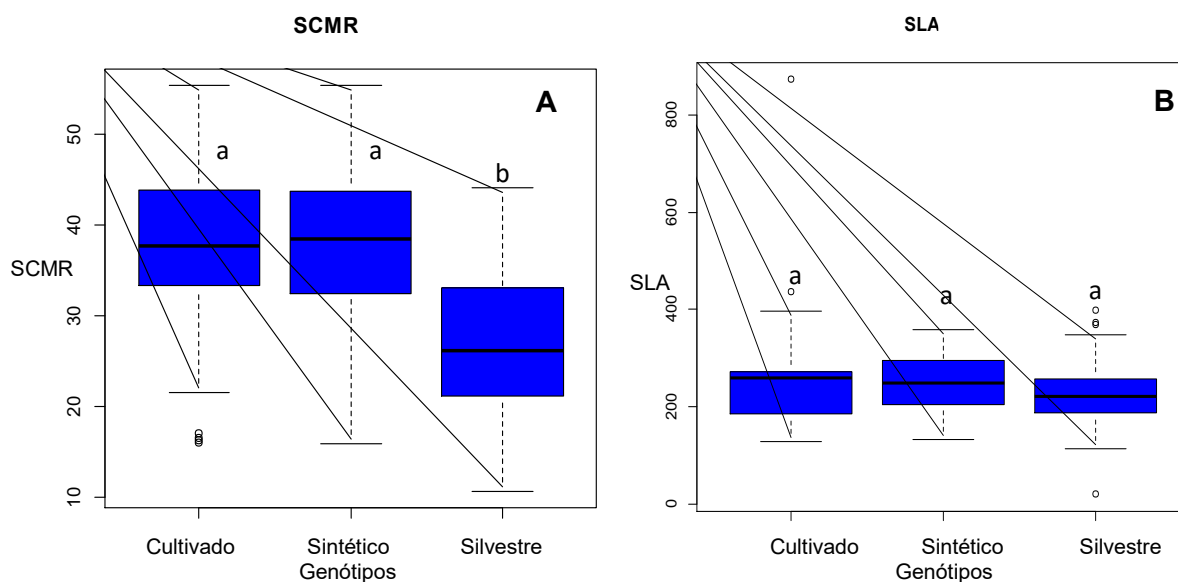


Figura 18. Variação do teor de clorofila (SCMR) (A) e área foliar específica (SLA) (B) nas diferentes classes (cultivares, sintéticos e silvestres) de genótipos de *Arachis* spp analisados.

Quando analisados esses grupos separadamente, dentre os conjuntos formados - parentais, sintéticos e cultivares, os genótipos mostraram diferenças significativas para valores obtidos para SCMR e alguns para SLA após o processo de tetraploidização.

Para os valores de SLA, os diploides variaram entre: Ipa  $193,36 \pm 26,92b$  e Bat  $286,88 \pm 63,38a$ , cultivados: Runner  $228,50 \pm 41,15a$  e BR1  $352,88 \pm 232,13ab$ , e tetraploides sintéticos: BatSten1  $185,22 \pm 61,79ab$  e BatDur1  $303,00 \pm 38,8a$ . A alta variabilidade dos dados não permite uma boa discriminação de médias, mas os tetraploides sintéticos não parecem mostrar diferenças significativas entre um dos parentais diploides (Tabela 1/anexo).

Para os conjuntos dos sintéticos BatDur2, BatDur1 e GregSten1, não houve diferença significativa entre os genótipos para análises de SLA (Figuras 19A, B e E). Para os demais conjuntos, foram observadas diferenças significativas entre os genótipos (Figura 19C, D e F). Para o conjunto IpaDur1, o sintético não apresentou nenhuma similaridade estatística com o parental materno Ipa-K30076, mas apresentou semelhança com seu parental masculino Dur1-V14167 e nenhuma diferença estatística com as cultivares Ah-Caiapó e Ah-Runner (Figuras 19D). Assim como no conjunto IpaVillo1, onde foi observada maior similaridade do sintético com parental masculino, Villo-V12812, além da cultivar Ah-Br1, mas sem diferença significativa com as cultivares Ah-Caiapó e Ah-Runner (Figuras



19F). Diferentemente dos demais sintéticos, no conjunto BatSten1, o sintético não apresentou nenhuma diferença estatística com o parental masculino, Sten-V10309, e apresentou similaridade tanto com o parental feminino, Bat-K9484-2, quanto com a cultivar Ah-Runner-2, não sobrepondo nenhum dos genótipos (Figura 19C).

A variação observada para SCMR mostrou que, de maneira geral, os sintéticos superaram seus parentais diploides, aproximando-se dos materiais cultivados. O valor de SCMR dos diploides variou entre  $20,73 \pm 3,63$  (Sten-V10309) e  $34,09 \pm 5,83$  (Bat-K9484) (Tabela 1/anexo), para os tetraploides sintéticos: entre  $31,79 \pm 4,79$  (IpaDur1) e  $43,47 \pm 6,27$  (BatDur2) (anexo), e para os cultivados:  $33,93 \pm 4,19$  (Ah-Tatu) e  $40,03 \pm 8,26$  (Ah-Caiapó) (Tabela 1/anexo).

Para as análises de SCMR, no conjunto BatDur1, o alotetraploide sintético diferiu dos demais genótipos, porém, com semelhança estatística entre as cultivares Ah-BR1 e Ah-Runner (Figura 20A). Para o conjunto BatDur2, o alotetraploide sintético foi estatisticamente diferente de todos os genótipos, diferindo dos parentais (Bat-K9484 e Dur-SeSn2848) e cultivares (Figura 20B), bem como para o conjunto BatSten1, no qual o sintético diferiu de todos os genótipos, superando estatisticamente seus parentais (Figura 20C). Para GregSten1, a variação de SCMR, mostrou que o sintético diferiu significativamente dos parentais (ambos, Greg-V6389 e Sten-V10309, sem nenhuma diferença entre eles), porém foi similar à cultivar Ah-Caiapó (Figura 20D). Assim como no conjunto IpaVillo1, onde o sintético foi estatisticamente diferente dos parentais e estatisticamente similar a cultivar Ah-Caiapó (Figura 20F). Para IpaDur1, a análise de SCMR mostrou que o alotetraploide sintético diferiu dos seus parentais (ambos semelhantes entre si), com similaridade apenas com a cultivar Ah-Tatu (Figura 20E).

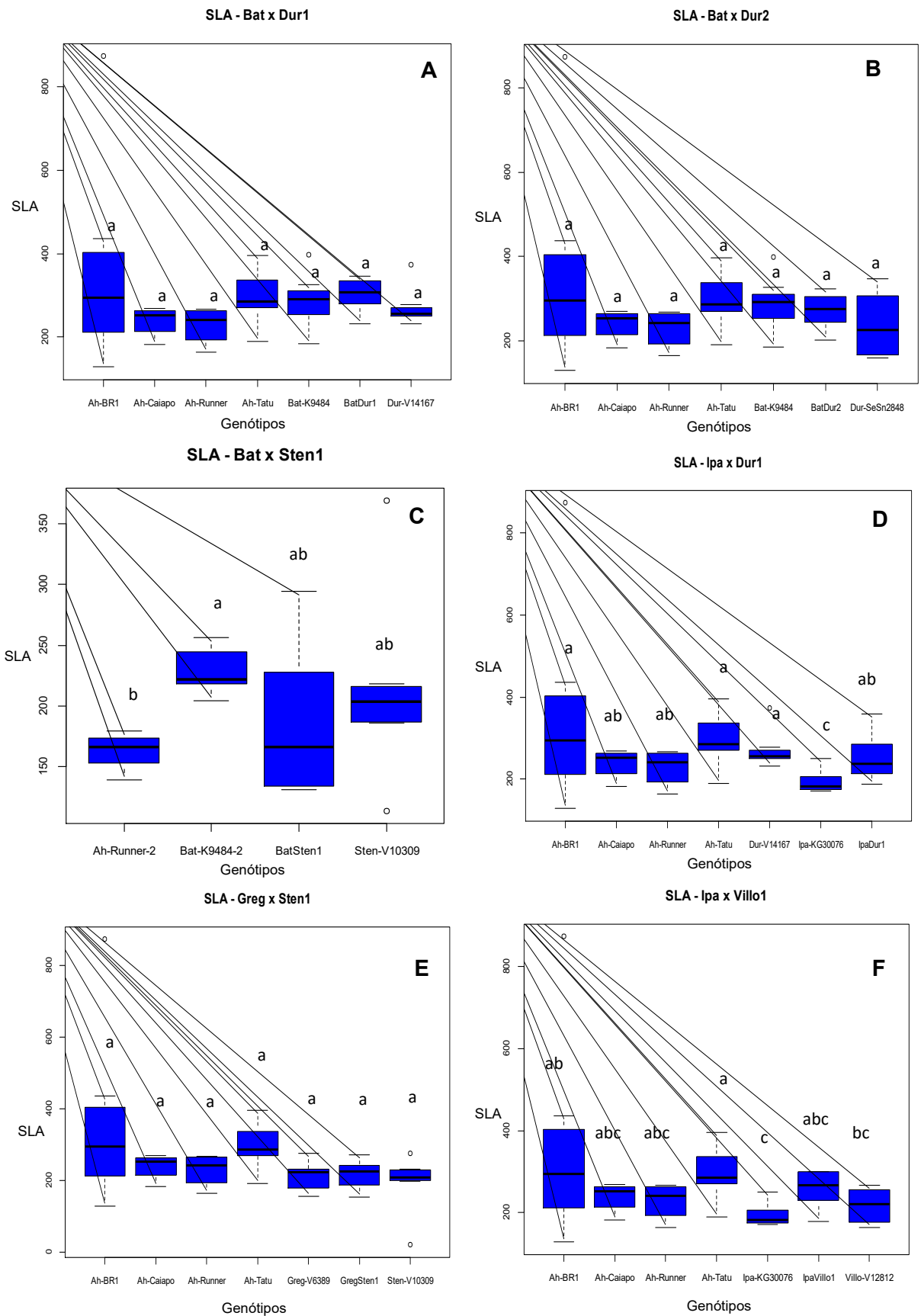


Figura 19. Gráficos em Box Plot para a variável área foliar específica (SLA) para os seis conjuntos de tetraploides sintéticos de *Arachis*. A) conjunto BatDur1 (sintético – BatDur1, parentais – Bat-K9484,

Dur-V14167 e cultivares); B) BatDur2 (sintético – BatDur2, parentais – Kat-K9484, Dur-SeSn2848 e cultivares); C) conjunto BatSten1 (sintético - BatSten1, parentais – Bat-K9484, Sten-V10309 e cultivares); D) conjunto GregSten1 (sintético – GregSten1, parentais – Greg-V6389, Sten-V10309 e cultivares); E) conjunto IpaDur1 (sintético – IpaDur1, parentais – Ipa-K30076, Dur-V14167 e cultivares); F) conjunto IpaVillo1 (sintético - IpaVillo1, parentais – Ipa-K30076, Villo-V12812 e cultivares). Para todos os conjuntos, as cultivares utilizadas como controles foram: Ah-BR1, Ah-Caiapó, Ah-Runner e AH-Tatu.

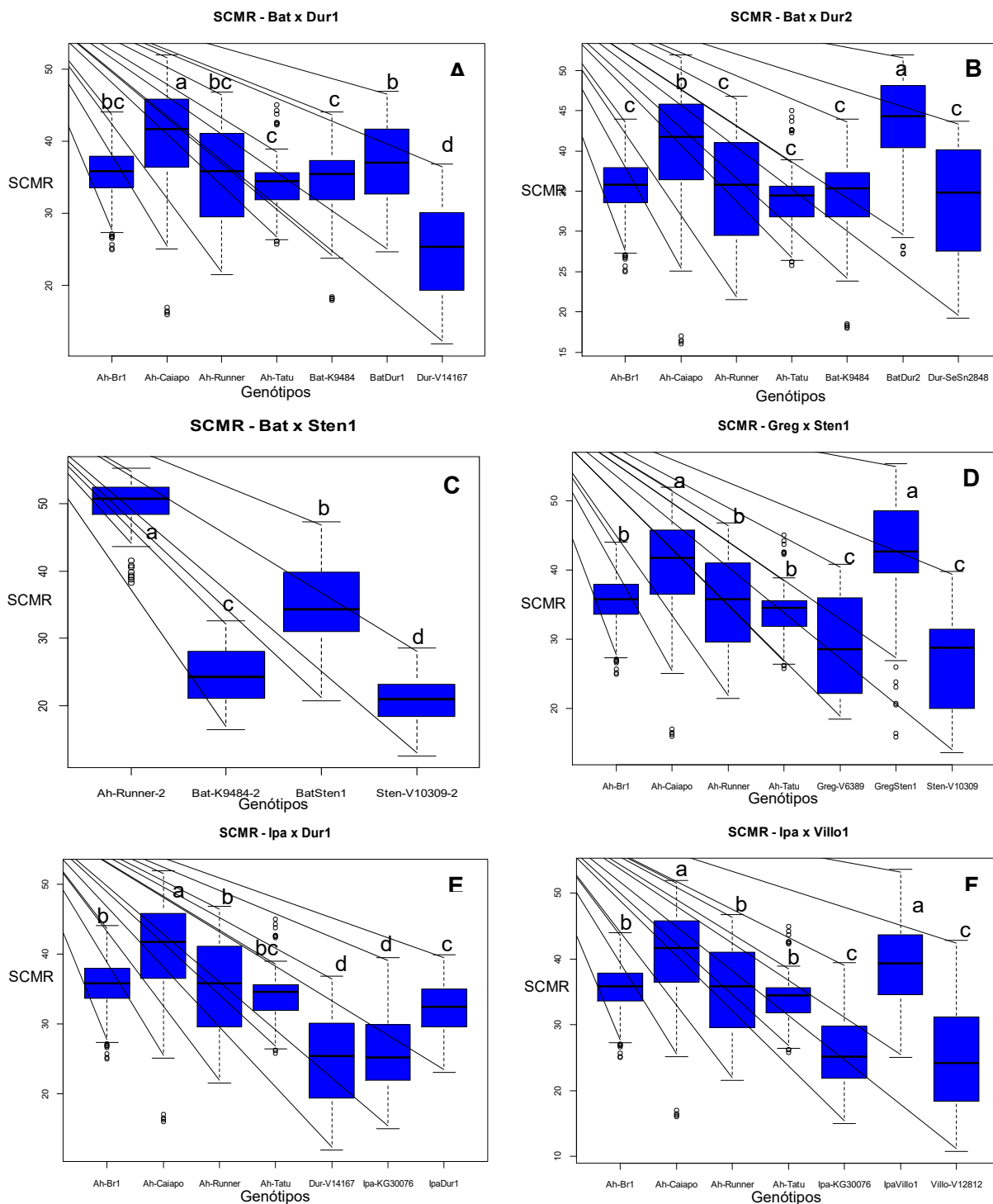


Figura 20. Gráficos em BoxPlot para a variável leitura do teor de clorofila (SCMR) para os seis conjuntos de tetraploides sintéticos de *Arachis*. A) conjunto BatDur1 (sintético – BatDur1, parentais –

Bat-K9484, Dur-V14167 e cultivares); B) BatDur2 (sintético – BatDur2, parentais – Kat-K9484, Dur-SeSn2848 e cultivares); C) conjunto BatSten1 (sintético - BatSten1, parentais – Bat-K9484, Sten-V10309 e cultivares); D) conjunto GregSten1 (sintético – GregSten1, parentais – Greg-V6389, Sten-V10309 e cultivares); E) conjunto IpaDur1 (sintético – IpaDur1, parentais – Ipa-K30076, Dur-V14167 e cultivares); F) conjunto IpaVillo1 (sintético - IpaVillo1, parentais – Ipa-K30076, Villo-V12812 e cultivares). Para todos os conjuntos, as cultivares utilizadas como controles foram: Ah-BR1, Ah-Caiapó, Ah-Runner e AH-Tatu.

Especialmente para os conjuntos BatSten1, IpaDur1 e IpaVillo1, quando comparados os valores de SCMR e SLA, percebe-se uma tendência inversamente proporcional entre as análises. Enquanto aumenta a leitura de clorofila pelo método SCMR, diminui a área foliar específica, nos mesmos genótipos (Figura 21).

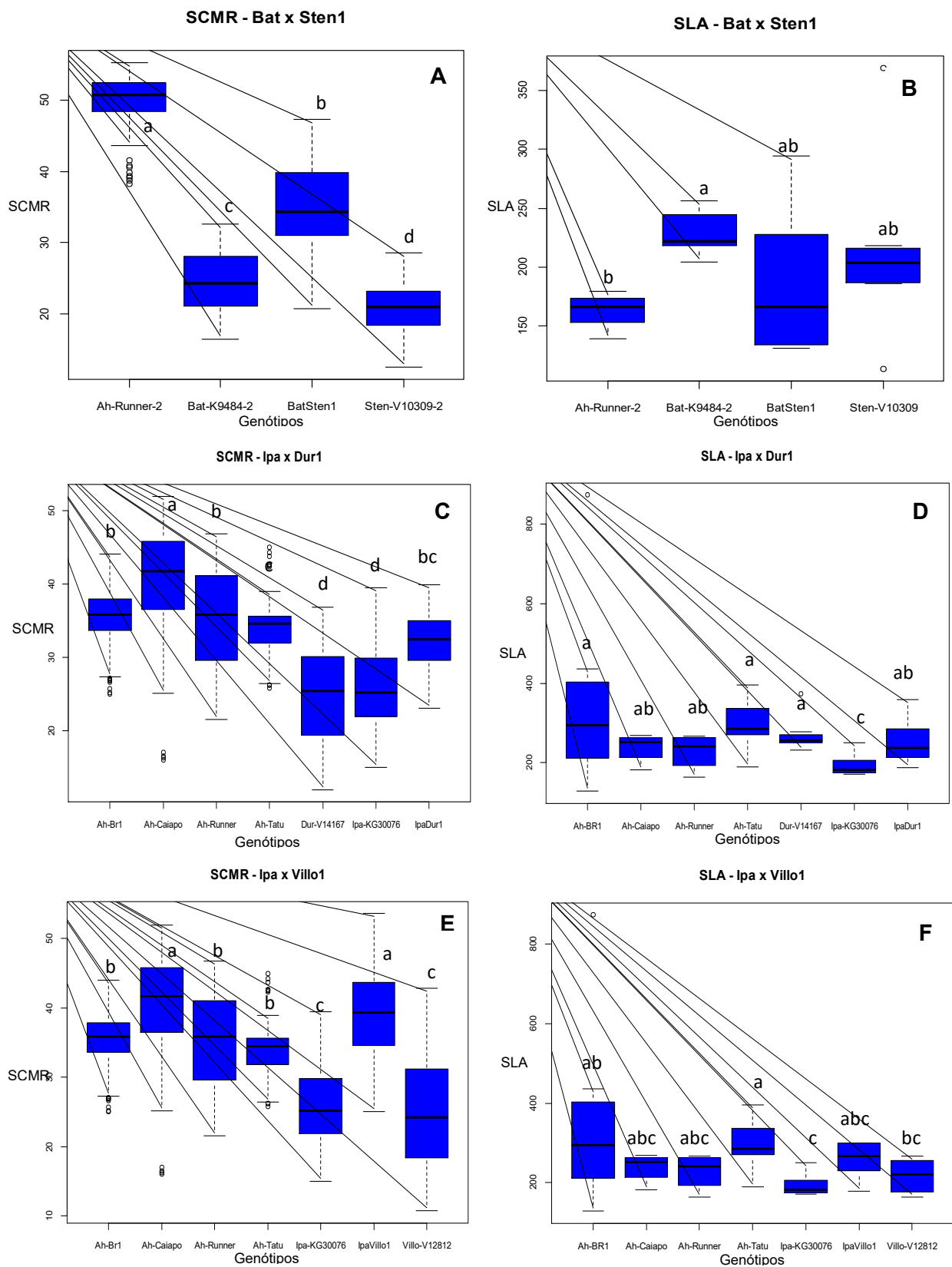


Figura 21. Comparação entre leitura do teor de clorofila (SCMR) e área foliar específica (SLA) dos conjuntos de tetraploides sintéticos que apresentaram variação nos valores para SLA. Conjunto BatSten1 (sintético - BatSten1, parentais – Bat-K9484, Sten-V10309 e cultivares) (A e B); conjunto IpaDur1 (sintético – IpaDur1, parentais – Ipa-K30076, Dur-V14167 e cultivares) (C e D) e conjunto

IpaVillo1 (sintético - IpaVillo1, parentais – Ipa-K30076, Villo-V12812 e cultivares). Para todos os conjuntos, as cultivares utilizadas como controles foram: Ah-BR1, Ah-Caiapó, Ah-Runner e AH-Tatu.

Quando a análise em boxplot é feita comparando sintéticos e cultivares (ambos alotetraploides), o sintético BatSten1 não apresentou nenhuma diferença estatística com as cultivares Ah-Br1 e Ah-Runner. Já GregSten1, BatDur1 e BatDur2 apresentaram semelhanças com as cultivares, e IpaDur1 diferiu de todos os genótipos (Figura 22) apresentando os menores valores.

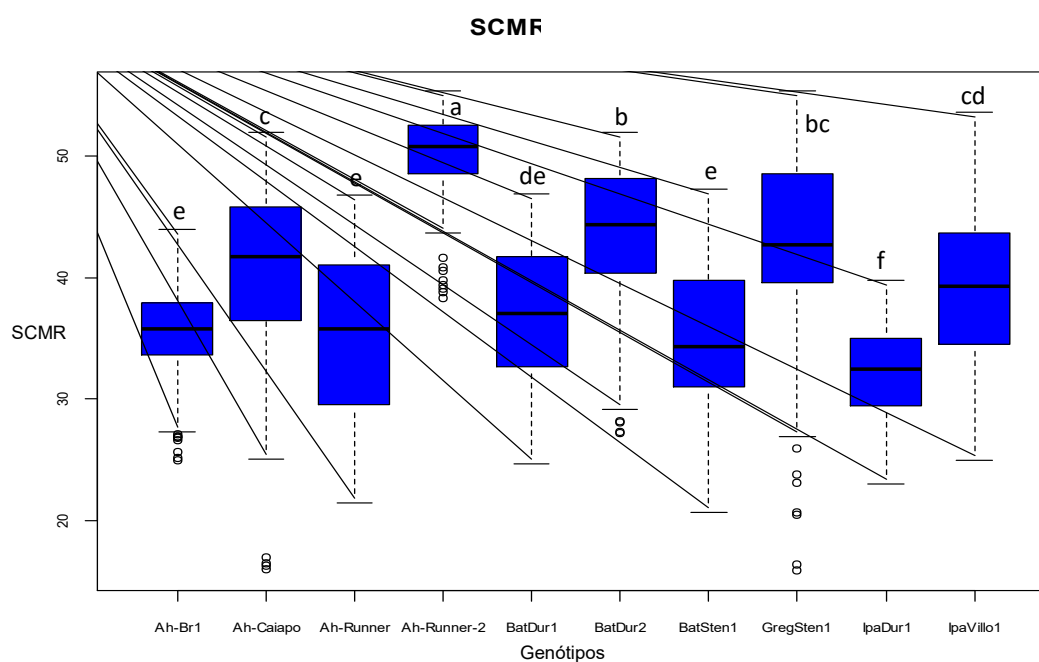


Figura 22. Comparação para a leitura do teor de clorofila (SCMR) entre todos os tetraploides sintéticos de *Arachis* (BatDur1, BatDur2, GregSten1, IpaDur1 e IpaVillo1) e cultivares de amendoim (Ah-BR1, Ah-Caiapó, Ah-Runner e Ah-Runner-1) utilizadas no experimento.

### Medidas de pigmentos foliares

Os alotetraploides sintéticos apresentaram valores maiores de pigmentos foliares que os cultivados e seus parentais diploides (Figuras 23A-C). Para o teor de carotenoides, foi observada uma semelhança entre sintéticos, cultivados e silvestres (Figura 23D).

