



**Universidade de Brasília – UnB  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Botânica**

**Distribuição de retrotansposons do tipo LTR e sequências de DNA  
ribossômico em cromossomos de genótipos diploides e tetraploides de  
*Arachis spp.* por hibridização *in situ* por fluorescência - FISH**

**Eliza Fabricio de Melo Bellard do Nascimento**

**Orientadora:** Dra. Ana Cláudia Guerra de Araújo

Brasília – DF

Agosto/ 2016



**Universidade de Brasília – UnB**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Departamento de Botânica**

**Distribuição de retrotansposons do tipo LTR e sequências de DNA ribossômico em cromossomos de genótipos diploides e tetraploides de *Arachis spp.* por hibridização in situ por fluorescência - FISH**

**Eliza Fabricio de Melo Bellard do Nascimento**

**Orientadora:** Dra. Ana Cláudia Guerra de Araújo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Botânica da Universidade de Brasília como requisito para obtenção do título de Mestre em Botânica.

Brasília – DF

Agosto/ 2016

Dissertação de autoria de Eliza Fabricio de Melo Bellard do Nascimento, intitulada “Distribuição de retrotansposons do tipo LTR e sequências de DNA ribossômico em cromossomos de genótipos diploides e tetraploides de *Arachis spp.* por hibridização in situ por fluorescência - FISH”, realizada junto ao Departamento de Botânica, do Instituto de Ciências Biológicas da UnB e à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, sob orientação da Dra. Ana Cláudia Guerra de Araújo, com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP/DF).

Aprovado por:

---

Dra. Ana Cláudia Guerra de Araújo (Orientadora)

---

Prof. Dra. Regina Célia de Oliveira (Examinadora)  
Departamento de Botânica  
Universidade de Brasília

---

Dra. Marisa Toniolo Pozzobon (Examinadora)  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

---

Dr. Márcio de Carvalho Moretzsohn (Suplente)  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

## *Dedicatória*

*A Deus, a meus amados pais, Janeth Melo e José Bellard pelo amor e incentivo constante durante minha formação.*

*Dedico.*

## *Agradecimentos*

Agradeço primeiramente a Deus e a Nossa Senhora, que sempre me acompanham, me acolhem, me confortam e me permitem todos os dias ter forças para lutar pelos meus objetivos.

À minha mãe, Janeth Melo e ao meu pai, José Bellard que diante de todas as dificuldades, conseguiram me dar todo amor e apoio necessários para que eu alcançasse meus objetivos e chegasse onde estou hoje. Aos meus amados avós, Maria Helena e Ataliba, ao meu Tio Helton e tia Madellon, por serem meus exemplos em todos os aspectos. Ao meu irmão Luiz Paulo, que apesar das diferenças sempre está presente. Amo vocês.

Ao meu companheiro, escudeiro fiél, caveira, por todo apoio, paciência, dedicação e amizade. Diego amo você.

À minha querida orientadora, Dra. Ana Cláudia, que idealizou esse projeto sempre ao meu lado, iluminando minhas ideias, acreditando em mim. Obrigada por contribuir imensamente para o meu crescimento profissional e pessoal. Sem dúvida levarei por toda a minha vida.

Ao grupo *Arachis*: Dr. José Francisco Montenegro Valls, Dra. Patrícia Guimarães, Dra. Ana Brasileiro, Dra. Soraya Bertioli, Dr. David John Bertioli e Dr. Márcio Moretzsohn, pelo imenso apoio, orientação, atenção e sugestões. E ainda, a Dra. Marisa Toniolo Pozzobon e a analista Ana Cristina Gomes (querida Aninnha) pelo apoio, carinho e atenção.

Aos amigos do Laboratório de Interação Planta-Praga III, que fizeram com que a rotina do laboratório se tornasse mais leve e divertida. Bruna V, Thaís, Andressa, Bruna M, Artur, Ana Zotta, Lara, Luiz Henrique, Gustavo, Larissa, Ageu e Cris. Vocês fizeram a diferença.

À minha querida amiga Dra. Bruna Vidigal, por toda amizade, carinho, confidências e ajuda intelectual. Você é um exemplo a ser seguido.

Ao Dr. Artur Fonsêca, pela amizade e por ter me ensinado tanto sobre citogenética.

A Dra. Larissa Arrais, pelo belo exemplo profissional e por ter ajudado a despertar em mim o amor e dedicação pela ciência.

Aos meus amigos, irmãos que a vida me deu de presente: Rayane, Paula, Nathália, Pedro, Larissa e Priscila. Obrigada por sempre estarem ao meu lado. Amo vocês.

Aos professores do departamento de Botânica da UnB, que contribuíram para que eu pudesse aprofundar meus conhecimentos Botânicos.

À Fundação de Apoio a Pesquisa do Distrito Federal (FAP/DF), pelo financiamento do projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por conceder a bolsa de estudos.

À Empresa Recursos Genéticos e Biotecnologia, por disponibilizar as instalações e serviços para que uma ampla parte do projeto fosse realizada.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	8
LISTA DE TABELAS .....	10
RESUMO .....	11
1. INTRODUÇÃO .....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	16
2.1. A cultura do amendoim.....	16
2.2. O gênero <i>Arachis</i> .....	17
2.3. O amendoim e sua origem .....	18
2.4. Conteúdo repetitivo do genoma do amendoim ( <i>Arachis hypogaea</i> ) .....	20
2.5. Elementos de transposição (ETs).....	21
2.6. Hibridização in situ por fluorescência (FISH) .....	24
3. JUSTIFICATIVA.....	27
4. HIPÓTESES.....	28
5. OBJETIVOS.....	29
5.1. Objetivo geral.....	29
5.2. Objetivos específicos .....	29
6. MATERIAL E MÉTODOS .....	30
6.1. Local de realização dos experimentos .....	30
6.2. Material vegetal .....	30
6.3. Análise do conteúdo de DNA por citometria de fluxo .....	30
6.4. Coleta de pontas de raízes, isolamento do meristema radical e preparo de lâminas contendo cromossomos metafásicos .....	31
6.5. Bandeamento cromossômico com CMA <sub>3</sub> /DAPI .....	31
6.6. Obtenção de sondas genômicas para GISH .....	32
6.7. Obtenção de sondas para FISH .....	33
6.8. Verificação da incorporação de nucleotídeos marcados nas sondas ( <i>dot blot</i> ).....	35
6.9. Distribuição <i>in silico</i> dos RT-LTR selecionados .....	35
6.10. FISH e GISH.....	36
7. RESULTADOS.....	38
7.1. Análise do conteúdo de DNA por citometria de fluxo .....	38
7.2. Bandeamento cromossômico com CMA <sub>3</sub> /DAPI .....	38
7.3. GISH .....	39
7.5. Sondas para FISH .....	43
7.5.1 Amplificação das sequências conservadas nas famílias de RT-LTR .....	43
7.5.2. Confeção de sondas e confirmação da incorporação de nucleotídeos marcados ( <i>dot blot</i> ) .....	43