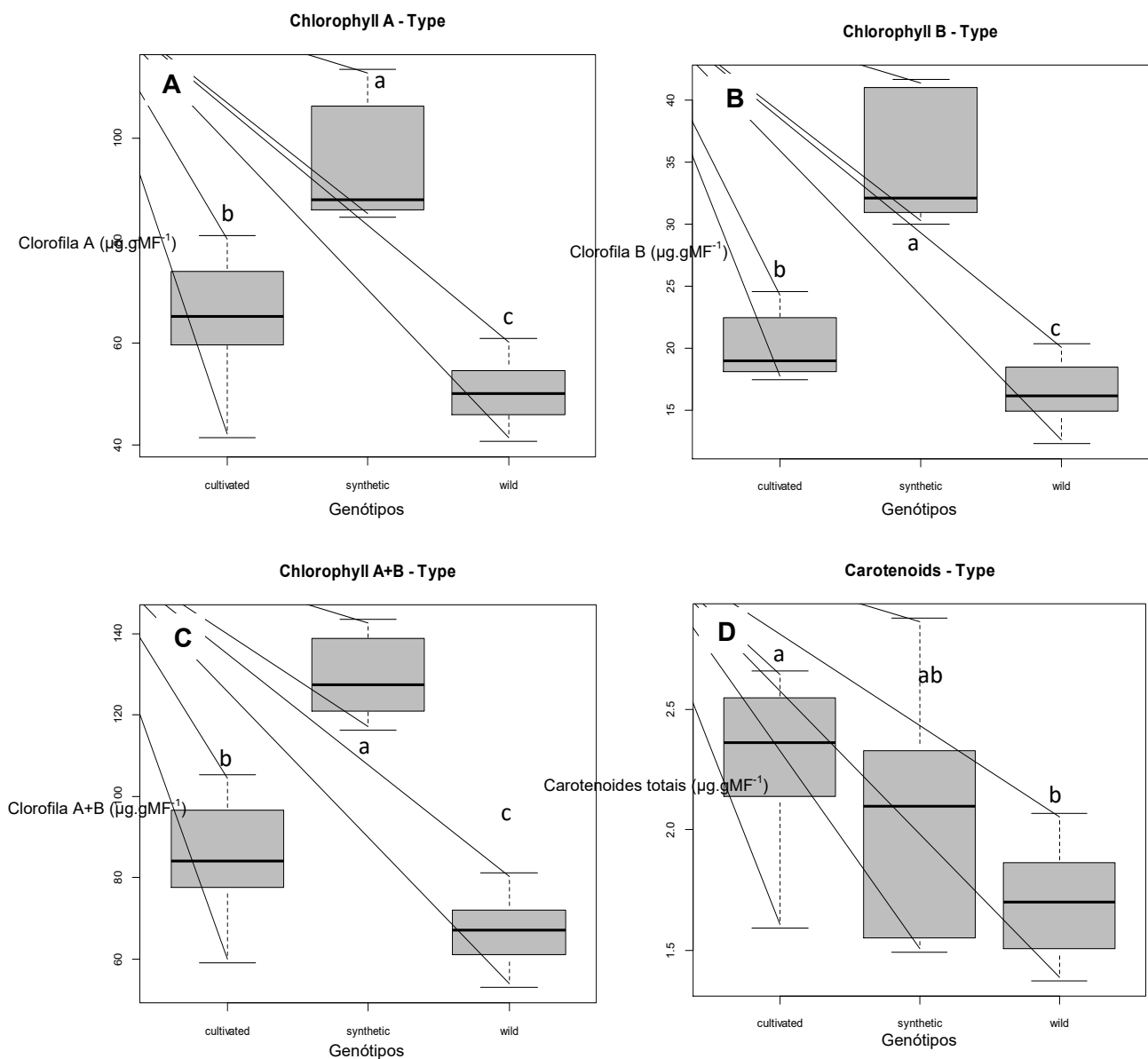


Figura 23. Comparação do teor de pigmentos fotossintéticos pelo método extrativo entre os tipos de genótipos de *Arachis* estudados – cultivados, sintéticos e silvestres. Teor de clorofila a (A), teor de clorofila b (B), teor de clorofila total a+b (C) e teor de carotenoides totais – xantofilas e β-caroteno (D) em µg.gMF<sup>-1</sup>.

Todos os alotetraploides testados, BatDur1, GregSten1, IpaDur1 e IpaVillo1 apresentaram significativamente mais clorofila a, clorofila b e carotenoides por área foliar do que seus respectivos parentais diploides, comparáveis com os valores dos genótipos cultivados ( $P \leq 0,05$ ), como observado para o conjunto IpaDur1, no qual o comportamento se repete para os demais tetraploides sintéticos (Figura 24). Com aumento mínimo de 24,5% do sintético IpaDur1 em relação a cultivar Ah-Runner e máxima de 103,77% em relação ao parental Dur1, o conteúdo de clorofila a aumentou mais que clorofila b e carotenoides.

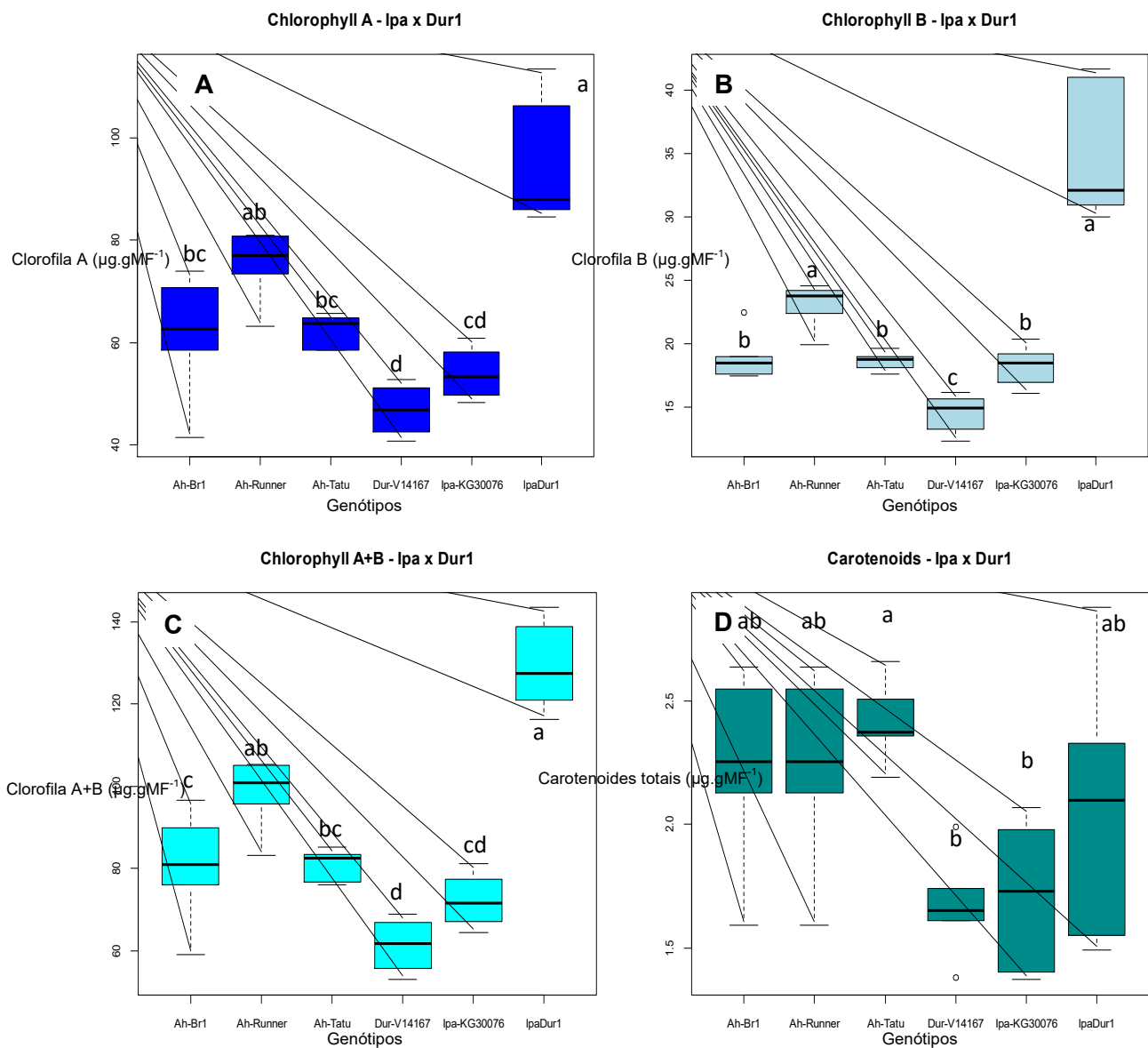


Figura 24. Teor de pigmentos fotsossintéticos para o conjunto IpaDur1 (sintético – IpaDur1, parentais diploides - Ipa-K30076, Dur1-V14167 e cultivares controles - *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* cv BR1, *A. hypogaea* subsp. *hypogaea* cv Runner-IAC 886, e *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* cv IAC-Tatu). Teor de clorofila a (A), teor de clorofila b (B), teor de clorofila total a+b (C) e teor de carotenoides totais (D).

Quando a análise é feita em nível de conjuntos, BatDur1, GregSten1, IpaDur1 e IpaVillo1 foram muito semelhantes e em alguns casos, sem nenhuma diferença estatística dos cultivados, superando seus parentais. Porém, observa-se que para o conjunto BatSten1, o sintético teve valores muito abaixo dos outros tetraploides, distanciando-se dos demais, apesar do mesmo nível de ploidia, inclusive, de seus parentais diploides (Figura 25).

Para o teor de clorofila A, os sintéticos BatDur1, GregSten1, IpaDur1 e IpaVillo1 se destacam por apresentar valores muito similares aos materiais cultivados, diferindo



estatisticamente de seus parentais silvestres (Figura 26). Dentre os controles, os genótipos da cultivar *A. hypogaea* subsp. *hypogaea*, a cv Runner-IAC 886, foi o controle que obteve as maiores concentrações de clorofila a, superando as demais cultivares de *A. hypogaea* subsp. *hypogaea* (IAC-Caiapó) e *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* (BR-1 e IAC-Tatu).

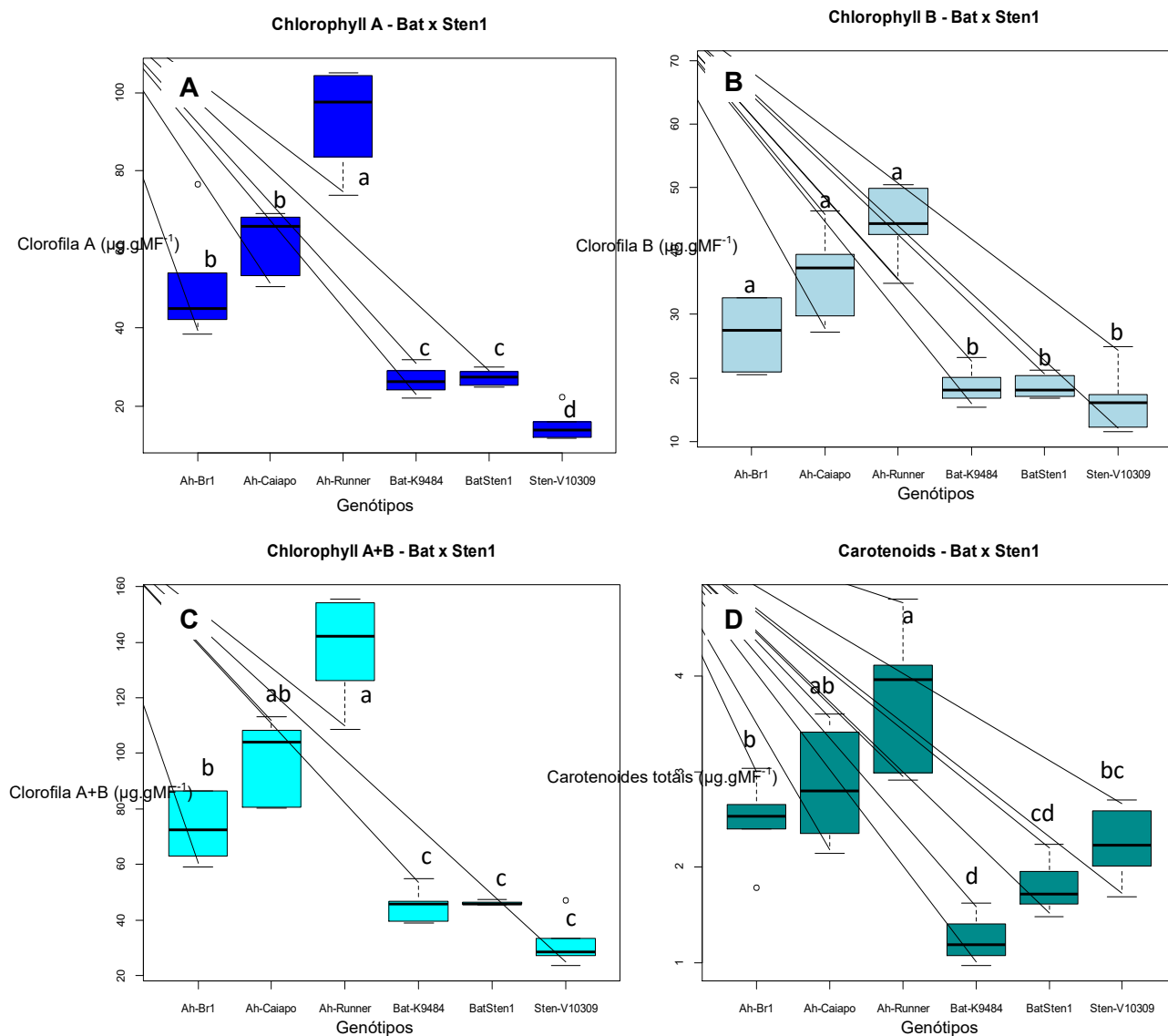


Figura 25. Boxplot para teor de Clorofila A (a), clorofila B (b), clorofila total (c) e carotenoides (d) para o conjunto BatSten1. Os controles foram *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* cv BR1, *A. hypogaea* subsp. *hypogaea* cv Runner-IAC 886, *A. hypogaea* subsp. *hypogaea* cv IAC-Caiapó e *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* cv IAC-Tatu.

Quando comparamos os valores para clorofila total e SCMR, percebemos uma tendência de alteração conjunta para os valores. No entanto, no conjunto BatSten1, para os valores de clorofila total, o tetraploide sintético não superou os parentais, ocorrendo uma sensível redução dos valores, fato não observado para SCMR e para os demais conjuntos (Figura 27).

Analisando de modo geral, todas as características relacionadas com fotossíntese, observou-se a formação de dois grandes grupos (tetraploides e diploides), seguindo a tendência observada em outras análises como no *heatmap* (Figura 28), especialmente para conteúdo de clorofila total (a+b) e área foliar total (TLA), que aumentaram de acordo com a ploidia, porém, sem variação para o conteúdo de carotenoides.

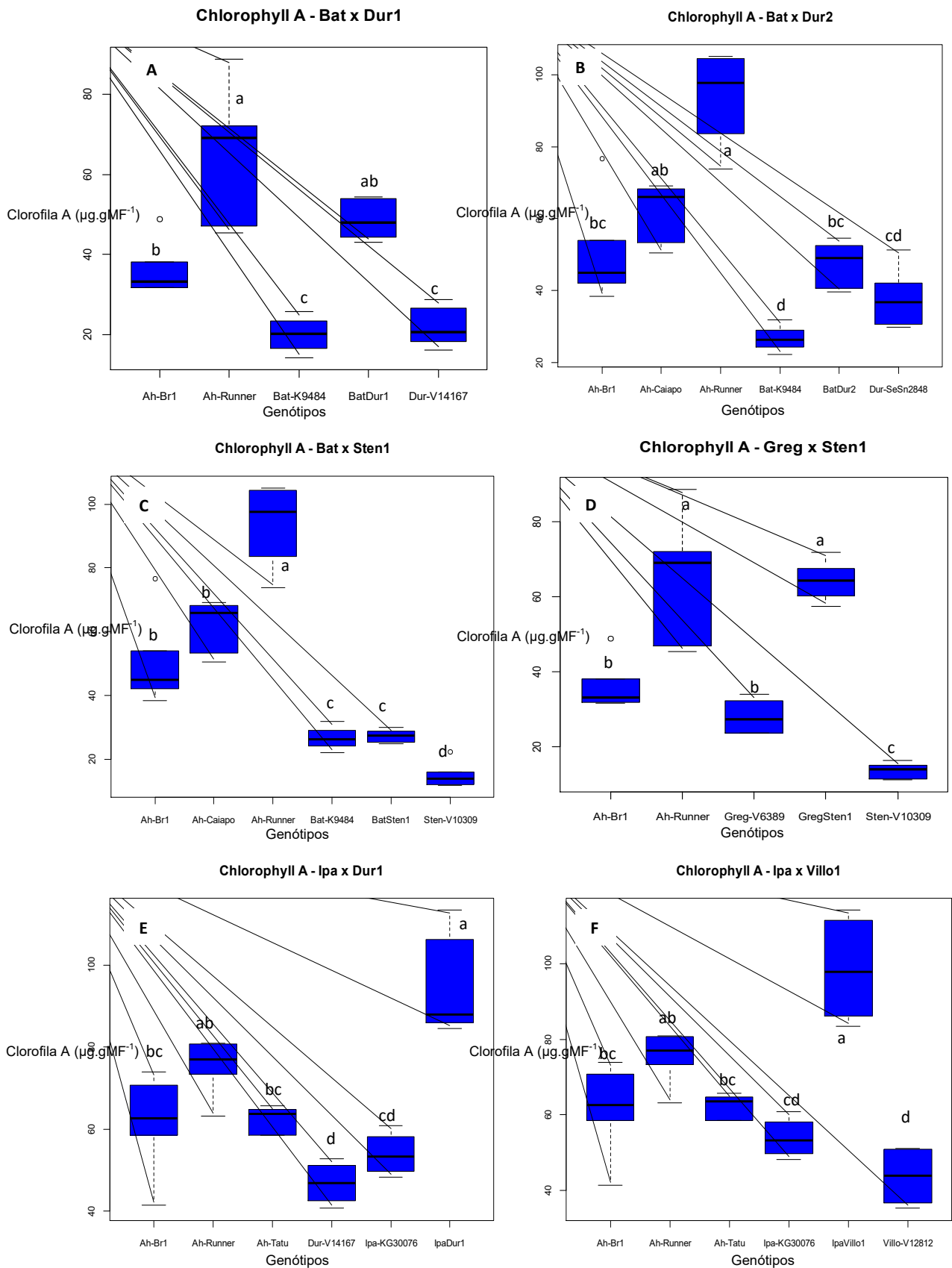


Figura 26. Boxplot para teor de Clorofila A, de todos os conjuntos dos tetraploides sintéticos. (A) BatDur1, (B) BatDur2, (C) Batsten1, (D) GregSten1, (E) IpaDur1 e (F) IpaVillo1. Os controles foram A.

*hypogaea* subsp. *fastigiata* cv BR1, *A. hypogaea* subsp. *hypogaea* cv Runner-IAC 886, *A. hypogaea* subsp. *hypogaea* cv IAC-Caiapó e *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* cv IAC-Tatu.

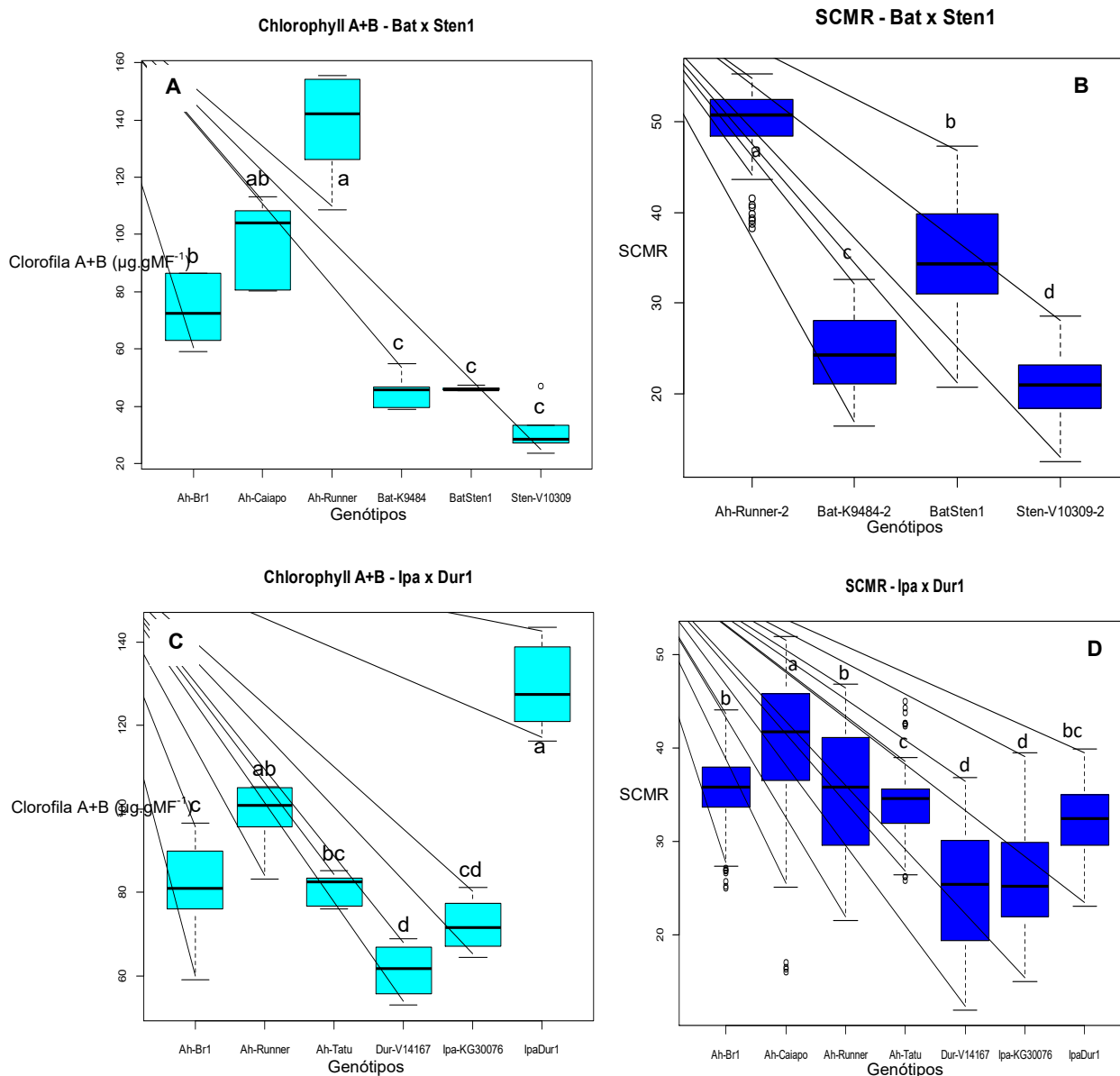


Figura 27. Comparação entre os teores de Clorofila total (a+b) e SCMR para os conjuntos Batxsten1 e IpaDur1. (A) Conteúdo de clorofila total (a+b) para o conjunto BatSten1, (B) Leitura do teor de clorofila (SCMR) para o conjunto BatSten1; (C) Conteúdo de clorofila total (a+b) para o conjunto IpaDur1 e (D) Leitura do teor de clorofila (SCMR) para o conjunto IpaDur1. Os controles foram *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* cv BR1, *A. hypogaea* subsp. *hypogaea* cv Runner-IAC 886, *A. hypogaea* subsp. *hypogaea* cv IAC-Caiapó e *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* cv IAC-Tatu.