7.6. FISH.....	45
7.6.1. Sondas de DNAr.....	45
7.6.2. Sondas de RT-LTR.....	47
8. DISCUSSÃO.....	50
9. CONCLUSÃO .....	60
10. PERSPECTIVAS .....	61
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	62

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Bandeamento cromossômico com CMA<sub>3</sub> (amarelo) e DAPI (cinza) em cromossomos metafásicos do alotetraploide sintético (A), mostrando dois pares de cromossomos com bandas CMA<sup>+</sup>: um com bandas distais na constrição secundária (A10 ou B10) (setas) e outro com bandas centroméricas (A02 ou B10) (cabeças de seta). CMA<sub>3</sub> em *A. hypogaea* (B), com seis pares de cromossomos com bandas CMA<sup>+</sup> nas regiões pericentroméricas. Ambos os alotetraploides com bandas DAPI<sup>+</sup> nas regiões centroméricas de nove pares de cromossomos do subgenoma A. Em *A. duranensis* (C) quatro pares de cromossomos com duas bandas pericentroméricas CMA<sup>+</sup> (setas), três pares com bandas centroméricas (cabeças de seta), incluindo o par 'A' e bandas distais no par A10. Nove pares de cromossomos com centrômeros DAPI<sup>+</sup>. Em *A. ipaënsis* (D) apenas um par de cromossomos (B10) com bandas CMA<sup>+</sup> nas regiões distais, sem bandas DAPI<sup>+</sup>. Barra: 5µm. ....39

Figura 2: Cromossomos metafásicos dos alotetraploides, sintético e natural após GISH com sondas genômicas e contracorados com DAPI (azul), evidenciado nos centrômeros do subgenoma A. Alotetraploide sintético (A) com sonda genômica de *A. hypogaea* (rosa) distribuída em quase todos os cromossomos, ausente nos centrômeros e em um par de cromossomos do subgenoma A (setas), não detectada nas regiões distais de todos os cromossomos. *Arachis hypogaea* (B) com sonda genômica do alotetraploide sintético (rosa) presente em quase todos os cromossomos, ausente nos centrômeros e em dois pares do subgenoma A (setas), não detectada nas regiões distais de todos os cromossomos. Duplo GISH com sondas genômicas de *A. duranensis* (vermelho) e *A. ipaënsis* (verde) nos cromossomos do alotetraploide sintético (C) hibridizadas em ambos os subgenomas, mais evidente no subgenoma A, com sonda de *A. duranensis* e vice-versa. Sobreposição de sinais (amarelo) observada ao longo dos braços da maioria dos cromossomos. Regiões distais, centrômeros do subgenoma A e um par de cromossomos A (setas) não mostraram sinais evidentes com nenhuma sonda. Um único par de cromossomos do subgenoma B com padrão alternado de bandas entre as duas sondas, incluindo as regiões centroméricas, excluindo as regiões distais (cabeças de seta). *Arachis hypogaea* (D) com padrão semelhante ao observado no sintético, exceto que a intensidade de sinais e sobreposição são mais fracas. Barra: 5µm. ....40

Figura 3: Distribuição *in silico* das famílias de RT-LTR RE128-84, Pipoka e Athena nas pseudomoléculas de *A. duranensis* e *A. ipaënsis*. ....43

Figura 4: Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio mostrando a amplificação das sequências da TR dos RT-LTR pertencentes às famílias Pipoka e RE128-84 e da sequência conservada de Athena, indicando os tamanhos dos fragmentos amplificados por PCR, respectivamente com 535, 558 e 618pb. O marcador utilizado foi o *1Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen).....43

Figura 5: Geis de agarose 1% corado com brometo de etídio mostrando o tamanho e concentração estimada das sondas confeccionadas a partir da sequência do gene que codifica a TR dos retrotransposons LTR pertencentes às famílias Pipoka e RE128-84 e da sequência conservada de Athena (A) marcadas com digoxigenina (DIG 11-dUTP), e da as sondas de DNAr 5S e 18S-5.8S-25S (B) marcadas com digoxigenina e CY3-dUTP. O marcador utilizado foi o *1Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen).....44

Figura 6: Membrana de *Nylon* após *dot blot* das sondas de DNA confirmando a incorporação de nucleotídeos marcados com digoxigenina (DIG 11-dUTP) dos RT-LTR pertencentes às famílias Athena (1), Pipoka (2) e RE128-84 (3) e de DNAr 5S (4) e 18S-5.8S-25S (5)...44

Figura 7: Cromossomos metafásicos dos genótipos alotetraploides e diploides após FISH com sondas de DNAr e contracolorados com DAPI (cinza), evidenciado em branco nos centrômeros do subgenoma A. FISH com sonda de DNAr 5S nos cromossomos do alotetraploide sintético (A- vermelho e C- verde) com sítios presentes nas regiões distais do par A03, e próximos ao centrômeros do par B03, semelhantes aos sítios 5S em *A. hypogaea* (B). FISH com sonda de DNAr 45S no alotetraploide sintético (C- vermelho e D- verde) com seis sítios nos cromossomos A02, A10 e B10. O par A02 com sinais mais fracos, próximos aos centrômeros e B10, mais evidentes, também próximos aos centrômeros. Sítios em A10 localizados nas regiões satélites com RON. Diferindo do sintético, *A. hypogaea* (E e F) com dez sítios nos cromossomos A02, A10, B3, B7 e B10. O par A10 com sinais mais fortes, localizados nas regiões satélites com RON (E). Sítios em A02, B03 e B10 nas regiões pericentroméricas, mais discretos em B03 e em B07 localizados nas regiões distais. Em *A. duranensis* (G) com presença de quatro sítios nos pares de cromossomos A02 e A10, com RON em A10. Em *A. ipaënsis* (H) presença de seis sítios nos pares de cromossomos B03, B07 e B10. Sítios em B10 foram localizados nos satélites com NOR. Sítios em B03 e B07 foram semelhantes aos observados em *A. hypogaea* (F), mas diferindo do sintético com sítios observados apenas no par B10 (B). Barra: 5µm. ....46

Figura 8: Cromossomos metafásicos dos genótipos alotetraploides e diploides após FISH com sondas de RT-LTR e contracolorados com DAPI (azul), evidenciado nos centrômeros do subgenoma A. Alotetraploide sintético (A, E e I), *A. hypogaea* (B, F e J), *A. duranensis* (C, G e K) e *A. ipaënsis* (D, H e L), após FISH com as sondas RE128-84 (A, B, C e D), Pipoka (E, F, G e H) e Athena (I, J, K e L). Sonda RE128-84 no alotetraploide sintético (A) com sinais difusos e pericentroméricos nos cromossomos do subgenoma A, exceto em um par sem marcação (setas). Distribuídos nos braços e centrômeros de todos os cromossomos do subgenoma B e ausentes nas regiões distais de ambos os subgenomas, assim como observado em todos os cromossomos de *A. hypogaea* (B). Em *A. duranensis* (C) o padrão também foi difuso e localizado nos braços, centrômeros e nas regiões distais de todos os cromossomos. Em *A. ipaënsis* (D) o padrão de hibridização foi pontual e presente em quase todos os cromossomos. Sonda Pipoka no alotetraploide sintético (E) mostrou padrão difuso, localizado nos braços e centrômeros de ambos os subgenomas, mais evidente em alguns cromossomos do subgenoma A e ausente na região distal de todos os cromossomos. Em *A. hypogaea* (F), a maioria dos cromossomos mostrou sinais pontuais e principalmente pericentroméricos em ambos os subgenomas. Em *A. duranensis* (G) o padrão foi difuso, presente nos braços e centrômeros de todos os cromossomos, mais discreto nos pares A09 e A10 e ausente na região distal de todos os cromossomos. Em *A. ipaënsis* (H) os sinais também foram difusos em todos os cromossomos, mais fortes em dois pares (setas). Sonda Athena no alotetraploide sintético (I) os sinais apresentaram um padrão difuso, presentes nos braços e centrômeros da maioria dos cromossomos do subgenoma B, não detectado na maioria dos cromossomos do subgenoma A e ausentes nas regiões distais. Em *A. hypogaea* (J) com padrão também difuso, distribuído nos braços e centrômeros de todos os cromossomos e mais discreto nos pares A09 e A10. Em *A. duranensis* (K) os sinais de hibridização foram difusos, presentes nos braços e centrômeros de quase todos os cromossomos e ausentes nas regiões distais. Em *A. ipaënsis* (L) o padrão também foi difuso e presente em todos os cromossomos. Barra: 5µm. ....48

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Genótipos de *Arachis* utilizadas no estudo, estado, número de cromossomos, fórmula genômica, acesso, origem e fornecimento de sementes. ....30

Tabela 2: Genótipos de *Arachis* analisados por citometria de fluxo, acesso, nível de ploidia, conteúdo de DNA (2C) em picogramas, coeficiente de variação (CV) e estimativa do tamanho em pares de base (Gb). ....38

Tabela 3: Sequências de DNA da TR dos membros das famílias de RT-LTRs RE 128-84 e Pipoka e da região interna altamente conservada de Athena. ....41

## RESUMO

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é uma espécie alotetraploide de origem recente, originado a partir da hibridação entre duas espécies silvestres diplóides, *A. duranensis* (genoma A) e *A. ipaënsis* (genoma B), seguida por uma duplicação cromossômica espontânea (3,500-10,000 anos atrás), cujo genoma tem aproximadamente 2,8 Gb de tamanho, composto em sua maioria por sequências repetitivas. A exploração do seu genoma grande e complexo, sem o genoma de referência tem sido um desafio. Portanto, o alotetraploide sintético (*A. ipaënsis* x *A. duranensis*)<sup>4x</sup>, que mimetiza o *background* genômico do amendoim foi utilizado com objetivo de desvendar os efeitos da hibridação e poliploidização. Esse estudo compreende a primeira caracterização citogenética dos subgenomas desse alotetraploide sintético de *Arachis*, em comparação com o genótipo natural, o amendoim, estendendo-se para as espécies genitoras. Os alotetraploides, natural e sintético apresentaram semelhanças, como a observada no conteúdo de DNA, com 2C (pg) de 5,71 e 5,92 respectivamente; na intensidade e posição de bandas centroméricas DAPI<sup>+</sup>; no número de loci de DNAr 5S e em alguns loci de DNAr 45S com presença de RONS. Foi demonstrado ainda que alguns aspectos da organização e composição dos subgenomas do sintético diferem das observadas nas espécies diplóides, e em menor grau, das observadas em *A. hypogaea*. Rearranjos de alguns segmentos de DNA nos subgenomas do sintético foram detectados, entre eles a perda dos loci 45S de *A. ipaënsis*; a inativação da RON no subgenoma B; ausência de bandas evidenciando regiões heterocromáticas CMA<sup>+</sup> e diferenças na frequência e distribuição de RT-LTRs. Portanto a poliploidia realmente vai além da simples união de dois genomas em um mesmo núcleo, podendo envolver também a participação de vastos ajustes moleculares e fisiológicos, que incluem rearranjos genômicos, além do controle epigenético. Algumas das alterações observadas no sintético podem ser semelhantes as que possivelmente ocorreram durante a formação e evolução do amendoim. Esses resultados trazem novos *insights* sobre a história genômica do amendoim, representando, portanto, uma contribuição significativa para estudos relacionados com o seu contínuo sequenciamento, bem como para a compreensão geral da evolução dos genomas de *Arachis*.