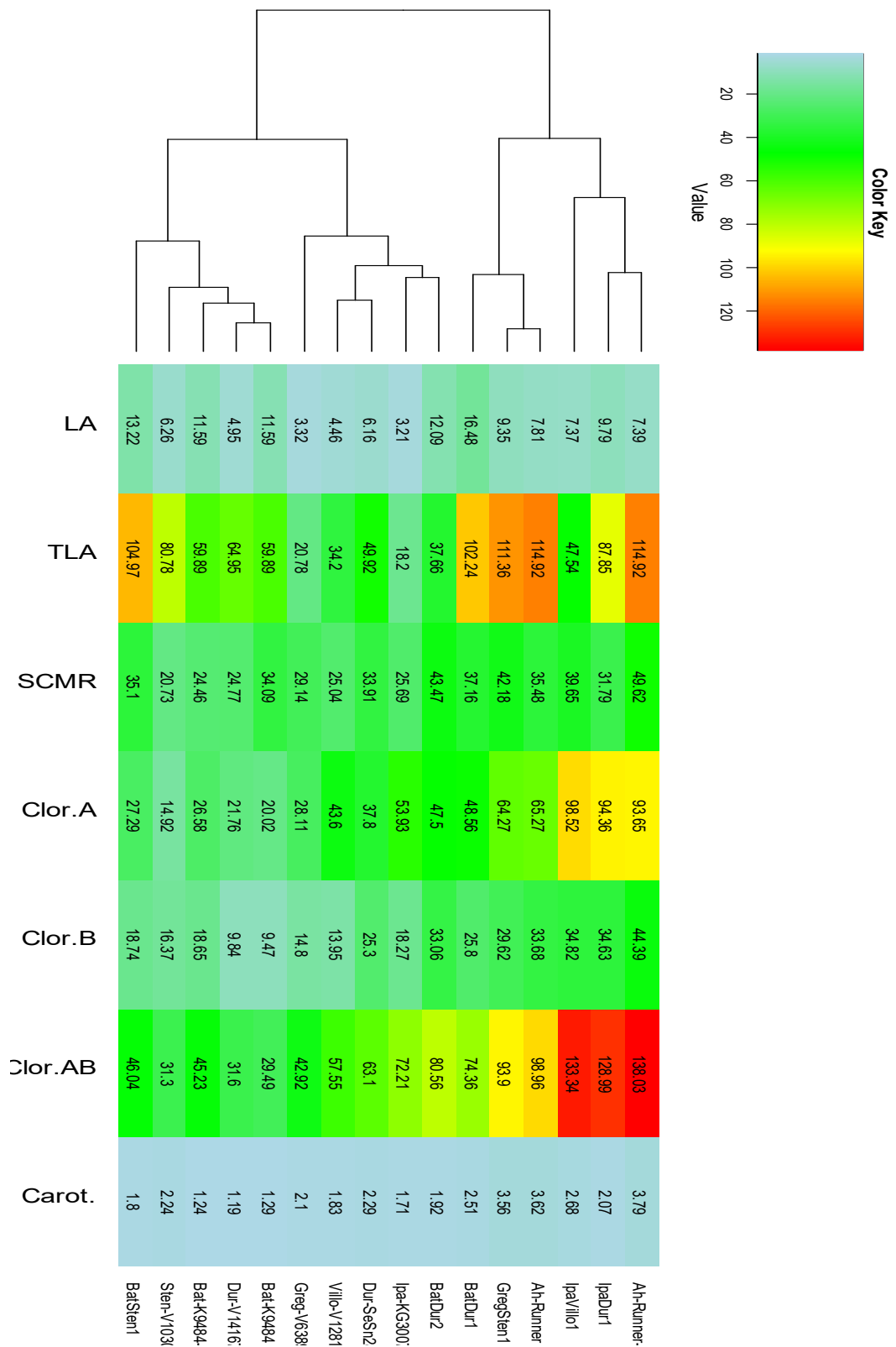


Figura 28. *Heatmap* gerado a partir de valores de clorofilas a, b, a+b, carotenoides, SCMR, área foliar e área foliar total para espécies silvestres diploides, cultivares e tetraploides sintéticos de *Arachis*. O controle utilizado foi *A. hypogaea subsp. hypogaea* cv Runner-IAC 886 com duas repetições provenientes de análises diferentes.

## Transpiração/área foliar (TR/AF)

A relação da taxa de transpiração (TR) pela área foliar (AF) para esses genótipos em condições de alto DPV foi utilizada como avaliação indireta da condutância estomática. Esse experimento mostrou diferenças quanto ao nível de ploidia. Durante o experimento, a temperatura variou entre 20°C e 44°C, umidade relativa (UR) de 94% a 24% e DPV entre 0,5 e 7,1KPa. A curva de transpiração dos genótipos de *Arachis* analisados mostrou que a razão TR/AF dos tetraploides sintéticos, tende a ser mais alta que a de seus parentais diploides (Figura 29).

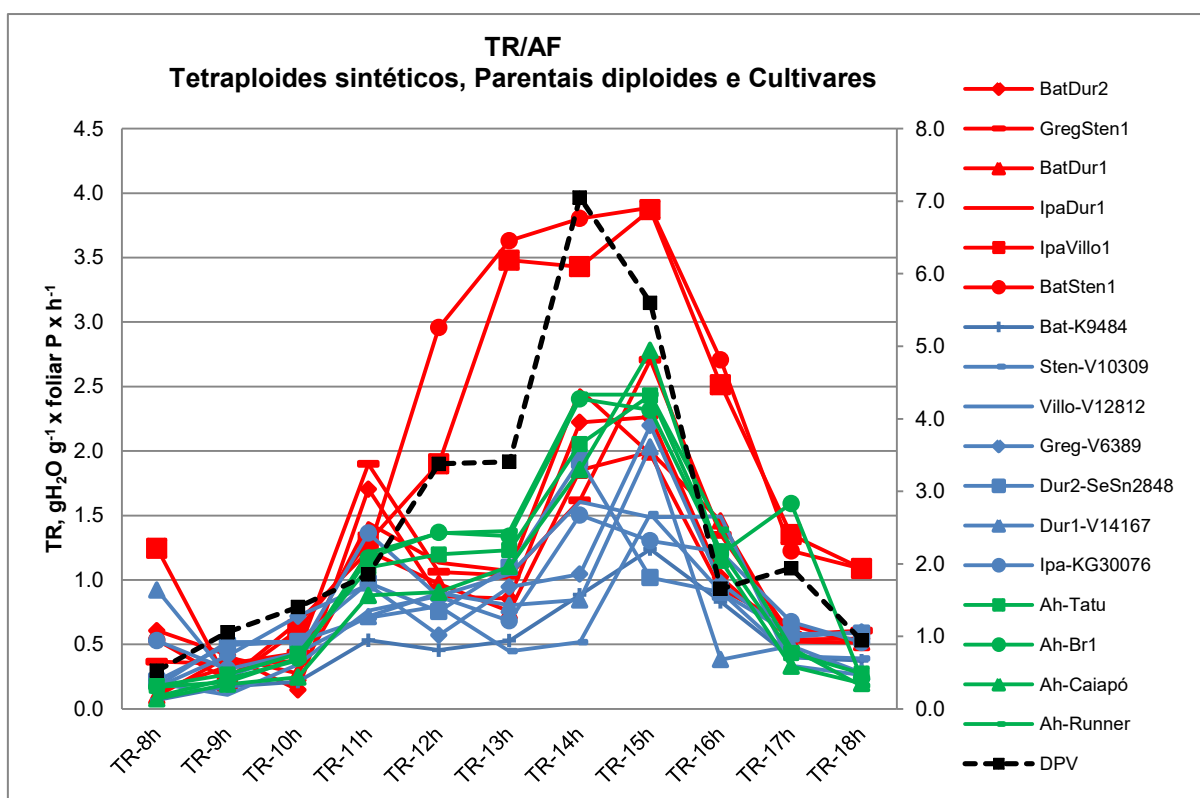


Figura 29. Curva de transpiração (TR) por área foliar (AF) – TR/AF dos genótipos de *Arachis* (tetraploides sintéticos – linha vermelha, parentais silvestres diploides – linha azul e cultivares de *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* e subsp. *hypogaea* – linha verde) analisados sob alto DPV – linha preta.

Quando o DPV foi maior que 1,9 KPa, a TR/AF dos sintéticos IpaVillo1 e BatSten1 superou a TR/AF dos materiais cultivados, sugerindo com isso, uma sensibilidade maior às condições de seca (maior DPV), com as maiores TR/AFs nos períodos mais quentes durante o experimento. As cultivares Ah-Tatu e Ah-Runner, e os demais sintéticos apresentaram comportamento semelhante, com TR/AF numa mesma faixa de variação (Figura 30).

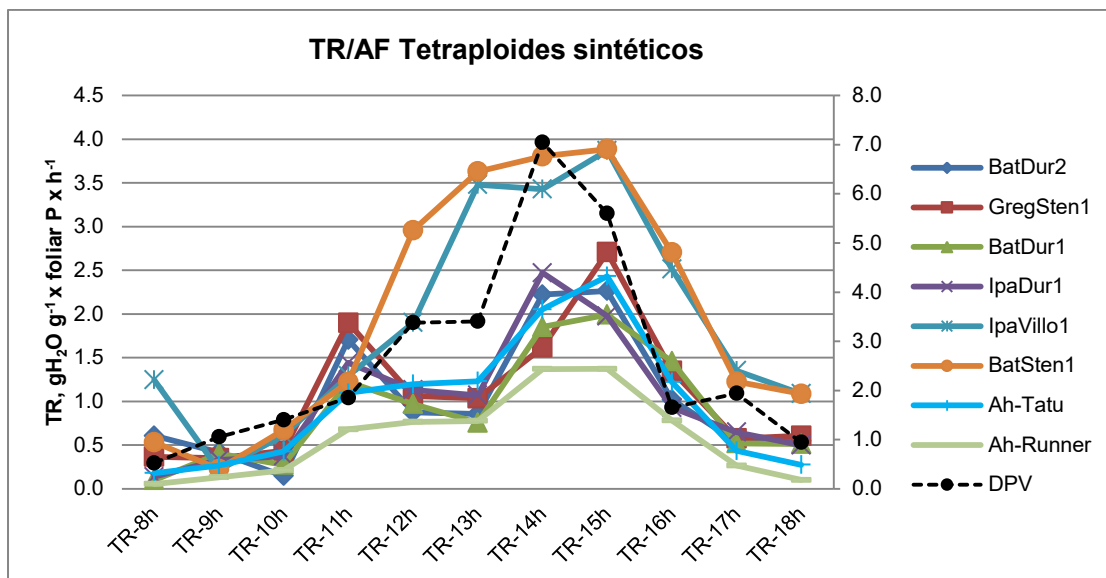


Figura 30. Curva de transpiração por área foliar (TR/AF) dos tetraploides sintéticos de *Arachis* analisados sob alto DPV (linha tracejada) com as cultivares Ah-Tatu e Ah-Runner como controles.

Quando se trata do efeito da transpiração dentro de cada conjunto, vemos que os valores foram muito similares. Os conjuntos IpaVillo1 e BatSten1, que tiveram os sintéticos com maiores TR/AFs, se comportaram de formas semelhantes dentro de cada conjunto (Figura 31). No conjunto IpaVillo1, a razão TR/AF do sintético superou os parentais e os controles (Figura 31A) assim como no conjunto BatSten1 (Figura 31B). Já o sintético BatDur1 foi o que apresentou os menores valores de TR/AF durante a análise, inferior ao controle Ah-Runner e mais próximo ao seu parental paterno Dur1-V14167 (Figura 31C).

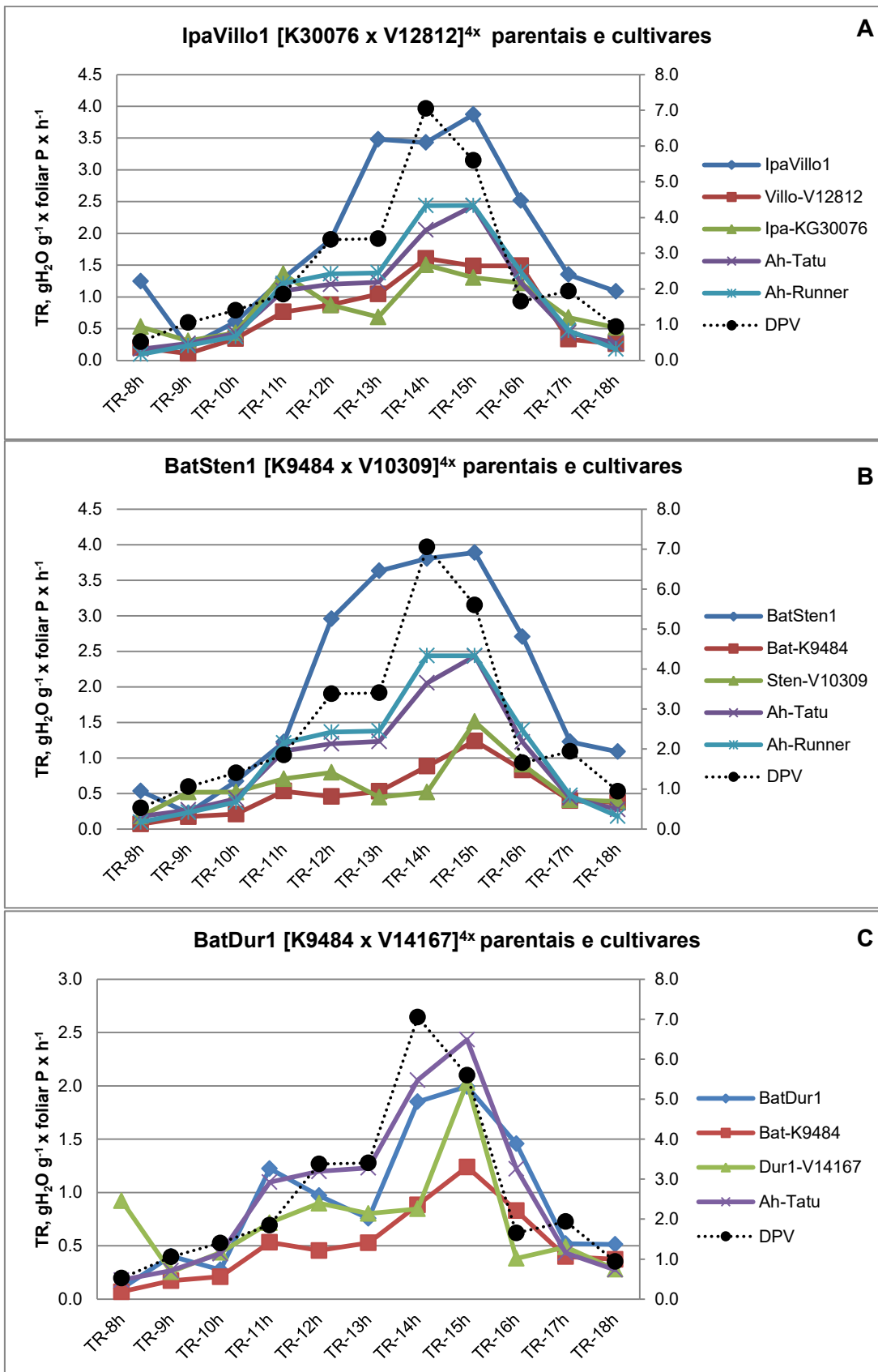


Figura 31. Curva da relação da taxa de transpiração (TR) pela área foliar (AF) – TR/AF, dos conjuntos IpaVillo1 (K30076 x V12812)<sup>4x</sup> (A) e do conjunto BatSten1 (K9484 x V10309)<sup>4x</sup> e BatDur1 (K9484 x V14167)<sup>4x</sup> (C) com seus respectivos parentais e cultivares de *Arachis* analisados sob alto DPV.



Considerando os parentais dos sintéticos com maior taxa de TR/AF, *A. ipaënsis*, *A. villosa*, *A. batizocoi* e *A. stenosperma*, vemos que eles não se sobressaíram quanto à transpiração, mantendo taxas baixas de TR/AF, com destaque para *A. batizocoi* (K9484) com taxas mais baixas no período das análises. Porém, vale salientar que ambos os acessos de *A. duranensis* (V14167 e SeSn2848) e *A. gregoryi* foram os genótipos com maior TR/AF após o pico mais alto de DPV (Figura 32).

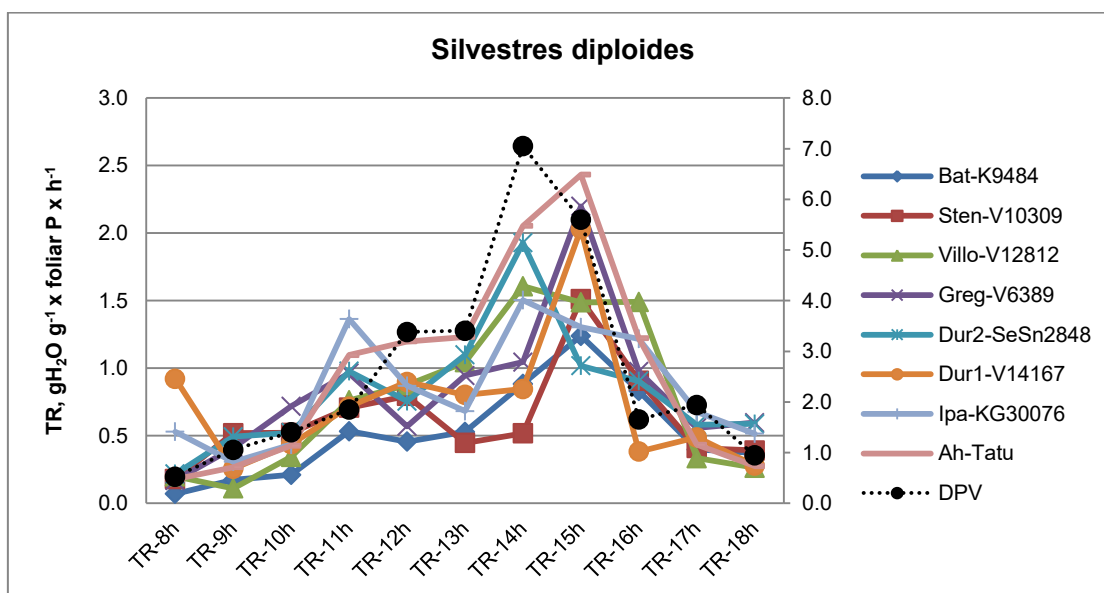


Figura 32. Curva de transpiração (TR) das espécies silvestres diploides (parentais), analisados sob alto DPV (linha preta) com cultivar Ah-Tatu como controle.

### Resposta fitopatológica ao fungo *Puccinia arachidis*

O tempo para o crescimento fúngico e detecção de sintomas nas folhas destacadas variou de acordo com a suscetibilidade do genótipo ao patógeno. 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 (Greg-V6389), *A. duranensis* SeSn2848 (Dur2-SeSn2848), *A. stenosperma* V10309 (Sten-V10309), *A. duranensis* V14167 (Dur1-V14167) e *A. villosa* V12812 (Villo-V12812) foram os mais resistentes.

Entre os parentais silvestres, *A. ipaënsis* K300876 mostrou-se suscetível ao fungo *Puccinia arachidis* baseado no escore das pústulas na área foliar afetada, enquanto que os alotetraploides mostraram-se resistentes. Essa espécie é doadora do genoma B para os alotetraploides IpaVillo1 [Ipa-K30076 x Villo-V12812]<sup>4x</sup> e IpaDur1 [Ipa-K30076 x Dur1-V14167]<sup>4x</sup> IpaDur1 e para *A. hypogaea*. Esses genótipos foram os únicos que se mostraram suscetíveis, inclusive mais do que o controle positivo a cultivar Ah-Runner (Figura 33), os quais foram todos consistentes quanto à ausência ou presença de sintomas, sendo

considerados suscetíveis. Os demais tetraploides sintéticos mostraram-se resistentes à ação patogênica do fungo.

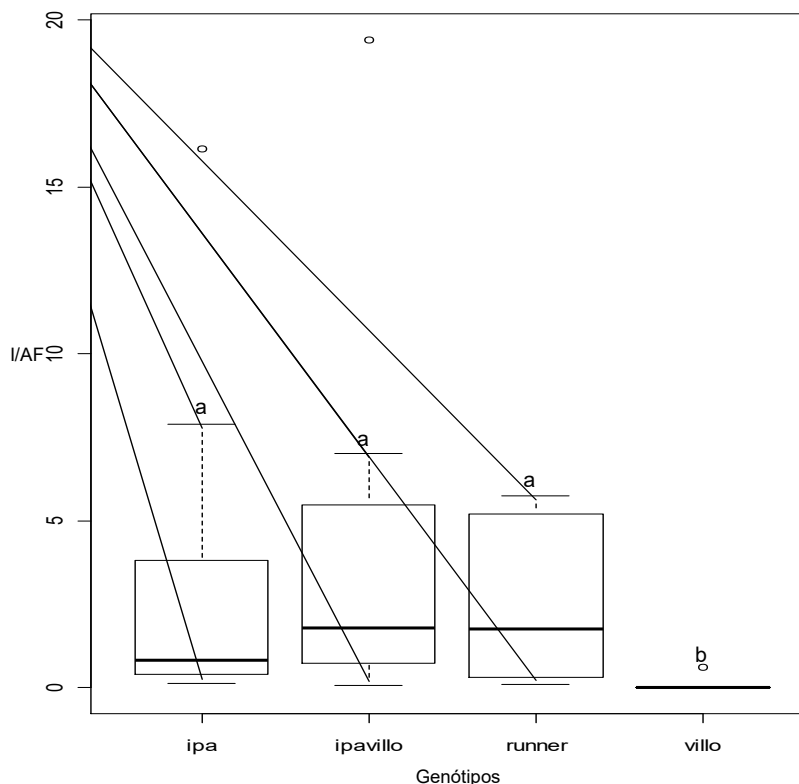


Figura 33. Gráfico em BoxPlot para análise comparativa de suscetibilidade à ferrugem (causada pelo fungo *P. arachidis*) do conjunto de dados Ipvillo1. Ipa (espécie *A. ipaënsis* acesso K30076 - parental materno), Ipvillo (tetraploide sintético), Runner (*A. hypogaea* - cultivar controle) e Villo (*A. villosa* acesso V12812 - parental paterno).

Quando as duas variáveis são analisadas separadamente (análise univariada), a média dos genótipos não difere em relação às variáveis período de incubação e I/AF (índice/área foliar), conforme mostra a Tabela 2.

Tabela 2. Média  $\pm$  Desvio Padrão para a I/AF e incubação. \*Estatísticas baseadas no modelo linear generalizado, onde atribuiu-se distribuição Gamma para I/AF e distribuição Normal para Incubação.

	I/AF	Período de Incubação
KG30076xV12812	2.69 $\pm$ 2.57 a	14.71 $\pm$ 2.70 a
Runner	1.61 $\pm$ 2.13 a	17.1 $\pm$ 3.75 a
Estatística*	LR=1.19, P-valor= 0.27	LR=3.35, P-valor=0.07

Ao analisar as duas variáveis agindo conjuntamente (análise de componentes principais), os dois genótipos continuam estatisticamente iguais. Adicionalmente, a ACP mostrou que I/AF e período de incubação são inversamente proporcionais. Como os

genótipos são iguais quanto a expressão de I/AF tanto no contexto univariado como no contexto multivariado, partiu-se para uma análise de regressão, desconsiderando o efeito dos genótipos.

Ao juntar os dois genótipos, com 72% de explicação ( $R^2$ ), o modelo de regressão permitiu descrever o I/AF em função de incubação, no qual o aumento de uma unidade de medida no período de incubação diminui em 3,47 unidades na medida de I/AF. Espera-se que cada unidade de medida de período de incubação gere I/AF de 31,008. A Figura 34 mostra essa correlação.