Palavras-chave: alotetraploide, amendoim, citometria de fluxo, CMA, cromossomos, DAPI, DNA ribossômico, FISH, GISH e retrotransposons do tipo LTR.

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Arachis* é originário da América do Sul, composto por 81 espécies arrançadas em nove seções taxonômicas (Stalker, 1991; Krapovickas e Gregory, 1994; Valls e Simpson, 2005; Valls *et al.*, 2013). A seção *Arachis* possui o maior número de espécies do gênero e é amplamente distribuída na América Latina, em países como o Brasil, Argentina, Bolívia, Paraguai e Uruguai, além de conter a espécie cultivada (*Arachis hypogaea* L.) e seus genitores silvestres (Krapovickas e Gregory, 1994; Valls e Simpson, 2005; Valls *et al.*, 2013; Seijo *et al.*, 2004, 2007). O gênero pertence à família Fabaceae ou Leguminosae, subfamília Papilionoideae, e ao clado Dalbergioide (Lavin *et al.*, 2001, Lewis *et al.*, 2005).

A maioria das espécies da seção *Arachis* é diploide, com 20 cromossomos ( $2n = 2x = 20$ ), enquanto *A. hypogaea* juntamente com *A. monticola* é tetraploide ( $2n = 2x = 40$ ) (Krapovickas e Gregory, 1994; Lavia, 1998; Valls e Simpson, 2005). O amendoim é uma espécie alotetraploide recente (Krapovickas e Gregory, 1994), que contém dois subgenomas distintos: A e B, onde  $2n = 4x (2A + 2B) = 40$  (Seijo *et al.*, 2004). A origem desta espécie está relacionada à hibridação entre duas espécies silvestres diplóides: *A. duranensis* (genoma A) e *A. ipaënsis* (genoma B), que após uma tetraploidização espontânea teve sua fertilidade restaurada (Smartt *et al.*, 1978; Singh, 1986; Fernández e Krapovickas, 1994; Stalker e Simpson, 1995; Kochert *et al.*, 1996; Seijo *et al.*, 2004; Robledo e Seijo, 2010).

Análises citogenéticas que mostram o padrão de distribuição de heterocromatina, de DNA ribossômico (DNAr) e de sondas de DNA genômico das espécies diploides *A. duranensis* e *A. ipaënsis* confirmam que o cariótipo do amendoim é equivalente ao somatório dos cariótipos dessas espécies (Seijo *et al.*, 2004, 2007; Robledo e Seijo, 2010), constatando-se que *A. duranensis* foi o provável doador para todos os 10 cromossomos do genoma A, ao passo que *A. ipaënsis* foi o doador para os cromossomos do genoma B (Burow *et al.*, 2009; Grabiele *et al.*, 2012; Moretzsohn *et al.*, 2013).

Quando analisadas por estudos de mapeamento genético, com marcadores moleculares com DNA com baixo número de cópias, as espécies genitoras do amendoim apresentam semelhanças na maior parte da porção gênica, evidenciando alta sintenia, indicando uma evolução lenta na organização dos genes (Moretzsohn *et al.*, 2009; Bertioli *et al.*, 2009; Shirasawa *et al.*, 2013). Entretanto, análises citogenéticas por hibridização *in situ* genômica (GISH) em amendoim apresentaram diferenças entre os subgenomas componentes, sugerindo que as frações repetitivas são distintas entre eles (Seijo *et al.*, 2007; Bertioli *et al.*; 2013).

De fato, a maioria das plantas, bem como outros organismos eucariotos complexos, o genoma apresenta uma região menor correspondente a sequências gênicas, enquanto a maior parte é composta por sequências repetitivas de DNA (Schmidt e Heslop-Harrison, 1998). Essas sequências, em sua maioria são elementos de transposição (ETs), definidos como sequências de DNA com capacidade de movimentação ao longo do genoma hospedeiro, com grande relevância na estrutura, organização e evolução dos genomas, desempenhando diversas atividades em plantas (Schulman, 2013). Dentre os ETs, os retrotransposons (RT), principalmente os que possuem sequências flanqueadoras do tipo *Long Terminal Repeats* (LTR) são os principais contribuidores da fração repetitiva de genomas de plantas, constituindo até 80% de grandes genomas (SanMiguel e Bennetzen, 1998).

O tamanho do genoma do amendoim foi estimado em 2.8 Gb (Greilhuber, 2005), onde aproximadamente 64% é representado por uma fração repetitiva (Dhillon *et al.*, 1980). O recente sequenciamento do genoma das espécies diploides genitoras do amendoim, confirmaram essas estimativas, onde foi determinado 1,25 e 1,56 Gb de tamanho respectivamente para *A. duranensis* e *A. ipaënsis* (Bertioli *et al.*, 2016).

Apesar da evidente relevância dos ETs, os primeiros RTs do tipo LTR só foram caracterizados no genoma do amendoim em 2010 por Nielen *et al.* (2010, 2012), onde foram identificados e caracterizados FIDEL (família Ty3-Gypsy) e Matita (família Ty1-Copia), ambos com diferenças na distribuição entre os cromossomos dos subgenomas A e B, possivelmente resultantes da atividade diferencial de transposição ocorrida após a divergência evolutiva das espécies genitoras ocorridas entre 3-3,5 milhões de anos (Nielen *et al.*, 2012; Moretzsohn *et al.*, 2013; Bertioli *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2016).

A distribuição *in situ* de alguns clones BAC de *A. duranensis* por FISH confirmou a ubiquidade e alta frequência de vários elementos repetitivos, principalmente de RT-LTRs (Bertioli *et al.*, 2013). Em outro estudo, análises *in silico* confirmaram a ocorrência de inúmeros elementos repetitivos nos genomas de *A. duranensis* e *A. ipaënsis* (Vidigal, 2014). Essa ubiquidade e alta frequência de RT-LTRs foi corroborada recentemente (Bertioli *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2016). Além disso, comparações entre as sequências desses genomas confirmaram alta sintenia gênica (Moretzsohn *et al.*, 2013), mas diferenças relevantes no conteúdo repetitivo, sugerindo que os retrotransposons, principalmente aqueles do tipo LTR, possuem um papel importante ao longo da evolução, na remodelação desses genomas de *Arachis* (Nielen *et al.*, 2010; 2011; Bertioli *et al.*, 2013, Vidigal, 2014; Bertioli *et al.*, 2016).

O amendoim apresenta baixo polimorfismo genético e menor variabilidade genética quando comparado com as espécies silvestres (Kochert *et al.*, 1991; 1996; Stalker e Simpson, 1995; Subramanian *et al.*, 2000; Gimenes *et al.*, 2002; Herselman, 2003; Moretzsohn *et al.*, 2004; Varshney *et al.*, 2009), o que dificulta o avanço mais expressivo dos programas de melhoramento dessa cultura. Uma importante ferramenta para superar a limitação de compatibilidade interespecies de diferença de ploidia para aumentar a variabilidade genética nos genótipos de amendoim consiste no uso de plantas alotetraploides sintéticas, obtidas a partir da hibridação entre duas espécies silvestres diploides previamente selecionadas, seguida da tetraploidização pelo uso de colchicina (Fávero *et al.* 2006, Leal-Bertioli *et al.*, 2015, Fávero *et al.*, 2015).

Entre os alotetraploides sintéticos de *Arachis*, está disponível a combinação entre *A. ipaënsis* (genitor materno) e *A. duranensis* (genitor paterno), como uma forma viável de mimetizar o amendoim (Fávero *et al.*, 2006). Além de ser uma ferramenta com caráter prático, os alotetraploides sintéticos servem como ponte para hibridação de espécies diploides silvestres com o alotetraploide cultivado (amendoim), podendo também contribuir para o melhor entendimento em termos genômicos, sobre efeitos da hibridação, poliploidização e domesticação no gênero.

O conhecimento sobre a distribuição, similaridade e especificidade dos ETs, e principalmente a influência dos RT-LTRs nesses genomas poderá contribuir para o melhor entendimento da estrutura, organização, função e evolução desses elementos nos genomas. Análises comparativas da distribuição de sequências repetitivas nos genomas do alotetraploide natural (amendoim) e alotetraploide sintético (*A. ipaënsis* x *A. duranensis*), baseando-se no conhecimento dos genomas de referência disponibilizados recentemente pelo sequenciamento completo das duas espécies genitoras do amendoim (Bertioli *et al.*, 2016) facilitará o entendimento da organização genética e genômica do amendoim.

A proposta desse trabalho foi realizar uma análise citogenética molecular comparativa entre os genótipos do alotetraploide sintético (*A. ipaënsis* x *A. duranensis*)<sup>4x</sup> e natural (*A. hypogaea*), incluindo seus genitores diploides silvestres. Para tal, foi determinado (1) o cariótipo; (2) o conteúdo de DNA dos genótipos por citometria de fluxo; (3) a ocorrência e organização dos subgenomas A e B no alotetraploide sintético por GISH; (4) o padrão de bandeamento de regiões heterocromáticas ricas em C-G e A-T por CMA<sub>3</sub>/DAPI; (5) o número e a localização de DNAr 5S e 45S por FISH; (6) o padrão de distribuição dos membros de três famílias de RT-LTRs por FISH.

Este é o primeiro relato de dados citogenéticos moleculares envolvendo um alotetraploide sintético de *Arachis*, cujos padrões obtidos estão aqui comparados com o do amendoim e seus genitores. Esses estudos tem grande valia para a elucidação dos caminhos evolutivos seguidos pelos subgenomas A e B do amendoim e do recém obtido alotetraploide sintético.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. A cultura do amendoim

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é uma leguminosa com grande importância na agricultura de subsistência em países tropicais, subtropicais e temperados (Chirinos, 2011). Possui excelentes propriedades nutricionais, entre elas estão presentes uma grande quantidade de aminoácidos, diversas vitaminas, sais, carboidratos, minerais e ainda resveratrol, um polifenol com princípios ativos importantes para o sistema cardiovascular (Santos *et al.*, 2013). Os grãos de amendoim possuem elevado valor nutritivo, compostos por 22 a 30% de proteínas, além de serem extremamente calóricos (média 596 calorias/100g de sementes), com até 50% de óleo, incluindo o oleico, linoléico dentre outros ácidos graxos encontrados em menor quantidade (Knauff *et al.*, 1993). É uma planta cujas sementes podem ser consumidas *in natura*, e, portanto, utilizadas como fonte de alimento há milhões de anos até os dias atuais, por povos de diferentes culturas (Freitas *et al.*, 2003a).

O amendoim tornou-se economicamente importante em diversas regiões do mundo. Atualmente a China ocupa a primeira posição em produtividade (16,7 Mt – milhões de toneladas), seguida pela Índia (4,1 Mt) e Estados Unidos (3,06 Mt) (USDA-FAS, 2016a). Em termos de produção mundial de oleaginosas, o amendoim ocupa o terceiro lugar, com uma área plantada equivalente a 20,61 milhões de hectares e produção de 40,07 milhões de toneladas/ano, ficando atrás da soja (*Glycine Max* L. Merr.; produção de 320,51 milhões de toneladas/ano – “Mt/ano”) e da canola (*Brassica napus* L.; 67,61 Mt/ano) (USDA-FAS, 2016a, 2016b).

O Brasil já foi um grande produtor de amendoim, com produção concentrada principalmente nos estados do Paraná e São Paulo, que atendia ao mercado interno e externo (Martins e Perez, 2006). Porém a partir de 1970, mudanças como a expansão da cultura da soja, laranja e cana-de-açúcar; custos crescentes na produção de amendoim associado ao baixo rendimento por área; suscetibilidade às variações climáticas e intensas variações de preços durante a comercialização resultaram na redução do cultivo nacional de amendoim (Freitas *et al.*, 2003b). Atualmente, a maior parte da cadeia de produção está localizada no Sudeste, e São Paulo representa o estado com a maior produção, equivalente a quase 80% do total produzido no país (Godoy *et al.*, 1999), que corresponde a menos de 1% da produção mundial, com 288,4 Mt na safra de 2014/15 (Conab, 2015). Quando comparado com outros produtos agrícolas no Brasil, o amendoim possui um mercado relativamente pequeno, já que parte da produção é familiar, destinada ao consumo doméstico, e os levantamentos não refletem nas estatísticas de produção (Santos *et al.*, 2013).