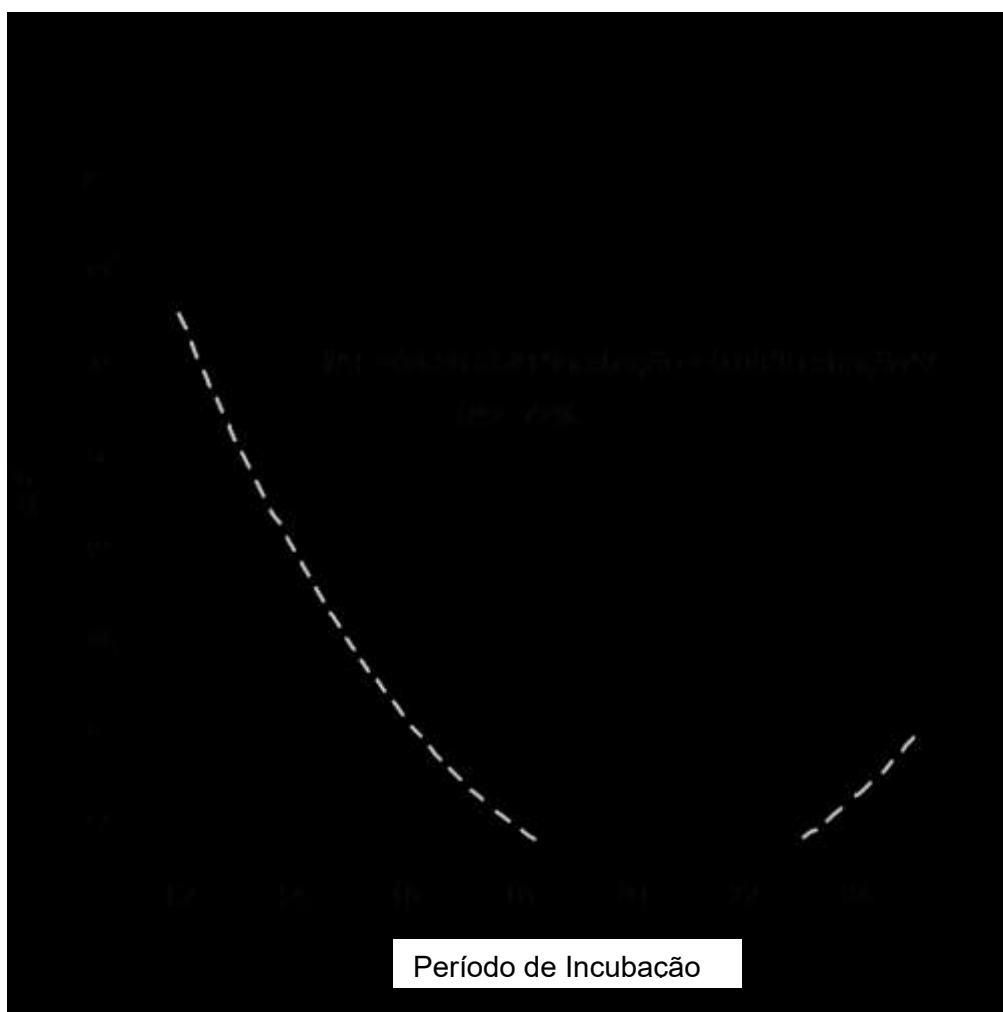


Figura 34. Correlação entre I/AF e período de incubação, segundo o modelo de regressão linear quadrático.

## Discussão

### Características gerais das plantas

Quando avaliada a área foliar total das plantas, os anfidiploides de maneira geral superaram seus parentais. Segundo Hegarty et al. (2013), esse fato é devido ao provável efeito da heterose, causado pela natureza híbrida dos sintéticos. Porém, as principais características avaliadas nesses genótipos são atribuídas ao efeito da tetraploidização, como visto nos experimentos com tetraploides sintéticos de *Arachis* de Santos (2012). Isso também foi observado em outras culturas, como no alotetraploide sintético *Arabidopsis suecica* (Chen, 2010). Outra observação interessante foi o progenitor masculino ter sido mais evidente para alguns grupos, como IpaDur1 e BatSten1, na maioria das variáveis analisadas, sugerindo uma contribuição genética maior que o progenitor feminino na expressão desses caracteres, como nodulação para IpaDur1, peso seco radicular para BatSten1 e área foliar total para maioria dos sintéticos. Esses resultados foram previamente obtidos por Leal-Bertioli et al. (2012), quando estudaram variações morfológicas e fisiológicas no tetraploide sintético IpaDur1, sendo agora expandidos esses estudos, para outras combinações de tetraploides sintéticos.

A interação planta-rizóbio é determinante para o bom desenvolvimento da planta e fertilidade do solo, a partir da absorção de nutrientes essenciais às plantas (Dey et al., 2004). De todas as espécies silvestres analisadas para números de nódulos por planta (raízes), *A. duranensis* acessos V14167 e SeSn2848 foram os genótipos com maior incidência de nódulos de rizóbios/grama de raiz. Esses resultados são ratificados pelo trabalho de Chen et al. (2014), que mostra *A. duranensis* como hospedeiro preferido das espécies de *Bradyrhizobium*. Esse caráter também seguiu na linha dos tetraploides sintéticos, nos quais as combinações que possuíam os acessos de *A. duranensis* como parentais, estavam entre os que mais apresentaram incidência de nódulos, como podemos ver para BatDur1 e IpaDur1 (Figura 8). Este último foi o sintético mais próximo da cultivar Ah-Runner (*A. hypogaea*), que tem como parentais os prováveis genitores de *A. hypogaea* (*A. ipaënsis* e *A. duranensis*). Esse comportamento sugere que essa combinação, beneficia a planta por possibilitar aumento de nitrogênio e fósforo no solo, influenciando no comprimento de raiz, número de vagens e número de nódulos.

Essas estruturas podem possibilitar às plantas, bem como aos tetraploides sintéticos, melhores condições adaptativas e produtivas, como crescimento e maior absorção de nutrientes, já que não se observa esse caráter com alta incidência nos diploides. No entanto, não se conhece a causa exata da maior incidência nos tetraploides sintéticos. Portanto,

pressupõe-se que novas combinações alélicas levam a novas vias metabólicas e essas induzem a origem de novas características. Esses são resultados preliminares, que ainda precisam ser validados e corroborados com experimentos de linhagens puras (já em andamento).

### Estruturas epidérmicas

Considerando que houve aumento de estruturas foliares nos tetraploides sintéticos, quando comparadas aos seus respectivos genitores diploides, a análise das estruturas morfológicas foliares dos genótipos demonstrou uma tendência de agrupamento em nível de ploidia. Quanto ao aumento estomático, o mesmo comportamento foi observado por Zaedhi et al. (2014) em plantas medicinais de *Dracocephalum kotschyi* induzidas à poliploidia por colchicina e por Gantait et al. (2011) em gérberas poliploides, que observaram aumento dessas mesmas estruturas estomáticas com o nível de ploidia. Sabendo-se que comprimento de estômato é considerado um indicador rápido para estimar a taxa de poliploidia em muitas plantas (Beck et al., 2003), os resultados mostraram que à medida que aumenta a ploidia nos acessos de *Arachis* estudados, aumenta o comprimento dos estômatos e diminui a densidade estomática (DE). Logo, pressupõe-se que redução da frequência de estômatos em relação às plantas diploides, está associado ao aumento no tamanho dessas estruturas, por meio de mecanismos de compensação associados com a expansão de células epidérmicas e/ou células-guarda (Beaulieu et al., 2008).

Quanto à densidade de estômatos, apesar de aproximar os tetraploides sintéticos dos materiais cultivados, seu valor foi significativamente menor quando comparado aos diploides, na ordem  $2n > 4n > 4n$ -sintético, como observado por Maosong et al. (2008) e Laere et al. (2011) com diferentes espécies de trigo e genótipos de *Spathiphyllum wallisii* (lírio-da-paz), respectivamente. Isso indica que no processo de evolução do amendoim, os estômatos se tornaram maiores, enquanto que o número reduziu. Esses resultados são consistentes com as observações feitas por Padoan et al. (2013) e Xu et al. (2010) em poliploides de *Citrus clementina* e *Juncus effusus*, respectivamente. Allario et al. (2011) demonstraram que em várias espécies a condutância estomática máxima de vapor de água está negativamente correlacionada com tamanho dos estômatos. Quanto menor os estômatos, melhor e mais rápida será a resposta (Franks e Beerling, 2009). Logo, a coordenação entre tamanho e frequência de estômatos é também uma característica importante para maximizar a eficiência do uso da água em todos os ambientes (Padoan et al., 2013).

Para as análises de índice estomático (IE), não foi observada diferença entre os níveis de ploidia, indicando que o número de células epidérmicas acompanhou as mudanças

dos estômatos. Nesse sentido, Pompelli et al. (2010) afirmam, que entre as várias características de estômatos, a densidade estomática bem como sua resposta às condições ambientais, é um importante parâmetro eco-fisiológico que afeta as trocas gasosas e fotossíntese. Conseqüentemente, a compreensão dessas respostas nos processos fisiológicos, é de grande interesse para o melhoramento genético, que busca desenvolver cultivares com melhores características agronômicas.

### Medidas de pigmentos foliares

O efeito da poliploidia na fotossíntese ainda não está bem elucidado, pois apesar de todas as enzimas envolvidas no processo estarem presentes nos cloroplastos e as plantas poliploides terem um grande número de cloroplastos no mesófilo, Caruso et al. (2013) relatam taxas fotossintéticas similares entre plantas diploides e tetraploides.

Quando é feita a correlação entre SCMR e LA, há uma diferença nos resultados, aproximando-os do que é visto para os materiais cultivados, pois folhas mais espessas geralmente têm densidade mais elevada de clorofila por unidade de área foliar e, portanto, têm uma maior capacidade fotossintética quando comparadas com folhas mais delgadas (Warner et al., 1987). Resultado similar também foi observado por Warner et al. (1987) na gramínea *Panicum virgatum*, em que o conteúdo de clorofila foi aumentado do tetraploide para o octaploide em 40-50%. Estudos iniciais em *Arachis* não mostraram aumento significativo no conteúdo de clorofila do anfidiplóide IpaDur1 (Leal-Bertioli et al., 2012), aproximando-se dos silvestres diploides. No entanto, quando a análise foi feita para outros tetraploides sintéticos, foi observado um aumento do conteúdo fotossintético em relação aos parentais, para todos os poliploides pelo método SCMR, positivamente correlacionado com o conteúdo de clorofila, como observado nos trabalhos de Arunyanark et al. (2008) e Upadhyaya (2005). Porém, considerando que valores de SCMR variam de acordo com a estação, o estado fisiológico da planta, tipo de solo, etc., esses valores podem ser comparados, apenas, em experimentos executados ao mesmo tempo, nas mesmas condições.

Como a poliploidização altera bioquimicamente e também influencia a eficiência fotoquímica de uma planta, é interessante saber o status (quantidade dos diferentes tipos) dos pigmentos fotossintéticos nos genótipos. Sabendo que leituras de SCMR refletem o teor de clorofila por unidade de área foliar, a comparação com a quantificação de pigmentos fotossintéticos pelo método extrativo, pode ajudar a corroborar os resultados iniciais de SCMR. A avaliação de clorofila pelo método de Coate et al. (2012) com modificações, demonstrou alterações de acordo com o nível de ploidia, tanto no conteúdo total de clorofilas, quanto na concentração de clorofilas a e b, separadamente. O conteúdo de

pigmentos fotossintéticos para todos os anfidiplóides foi muito maior, aproximadamente duas vezes do valor estimado dos diploides. O aumento desses pigmentos associado ao maior nível de ploidia foi estudado por Lagibo et al. (2005) em diferentes poliploides de *Violaceae*, com variação na tolerância a estresses ambientais. Os resultados confirmam o que sugerem Warner e Edwards (1993), que alotetraploides apresentam uma variação maior de respostas para taxa fotossintética por unidade de área foliar. Resultados similares também foram relatados em plantas tetraploides de *Aloe vera* L. (Li et al., 2002) e *Tanacetum parthenium* L. (crisântemo) (Majdi et al., 2010) induzidas por colchicina. Estudos sugerem que análises por fluorescência emitidas por clorofilas é uma técnica rápida e confiável para detecção e quantificação de pigmentos de tolerância das plantas a estresses ambientais, como temperatura (calor, frio, geadas), estresse hídrico (seca ou alagamento), salinidade, etc. (Lagibo et al., 2005). De acordo com os resultados podemos inferir que, de maneira geral, SCMR e clorofila total aumentam juntas em direção ao maior nível de ploidia, apresentando uma mesma tendência diante da tetraploidização, além de combinar genótipos mais tolerantes com melhores características estéticas (Lagibo et al., 2005).

#### Transpiração/área foliar (TR/AF)

A conservação de água no solo, resultante da diminuição na condutância estomática, sob condições atmosféricas de alto déficit de pressão de vapor (DPV) é uma abordagem possível para maior tolerância das culturas sob déficit hídrico (Devi et al., 2010). Uma possibilidade para as plantas é limitar a transpiração quando o DPV se torna elevado. Tal comportamento é observado com o fechamento dos estômatos, geralmente ao meio-dia, quando a temperatura está mais alta. Esta característica tem o benefício da conservação da água no solo. Sem sensibilidade ao aumento do DPV, as plantas terão continuamente taxas crescentes de transpiração com o aumento do DPV (Devi e Sinclair, 2011).

Características que controlam a retenção e o uso limitado de água, normalmente promovem o uso dessa água retida no solo, para o crescimento vegetativo e enchimento de grãos (Belko et al., 2012). Outra característica é a troca gasosa baixa durante períodos de déficit de pressão de vapor (DPV) elevado, sob condições limitantes de água, os quais reduzem a transpiração, levando a uma baixa TR nos genótipos mais tolerantes à seca (Devi et al., 2010). Ao submeter os genótipos sob diferentes DPVs, foi observada uma maior taxa de transpiração por unidade de área foliar pelos tetraploides sintéticos, quando comparado com seus parentais diploides. Apesar do sintético BatDur1 ter como parental um dos genótipos que mais transpiraram (Dur-V14167), este foi o alotetraploide que apresentou as menores TR/AFs ao longo do experimento, assim como o silvestre diploide *A. batizocoi*

acesso K9484, sugerindo uma contribuição maior do parental materno (Bat-K9484) para esse caráter.

Embora estudos apontem que a área foliar reduzida, influencia na resposta de tolerância ao estresse hídrico, como observado em Caupi (Belko et al., 2012) e em diferentes genótipos de amendoim (Ratnakumar et al., 2009; Ratnakumar e Vadez, 2011), o acesso Bat-K9484 apresentou uma AF intermediária entre os diploides, porém foi o silvestre mais eficiente, por responder com menor TR/AF às condições impostas no experimento. Resultados semelhantes foram obtidos por Ratnakumar et al. (2009), que não observaram nenhuma relação significativa entre absorção de água do solo/área foliar em genótipos de amendoim nos primeiros dias após imposição de seca. Além disso, as combinações com esse acesso (Bat-K9484) demonstraram resultados semelhantes, com baixa TR/AF, exceto a combinação Batsten1 (K9484 x V10309)<sup>4x</sup>, que foi um dos tetraploides sintéticos que apresentaram maiores taxas de transpiração por área foliar.

Considerando a importância da SLA como reflexo da compensação entre rápida produção de biomassa e eficiente conservação de nutrientes, não foram observadas diferenças significativas entre a maioria dos genótipos estudados. No entanto, dentre as conjuntos que apresentaram variação em SLA, a comparação dos gráficos para SCMR e SLA mostrou um aumento nos valores para SCMR inversamente proporcionais a SLA dentro de cada conjunto, especialmente para a conjunto IpaDur1, prováveis parentais do amendoim, mas também para a conjunto BatSten1, indicando um possível resultado semelhante ao que é observado na literatura (Vadez et al., 2014). Logo, pressupõe-se que o híbrido alotetraploide resultante, BatSten1, não teve uma boa capacidade de combinação, com possível ocorrência de supressão dos alelos parentais, provocando o efeito da heterose negativa no híbrido e comportamento inferior aos genitores.

De modo geral, percebeu-se que os tetraploides sintéticos estudados, apresentaram modificações importantes com a poliploidização, em características relacionadas à seca (Leal-Bertioli et al., 2012) e que o agrupamento dos genótipos a partir de variações na TR/AF podem estar ocorrendo, devido a fatores dominantes que possivelmente controlam a condutância anatômica ou fisiológica, resultando em taxas máximas de transpiração (Devi et al., 2010). Além disso, segundo Vadez et al. (2014) existe uma base hidráulica para as diferenças na respostas de transpiração sob alto DPV. Acredita-se que a ausência de algumas formas de aquaporinas, podem provocar a restrição da transpiração em altos DPVs (Devi et al., 2012), explicando a variação na TR/AF observada nos genótipos estudados.



## Resposta fitopatológica ao fungo *Puccinia arachidis* Speg.

Em estudos de resistência em híbridos entre *A. hypogaea* e espécies silvestres de *Arachis*, Dwivedi et al. (2002) observaram que a resistência à ferrugem parece ser devida ao longo período de incubação e latência, menor número de lesões por folha, menor diâmetro das lesões, menor índice de esporulação, menor dano de área foliar e escore da doença. A arquitetura dos híbridos tetraploides não é adequada para a aplicação de testes em campo, por derivar de plantas diploides e, portanto, foi necessária uma abordagem diferente para avaliação dos genótipos em câmara de crescimento.

Considerando a ausência de esporulação e o longo período de incubação, os tetraploides sintéticos desse estudo foram resistentes ao ataque do fungo *P. arachidis*, além da maior parte dos silvestres. Com exceção dos tetraploides sintéticos IpaVillo1 e IpaDur1 e do silvestre Ipa-K30076. Esse resultado sugere que a suscetibilidade do amendoim ao fungo *P. arachidis* foi adquirida pela contribuição gênica da espécie *A. ipaënsis*. Os demais genótipos podem ser utilizados para transferência de genes de resistência a esse fungo para cultivares, como demonstrado em trabalhos de introgressão de genes silvestres no amendoim (Simpson e Star, 2001; Simpson et al., 2003). Altos níveis de resistência também foram observados por Fávero et al. (2009) em espécies silvestres de diferentes seções de *Arachis*. Dentre as espécies, acessos de *A. magna*, mostraram-se como um dos mais resistentes, apresentando apenas reações de hipersensibilidade.

Várias espécies silvestres do gênero *Arachis* são assintomáticas ou altamente resistentes à ferrugem, e, portanto, poderiam ser importantes para a hibridização interespecífica para incorporar níveis mais elevados de resistência a doenças no amendoim, além do que está atualmente disponível (Pande e Rao, 2001).

Para tanto, a identificação de regiões genômicas que conferem resistência à ferrugem como *quantitative trait loci* (QTL) é importante para introgressão em *A. hypogaea* em cruzamentos controlados. Para isso será interessante desenvolver mapas genéticos como primeiro passo para identificação dessas regiões, com marcadores associados aos locos de resistências para utilização de seleção assistida por marcadores (MAS) no melhoramento do amendoim.

## Conclusões

- A tetraploidização causou alterações profundas em todas as características avaliadas. Algumas dessas características são favoráveis tanto agronomicamente, quanto em termos de adaptação (porte da planta, pigmentos foliares, nodulação, etc.). Outras, no entanto, são desfavoráveis (alta condutância estomática);
- Para fins de introgressão, é importante avaliar as plantas após a tetraploidização e acompanhar seu desenvolvimento para compreender os efeitos da poliploidia ao longo do desenvolvimento da planta;
- A única exceção é quanto ao caráter de resistência à ferrugem, que tem um forte componente genético. Portanto, essa característica será analisada sob uma ótica genética no próximo capítulo.

## Capítulo 2: Mapeamento de QTLs de resistência à ferrugem (*Puccinia arachidis* Speg.) em população F<sub>6</sub> de genoma B de *Arachis*

Observação:

Esse capítulo compõe o artigo (em anexo) publicado na edição de Julho/2013 no periódico G3: Genes, Genomes, Genetics.

 G3 Genes | Genomes | Genetics

 G3 Genes | Genomes | Genetics

### Identification of QTLs for Rust Resistance in the Peanut Wild Species *Arachis magna* and the Development of KASP Markers for Marker-Assisted Selection

Soraya C. M. Leal-Bertioli,<sup>\*,†,1,2,3</sup> Uiara Cavalcante,<sup>\*,‡,1</sup> Ediene G. Gouvea,<sup>\*,‡</sup> Carolina Ballén-Taborda,<sup>†</sup> Kenta Shirasawa,<sup>§</sup> Patrícia M. Guimarães,<sup>\*</sup> Scott A. Jackson,<sup>†</sup> David J. Bertioli,<sup>†,‡</sup> and Márcio C. Moretzsohn<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, 70770-917 Brasília, DF, Brazil, <sup>†</sup>Center for Applied Genetic Technologies, University of Georgia, Athens, Georgia 30602-6810, <sup>‡</sup>University of Brasília, Institute of Biological Sciences, Campus Darcy Ribeiro, 70910-900 Brasília, DF, Brazil, and <sup>§</sup>Kazusa DNA Research Institute, Kisarazu, Chiba, 292-0818, Japan

## Introdução

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é uma oleaginosa muito importante, cultivada em mais de 25 milhões de hectares em regiões tropicais e subtropicais, e com uma produção mundial de cerca de 45 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2014). Originou-se em uma região que abrange o sul da Bolívia e noroeste da Argentina, por hibridização de duas espécies silvestres e duplicação espontânea de cromossomos para formar um alotetraploide.

Essa cultura é afetada por várias pragas e doenças que reduzem o rendimento e aumentam os custos de produção. A ferrugem, causada pelo fungo *Puccinia arachidis* Speg. é uma das doenças foliares mais importantes e disseminadas pelo mundo (Subrahmanyam et al., 1993). Acredita-se que o patossistema ferrugem-amendoim co-evoluiu no Peru, onde o hospedeiro tem sido cultivado desde os tempos pré-históricos. A cultura do amendoim espalhou-se amplamente em todo o mundo depois da colonização espanhola e portuguesa da América do Sul, mas o patógeno ficou limitado em grande parte à América do Sul, até o final da década de 60. Desde então, se espalhou para todas as áreas de cultivo de amendoim (Hammons, 1973; Subrahmanyam et al., 1993). O patógeno é hospedeiro específico. As perdas são particularmente graves se a cultura também for atacada por manchas foliares como mancha-castanha (*Cercospora arachidicola* Hori) e/ou mancha-preta (*Cercosporidium personatum* (Berk. e Curt.). Ao contrário das manchas foliares, a ferrugem infecta as folhas que tendem a permanecer fixas à planta. Isso combinado com um ciclo de vida curto favorece a rápida multiplicação do patógeno e rápida propagação da doença. Variedades modernas utilizadas localmente são geralmente suscetíveis à ferrugem e outras doenças foliares. O controle químico do fungo pode ser eficaz, mas é oneroso, além do momento de aplicação de pesticidas apresentar-se como um desafio.

O desenvolvimento e a adoção de variedades de alto rendimento para o cultivo, resistentes à ferrugem, são vistos como a melhor estratégia para controlar a propagação da doença (Gibbons, 1980). No entanto, nenhuma resistência completa foi encontrada no germoplasma cultivado (Subrahmanyam et al., 1982; Pande e Rao, 2001; Fávero et al., 2009). Isso é consistente com a recente origem alotetraploide do amendoim e ao número limitado de alelos de resistência à doença, disponíveis em seu pool genético contra ferrugem. Além disso, até o final dos anos 60, a ferrugem ficou essencialmente restrita à América do Sul e cultivares de amendoim de outras regiões não sofreram pressão de seleção imposta pelo patógeno. Em avaliações de germoplasma para genótipos resistentes, a maioria dos genótipos encontrados era do Peru (Subrahmanyam et al., 1989; Subrahmanyam et al., 1993). Embora existam genótipos de amendoim parcialmente resistentes, altos níveis de resistência ou até mesmo imunidade à ferrugem só é encontrada em espécies silvestres (Pande e Rao 2001; Fávero et al., 2009; Leal-Bertioli et al., 2010).

A introgressão de resistência de parentes silvestres diploides no amendoim envolve sistemas de cruzamentos especiais para superar as diferenças de ploidia, seguido de vários ciclos de retrocruzamentos (Simpson e Starr 2001; Simpson et al., 2003; Stalker e Lynch 2002; Holbrook et al., 2008). O uso de marcadores ligados à resistência contra ferrugem é importante para ajudar na seleção da progênie retrocruzada, na quebra do arraste de ligação, na piramidação e no aumento da velocidade de seleção. Anteriormente, foram publicados dois mapas de ligação utilizando uma população proveniente do cruzamento entre o único acesso encontrado do ancestral mais provável de amendoim, *A. ipaënsis* K30076 e um acesso altamente resistente à ferrugem de *A. magna*, K30097 (Moretzsohn et al., 2009; Shirasawa et al., 2013). Aqui nós relatamos a identificação de um forte QTL (*quantitative trait loci*) ligado à resistência contra ferrugem.

## Objetivos

- Identificar, a partir de uma população de mapeamento  $F_6$  para o genoma B, QTLs de resistência à ferrugem (*Puccinia arachidis* Speg.);
- Mapear QTLs para características agronômicas de importância econômica na população de mapeamento  $F_6$ ;
- Detectar QTLs e o efeito desses locos quanto a características de domesticação nas progênies da população para o genoma B.