## 2.2. O gênero *Arachis*

O gênero *Arachis* é originário da América do Sul, composto por 81 espécies (Krapovickas e Gregory, 1994; Valls e Simpson, 2005; Valls *et al.*, 2013). Atualmente as espécies desse gênero estão distribuídas em cinco países da América do Sul: Argentina, Bolívia, Paraguai, Uruguai e Brasil. Dentre todas as suas espécies, 65 ocorrem no Brasil (Krapovickas e Gregory, 1994; Valls e Simpson, 2005; Valls *et al.*, 2013) das quais 48 são consideradas endêmicas da flora brasileira (Krapovickas e Gregory, 1994). Todas as espécies de *Arachis* são geocárpicas, peculiaridade que define o gênero, e que consiste na produção de flores acima do solo e frutos abaixo do solo (Krapovickas e Gregory, 1994; Holbrook e Stalker, 2003).

A taxonomia do gênero *Arachis* foi realizada com base na distribuição geográfica, morfologia, análises citogenéticas e compatibilidade de cruzamentos, e atualmente esta distribuído em nove seções taxonômicas designadas *Arachis*, *Erectoides*, *Heteranthae*, *Caulorrhizae*, *Rhizomatosae*, *Extranervosae*, *Triseminatae*, *Procumbentes* e *Trirectoides*, baseadas (Krapovickas e Gregory, 1994; Fernández e Krapovickas, 1994; Lavia, 1999; Valls e Simpson, 2005, Peñaloza e Valls, 2005). A seção *Arachis* apresenta grande notoriedade por conter a espécie cultivada *A. hypogaea* (Krapovickas e Gregory, 1994), com provável centro de origem localizado na região que vai do noroeste da Argentina ao sul da Bolívia (Krapovickas e Gregory, 1994; Freitas *et al.*, 2003a).

*Arachis hypogaea*, juntamente com *A. monticola* são espécies tetraploides ( $2n = 4x = 40$ ). Contudo a maioria das espécies da seção diploides ( $2n = 2x = 20$  cromossomos). Existem ainda quatro espécies que possuem 18 cromossomos (*A. decora*, *A. praecox*, *A. palustris* e *A. porphyrocalyx*) (Krapovickas e Gregory, 1994; Peñaloza e Valls, 1997; Lavia, 1998,1999; Peñaloza, 2000; Valls e Simpson, 2005; Peñaloza e Valls, 2005).

Estudos citogenéticos e avaliação da viabilidade após cruzamentos levaram a descrição inicial dos genomas A, B e D para as espécies diploides da seção *Arachis* (Gregory e Gregory, 1979; Singh e Moss, 1982; Singh, 1986; Stalker, 1991; Fernández e Krapovickas, 1994; Peñaloza e Valls, 2005). O genoma A é caracterizado pela presença de um pequeno par de cromossomos chamado par 'A' (Husted, 1936), que apresenta menor condensação da cromatina na região centromérica quando comparado aos demais cromossomos, que por sua vez apresentam bandas heterocromáticas ricas em A-T fortemente evidenciadas com DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) (Seijo *et al.*, 2004; Robledo *et al.*, 2009; Robledo e Seijo, 2010). Os cromossomos do genoma B não possuem o pequeno par de cromossomos 'A', têm cariótipo simétrico e não apresentam cromossomos com

bandas heterocromáticas centroméricas coradas por DAPI (Smartt *et al.*, 1978; Smartt e Stalker, 1982; Seijo *et al.*, 2004; Robledo e Seijo, 2010). Já o genoma D, descrito em *A. glandulifera*, possui cariótipo assimétrico, sem a presença do pequeno par 'A', composto por cromossomos submetacêntricos e subtlocêntricos, caracterizado pela presença de apenas oito pares de cromossomos com bandas principalmente pericentroméricas com tamanho e intensidade variáveis coradas com DAPI (Stalker, 1991; Fernández e Krapovickas, 1994, Robledo e Seijo, 2008).

Com base na presença e tamanho de bandas heterocromáticas, Robledo e Seijo (2010) revisaram a classificação das espécies com genoma B. Nesse estudo, algumas espécies foram reclassificadas como genoma F (*A. benensis* e *A. trinitensis*) e genoma K (*A. batizocoi*, *A. cruziana* e *A. krapovickasii*), com bandas centroméricas DAPI<sup>+</sup> na maior parte dos cromossomos, diferindo uma das outras na quantidade e distribuição da heterocromatina. Com o genoma B permaneceram *A. ipaënsis*, *A. gregory*, *A. valida*, *A. magna* e *A. williansii*. Através de análises da distribuição de DNAr e análises da heterocromatina, Silvestri *et al* (2015) propuseram o genoma G para três espécies com  $2n = 18$  cromossomos (*A. decora*, *A. praecox* e *A. palustris*).

### **2.3. O amendoim e sua origem**

Existem algumas hipóteses fundamentadas em achados arqueológicos datados com mais de 3.700 anos que levam a crer que o amendoim tenha surgido entre 3.500 e 10.000 anos atrás (Bonavia, 1982; Hammons, 1994; Simpson *et al.*, 2001). Essa hipótese corrobora estudos moleculares que sugerem que a origem híbrida do amendoim a partir das espécies diploides *A. duranensis* e *A. ipaënsis* tenha ocorrido entre 3.500 e 10.000 anos atrás (Bonavia, 1982; Hammons, 1994; Simpson *et al.*, 2001; Bertoli *et al.*, 2013; Bertoli *et al.*, 2016). Os grãos de amendoim ancestral tem uma aparência diferente do amendoim moderno e isso pode ser devido à pressão seletiva em diferentes ambientes agroecológicos, que somadas à seleção antropomórfica podem ter proporcionado a variabilidade morfológica observada hoje no amendoim e nas diferentes subespécies e variedades (Seijo *et al.*, 2007).