## Material e Métodos

### Material vegetal

A população F<sub>6</sub> composta de 94 indivíduos foi obtida pelo método SSD (*single seed descent*) da população F<sub>2</sub> descrita em Moretzsohn et al. (2009). As progênies foram derivadas do cruzamento entre *A. ipaënsis* (acesso GKBSPP 30076 - forma abreviada K30076) e *A. magna* geneticamente relacionada (GKSSc 30097 - forma abreviada K30097), usadas como parentais feminino e masculino, respectivamente. As sementes foram obtidas na coleção de germoplasma de *Arachis*, mantida na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília-DF, Brasil).

### Fenotipagem para ferrugem

A população RIL (*recombinant inbred lines*) e os parentais foram fenotipados e avaliados nas gerações F<sub>6</sub> e F<sub>7</sub> para resistência a *P. arachidis*. *Arachis hypogaea* cv. Runner-IAC 886 foi incluída como controle de suscetibilidade. Ensaios de campo não foram realizados, por não serem adequados devido à arquitetura das plantas diploides derivarem de silvestres. A fenotipagem foi realizada utilizando a técnica de folhas destacadas (Moraes e Salgado 1982; Leal-Bertioli et al., 2009). Os esporos de ferrugem foram coletados de plantas de amendoim infestadas, em Pindorama-SP (coordenadas 21,1858 ° S, 48,9072 ° W). Dois bioensaios foram realizados, um em 2012 e outro em 2013. No bioensaio de 2012, as folhas foram inoculadas com uma solução de 4x10<sup>5</sup> urediniósporos/mL em 0,05% de Tween 20 de esporos fúngicos e mantida a 26-28 °C com fotoperíodo de 10h de luz e 14h de escuro. No bioensaio de 2013, foi usada uma suspensão de 2x10<sup>5</sup> urediniósporos/mL. Quatro repetições de cada indivíduo foram analisadas 25 dias após a inoculação. A suscetibilidade foi medida usando os seguintes parâmetros: número total de lesões/área foliar (cm) (T/LA), número de lesões esporulados/área foliar (cm) (SL/LA), período de incubação (tempo para o aparecimento da primeira lesão em número de dias) (IncPer) e índice de suscetibilidade (SI). O índice de suscetibilidade foi calculado usando a escala de Savary et al. (1989), com as seguintes modificações: Índice era o número de lesões vezes um número que refletia o tamanho da lesão/reação.  $I = \sum (s \times n)/LA$ , em que s= o tamanho da lesão (1 = lesão necrótica abortada, 2 a 6 = rompido, pústulas esporuladas, variando entre 0,5 - 3mm de diâmetro), n = número de lesões de um determinado tamanho, LA = área foliar (mm<sup>2</sup>). A esporulação foi avaliada com o auxílio de um microscópio estereoscópico. A área foliar foi calculada utilizando o software Quant ® (Vale et al., 2001). Genótipos que não

apresentaram sintomas e, portanto, não tiveram período de incubação, foram artificialmente tabuladas como 200 para análises de QTL.

### Outras características agronômicas e de domesticação

As plantas foram cultivadas em bandejas longas (1m x 30 centímetros x 30 centímetros), com espaço suficiente para sementes e ramos laterais. Os ramos foram regularmente enrolados em volta dos vasos para garantir que os pegs chegassem ao solo. Entre 40 e 60 dias após o plantio, foi medida a altura do eixo central de até 10 plantas de cada RIL (MSH). No momento da colheita (cerca de 120 dias após o plantio), os comprimentos do peg (PL) e da constrição de vagens (PC) foram medidas com 6 repetições. As sementes (com casca) colhidas foram contadas (SN), secas a 20°C em UR de 15% durante 15 dias e, em seguida, 10 sementes escolhidas ao acaso foram pesadas (10-SW). As avaliações foram feitas em três anos, 2011, 2012 e 2013, com exceção de PL e PC, que foram avaliados apenas em 2012.

### Extração de DNA

O DNA genômico total foi extraído a partir de folhas jovens como descrito por Grattapaglia e Sederoff (1994). A qualidade e quantidade do DNA foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 1% e em espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

### Mapeamento genético e análise de QTLs

Um mapa de ligação para esta população pode também usar locos publicados por Shirasawa et al. (2013). O mapa continha 773 microssatélites e 25 marcadores MITE. Usamos esses 798 marcadores mais 26 marcadores microssatélites recém genotipados para construir um mapa de ligação atualizado, usando o software Mapmaker Macintosh 2.0 e Mapmaker/EXP 3.0 (Lander et al., 1987; Lincoln et al., 1992). Foi realizado o teste  $\chi^2$  para testar a hipótese nula de segregação 1:1 em todos os marcadores utilizados. Foi usado um mínimo LOD de 6,0 e máxima fração de recombinação ( $\theta$ ) de 0,35, definidos como limites para a determinação de grupos de ligação com o comando "group". A ordem mais provável dentro de cada GL foi estimada pelo método de correlação de matrizes usando o comando "first order". A ordem dos marcadores foi confirmada através da comparação da verossimilhança das possíveis ordens permutando todas as ordens dos locos adjacentes (comando "ripple"). Após o estabelecimento das ordens dos grupos, o LOD foi reduzido para



3.0, a fim de incluir marcadores adicionais nos grupos. O comando "try" foi então utilizado para determinar a posição exata dos novos marcadores dentro de cada grupo. As novas ordens dos marcadores foram novamente confirmadas com o comando "ripple". As frações de recombinação foram convertidas em distâncias de mapa centimorgans (cM), utilizando a função de mapeamento de Kosambi e o comando "erro detection", disponível no Mapmaker/EXP 3.0 (Lincoln et al., 1992; Lander et al., 1987). Com base neste mapa, regiões genômicas sem recombinação ou marcadores idênticos foram identificados e todos os locos menos um, foram removidos destas regiões (pares ou grupos de *loci* com distância de 0cM).

O novo mapa foi utilizado para análise de QTLs. Os dados fenotípicos incluíram os componentes de resistência a *P. arachidis* e características agrônômicas. Características fenotipadas em diferentes ensaios ou bioensaios foram analisadas separadamente. A normalidade da distribuição dos dados foi avaliada pelos valores de skewness e kurtosis, usando WinQTL Cartographer, versão 2.5 (Wang et al., 2012). Os QTLs foram mapeados utilizando o método de mapeamento de intervalo composto (CIM), proposto por Zeng (1993, 1994), também pelo programa WinQTL Cartographer. Este software assume que os dados quantitativos analisados apresentam distribuição normal. Alguns dos conjuntos de dados que não se encaixaram nessa hipótese foram transformados em log (x). A análise CIM foi realizada utilizando o modelo padrão (Modelo 6), avaliando o mapa genético e estimando a probabilidade de um QTL e seus efeitos correspondentes a cada 1cM, usando 8 marcadores como cofatores para ajustar os efeitos fenotípicos associados com outras posições no mapa genético.

Para cada um dos caracteres, o número de marcadores cofatores foi escolhido de acordo com o número e significância dos QTLs detectados. Um intervalo de 10cM foi utilizado, e, portanto, cofatores dentro de 10cM de cada lado do QTL não foram incluídos no modelo do QTL. Foram determinados limites para cada característica por testes de permutação (Churchill e Doerge 1994; Doerge e Churchill, 1996), utilizando 1.000 permutações e um nível de significância de 0,05. A representação gráfica dos grupos de ligação e os QTLs significativos foi feita no MapChart, versão 2.1 (Voorrips, 2002).

## Resultados

### Fenotipagem

A população RIL F<sub>6</sub> usada foi produzida pelo método SSD do cruzamento entre *A. ipaënsis* x *A. magna*. A progênie F<sub>1</sub> apresentou alta fertilidade, o que demonstra que os parentais estão geneticamente relacionados. A população mostrou grande variabilidade para a altura do eixo central, comprimento de ramos laterais, tamanho e número de sementes e resistência à ferrugem. A maioria dos indivíduos mostrou valores intermediários aos parentais, mas a população mostrou grande segregação transgressiva. Altos valores de skewness e kurtosis mostraram que quatro das 15 características não apresentaram distribuição normal. Foram estas: período de incubação para 2012 e 2013 (IncPer\_2012, IncPer\_2013); número de sementes com casca (SN), média de três anos, e altura do eixo central para 2011 (MSH\_2011). A fim de alcançar as distribuições aproximadamente normais, estas quatro características foram transformadas em log(x) (Tabela 3).

### Ferrugem

A distribuição de frequência com base nos dados obtidos para o número total de lesões/área foliar (TL/LA), número de lesões esporuladas/área foliar (SL/LA) e período de incubação (IncPer) mostrou forte resistência para 41 indivíduos e para o parental resistente, *A. magna* acesso K30097, que não apresentaram lesões em nenhum dos experimentos (Figura 35A e 35B). O parental suscetível *A. ipaënsis* K30076 apresentou mais suscetibilidade que o controle suscetível, *A. hypogaea* cv. Runner IAC 886 em todos os componentes testados: Índice de Suscetibilidade (SI), TL/LA e SL/LA maiores e IncPer mais curto. Dezesete indivíduos tiveram SI, SL/LA e TL/LA maiores do que o controle suscetível. Além disso, cinco tiveram IncPer menor. Como esperado, o número e o tamanho das lesões foram negativamente correlacionados com o período de incubação (Pearson  $r = -0,6$ ,  $p < 0,005$ ). Não foi observada clorose em nenhum acesso da população F<sub>6</sub>/F<sub>7</sub>. Em folhas de alguns dos genótipos menos sensíveis, foram observadas áreas de necrose correspondendo a colônias abortadas em um estágio de desenvolvimento tardio.

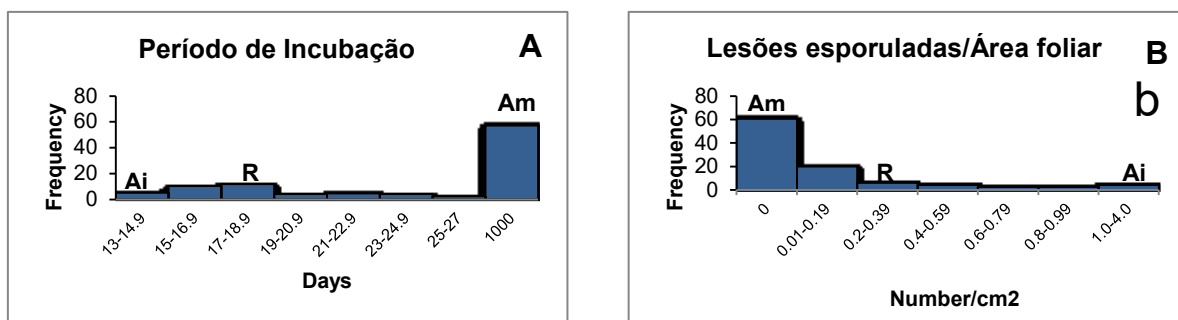


Figura 35. Distribuição de frequência das características de resistência à ferrugem. (A) Período de incubação e (B) Lesões esporuladas/área foliar ( $\text{cm}^2$ ) em linhagens recombinantes ( $F_6/F_7$  RILs) derivadas de um cruzamento de *A. ipaënsis* KG30076 (Ai) com *A. magna* KG30097 (Am). Para os testes de ferrugem, *A. hypogaea* cv. Runner IAC 886 (R) foi o controle suscetível.

### Outras características agronômicas e de domesticação

As avaliações fenotípicas foram realizadas em diferentes gerações. Os valores foram distribuídos normalmente para a maior parte das características na maioria dos anos. Com exceção de constrição de vagens e comprimento de pegs, as médias dos pais foram significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). A comparação de médias entre os parentais e os genótipos segregantes revela que para todas as características, há segregação transgressiva nas progênes (Figuras 36A-D). Na média dos três anos, *A. magna* produziu mais sementes do que *A. ipaënsis*, mas o peso de 10 sementes foi menor (Figuras 36C e D).

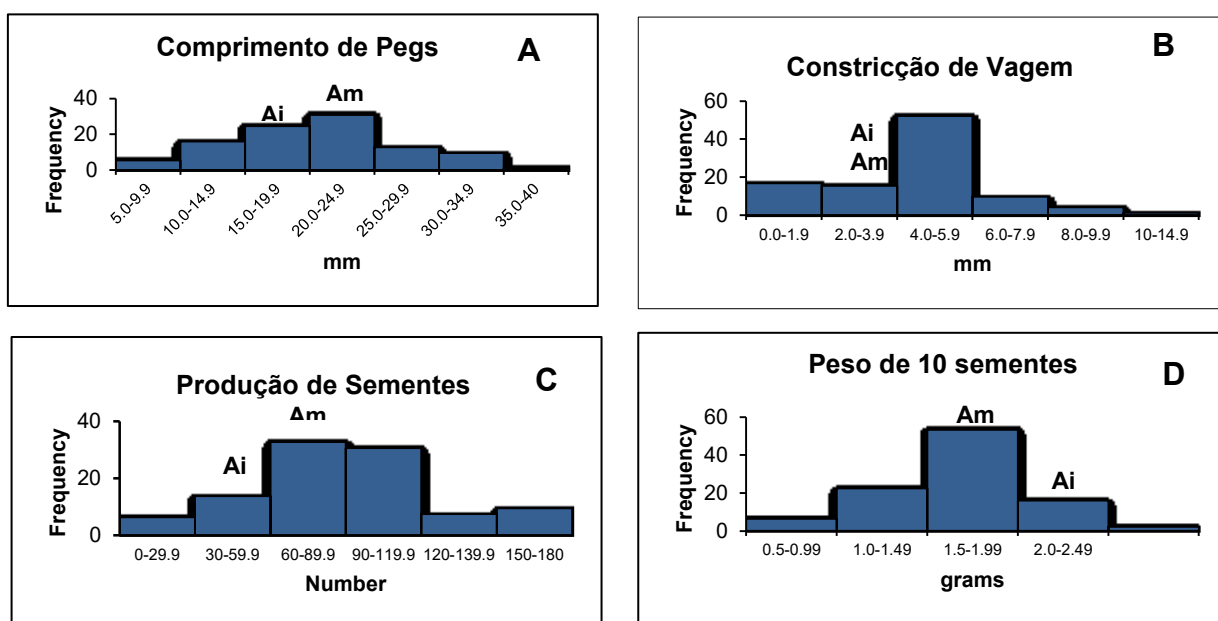


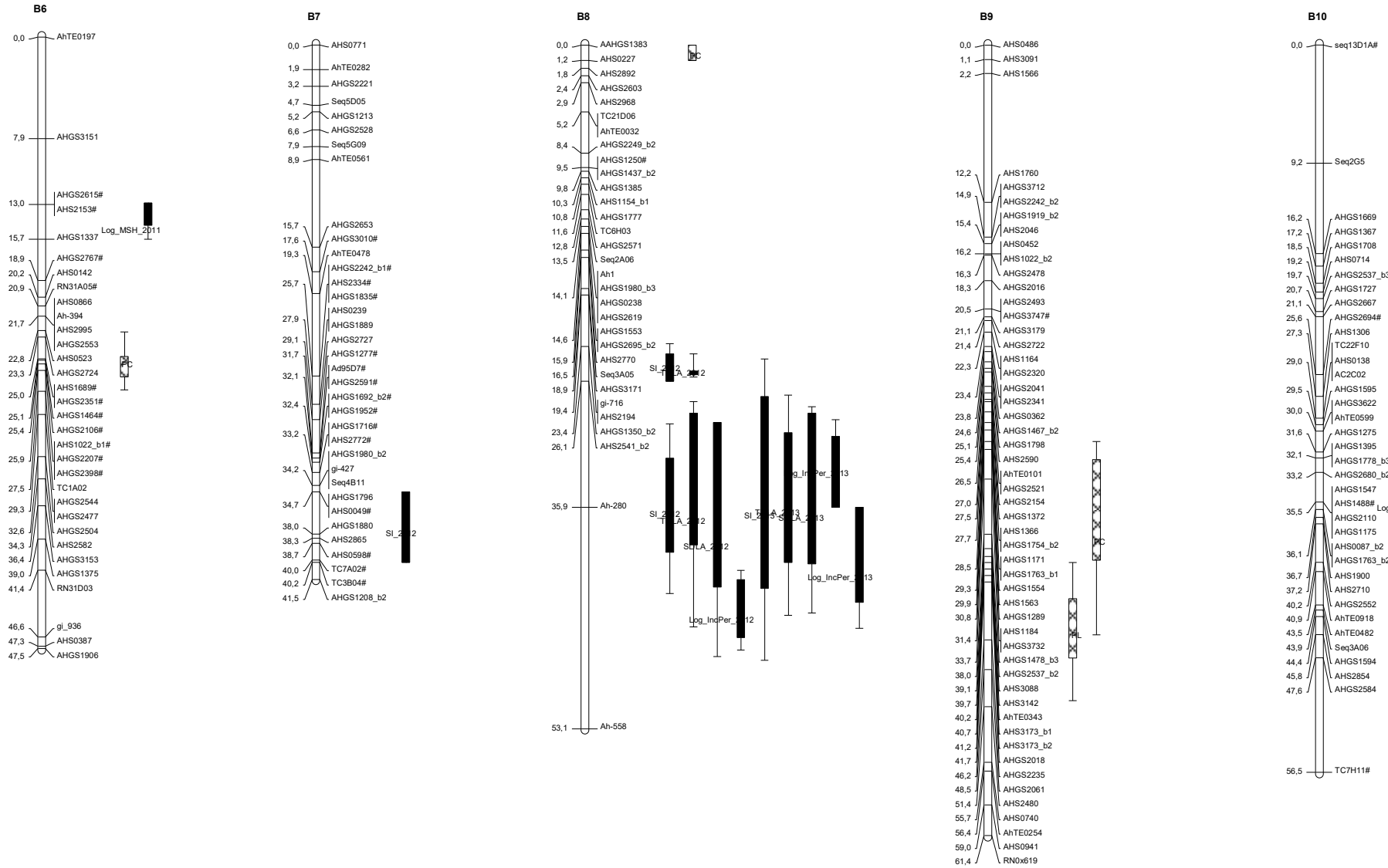
Figura 36. Distribuição de frequência das características agronômicas e de domesticação. (A) comprimento de pegs, (B) Constrição de vagem, (C) Produção de sementes e (D) Peso de 10 sementes em linhagens recombinantes ( $F_6/F_7$  RILs) derivadas de um cruzamento de *A. ipaënsis* KG30076 (Ai) com *A. magna* KG30097 (Am). Com exceção de constrição de vagem, todas as médias das características dos parentais foram significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

## Construção do Mapa

Todos os marcadores avaliados neste estudo foram amplificados utilizando *primers* heterólogos. Usando um LOD mínimo de 6,0 e uma fração de recombinação máxima ( $\theta$ ) de 0,35 e após a exclusão dos marcadores co-segregantes, 399 marcadores foram mapeados em 10 grupos de ligação (GLs), abrangendo um mapa com distância total de 678,2 cM. Estes marcadores incluíram 378 marcadores microssatélites e 21 transposons (MITE). Os grupos de ligação foram numerados e orientados essencialmente de acordo com Moretzsohn et al. (2009), mas com B05 e B08 invertidos para garantir a compatibilidade com as pseudomoléculas produzidas pelo *Peanut Genome Sequencing Consortium* ([www.peanutbase.org](http://www.peanutbase.org) Genbank GCA\_000816755.1). Os grupos de ligação variaram de 41,5cM (com 35 marcadores) a 139,2cM (55 marcadores), com uma distância média de 1,7cM entre marcadores adjacentes. Dos 399 marcadores mapeados, 91 (22,6%) desviaram da razão esperada 1:1 de ( $p < 0,05$ ). Desses, 79 marcadores eram distorcidos para alelos do parental *A. ipaënsis* e apenas 12 marcadores para alelos do parental *A. magna*. A maioria dos grupos de ligação teve poucos marcadores distorcidos, e GL B05 e B08 não apresentaram marcadores distorcidos. Em contraste, o GL B02 e a porção superior do GL B04 foram quase inteiramente compostos por marcadores distorcidos. Esses dois GLs e o GL B06 foram distorcidos em direção aos alelos de *A. ipaënsis*. Marcadores distorcidos com  $P < 0,05$  foram identificados por # (Figura 37).



Figura 37. Continuação.



## Identificação de QTLs

O novo mapa composto de 399 marcadores foi utilizado para análise QTLs. O LOD mínimo estimado para cada característica variou de 2,5 a 3,2, e apenas QTLs com valores de LOD superiores a esses valores foram incluídos. Pelo menos um QTL foi detectado para cada uma das 15 características analisadas, com um total de 38 QTLs mapeados. Um resumo dos QTLs é fornecido na Tabela 3.

### QTLs para resistência à ferrugem

Para resistência à ferrugem, 13 QTLs foram identificados nos dois bioensaios. Um QTL principal para os quatro componentes da resistência à ferrugem (SI, TL/LA, SL/LA, e IncPer) foi consistentemente identificado em ambos os bioensaios e mapeado no mesmo intervalo, na posição 35,1cM - 42,9cM do mapa no GL B08, com valores de LOD entre 2.9 e 8.2 com o marcador Ah-280 sendo o mais próximo. Este QTL explicou 5,8% a 59,3% da variação fenotípica das quatro diferentes características (SI, TL/LA, SL/LA e IncPer). Para SI e TL/LA avaliado em 2012 e para IncPer\_2013 foi encontrado outro QTL na posição 25,4cM – 33,1cM no mesmo GL B08 (Tabela 3, Figura 36), explicando 13,2% a 34,8% da variância total em 2012 e 2013, respectivamente. Os marcadores mais próximos são AHGS1350 e AHGS2541. Além destes dois QTLs, outros dois QTLs menores foram identificados no GL B04 e B07 para SI\_2012, e um QTL no LG B03 para IncPer\_2013. Para todos os QTLs, a resistência foi derivada de *A. magna*. A contribuição de alelos de *A. magna* foi estimada pelo cálculo da média fenotípica das progênies que apresentaram alelo de *A. magna* em relação à média fenotípica daqueles com o alelo de *A. ipaënsis*. Alelos de *A. magna* contribuíram de forma significativa para a redução da SI, TL/LA e SL/LA. O efeito dos alelos de *A. magna* foi menos pronunciado no período de incubação (IncPer, Figura 38).

Tabela 3. QTLs identificados para resistência a *Puccinia arachidis* e características agrônômicas em uma população F<sub>6</sub> *A. ipaënsis* x *A. magna*.

Características/ categorias	Característica s/símbolos	LG	Posição (cM)	Marcador adjacente(s)	LOD	Efeito Aditivo	R <sup>2</sup> (%)	
Resistência à ferrugem	SI_2012	4	17.0	TC7G10	2.7	0.1807	7.8	
		7	38.7	AHS0598	3.0	0.1582	8.2	
		8	25.4	AHGS1350 / AHS2541	3.3	0.1950	13.2	
		8	35.9	Ah-280	6.9	0.2511	21.2	
	SI_2013	8	35.9	Ah-280	3.2	0.3133	5.8	
		T/LA_2012	8	25.4	AHGS1350 / AHS2541	4.1	0.1264	16.0
			8	35.1	Ah-280	2.9	0.0912	8.9
	T/LA_2013	8	35.9	Ah-280	3.8	0.1993	12.3	
	S/LA_2012	8	35.9	Ah-280	3.8	0.0724	11.1	
	S/LA_2013	8	35.9	Ah-280	3.5	0.1378	11.0	
	Log_IncPer_2	012	8	42.9	Ah-280 / Ah-558	8.2	-0.4643	59.3
			3	39.9	AHGS2188 / AHGS2228	4.1	-0.3413	11.4
		013	8	33.1	AHS2541 / Ah-280	6.9	-0.2987	28.3
			8	38.9	Ah-280	4.2	-0.2182	15.0
8			38.9	Ah-280	4.2	-0.2182	15.0	
Produtividade	Log_10SN	3	82.3	ML2A05	3.4	-0.1065	8.6	
		4	28.0	AHGS2785	2.6	-0.0989	6.2	
		10	35.5	AHS1488	3.1	-0.1476	10.3	
	10-SW	4	68.8	AHGS1279 / AHS2728	3.9	0.3171	18.4	
		5	44.5	AHGS2602	2.9	0.1960	8.3	
Características De sementes	Peg_Length	1	40.8	AHGS2019 / Seq12B2	3.4	-2.0698	7.2	
		4	64.9	AHGS2155	11.2	4.1804	25.8	
		4	70.8	AHGS1279 / AHS2728	8.7	4.3753	30.2	
		5	10.4	AHS2897	3.4	2.0582	6.9	
		9	43.7	AHGS2018 / AHGS2235	3.0	1.9068	6.3	
	Pod_constricti on	1	37.1	AHGS2332	4.1	-0.6681	9.4	
		4	64.3	AHGS1917	3.4	0.5893	7.4	
		5	47.0	AHGS2513	3.5	-0.7907	8.0	
		6	25.4	AHGS2106	3.7	-0.6623	9.7	
		8	0.0	AHGS1383	3.5	-0.6048	8.1	
Arquitetura da planta	MSH_2009			AHGS1478_b3	/			
		9	36.3	AHGS2537_b2	3.3	0.5560	7.3	
		2	37.8	RN31F06	4.8	-5.4429	14.5	
		4	64.3	AHGS1917 / AHGS2155	6.5	-5.7860	17.6	
		5	48.7	AHGS1228	3.2	3.6098	8.1	
	Log_MSH201 1	4	64.9	AHGS2155	4.1	-0.1030	10.7	
		5	41.1	AHGS1980	4.0	1.6414	10.0	
		6	13.0	AHS2153	4.5	-0.1066	11.4	
		MSH_2012	3	23.2	TC1E06	4.0	-1.9735	8.1
			4	64.3	AHGS1917 / AHGS2155	12.3	-3.5641	30.4
5	48.7		AHGS1228	3.6	2.1333	7.4		



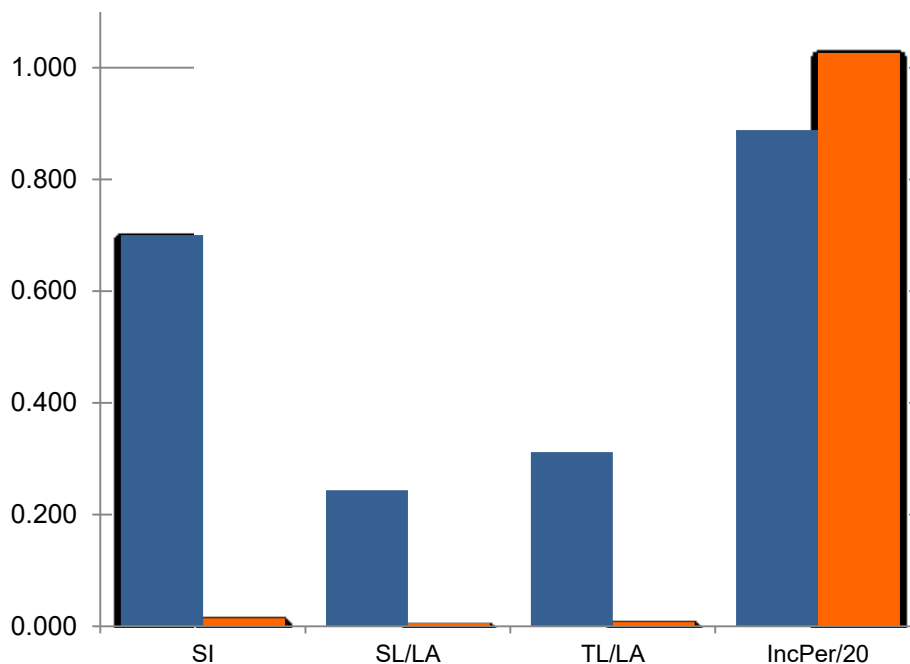


Figura 38. Gráfico de barras para contribuição alélica de *A. ipaënsis* (barras azuis) versus *A. magna* (barras laranja) às características associadas à resistência à ferrugem: índice de suscetibilidade (SI), número de lesões esporuladas/área foliar (SL/LA), número total de lesões/área foliar (TL/LA) e período de incubação (dias/20) (IncPer / 20).

### QTLs para outras características agrônômicas e de domesticação

As características agrônômicas e de domesticação foram avaliadas em três anos diferentes. Os QTLs foram consistentes entre os anos e para análise final de QTLs, os dados dos diferentes anos, foram reunidos e considerados como diferentes repetições do mesmo experimento. A exceção foi MSH (altura do eixo central), que não foi reunido, porque as medidas foram feitas em diferentes estágios de crescimento das plantas em cada ano. Foram identificados 25 QTLs. Curiosamente, QTLs para duas características de domesticação (PC e PL) foram colocados nas mesmas posições do mapa: 42,9cM-45,6cM no LG B01 e 64,3cM-64,9cM no LG B04 (Tabela 3, Figura 36). O LG B04 também abrigou um conjunto de QTLs para MSH na posição 64,3cM e 64,9cM, explicando entre 10,7% e 30,4% da variância fenotípica total. Para todas essas características, os principais marcadores associados foram AHGS1917 e AHGS2155. Alelos que aumentam os valores de características ligadas à domesticação foram originados de ambos os progenitores. No entanto, alelos que aumentam o número de sementes são todos derivados de *A. ipaënsis*. Nenhum QTL para características de domesticação/produzitividade co-localizaram com QTLs de resistência à ferrugem.

## Discussão

Este estudo procurou gerar informações e ferramentas para a introgressão de regiões genômicas do diploide *A. magna* K30097, que conferem resistência à ferrugem, no amendoim, um alotetraploide. A informação consiste da definição dos QTLs que controlam a resistência a doenças, e as ferramentas, de marcadores genéticos para rastrear as regiões genômicas de interesse num contexto genético tetraploide (o contexto de introgressão).

Para o mapeamento, usamos a progênie resultante do cruzamento entre as espécies selvagens, o mais provável doador do genoma B do amendoim, *A. ipaënsis* K30076 (suscetível à ferrugem) e *A. magna* K30097 (resistente à ferrugem). *Arachis ipaënsis* é geneticamente relacionado com o genoma B do amendoim e foi coletado e identificado em estado selvagem em um único local. *Arachis magna* é intimamente relacionada a ele e podem até mesmo ser consideradas como a mesma espécie biológica (José Valls, comunicação pessoal). A progênie desse cruzamento foi usada em dois estudos publicados anteriormente. No primeiro, a progênie F<sub>2</sub> foi usada para produzir um mapa com 149 marcadores em dez grupos de ligação, abrangendo um total de 1,294cM (Moretzsohn et al., 2009). No segundo, um mapa genético mais denso de 798 *loci*, mas abrangendo apenas 461cM, foi construído utilizando linhagens recombinantes F<sub>6</sub> geradas por SSD. Esse mapa foi integrado a um mapa consenso dos dois genomas diploides A e B no amendoim em separado e para o amendoim tetraploide (Shirasawa et al. 2013). Aqui, usamos as mesmas linhagens F<sub>6</sub> e informações de genotipagem de alguns marcadores adicionais para desenvolver um mapa constituído por 399 marcadores de alta qualidade, nenhum dos quais co-segregaram. O mapa cobriu 678cM. As diferenças nos tamanhos destes mapas, gerados a partir dos mesmos pais biológicos, parecem ser melhor explicadas pelos diferentes softwares e parâmetros que tratam erros de genotipagem de diferentes maneiras (Bertioli et al. 2014). O maior tamanho (1,294cM), foi obtido com o Mapmaker sem detecção de erro, o tamanho intermediário (678cM) foi obtido pelo Mapmaker com detecção de erro (Lincoln et al., 1992), e o menor tamanho (461cM) foi obtido com JoinMap, um programa que contém os seus próprios algoritmos que detectam erros e corrigem as distâncias genéticas. Embora pareça claro que a distância genética do mapa F<sub>2</sub> de 1294cM esteja substancialmente inflado, não está claro qual das outras duas estimativas é melhor. No entanto, o mapa aqui apresentado tem marcadores posicionados com uma confiança muito alta, por não conter marcadores co-segregando é mais adequado para a detecção de QTLs.

O foco principal deste estudo foi a identificação de QTLs de resistência a doenças. No entanto, também foram investigados QTLs para características de domesticação. *A.*

*ipaënsis* e *A. magna* são espécies silvestres que diferem pouco para essas características, ambas com longos pegs e constrictões além de sementes pequenas. Contudo, muitos segregantes apresentaram características um pouco mais semelhantes aos cultivados: 38 segregantes têm pegs mais curtos, 32 têm menor constrictão de vagem e 8 tiveram sementes maiores do que ambos os pais. Novas combinações alélicas conferiram características não observadas nos parentais. O posicionamento desses QTLs pode ser útil na localização de alelos silvestres importantes, com possível utilização para o melhoramento do amendoim. No entanto, acredita-se que essas características sejam complexas, quantitativas e altamente dependentes do ambiente. Apesar disso, esses QTLs foram surpreendentemente consistentes entre os anos. É possível também, que o efeito destes QTLs possam variar com o conteúdo genético. Infelizmente, a comparação dos QTLs para fenótipos semelhantes identificados por Foncéka e colaboradores (Foncéka et al., 2012a; Foncéka et al., 2012b) em estudos de alelos silvestres incorporados ao material cultivado é difícil devido à dificuldade de comparação entre os mapas. Além disso, a interpretação do significado de possíveis sobreposições também torna-se um problema por causa dos vários QTLs identificados em ambos os estudos.

Para a identificação de QTLs de resistência a doenças, avaliamos as RILs em quatro medidas de suscetibilidade à ferrugem em dois bioensaios independentes realizados em anos diferentes. Estas avaliações foram baseadas na técnica de folha destacada, que oferece fenotipagem precisa em condições controladas. Nós não utilizamos ensaios de campo por três razões: (i) a ocorrência de ferrugem no campo é muito desigual, varia de ano para ano e é fragmentada dentro do mesmo campo; (ii) a predominância habitual de LLS ou ELS dificulta a avaliação (Subrahmanyam et al., 1982; Sujay et al., 2012.) e, finalmente, (iii) a diferença extrema de arquitetura entre os genótipos selvagens e o amendoim cultivado teria feito o sistema de pontuação em campo sem sentido para este estudo. Esperamos realizar avaliações de campo posteriormente, em nossa pesquisa dentro de um esquema de retrocruzamentos, quando as linhagens avançadas já com os segmentos genômicos de silvestres, apresentarem arquitetura semelhante ao material cultivado parental, então, a ocorrência de várias doenças será avaliada concomitantemente.

Aqui, utilizando ensaios de folha destacada, observaram-se diferentes fenótipos de resistência à doença. Em algumas progênies, nenhuma lesão foi desenvolvida. Em outras, as lesões apareceram, porém, em seguida, um tecido necrosado foi desenvolvido em torno delas de uma maneira semelhante a uma reação de hipersensibilidade. Essas lesões não esporularam. Além disso, um período de incubação retardado também foi observado. Isto sugere diversos mecanismos de resistência e genes envolvidos na resistência. No total, foram detectados 13 QTLs com valores de LOD acima dos limites estabelecidos pelos testes de permutação (Churchill e Doerge 1994; Doerge e Churchill, 1996), que variou entre 2,5-

3,2. Todos os alelos que conferiram resistência foram obtidos do progenitor resistente *A. magna*. Eles conferem menos e menores lesões, lesões menos esporuladas e longos períodos de incubação da doença. Embora tenham sido detectados vários QTLs, um marcador particular (Ah-280) localizado no LGB08 está ligado aos QTLs associados aos quatro componentes de resistência à ferrugem, avaliados em ambos os anos. As diferenças entre as médias fenotípicas das RILs que possuem o alelo de *A. magna* desse marcador em comparação com aqueles que possuem o alelo de *A. ipaënsis* são impressionantes (Figura 36). O efeito alélico de *A. magna* no período de incubação aparece menos pronunciado. No entanto, isso é devido ao fato de que este só pôde ser medido em um subconjunto de genótipos: a minoria que mostrou sintomas. Como genótipos resistentes não têm período de incubação, não é possível medir com precisão o efeito alélico dessa característica em todos os genótipos. Considerando que esse QTL confere forte resistência à doença, e está localizado no final do cromossomo de uma espécie com estreita afinidade com o genoma B do amendoim cultivado, é improvável que sofra forte arraste de ligação. No geral, parece ser um candidato ideal para a introgressão de resistência à ferrugem no amendoim cultivado. Para facilitar isso, nós desenvolvemos vários marcadores ao redor do Ah-280. Para fazer isso, identificamos polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) entre *A. magna* e *A. ipaënsis*. Devido à elevada semelhança de *A. ipaënsis* com o genoma B de *A. hypogaea*, 19 dos 22 marcadores desenvolvidos, diferenciaram os genótipos silvestres resistentes à ferrugem e seus alotetraploides derivados de *A. ipaënsis* e *A. hypogaea*.

Estudos anteriores de resistência à ferrugem em *A. hypogaea* produziram informações limitadas. Há indícios de que a resistência à ferrugem seja controlada por poucos genes (Van der Plank, 1963). No entanto, uma análise genética quantitativa dos parentais e progênies indicou que a resistência à ferrugem é mais complexa e não se encaixa num padrão específico (Subrahmanyam et al. 1993). Estudos mais recentes, utilizando germoplasma no qual um dos parentais tem uma pequena contribuição genômica das espécies silvestres têm sido mais informativos. Foi identificado um grande QTL que explica até 83% da variação fenotípica (Khedikar et al 2010;. Sujay et al 2012). A origem desta resistência é possivelmente derivada de um segmento de cromossomo da espécie *A. cardenasii* de genoma A. Este segmento foi provavelmente herdado do parental comum GPBD4, que por sua vez tem um parental ICGV 86855 que é derivado do cruzamento *A. hypogaea* x *A. cardenasii* (Gowda et al., 2002). Os marcadores microssatélites nesta região do QTL, estão sendo usados atualmente para retrocruzamentos assistidos por marcadores com resultados muito promissores (Varshney et al., 2014). O QTL foi localizado no GL AhXV de acordo com um mapa consenso publicado para *A. hypogaea* (Gautami et al., 2012a). Pesquisas de similaridades de sequências dos cinco marcadores ligados a este QTL contra as sequências das pseudomoléculas recentemente disponíveis de *A. duranensis*, a mais

provável espécie ancestral do genoma A do amendoim ([www.peanutbase.org](http://www.peanutbase.org) Genbank acesso PRJNA258023), indicam que os melhores resultados para quatro deles estão no final do cromossomo 3 (Aradu.A03) entre 131,3 e 133,7Mbp. Portanto este QTL e o QTL identificado no presente estudo parecem ser diferentes e podem, a princípio, ser incorporados na mesma cultivar de amendoim, para proporcionar resistência mais forte e mais durável.

Para o introgressão de segmentos cromossômicos de *A. magna* K30097, um alotetraploide com *A. stenosperma* ( $[A. magna \times A. stenosperma]^{4x}$ ; Anf10) foi criado (A. Fávero, não publicado) e está sendo usado no programa de melhoramento genético do amendoim, no Instituto Agrônomo de Campinas, em São Paulo, Brasil, em colaboração com a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Leal-Bertioli et al. 2014a; I. Godoy, não publicado). O marcador SSR Ah-280 está sendo utilizado neste programa de melhoramento para a seleção de linhagens retrocruzadas que possuem o QTL para ferrugem. Isso facilitará os testes para função deste segmento cromossômico no background genético do amendoim cultivado.

Ao longo das últimas duas décadas, a introgressão de alelos silvestres para resistência a pragas e doenças provou ser muito valiosa para a cultura do amendoim. Além disso, os alelos silvestres conferem os fenótipos de resistência mais fortes, conhecidos não apenas contra a ferrugem (Stalker et al., 2002; Simpson et al., 2003; Varshney et al., 2014), mas também para mancha preta e nematoide das galhas (Khedikar et al., 2010; Chu et al., 2011; Burow et al., 2014). Esses alelos têm provado que são estáveis em diferentes ambientes e em diferentes contextos genéticos. A utilização de alelos localizados em segmentos de cromossomos silvestres tem facilitado o uso de marcadores moleculares para seleção em retrocruzamentos, pois os segmentos tem uma alta taxa de polimorfismo do DNA em relação ao amendoim cultivado. A melhor compreensão das relações entre a espécie cultivada e as espécies silvestres (Milla et al., 2005; Burow et al., 2009; Moretzsohn et al., 2013; Leal-Bertioli et al., 2014b; Seijo et al., 2007; Robledo et al., 2009) a facilidade crescente de desenvolver marcadores, e a melhor compreensão da estrutura genômica que está sendo adquirida a partir de sequenciamento do genoma de ancestrais diploides de amendoim ([www.peanutbase.org](http://www.peanutbase.org)), provavelmente facilitarão a maior utilização de alelos silvestres, permitindo maiores ganhos para a cultura do amendoim.

## Conclusões

- A utilização do marcador Ah-280 torna-se viável para MAS nos programas de melhoramento genético do amendoim. Esta região gênica pode ser explorada pelos programas de melhoramento genético na obtenção de cultivares resistentes ao fungo *Puccinia arachidis*;
- Devido à fonte de resistência de *A. magna* ser diploide, uma das alternativas para o desenvolvimento de cultivares resistentes é a piramidação baseada na exploração de linhagens com diferentes genes de resistência, ou ainda, através da incorporação em tetraploide sintético.

## Bibliografia

- ABBOTT, R. J. et al. Homoploid hybrid speciation in action. **Taxon**, v. 59, n. 5, p. 1375–1386, 2010.
- ADAMS, K. L.; WENDEL, J. F. Polyploidy and genome evolution in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, p. 135–141, 2005.
- AGROCHART. Produção mundial e do Brasil, 2015. Disponível em: <<http://www.agrochart.com/en/usda/section/17/oilseeds/>>. Acesso em: 03 nov. 2015.
- ALLARIO, T.; BRUMOS, J.; COLMENERO-FLORES, J. M. Large changes in anatomy and physiology between diploid Rangpur lime (*Citrus limonia*) and its autotetraploid are not associated with large changes in leaf gene expression. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 8, p. 507–2519, 2011.
- ARRIGO, N.; BARKER, M. S. Rarely successful polyploids and their legacy in plant genomes. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 15, p. 140–146, 2012.
- ARUNYANARK, A. et al. Chlorophyll Stability is an Indicator of Drought Tolerance in Peanut. **J. Agronomy & Crop Science**, v. 194, p. 113–125, 2008.
- BEAULIEU, J. M.; LEITCH, I. J.; PATEL, S. Genome size is a strong predictor of cell size and stomatal density in angiosperms. **New Phytologist**, v. 179, p. 975–986, 2008.
- BECK, S. L.; DUNLOP, R. W.; FOSSEY, A. Stomatal length and frequency as a measure of ploidy level in black wattle, *Acacia mearnsii* (de Wild). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 141, p. 177–181, 2003.
- BEEST, M.; ROUX, J. J. L.; RICHARDSON, D. M. The more the better? The role of polyploidy in facilitating plant invasions. **Annals of Botany**, 27p., 2012.
- BELKO, N. et al. Restriction of transpiration rate under high vapour pressure deficit and non-limiting water conditions is important for terminal drought tolerance in *cowpea*. **Plant Biology**, 15p., 2012.
- BENESOVÁ, M. et al. The Physiology and Proteomics of Drought Tolerance in *Maize*: Early Stomatal Closure as a Cause of Lower Tolerance to Short-Term Dehydration? **PLoS ONE**, v. 7, 1p.7, 2012.
- BERLYN, G. P.; MIKSCH, J. P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Iowa: The Iowa State University Press, 1976.
- BERTIOLI, D. J. et al. A large scale analysis of resistance gene homologues in *Arachis*. **Mol Gen Genomics**, v. 270, p. 34–45, 2003.
- BERTIOLI, D. J. et al. An analysis of synteny of *Arachis* with *Lotus* and *Medicago* sheds new light on the structure, stability and evolution of legume genomes. **BMC Genomics**, v. 10, 45p., 2009.

BERTIOLI, D. J. et al. An overview of peanut and its wild relatives. **Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization**, v. 9, n. 1, p. 134–149, 2011.

BERTIOLI, D. J. et al. The Use of SNP Markers for Linkage Mapping in Diploid and Tetraploid Peanuts. **G3 genes**, v. 4, p. 89-96, 2014.

BHATNAGAR-MATHUR, P. et al. Stress-inducible expression of At DREB1A in transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.) increases transpiration efficiency under water-limiting conditions. **Plant Cell Rep**, v. 26, p. 2071–2082, 2007.

BIDINGER, F. R. Utilization of plant genetic resources in crop breeding programmes. **Dinteria**, v. 23, p. 70-81, 1992.

BOGINO, P.; BANCHIO, E.; GIORDANO, W. Molecular diversity of peanut-nodulating *rhizobia* in soils of Argentina. **Journal of Basic Microbiology**, v. 50, p. 274–279, 2010.

BONDADA, B. R. and OOSTERHUIS, D. M. Comparative Epidermal Ultrastructure of Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Leaf, Bract and Capsule Wall. **Annals of Botany**, v. 86, p. 1143-1152, 2000.

BUBLIN, M. et al. IgE cross-reactivity between the major peanut allergen Ara h 2 and the nonhomologous allergens Ara h 1 and Ara h 3. **J Allergy Clin Immunol**, v. 132, n. 1, p. 118-124, 2013.

BUROW, M. D. et al. Transmission Genetics of Chromatin From a Synthetic Amphidiploid to Cultivated Peanut (*Arachis hypogaea* L.): Broadening the Gene Pool of a Monophyletic Polyploid Species. **Genetics**, v. 159, p. 823–837, 2001.

BUROW, M. D. et al. Molecular biogeographic study of recently described B- and A-genome *Arachis* species, also providing new insights into the origins of cultivated peanut. **Genome**, v. 52, p. 107-119, 2009.

BUROW, M. D. et al. Introgression of homeologous quantitative trait loci (QTLs) for resistance to the root-knot nematode [*Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood] in an advanced backcross-QTL population of peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Mol Breeding**, v. 34, p. 393-406, 2014.

CARUSO, I. et al. Impact of Ploidy Change on Secondary Metabolites and Photochemical Efficiency in *Solanum bulbocastanum*. **Natural Product Communications**, v. 8, n. 10, p. 1387 - 1392, 2013.

CHAO, D. et al. Polyploids Exhibit Higher Potassium Uptake and Salinity Tolerance in *Arabidopsis*. **Science**, v. 341, p. 658-659, 2013.

CHEN, J. Y.; GU, J.; WANG, E. T. Wild peanut *Arachis duranensis* are nodulated by diverse and novel *Bradyrhizobium* species in acid soils. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 37, p. 525–532, 2014.



CHEN, Z. J. Molecular mechanisms of polyploidy and hybrid vigor. **Trends Plant Sci.**, v. 15, n. 2, p. 57, 2010.

CHU, Y. et al. Development of a PCR-Based Molecular Marker to Select for Nematode Resistance in Peanut. **Crop Science**, v. 47, p. 841-847, 2007.

CHU, Y. et al. Marker-Assisted Selection to Pyramid Nematode Resistance and the High Oleic Trait in Peanut. **The Plant Genome**, v. 4, n. 2, p. 110–117, 2011.

CHURCHILL, G. A.; DOERGE, R. W. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. **Genetics**, v. 138, p. 963-971, 1994.

COATE, J. E.; LUCIANO, A. K.; SERALATHAN, V. Anatomical, biochemical, and photosynthetic responses to recent allopolyploidy in *Glycine dolichocarpa* (Fabaceae). **American Journal of Botany**, v. 99, n. 1, p. 55–67, 2012.

COMAI, L. The advantages and disadvantages of being polyploid. **Nature Reviews - Genetics**, v. 6, p. 836-846, 2005.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. **Companhia Nacional de Abastecimento**, v. 2-SAFRA 2014/2015, n. 2 - Terceiro Levantamento - Dezembro/2014, 2014.

DANG, P. M.; CHEN, C. Y.; HOLBROOK, C. C. Evaluation of five peanut (*Arachis hypogaea*) genotypes to identify drought responsive mechanisms utilising candidate-gene approach. **Functional Plant Biology**, p. 11, 2013.

DEVI, M. J.; SADOK, W.; SINCLAIR, T. R. Transpiration response of de-rooted peanut plants to aquaporin inhibitors. **Environmental and Experimental Botany**, v. 78, p. 167–172, 2012.