O amendoim é uma espécie alotetraploide recente ( $2n = 4x = 40$ ), com genoma AABB e que possui cromossomos centroméricos (Krapovickas e Gregory, 1994). Análises citogenéticas do padrão de distribuição de bandas heterocromáticas e de sequências de DNAr distinguem dois tipos de componentes genômicos em seu núcleo: o subgenoma A, com bandas heterocromáticas fortemente evidenciadas com DAPI, ricas em

A-T, e o subgenoma B, com bandas centroméricas heterocromáticas não identificáveis com DAPI (Seijo *et al.*, 2004; Robledo e Seijo, 2010).

Seijo *et al.* (2004) mostraram que o cariótipo do amendoim equivale à soma dos cariótipos das espécies diploides silvestres *A. duranensis* (genoma A) e *A. ipaënsis* (genoma B). Em outro estudo, Seijo *et al.* (2007) através de um duplo GISH, reforçaram essa hipótese da origem do amendoim fundamentados na evidente hibridização específica para cada subgenoma componente do amendoim utilizando sondas obtidas a partir do DNA genômico de cada uma dessas espécies. Para acrescentar sobre essa hipótese, Fávero *et al.* (2006) por meio de cruzamentos entre esses diploides produziram com sucesso um alotetraploide sintético, que após cruzamentos subsequentes entre esse alotetraploide e cultivares de amendoim geraram híbridos altamente férteis.

Portanto a origem do amendoim se deu a partir do cruzamento das espécies diploides *A. duranensis* e *A. ipaënsis*, gerando um híbrido, que após um evento de tetraploidização espontânea originou um alotetraploide fértil. A planta alotetraploide resultante apresentava vigor híbrido, porém tornou-se reprodutivamente isolada de seus genitores silvestres (Kochert *et al.*, 1991; 1996; Moretzsohn *et al.*, 2004; Varshney *et al.*, 2009), o que resultou na redução da variabilidade genética (Kochert *et al.*, 1991; 1996; Subramanian *et al.*, 2000; Gimenes *et al.*, 2002; Herselman, 2003; Moretzsohn *et al.*, 2004; Varshney *et al.*, 2009).

Embora sua natureza seja alotetraplóide, os cromossomos de cada subgenoma do amendoim se comportam de maneira independente e inteiramente regular para formação de bivalentes durante a meiose (Smartt, 1990), conseqüentemente não há recombinação genética entre os cromossomos dos dois subgenomas, indicando uma divergência evolutiva entre eles, com data estimada em cerca de 3,5 milhões de anos atrás a partir de um ancestral comum (Nielen *et al.*, 2012; Moretzsohn *et al.*, 2013; Bertoli *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2016). A origem do amendoim a partir de um único evento possivelmente, resultante da hibridação entre dois indivíduos somada à duplicação dos seus cromossomos, foi determinante para impossibilitar o fluxo gênico, ocasionando o isolamento reprodutivo desse amendoim ancestral (Ramsey e Schemske, 1998; Bertoli *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2016).

Por meio da seleção de características como arquitetura e formato das sementes totalmente diferente de seus genitores, o amendoim foi modificado por meio da domesticação humana em uma cultura bastante importantes no mundo (Hilu, 1993). O que trouxe ao amendoim algumas vantagens como adaptabilidade ao cultivo, devido ao vigor

oriundo da heterose e aumento do tamanho dos tecidos (Hilu, 1993) Consequentemente, a variabilidade morfológica do amendoim e as diferentes subespécies e variedades existentes, provavelmente são derivadas da pressão seletiva em diferentes ambientes agroecológicos, juntamente com a seleção artificial (Seijo et al., 2007).

A baixa variabilidade genética do amendoim e a diferença entre níveis de ploidia com a maioria das espécies silvestres são barreiras que dificultam o avanço de programas de melhoramento genético. Entretanto, estudos que utilizam as espécies silvestres de *Arachis*, selecionadas naturalmente ao longo da evolução em ambientes diversos e sob estresses bióticos variados, constituem uma ampla fonte de diversidade alélica que podem ser utilizadas de diferentes formas para a incorporação de características desejáveis no amendoim (Simpson *et al.*, 1993). As espécies silvestres *A. duranensis* e *A. ipaënsis* genitoras do amendoim, por serem portadoras do seu genoma, apresentam modelos tanto para o conhecimento sobre o seu conteúdo genômico quanto para a sua estrutura. Portanto, para acelerar o processo de melhoramento e consequentemente a obtenção de cultivares com características agronomicamente desejáveis, estudos estratégicos estão sendo realizados (Vidigal, 2014).

A obtenção de plantas alotetraploides sintéticas a partir da hibridação entre duas espécies silvestres diploides, seguida da tetraploidização pelo uso de colchicina (Fávero *et al.*, 2006) vem sendo aplicada como ferramenta para o melhoramento. Esses tetraploides sintéticos contendo as características das espécies silvestres podem então ser cruzados com diferentes cultivares de amendoim, funcionando como pontes para cruzamentos e assim acelerar o avanço nos programas de melhoramento genético (Simpson, 2001; Fávero *et al.*, 2006, Leal-Bertioli *et al.*, 2015, Fávero *et al.*, 2015).

#### **2.4. Conteúdo repetitivo do genoma do amendoim (*Arachis hypogaea*)**

O genoma de organismos eucariotos complexos, assim como o genoma de plantas, está codificado em seu DNA, que é diferenciado em dois tipos de sequências: o DNA não-repetitivo e o DNA repetitivo (Flavell e Harrison, 1974). Nas sequências de DNA não-repetitivo estão presentes os genes responsáveis por controlar diferentes funções celulares. O restante do genoma é formado por uma fração considerável de sequências de DNA repetitivas, tais como o DNAr, sequências satélites e elementos transponíveis (ETs). Esses ETs formam o principal componente dos genomas dos eucariotos, em particular as plantas e estão organizados em função das respostas às pressões seletivas que ocorreram durante a evolução (Schmidt e Heslop-Harrison, 1998).

As sequências repetitivas são diferenciadas quanto à sua organização física e genômica, e ainda, pela sua homologia e distribuição nas espécies. A maioria das sequências de DNA repetitivo apresenta capacidade de alterar a estrutura e função do genoma, podendo estar distribuídas no genoma de forma dispersa ou em blocos consecutivos (*tandem*), que podem ser de DNA codificante, tais como as sequências de DNAr e DNA não codificante, como classes de DNA satélite (Schmidt e Heslop-Harrison, 1998).