DEVI, M. J.; SINCLAIR, T. R. Diversity in Drought Traits among Commercial Southeastern US Peanut Cultivars. **International Journal of Agronomy**, p. 7, 2011.

DEVI, M. J.; SINCLAIR, T. R.; VADEZ, V. Genotypic Variation in Peanut for Transpiration Response to Vapor Pressure Deficit. **Crop Science**, v. 50, p. 191-196, 2010.

DEY, R. et al. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting *rhizobacteria*. **Microbiological Research**, v. 159, p. 371—394, 2004.

DOERGE, R. W.; CHURCHILL, G. A. Permutation tests for multiple loci affecting a quantitative character. **Genetics**, v. 142, p. 285-294, 1996.

DOYLE, J. J.; LUCKOW, M. A. The Rest of the Iceberg. Legume Diversity and Evolution in a Phylogenetic Context. **Plant Physiology**, v. 131, p. 900-910, March 2003.

DWIVEDI, S. L. et al. Components of resistance to late leaf spot and rust among interspecific derivatives and their significance in a foliar disease resistance breeding in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). **Euphytica**, v. 125, p. 81–88, 2002.

- DWIVEDI, S. L. et al. Oilseeds. In: KOLE, C. **Genome mapping and molecular breeding in plants**. [S.l.]: Berlin: Springer-Verlag, v. 2, 2007. Cap. 3 - Peanut, p. 115-151.
- EL-AKHAL, M. R. et al. Effects of salt stress and *rhizobial* inoculation on growth and nitrogen fixation of three peanut cultivars. **Plant Biology**, v. 15, p. 415–421, 2013.
- EMBRAPA. **Amendoim BR-1 - Informações para seu cultivo**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2009.
- ERISMANN, N. M.; MACHADO, E. C.; GODOY, I. J. Capacidade fotossintética de genótipos de amendoim em ambiente natural e controlado. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 41, n. 7, p. 1099-1108, jul. 2006.
- FABRA, A. et al. Interaction among *Arachis hypogaea* L. (peanut) and beneficial soil microorganisms: how much is it known? **Critical Reviews in Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 179–194, 2010.
- FAOSTAT. Produção mundial de amendoim entre 2013 -2014, 2015. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/compare/E>>. Acesso em: 12 maio 2015.
- FÁVERO, A. P. **Cruzabilidade entre espécies silvestres de Arachis visando à introgressão de genes de resistência a doenças do amendoim cultivado**. Escola superior de agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo. Piracicaba, p. 182. 2004.
- FÁVERO, A. P. et al. Study of the Evolution of Cultivated Peanut through Crossability Studies among *Arachis ipaënsis*, *A. duranensis*, and *A. hypogaea*. **Crop. Sci.**, v. 46, p. 1546–1552, 2006.
- FÁVERO, A. P. et al. Characterization of rust, early and late leaf spot resistance in wild and cultivated peanut germplasm. **Sci. Agric.**, v. 66, n. 1, p. 110-117, 2009.
- FENG, S. et al. Peanut (*Arachis hypogaea*) Expressed Sequence Tag Project: Progress and Application. **Comparative and Functional Genomics**, p. 9, 2012.
- FERGUSON, M. E. et al. Biogeography of wild *Arachis* (Leguminosae): distribution and environmental characterisation. **Biodiversity and Conservation**, v. 14, p. 1777–1798, 2005.
- FONCÉKA, D. et al. Genetic mapping of wild introgressions into cultivated peanut: a way toward enlarging the genetic basis of a recent allotetraploid. **BMC Plant Biology**, v. 9, n. 103, p. 13, 2009.
- FONCÉKA, D. et al. Fostered and left behind alleles in peanut: interspecific QTL mapping reveals footprints of domestication and useful natural variation for breeding. **BMC Plant Biology**, v. 12, n. 26, p. 16, 2012a.
- FONCÉKA, D. et al. Construction of Chromosome Segment Substitution Lines in peanut (*Arachis hypogaea* L.) using a wild synthetic and QTL mapping for plant morphology. **PlosOne**, v. e48642, p. 7(11), 2012b.
- FOWLER, J.; COHEN, L. **Practical statistics for field biology**. Chichester, 1990.

- FRANKLIN, G. L. Preparation of thin sections of synthetic resins and wood-resin composites, and a new acerating method for wood. **Nature**, v. 155, p. 51, 1945.
- FRANKS, P. J.; BEERLING, D. J. Maximum leaf conductance driven by CO<sub>2</sub> effects on stomatal size and density over geologic time. **PNAS**, v. 106, n. 25, p. 10343–10347, 2009.
- FREITAS, F. O.; PEÑALOZA, A. P. S.; VALLS, J. F. M. O amendoim contador de história. **Embrapa Recursos genético e Biotecnologia**, Documentos 107, p. 12, 2003.
- FU, G. et al. Epigenetic regulation of peanut allergen gene Ara h 3 in developing embryos. **Planta**, p. 12, 2010.
- GAETA, R. T. et al. Genomic Changes in Resynthesized Brassica napus and Their Effect on Gene Expression and Phenotype. **The Plant Cell**, v. 19, p. 3403–3417, 2007.
- GANTAIT, S.; MANDAL, N.; BHATTACHARYYA, S. Induction and identification of tetraploids using in vitro colchicine treatment of *Gerbera jamesonii Bolus* cv. Sciella. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 106, p. 485–493, 2011.
- GAUTAMI, B. et al. An International Reference Consensus Genetic Map with 897 Marker Loci Based on 11 Mapping Populations for Tetraploid Groundnut (*Arachis hypogaea* L.). **PLoS ONE**, v. 7, p. 11, 2012a.
- GAUTAMI, B. et al. Quantitative trait locus analysis and construction of consensus genetic map for drought tolerance traits based on three recombinant inbred line populations in cultivated groundnut (*Arachis hypogaea* L.). **Molecular Breeding**, v. 30, p. 757-772, 2012b.
- GEPTS, P.; PAPA, P. Possible effects of (trans)gene flow from crops on the genetic diversity from landraces and wild relatives. **Environ. Biosafety Res**, v. 2, p. 89-103, 2003.
- GIBBONS, R. W. Groundnut improvement research technology for the semi-arid tropics. **Proc. International Symposium on Development and Transfer of Technology for Rain-fed Agriculture and the SAT Farmer**, ICRISAT, India, p. 27-37, 1980.
- GODOY, I. J. et al. Produtividade, estabilidade e adaptabilidade de cultivares de amendoim em três níveis de controle de doenças foliares. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 34, n. 7, p. 1183-1191, Jul. 1999.
- GOMES, R. L. F.; LOPES, A. C. A. Correlations and path analysis in peanut. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 5, p. 105-112, 2005.
- GONZÁLES, W. L. et al. Induction of glandular and non-glandular trichomes by damage in leaves of *Madia sativa* under contrasting water regimes. **Acta Oecologica**, v. 33, p. 128-132, 2008.
- GOWDA, M. V. C. et al. GPBD 4: a Spanish bunch groundnut genotype resistant to rust and late leaf spot. **International Arachis Newsletter**, 2002. 29-32.

GRATTAPAGLIA, D.; SEDEROFF, R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. **Genetics**, v. 137, p. 1121-1137, 1994.

HAJJAR, R.; HODGKIN, T. The use of wild relatives in crop improvement: A survey of developments over the last 20 years. **Euphytica**, v. 156, p. 1-13, 2007.

HAMIDOU, F. et al. Selection of intermittent drought tolerant lines across years and locations in the reference collection of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). **Field Crops Research**, p. 46, 2011.

HAMMONS, R. O. Early history and origin of the peanut. **Peanuts: culture and uses. American Peanut Research**, Stillwater, 1973. 17-46.

HAO, G.; LUCERO, M. E.; SANDERSON, S. C. Polyploidy enhances the occupation of heterogeneous environments through hydraulic related trade-offs in *Atriplex canescens* (Chenopodiaceae). **New Phytologist**, v. 197, p. 970–978, 2013.

HEGARTY, M.; COATE, J.; SHERMAN-BROYLES, S. Lessons from Natural and Artificial Polyploids in Higher Plants. **Cytogenet Genome Res**, v. 140, p. 204–225, 2013.

HODGSON, J. G.; SHARAFI, M.; JALILI, A. Stomatal vs. genome size in angiosperms: the somatic tail wagging the genomic dog? **Annals of Botany**, v. 105, p. 573–584, 2010.

HOLBROOK, C. C. et al. Registration of 'Tifguard' Peanut All rights reserved. **J. Plant Reg**, v. 2, p. 92-94, 2008.

HOLBROOK, C. C. et al. Impact of Molecular Genetic Research on Peanut Cultivar Development. **Agronomy**, v. 1, p. 3-17, 2011.

HOLBROOK, C. C.; STALKER, H. T. **Peanut Breeding and Genetic Resources**. John Wiley & Sons, Inc, v. 22, 2003.

HONG, Y. et al. A SSR-based composite genetic linkage map for the cultivated peanut-*Arachis hypogaea* L. **BMC Plant Biology**, p. 10:17, 2010.

IBGE. Levantamento sistemático da produção agrícola. **IBGE- LSPA\_2**, v. 29, n. 1, p. 1-83, Segunda estimativa 2015. ISSN 0103-443X.

JACKSON, S.; CHEN, Z. J. Genomic and expression plasticity of polyploidy. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 13, p. 153–159, 2010.

JIANG, H. et al. Diversity characterization and association analysis of agronomic traits in a Chinese peanut (*Arachis hypogaea* L.) mini-core collection. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 56, p. 159-169, 2014.

JONGRUNGLANGA, N.; TOOMSANA, B.; VORASOOTA, N. Rooting traits of peanut genotypes with different yield responses to pre-flowering drought stress. **Field Crops Research**, v. 120, p. 262–270, 2011.

KELLY, L. A. et al. Reduced fungicide use on a new Australian peanut cultivar, highly resistant to the late leaf spot and rust pathogens. **Australasian Plant Pathol.**, v. 41, p. 359-373, 2012.

KENAN-EICHLER, M. et al. Wheat Hybridization and Polyploidization Results in Deregulation of Small RNAs. **Genetics**, v. 188, p. 263–272, 2011.

KHEDIKAR, Y. P. et al. A QTL study on late leaf spot and rust revealed one major QTL for molecular breeding for rust resistance in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). **Theor Appl Genet**, v. 121, p. 971–984, 2010.

KHERA, P. et al. Single Nucleotide Polymorphism–based Genetic Diversity in the Reference Set of Peanut (*Arachis* spp.) by Developing and Applying Cost-Effective Kompetitive Allele Specific Polymerase Chain Reaction Genotyping Assays. **The plant genome**, v. 6, n. 3, p. 11, 2013.

KOTTAPALLI, K. R. et al. Shotgun Label-Free Quantitative Proteomics of Water-Deficit-Stressed Midmature Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Seed. **Journal of Proteome Research**, v. 12, p. 5048–5057, 2013.

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

KRISHNAMURTHY, L.; VADEZ, V.; DEVI, M. J. Variation in transpiration efficiency and its related traits in a groundnut (*Arachis hypogaea* L.) mapping population. **Field Crops Research**, v. 103, p. 189–197, 2007.

LAERE, K. V.; FRANÇA, S. C.; VANSTEENKISTE, H. Influence of ploidy level on morphology, growth and drought susceptibility in *Spathiphyllum wallisii*. **Acta Physiol Plant**, v. 33, p. 1149–1156, 2011.

LAGIBO, A. D.; KOBZA, F.; SUCHÁNKOVÁ, P. Polyploidy effects on frost tolerance and winter survival of garden pansy genotypes. **Hort. Sci.**, v. 32, n. 4, p. 138–146, 2005.

LANDER, E. S. et al. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic maps of experimental and natural populations. **Genomics**, v. 1, p. 174-181, 1987.

LAVANIA, U. C. Polyploidy, body size, and opportunities for genetic enhancement and fixation of heterozygosity in plants. **Nucleus**, v. 56, p. 1–6, 2013.

LEAL-BERTIOLI, S. C. et al. *Arachis batizocoi*: a study of its relationship to cultivated peanut (*A. hypogaea*) and its potential for introgression of wild genes into the peanut crop using induced allotetraploids. **Ann Bot**, v. 115, n. 2, p. 237-249, 2014b.

LEAL-BERTIOLI, S. C. M. et al. Identification of candidate genome regions controlling disease resistance in *Arachis*. **BMC Plant Biology**, v. 9, n. 112, p. 12, 2009.

LEAL-BERTIOLI, S. C. M. et al. Ultrastructure of the Initial Interaction of *Puccinia arachidis* and *Cercosporidium personatum* with Leaves of *Arachis hypogaea* and *Arachis stenosperma*. **Journal of Phytopathology**, v. 158, p. 792–796, 2010.

- LEAL-BERTIOLI, S. C. M. et al. The effect of tetraploidization of wild *Arachis* on leaf morphology and other drought-related traits. **Environmental and Experimental Botany**, v. 84, p. 17–24, 2012.
- LEAL-BERTIOLI, S. C. M. et al. The use of the diploid *Arachis* genomes to aid introgression of wild segments into Peanut. **7th International Conference on Advances in Arachis through Genomics & Biotechnology - AAGB**, Savannah, GA, 2014a.
- LEITCH, A. R.; LEITCH, I. J. Genomic Plasticity and the Diversity of Polyploid Plants. **Science**, v. 320, p. 481-484, 2008.
- LEVIN, J. **Estatística aplicada a ciências humanas**. São Paulo: Harper e Row do Brasil, 1985.
- LEWIS, G; SCHRIRE, B; MACKINDER, B; LOCK, M; (Editors): **Legumes of the World** Kew Publishing; 2005. ISBN 1 900 34780 6.
- LI, C. et al. Cloning and characterization of an NBS-LRR resistance gene from peanuts (*Arachis hypogaea* L.). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 84, p. 70-75, 2013.
- LI, W.; SIXIANG, Z.; ZHIJIAN, G. In Vitro Culture of Tetraploids of *Aloe vera* L. **Acta Horticulturae Sinica**, 2002.
- LIANG, X. Q.; LUO, M.; GUO, B. Z. Resistance mechanisms to *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin contamination in peanut (*Arachis hypogaea*). **Plant Pathology Journal**, v. 5, n. 1, p. 115-124, 2006.
- LICHTENTHALER, H. K. Chlorophyll Fluorescence Signatures of Leaves during the Autumnal Chlorophyll Breakdown. **Journal of Plant Physiology**, v. 131, p. 101–110, 1987.
- LINCOLN, S.; MARK, J. D.; LANDER, E. S. Mapping genes controlling quantitative traits with MAPMAKER/EXP3.0. **Whitehead Institute Technical Report**, Cambridge, MA, 3<sup>a</sup> Ed. 1992.
- LIU, B. et al. Polyploid formation in cotton is not accompanied by rapid genomic changes. **Genome**, v. 44, p. 321–330, 2001.
- MACE, E. S. et al. SSR analysis of cultivated groundnut (*Arachis hypogaea* L.) germplasm resistant to rust and late leaf spot diseases. **Euphytica**, v. 152, p. 317–330, 2006.
- MADLUNG, A.; WENDEL, J. F. Genetic and Epigenetic Aspects of Polyploid Evolution in Plants. **Cytogenet Genome Res**, p. 16, 2013.
- MAJDI, M.; KARIMZADEH, G.; MALBOOBI, M. A. Induction of Tetraploidy to Feverfew (*Tanacetum parthenium* Schulz-Bip.): Morphological, Physiological, Cytological, and Phytochemical Changes. **Hortscience**, v. 45, n. 1, p. 16–21, 2010.
- MALLIKARJUNA, N.; SENTHILVEL, S.; HOISINGTON, D. Development of new sources of tetraploid *Arachis* to broaden the genetic base of cultivated groundnut (*Arachis hypogaea* L.). **Genet Resour Crop Evol**, v. 58, p. 889–907, 2011.

MANDEL, J. R. et al. Genetic diversity and population structure in cultivated sunflower and a comparison to its wild progenitor, *Helianthus annuus* L. **Theor Appl Genet**, v. 123, p. 693–704, 2011.

MANJULATHA, M. et al. Overexpression of a Pea DNA Helicase (PDH45) in Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Confers Improvement of Cellular Level Tolerance and Productivity Under Drought Stress. **Mol Biotechnol**, v. 56, p. 111–125, 2014.

MAOSONG, L.; CHUNYAN, W.; JIQING, S. Evolutional trends of leaf stomatal and photosynthetic characteristics in wheat evolutions. **Acta Ecologica Sinica**, v. 28, n. 11, p. 5385-5391, 2008.

MAYROSE, I.; BARKER, M. S.; OTTO, S. P. Probabilistic Models of Chromosome Number Evolution and the Inference of Polyploidy. **Syst. Biol.**, v. 59, n. 2, p. 132–144, 2010.

MCCOUCH, S. R. et al. Genomics of gene banks: a case study in rice. **American Journal of Botany**, v. 99, n. 2, p. 407–423, 2012.

MEHAN, V. K. et al. Components of rust resistance in peanut genotypes. **The American Phitopathological society**, v. 84, p. 1421-1426, 1994.

MERRITT, D. J.; DIXON, K. W. Restoration Seed Banks - A Matter of Scale. **Science**, v. 332, p. 424-425, 2011.

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

MINOCHA, R. et al. Development of a standardized methodology for quantifying total chlorophyll and carotenoids from foliage of hardwood and conifer tree species. **Can. J. For. Res.**, v. 39, p. 849-861, 2009.

MONDAL, S.; BADIGANNAVAR, A. M.; D'SOUZA, S. F. Development of genic molecular markers linked to a rust resistance gene in cultivated groundnut (*Arachis hypogaea* L.). **Euphytica**, v. 188, p. 163–173, 2012.

MONDAL, S.; BADIGANNAVAR, A. M.; MURTY, G. S. S. RAPD markers linked to a rust resistance gene in cultivated groundnut (*Arachis hypogaea* L.). **Euphytica**, v. 159, p. 233–239, 2007.

MOORE, K. M.; KNAUFT, D. A. The inheritance of high oleic acid in peanut. **J Hered**, v. 80, p. 252–253, 1989.

MORAES, S. A.; SALGADO, C. L. Utilização da técnica de folhas destacadas de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) para inoculações com *Cercospora arachidicola* Horii e *Cercospora personata* (Bert & Curt.) Ell. & Ev. **Summa Phytopathologica**, v. 8, p. 39-55, 1982.

MORETZSOHN, M. C. . G. E. G. . I. P. W. . L.-B. S. C. M. A study of the relationships of cultivated peanut (*Arachis hypogaea*) and its most closely related wild species using intron sequences and microsatellite markers. **Annals of Botany**, v. 111, p. 13–126, 2013.

MORETZSOHN, M. C. et al. 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, p. 11, 2004.

MORETZSOHN, M. C. et al. A linkage map for the B-genome of *Arachis* (Fabaceae) and its synteny to the A-genome. **BMC Plant Biology**, v. 9, n. 40, p. 10, 2009.

MRÁZ, P.; GARCIA-JACAS, N.; GEX-FABRY, E. Allopolyploid origin of highly invasive *Centaurea stoebe* s.l. (Asteraceae). **Mol. Phylogenet. Evol.**, p. 12, 2011.

NAGY, E. D. et al. Recombination is suppressed in an alien introgression in peanut harboring *Rma*, a dominant root-knot nematode resistance gene. **Mol Breeding**, v. 26, p. 357–370, 2010.

NAUTIYAL, P. C.; RAJGOPAL, K.; ZALA, P. V. Evaluation of wild *Arachis* species for abiotic stress tolerance: I. Thermal stress and leaf water relations. **Euphytica**, v. 159, p. 43–57, 2008.

NIGAM, S. N.; ARUNA, R. Stability of soil plant analytical development (SPAD) chlorophyll meter reading (SCMR) and specific leaf area (SLA) and their association across varying soil moisture stress conditions in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). **Euphytica**, v. 160, p. 111–117, 2008.

OSUJI, G. O.; BROWN, T. K.; SOUTH, S. M. Molecular Modeling of Metabolism for Allergen-Free Low Linoleic Acid Peanuts. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 168, p. 805–823, 2012.

PADOAN, D.; MOSSAD, A.; CHIANCONE, B. Ploidy levels in Citrus clementine affects leaf morphology, stomatal density and water content. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 25, n. 4, p. 283–290, 2013.

PAIK-RO, O. G.; SMITH, R. L.; KNAUFT, D. A. Restriction fragment length polymorphism evaluation of six peanut species within the *Arachis* section. **Theor Appl Genet**, v. 84, p. 201–208, 1992.

PANDE, S.; RAO, J. N. Resistance of Wild *Arachis* Species to Late Leaf Spot and Rust in Greenhouse Trials. **Plant Disease**, v. 85, n. 8, p. 851–855, 2001.

PANDEY, M. K. et al. Advances in *Arachis* genomics for peanut improvement. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 639–651, 2012.

PARISOD, C.; HOLDEREGGER, R.; BROCHMANN, C. Evolutionary consequences of autopolyploidy. **New Phytologist**, v. 186, p. 5–17, 2010.

PASSIOURA, J. B.; ANGUS, J. F. **Advances in Agronomy**. Burlington: Academic Press, v. 106, 2010.

PAUNESCU, A. Biotechnology for Endangered Plant Conservation: A Critical Overview. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 14, n. 1, p. 4095–4103, 2009.



PEÑALOZA, A. D. P. S.; VALLS, J. F. M. Contagem do número cromossômico em acessos de *Arachis decora* (Leguminosae). In: VEIGA, R. F. A., et al. **Simpósio Latino-Americano de Recursos Genéticos Vegetais**. Campinas: IAC/Embrapa-cenargen, v. 1, 1997. p. 39.

POMPELLI, M. F.; MARTINS, S. C. V.; CELIN, E. F. What is the influence of ordinary epidermal cells and stomata on the leaf plasticity of coffee plants grown under full-sun and shady conditions? **Braz. J. Biol.**, v. 70, n. 4, p. 1083-1088, 2010.

PRUTHVI, V. et al. Expression analysis of drought stress specific genes in Peanut (*Arachis hypogaea*, L.). **Physiol Mol Biol Plants**, v. 19, n. 2, p. 277–281, 2013.

RAMSEY, J.; SCHEMSKE, D. W. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. **Annu. Rev. Ecol. Syst.**, v. 29, p. 467-501, 1998.

RAMSEY, J.; SCHEMSKE, D. W. Neopolyploidy in flowering plants. **Annu. Rev. Ecol. Syst.**, v. 33, p. 589–639, 2002.

RANNEY, T. G. Polyploidy: From Evolution to New Plant Development. **Combined Proceedings International Plant Propagators' Society**, v. 56, p. 137-142, 2006.

RATNAKUMAR, P. et al. Assessment of transpiration efficiency in peanut (*Arachis hypogaea* L.) under drought using a lysimetric system. **Plant Biology**, p. 7, 2009.

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

RAVI, K. et al. Identification of several small main-effect QTLs and a large number of epistatic QTLs for drought tolerance related traits in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). **Theor Appl Genet**, v. 122, p. 1119–1132, 2011.

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

ROUSSEEUW, P. Silhouettes: A graphical aid to the interpretation and validation of cluster analysis. **Journal of Computational and Applied Mathematics**, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, The Netherlands, The Netherlands, v. 20, n. 1, p. 53–65, 1987.

SANTOS, J. F. et al. Resistência à mancha preta em populações F4 selecionadas de cruzamentos entre o amendoim cultivado e um anfidiplóide de *Arachis*. **Bragantia**, Campinas, v. 70, n. 3, p. 512-518, 2011.

SANTOS, J. F. et al. Resistência à mancha preta e qualidade agronômica de plantas rc1f2 de cruzamentos do híbrido anfidiplóide (*Arachis ipaensis* x *A. duranensis*) com o amendoim cultivado (*A. hypogaea*). **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 29, n. 2, p. 280-287, 2013.

SANTOS, S. P. **Produção e caracterização de alotetraploides sintéticos entre espécies silvestres do gênero *Arachis***. Universidade de Brasília. Brasília, p. 62. 2012.

SAVARY, S.; SUBBA RAO, P. V.; ZADOKS, J. C. A scale of reaction types of groundnut to *Puccinia arachidis* Speg. **Journal of phytopathology**, v. 124, p. 259-266, 1989.

SEIJO, G. et al. Genomic relationships between the cultivated peanut (*Arachis hypogaea*, Leguminosae) and its close relatives revealed by double GISH. **American Journal of Botany**, v. 94, n. 12, p. 1963–1971, 2007.

SEIJO, G. J. et al. Physical mapping of the 5 S and 18S-25 S rRNA genes by FISH as evidence that *Arachis duranensis* and *A. ipaënsis* are the wild diploid progenitors of *A. hypogaea* (Leguminosae). **American Journal of Botany**, v. 91, n. 9, p. 1294-1303, 2004.

SHIRASAWA, K. et al. Integrated Consensus Map of Cultivated Peanut and Wild Relatives Reveals Structures of the A and B Genomes of *Arachis* and Divergence of the Legume Genomes. **DNA Research**, v. 20, p. 173–184, 2013.

SILVENTE, S.; SOBOLEV, A. P.; LARA, M. Metabolite Adjustments in Drought Tolerant and Sensitive Soybean Genotypes in Response to Water Stress. **Plos One**, v. 7, p. 11, 2012.

SILVESTRI, M. C.; ORTIZ, A. M.; LAVIA, G. I. rDNA loci and heterochromatin positions support a distinct genome type for 'x = 9 species' of section *Arachis* (*Arachis*, Leguminosae). **Plant Syst Evol**, p. 8, 2014.

SIMPSON, C. E. et al. Registration of TxAG-6 and TxAG-7 Peanut Germplasm Lines. **Crop Sci.**, v. 33, p. 1418–1418, 1993.

SIMPSON, C. E. et al. Registration of 'NemaTAM' Peanut. **Crop Science**, v. 43, p. 1561, 2003.

SIMPSON, C. E.; STARR, J. L. Registration of 'COAN' Peanut. **Crop Sci.**, v. 41, p. 918, 2001.

SOLTIS, D. E. et al. Autopolyploidy in angiosperms: have we grossly underestimated the number of species? **Taxon**, v. 56, n. 1, p. 13-30, 2007.

SONGSRI, P. et al. Association of stomatal conductance and root distribution with water use efficiency of peanut under different soil water regimes. **AJCS**, v. 7, n. 7, p. 948-955, 2013.

STALKER, H. T. A new species in section arachis of peanuts with a d genome. **American Journal of Botany**, v. 78, n. 5, p. 630-637, 1991.

STALKER, H. T.; LYNCH, R. E. Registration of Four Insect-Resistant Peanut Germplasm Lines. **Crop Sci**, v. 42, p. 313-314, 2002.

SUBRAHMANYAM, P. et al. Resistance to rust and late leafspot diseases in some genotypes of *Arachis hypogaea*. **Peanut Sci**, v. 9, p. 6-10, 1982.

SUBRAHMANYAM, P. et al. Peanut rust: A major threat to peanut production in the semi-arid tropics. **Plant Disease**, v. 69, p. 813–819, 1985.

SUBRAHMANYAM, P. et al. Origins of resistance to rust and late leaf spot in peanut (*Arachis hypogaea*) Fabaceae. **Economic Botany**, v. 43, p. 444-455, 1989.

- SUBRAHMANYAM, P. et al. Origin and utilization of rust resistance in groundnut. In: PARLEVLIE, J. T. A. J. E. **Durability of disease resistance**. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1993. p. 147-158.
- SUJAY, V. et al. Quantitative trait locus analysis and construction of consensus genetic map for foliar disease resistance based on two recombinant inbred line populations in cultivated groundnut (*Arachis hypogaea* L.). **Mol Breeding**, v. 30, p. 773–788, 2012.
- SUN, L. et al. Genetic Engineering Peanut for Higher Drought- and Salt-Tolerance. **Food and Nutrition Sciences**, v. 4, p. 1-7, 2013.
- TANKSLEY, S. D.; MCCOUCH, S. R. Seed Banks and Molecular Maps: Unlocking Genetic Potential from the Wild. **Science**, v. 277, p. 1063, 1997.
- TASHILDAR, C. B. et al. Morphological and isozyme variations in *Puccinia arachidis* Speg. causing rust of peanut. **Karnataka J. Agric. Sci.**, v. 25, n. 3, p. 340-345, 2012.
- TAURIAN, T. et al. Genetic diversity of rhizobia nodulating *Arachis hypogaea* L. in Central Argentinean Soils. **Plant and Soil**, v. 282, p. 41–52, 2006.
- UPADHYAYA, H. D. Variability for Drought Resistance Related Traits in the Mini Core Collection of Peanut. **Crop Science**, v. 45, p. 1432–1440, 2005.
- UPADHYAYA, H. D. et al. Phenotypic diversity and identification of wild *Arachis* accessions with useful agronomic and nutritional traits. **Euphytica**, v. 182, p. 103–115, 2011.
- VADEZ, V. et al. Transpiration efficiency: new insights into an old story. **Journal of Experimental Botany**, p. 13, 2014.
- VALE, F. X. R.; FERNANDES FILHO, E.; LIBERATO, J. R. Quant - Quantificação de doenças: versão 1.0.1. **UFV**, Viçosa, 2001.
- 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.; COSTA, L.C.; CUSTÓDIO, A.R. A novel trifoliolate species of *Arachis* (Fabaceae) and further comments on the taxonomic section *Trirectoides*. **Bonplandia**, v. 22, n. 1, p. 91-97. 2013.
- VAN DER PLANK, J. E. **Plant diseases: epidemics and control**. New York: USA: Academic Press, 1963.
- VARSHNEY, R. K. et al. The first SSR-based genetic linkage map for cultivated groundnut (*Arachis hypogaea* L.). **Theor Appl Genet**, v. 118, p. 729–739, 2009.
- VARSHNEY, R. K. et al. Marker-assisted introgression of a QTL region to improve rust resistance in three elite and popular varieties of peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Theor Appl Genet**, v. 127, p. 1771–1781, 2014.
- VARSHNEY, R. K.; ROORKIWAL, M.; NGUYEN, H. T. Legume Genomics: From Genomic Resources to Molecular Breeding. **the plant genome**, v. 6, n. 3, p. 7, 2013.

VENABLES, W. N.; SMITH, D. M. Notes on R: A Programming Environment for Data Analysis and Graphics, n. Version 3.1.2 , 2014.

VISSER, V.; MOLOFSKY, J. Ecological niche differentiation of polyploidization is not supported by environmental differences among species in a cosmopolitan grass genus. **American Journal of Botany**, v. 102, n. 1, p. 1-14, 2015.

VOORRIPS, R. E. MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. **The Journal of Heredity**, v. 93, n. 1, p. 77-78, 2002.

WANG, C. T. et al. Novel protocol to identify true hybrids in normal oleate x high oleate crosses in peanut. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 13, p. 7, 2010.

WANG, S.; BASTEN, C. J.; ZENG, Z.-B. Windows QTL Cartographer 2.5. **Department of Statistics, North Carolina State University**, Raleigh, NC, 2012.

WARNER, D. A.; EDWARDS, G. E. Effects of polyploidy on photosynthesis. **Photosynthesis Research**, v. 35, p. 135-147, 1993.

WARNER, D. A.; KU, M. S. B.; EDWARDS, G. E. Photosynthesis, leaf anatomy, and cellular constituents in the polyploid C4 grass *Panicum virgatum*. **Plant Physiol**, v. 84, p. 461-466, 1987.

XU, L.; NAJEEB, U.; NAEEM, M. S. Induction of tetraploidy in *Juncus effusus* by colchicine. **Biologia Plantarum**, v. 54, n. 4, p. 59-663, 2010.

YERI, S. et al. Development of NILs from heterogeneous inbred families for validating the rust resistance QTL in peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Plant Breeding**, v. 133, p. 80-85, 2014.

YOKOTA, K.; HAYASHI, M. Function and evolution of nodulation genes in legumes. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 68, p. 1341–1351, 2011.

YU, S. et al. Comparison of the delta12 fatty acid desaturase gene between high-oleic and normal-oleic peanut genotypes. **J. Genet. Genomics**, v. 35, p. 679-685, 2008.

ZAHEDI, A. A.; HOSSEINI, B.; FATTAHI, M. Overproduction of valuable methoxylated flavones in induced tetraploid plants of *Dracocephalum kotschy* Boiss. **Botanical Studies**, v. 55, n. 22, p. 10, 2014.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ., 1999.

ZENG, Z. B. Theoretical basis for separation of multiple linked gene effects in mapping quantitative trait loci. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 90, p. 10972 - 10976, 1993.

ZENG, Z. B. Precision mapping of quantitative trait loci. **Genetics**, v. 136, p. 1457 - 1468, 1994.

ZHANG, J.; ZHENG, H. G.; AARTI, A. Locating genomic regions associated with components of drought resistance in rice: comparative mapping within and across species. **Theor Appl Genet**, v. 103, p. 19–29, 2001.

ZONG, W. et al. Genome-wide profiling of histone H3K4-tri-methylation and gene expression in rice under drought stress. **Plant Mol Biol**, v. 81, p. 175–188, 2013.

## Anexo

Tabela 1. Descrição das medidas foliares e características de pigmentos fotossintéticos para os seis conjuntos de tetraploides sintéticos, parentais e controles cultivados. Área foliar específica (SLA), área foliar (LA), área foliar total (TLA), SCMR (leitura da medida de clorofila da planta no solo com SPAD), clorofila A, Clorofila B, Clorofila total (A+B) e carotenoides.

Conjuntos	SLA		LA		TLA		SCMR		Clorofila A		Clorofila B		Clorofila A+B		Carotenoides	
	Média	SD	Média	SD	Média	SD	Média	SD	Média	SD	Média	SD	Média	SD	Média	SD
Bat-K9484	286.88	63.38	11.59	2.75	59.89	18.46	34.09	5.83	26.58	3.41	18.65	2.84	45.23	5.78	1.24	0.24
Dur-SeSn2848	237.95	76.82	6.16	1.56	49.92	9.96	33.91	7.06	37.8	8.26	25.3	2.89	63.1	10.27	2.29	0.56
BatDur2	271.17	40.27	12.09	3.41	37.66	20.95	43.47	6.27	47.5	6.36	33.06	5.22	80.56	9.01	1.92	0.29
Ah-Runner	228.5	41.15	7.39	1.16	114.92	33.31	35.48	6.98	93.65	12.53	44.39	5.65	138.03	17.98	3.79	0.72
Bat-K9484	286.88	63.38	11.59	2.75	59.89	18.46	34.09	5.83	20.02	4.25	9.47	0.99	29.49	4.91	1.29	0.29
Dur-V14167	269.71	43.73	4.95	1.09	64.95	11.64	24.77	6.59	21.76	4.88	9.84	1.72	31.6	6.25	1.19	0.21
BatDur1	303	38.85	16.48	3.95	102.24	37.17	37.16	5.44	48.56	4.88	25.8	1.24	74.36	5.38	2.51	0.18
Ah-Runner	228.5	41.15	7.81	1.85	114.92	33.31	35.48	6.98	65.27	16.52	33.68	5.79	98.96	20.65	3.62	0.71
Bat-K9484-2	228.84	18.14	11.59	2.75	59.89	18.46	24.46	4.14	26.58	3.41	18.65	2.84	45.23	5.78	1.24	0.24
Sten-V10309	212.08	71.4	6.26	2.09	80.78	19.66	20.73	3.63	14.92	3.91	16.37	4.77	31.3	8.37	2.24	0.38
BatSten1	185.22	61.79	13.22	4.52	104.97	51.31	35.1	5.78	27.29	2.22	18.74	1.98	46.04	0.78	1.8	0.3
Ah-Runner-2	163	14.72	7.39	1.16	114.92	33.31	49.62	4.24	93.65	12.53	44.39	5.65	138.03	17.98	3.79	0.72
Greg-V6389	211.36	38.8	3.32	1.42	20.78	5.94	29.14	7.1	28.11	4.3	14.8	3.92	42.92	7.71	2.1	0.36
Sten-V10309	195.77	75.46	6.26	2.09	80.78	19.66	26.73	6.81	13.62	2.02	6.76	1.78	20.39	3.78	0.84	0.14
GregSten1	217	38.18	9.35	4.79	111.36	33.86	42.18	8.93	64.27	5.15	29.62	4.7	93.9	9.07	3.56	0.25
Ah-Runner	228.5	41.15	7.39	1.16	114.92	33.31	35.48	6.98	65.27	16.52	33.68	5.79	98.96	20.65	3.62	0.71
Ipa-KG30076	193.36	26.92	3.21	0.78	18.2	10.51	25.69	6.33	53.93	5.21	18.27	1.53	72.21	6.65	1.71	0.28
Dur-V14167	269.71	43.73	4.95	1.09	64.95	11.64	24.77	6.59	46.72	5.08	14.56	1.54	61.29	6.6	1.67	0.19
IpaDur1	252.7	55.41	9.79	2.84	87.85	31.92	31.79	4.79	94.36	12.31	34.63	5.25	128.99	10.36	2.07	0.53
Ah-Runner	228.5	41.15	7.39	1.16	114.92	33.31	35.48	6.98	75.37	6.66	23.12	1.71	98.49	8.36	2.23	0.37
Ipa-KG30076	193.36	26.92	3.21	0.78	18.2	10.51	25.69	6.33	53.93	5.21	18.27	1.53	72.21	6.65	1.71	0.28

Villo-V12812	217.32	42.26	4.46	1.57	34.2	22.49	25.04	8.54	43.6	7.17	13.95	2.22	57.55	9.32	1.83	0.28
IpaVillo1	259.36	44.77	7.37	3.56	47.54	34.66	39.65	7.32	98.52	12.72	34.82	4.59	133.34	17.24	2.68	0.39
Ah-Runner	228.5	41.15	7.39	1.16	114.92	33.31	35.48	6.98	75.37	6.66	23.12	1.71	98.49	8.36	2.23	0.37

Tabela 2. Descrição das medidas de estruturas foliares na face abaxial para os seis conjuntos de tetraploides sintéticos, parentais e controles cultivados. Comprimento estomático abaxial (Comprimento\_ABA), Largura estomática abaxial (Largura\_ABA), Densidade de células epidérmicas abaxial (Cel\_epi/mm<sup>2</sup>\_ABA), Densidade de tricomas abaxial (tric/mm<sup>2</sup>\_ABA), Densidade de estômatos abaxial (est/mm<sup>2</sup>\_ABA) e Índice estomático abaxial (Índice estomático (IE)\_ABA).

Conjuntos	Comprimento_ABA		Largura_ABA		cel_epi/mm <sup>2</sup> _ABA		tric_mm <sup>2</sup> _ABA		est_mm <sup>2</sup> _ABA		Índice estomático (IE)_ABA	
	Média	SD	Média	SD	Média	SD	Média	SD	Média	SD	Média	SD
Bat-K9484	18.25	0.89	23.85	1.68	799	88.29	4.25	4.32	121.4	25.92	13.15	2.31
Dur-SeSn2848	23.46	1.13	18.98	0.69	1060.62	138.41	22.05	6.39	156.2	37.14	12.74	2.04
BatDur2	32.72	2.34	22.16	0.88	543.79	48.71	5.23	3.37	67.81	12.44	11.1	1.96
Ah-Runner	30.82	1.08	24.16	0.93	709.8	62.39	8.71	5.24	131.15	27.08	15.56	2.67
Bat-K9484	18.25	0.89	23.85	1.68	799.83	88.29	4.25	4.32	121.4	25.92	13.15	2.31
Dur-V14167	22.33	1.31	17.4	2.66	1034.8	140.54	16.17	9.92	175.16	37.37	14.41	2.22
BatDur1	31.5	0.95	21.18	1.29	635.94	87.74	6.37	3.76	84.47	20.36	11.65	1.87
Ah-Runner	30.82	1.08	24.16	0.93	709.8	62.39	8.71	5.24	131.15	27.08	15.56	2.67
Bat-K9484-2	18.25	0.89	23.85	1.68	799.83	88.29	4.25	4.32	121.4	25.92	13.15	2.31
Sten-V10309	20.87	0.55	15.35	0.77	1367.95	121.24	39.21	8.1	223.67	34.07	14.02	1.48
BatSten1	30.47	0.84	20.27	0.74	749.76	96.53	6.98	4.59	97.81	24.79	11.54	2.62
Ah-Runner-2	30.82	1.08	24.16	0.93	709.8	62.39	8.71	5.24	131.15	27.08	15.56	2.67
Greg-V6389	20.81	0.62	15.09	0.71	1386.49	118.69	39.21	12.01	242.26	37.44	14.85	1.79
Sten-V10309	20.87	0.55	15.35	0.77	1367.95	121.24	39.21	8.1	223.67	34.07	14.02	1.48
GregSten1	30.34	1.16	20.17	1.11	603.05	49.38	14.16	5.71	84.09	18.3	12.2	2.79
Ah-Runner	30.82	1.08	24.16	0.93	709.8	62.39	8.71	5.24	131.15	27.08	15.56	2.67
Ipa-KG30076	21.67	0.86	17.13	1.23	962.62	144.14	18.26	8.63	171.94	40.84	15.06	2.42
Dur-V14167	22.33	1.31	17.4	2.66	1034.8	140.54	16.17	9.92	175.16	37.36	14.41	2.22
IpaDur1	29.59	1.32	20.7	1.02	712.85	52.95	10.67	5.81	100.21	23.24	12.21	2.04
Ah-Runner	30.82	1.08	24.16	0.93	709.8	62.39	8.71	5.24	131.15	27.08	15.56	2.67

Ipa-KG30076	21.67	0.86	17.13	1.23	962.62	144.14	18.26	8.63	171.94	40.84	15.06	2.42
Villo-V12812	19.81	0.64	14.67	0.71	1667.11	266.64	27.94	8.17	348.8	55.2	17.35	2.02
IpaVillo1	29.52	1.21	21.25	1.74	592.98	67.23	8.12	4.9	88.32	15.9	12.88	2.15
Ah-Runner	30.82	1.08	24.16	0.93	709.8	62.39	8.71	5.24	131.15	27.08	15.56	2.67

Tabela 3. Descrição das medidas de estruturas foliares na face adaxial para os seis conjuntos de tetraploides sintéticos, parentais e controles cultivados. Comprimento estomático adaxial (Comprimento\_ADA), Largura estomática adaxial (Largura\_ADA), Densidade de células epidérmicas adaxial (Cel\_epit/mm<sup>2</sup>\_ADA), Densidade de tricomas adaxial (tric/mm<sup>2</sup>\_ADA), Densidade de estômatos adaxial (est/mm<sup>2</sup>\_ADA) e Índice estomático adaxial (Índice estomático (IE)\_ADA).

Conjuntos	Comprimento_ADA		Largura_ADA		cel_epit/mm <sup>2</sup> _ADA		tric_mm2_ADA		est_mm2_ADA		Índice estomático (IE)_ADA	
	Média	SD	Média	SD	Média	SD	Média	SD	Média	SD	Média	SD
Bat-K9484	21.28	1.74	17.13	1.14	901.3	125.06	1.3	3.6	136.16	24.09	13.15	1.73
Dur-SeSn2848	19.58	0.86	16.26	0.54	1098.69	81.29	3.48	4.11	182.56	24.14	14.23	1.34
BatDur2	28.53	0.91	21.09	0.57	522.22	68.34	0	0	83.22	13.06	13.79	1.87
Ah-Runner	23.9	1.06	19.24	0.72	846.4	97.5	3.7	4.43	138.78	28.23	13.99	1.48
Bat-K9484	21.28	1.74	17.13	1.14	901.3	125.06	1.3	3.6	136.16	24.09	13.15	1.73
Dur-V14167	18.95	0.72	16.23	0.67	1302.45	247.38	0.9	2.29	214.55	44.84	14.14	1.14
BatDur1	25.36	0.71	18.04	0.88	698.03	60.96	0.43	1.65	101.3	13.15	12.68	1.34
Ah-Runner	23.9	1.06	19.24	0.72	846.4	97.5	3.7	4.43	138.78	28.23	13.99	1.48
Bat-K9484-2	21.28	1.74	17.13	1.14	901.3	125.06	1.3	3.6	136.16	24.09	13.15	1.73
Sten-V10309	17.37	0.39	14.53	0.48	1787.58	227.3	15.25	8.63	272.76	46.05	13.2	1.02
BatSten1	27.26	0.86	19.37	0.44	739.65	60.51	1.3	2.66	112.41	16.76	13.15	1.29
Ah-Runner-2	23.9	1.06	19.24	0.72	846.4	97.5	3.7	4.43	138.78	28.23	13.99	1.48
Greg-V6389	18.93	0.44	15.23	0.26	1496.94	105.14	2.61	3.68	252.94	31.6	14.41	1.06
Sten-V10309	17.37	0.39	14.53	0.48	1787.58	227.3	15.25	8.63	272.76	46.05	13.2	1.02
GregSten1	25.83	2.11	18.5	1.12	912.85	69.83	4.35	4.64	135.51	17.83	12.92	1.52
Ah-Runner	23.9	1.06	19.24	0.72	846.4	97.5	3.7	4.43	138.78	28.23	13.99	1.48
Ipa-KG30076	19.41	0.92	15.64	0.82	892.81	82.7	1.74	3.4	157.29	20.3	15.02	1.89
Dur-V14167	18.93	0.71	16.22	0.66	1313.94	251.09	1.3	3.16	214.59	44.06	14.05	1.21



IpaDur1	25.36	0.71	18.04	0.88	793.02	53.76	2.39	3.2	106.75	10.05	11.88	1.08
Ah-Runner	23.9	1.06	19.24	0.72	846.4	97.5	3.7	4.43	138.78	28.23	13.99	1.48
Ipa-KG30076	19.41	0.92	15.64	0.82	892.81	82.7	1.74	3.4	157.29	20.3	15.02	1.89
Villo-V12812	19.83	0.76	16.75	0.64	1471.24	203.79	16.99	7.78	224.61	56.99	13.08	1.58
IpaVillo1	27.5	1.83	19.65	0.79	742.04	77.76	2.61	4.06	104.57	18	12.32	1.43
Ah-Runner	23.9	1.06	19.24	0.72	846.4	97.5	3.7	4.43	138.78	28.23	13.99	1.48

Tabela 4. Descrição das medidas de caráter agrônomo para os seis conjuntos de tetraploides sintéticos, parentais e controles cultivados. Peso da parte radicular em gramas (Peso radicular-PR), Peso da parte aérea da planta em gramas (Peso parte aérea-PA) e Altura do eixo central em centímetros (Altura do eixo central – AEC).

Conjuntos	Peso radicular-PR		Peso parte aérea-PA		Altura do eixo central-AEC	
	Média	SD	Média	SD	Média	SD
Bat-K9484						
Dur-SeSn2848						
BatDur2						
Ah-Runner						
Bat-K9484	0.61	0.22	4.37	1.94	16.05	3.03
Dur-V14167	0.35	0.15	4.11	1.7	21.15	4.13
BatDur1	1.32	0.44	12	3	59	26.96
Ah-Runner	2.63	0.47	15.32	2.25	17.41	1.39
Bat-K9484-2	0.61	0.22	4.37	1.94	16.05	3.03
Sten-V10309	1.27	0.41	5.25	1.85	10.45	1.38
BatSten1	1.31	0.6	6.59	2.42	17	1.69
Ah-Runner-2	2.63	0.47	15.32	2.25	17.41	1.39
Greg-V6389	0.75	0.28	4.38	1.52	10.8	2.46
Sten-V10309	1.27	0.41	5.25	1.85	10.45	1.38
GregSten1	2.09	0.57	12.02	3.28	22.05	2.91
Ah-Runner	2.63	0.47	15.32	2.25	17.41	1.39
Ipa-KG30076	0.54	0.18	2.74	1.18	7.65	2.7
Dur-V14167	0.35	0.15	4.11	1.7	21.15	4.13

IpaDur1	0.84	0.51	5.22	1.9	27.85	11.89
Ah-Runner	2.63	0.47	15.32	2.25	17.41	1.39
Ipa-KG30076	0.54	0.18	2.74	1.18	7.65	2.7
Villo-V12812	0.55	0.15	4.5	1.55	10.35	1.41
IpaVillo1	0.87	0.33	5.81	2.1	17.35	5.21
Ah-Runner	2.63	0.47	15.32	2.25	17.41	1.39

---