Temsch e Greilhuber (2000; 2001) determinaram que o genoma do amendoim possuía tamanho de aproximados 2,8 Gb (Gigabases), composto por uma fração repetitiva que variava de alta a raramente repetitiva de aproximadamente 64%, e o restante, cerca de 36%, era formado por sequências de cópia única, estimadas através da cinética de renaturação desse genoma (Dhillon *et al.*, 1980). Seijo *et al.* (2007) sugeriram que a soma do tamanho dos genomas de *A. duranensis* e *A. ipaënsis* é similar ao tamanho do genoma do amendoim, porém com regiões sem afinidade com ambos os genomas (Raina e Mukai, 1999; Seijo *et al.*, 2007). Essas estimativas foram confirmadas por Bertoli *et al.* (2016), com o sequenciamento do genoma das espécies diploides genitoras do amendoim, onde foi determinado 1,25 e 1,56 Gb de tamanho respectivamente para *A. duranensis* e *A. ipaënsis*, indicando que não houve nenhuma grande alteração no tamanho do genoma desde a poliploidização. Além disso foi identificado que os ETs representam 61,7 % e 68,5 % dos genomas de *A. duranensis* e *A. ipaënsis* respectivamente, sendo esses valores compatíveis com conteúdo repetitivo estimado para o amendoim.

Bertoli *et al.* (2013) analisaram a distribuição *in situ* de clones BAC de *A. duranensis* (Guimarães *et al.*, 2008) por hibridização por fluorescência - FISH em cromossomos de *A. hypogaea*, que indicaram pelo padrão difuso de hibridização uma alta frequência de elementos repetitivos ainda não caracterizados nesses clones. Em outros estudos foi observada uma alta colinearidade gênica entre marcadores moleculares, em mapas genéticos de ligação construídos a partir de populações das espécies diplóides com genoma A e B, indicando uma baixa divergência evolutiva nas porções gênicas desses genomas (Burow *et al.*, 2001; Moretzsohn *et al.*, 2009; Bertoli *et al.*, 2009; Shirasawa *et al.*, 2013). Consequentemente, esses estudos levaram à hipótese de que principalmente os componentes repetitivos presentes nos subgenomas A e B do amendoim divergiram de forma significativa durante a evolução.

## **2.5. Elementos de transposição (ETs)**

Elementos de transposição são sequências de DNA com capacidade de se mover de uma região para outra em um genoma por meio da transposição (Feschotte *et al.*, 2002).

Este evento foi relatado pela primeira vez por Barbara McClintock em 1950 em um estudo com milho, que mostrou a existência desses elementos móveis, quebrando o paradigma de que o genoma é um conjunto estático de informações transmitidas entre gerações. Foram identificados nesse trabalho dois *loci* denominados *Dissociator* e *Activator* que agiam de forma associada entre si, alterando o fenótipo de coloração dos grãos do milho. Esses elementos possuem natureza ativa com algumas características, tais como persistência nos genomas, geração de mutações deletérias, além de beneficiar-se da maquinaria celular de replicação para a conservação de suas cópias (Orgel e Crick, 1980).

Os ETs têm uma enorme influência na evolução e composição de genomas de plantas e animais. A possibilidade de se inserirem dentro de genes do próprio organismo pode causar diversas doenças, bem como ser fonte de nova informação genética possuindo um papel fundamental na evolução dos genes e na estrutura genômica dos eucariotos (Cordaux *et al.*, 2006). Evidências moleculares obtidas a partir do sequenciamento de genomas iniciados na década de 1990 apontam a presença de ETs em quase todos os eucariotos estudados (Wicker *et al.*, 2007), correspondendo a maior parte dos componentes desses genomas, formando até 45% do genoma humano (Lander *et al.*, 2001) e ultrapassando 80% em algumas plantas como o milho (Meyers *et al.*, 2001).

Os ETs podem alterar padrões de expressão de genes, gerando alterações funcionais, principalmente se inseridos dentro ou próximos às regiões promotoras de genes (Kashkush *et al.*, 2003a). Podem ainda ser responsáveis pela junção de segmentos de DNA durante sua transposição, alterando a colinearidade existente entre genomas (Wicker *et al.*, 2010) e alavancando a expansão e evolução da estrutura genômica (Alix e Heslop-Harrison, 2004). Realizando com isso, um papel importante na evolução dos organismos (Kidwell e Lisch, 1997; Fedoroff, 2000).

Existem na literatura uma diversidade de exemplos de ETs envolvidos em diferentes funções importantes ao organismo hospedeiro. Um exemplo claro está no fenótipo rugoso de ervilhas observado por Mendel, neste caso a inserção de um ET no gene que codifica a enzima responsável pela concatenação de moléculas de amido gera uma enzima não-funcional, permitindo a expressão do fenótipo rugoso. (Bhattacharyya *et al.*, 1990). Em *Arabiposis thaliana*, genes que codificam as transposases, responsáveis pela excisão e integração de um elemento em outro sítio, estão relacionados a processos de desenvolvimento da planta (Bundock e Hooykaas, 2005) e às respostas da planta à incidência de luz (Hudson *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2007). O efeito da seleção humana pode ser observado na cor da pele da uva (*Vitis vinifera* L.) pela variação no gene *VmhbAI*, um

regulador da transcrição da biossíntese de antocianina, pela inserção do retroelemento Gret1 na sua região promotora conferindo um fenótipo branco na pele da uva (This *et al.*, 2007). A ausência de sementes em algumas variedades de maçã (*Malus domestica*) ocorre devido a inserção de um retrotransposon LTR no íntron 4 ou 6, suprimindo a expressão normal do gene *MDPI* (Yao *et al.*, 2001). No pêsego (*Prunus pérsica*) o fenótipo de pele sem pêlos ocorre pela inserção de um retrotransposon LTR na sequência do exon 3 do gene *PpeMYB25* (Vendramin *et al.*, 2014).

Atualmente os ETs podem ser classificados com base no modo de transposição, similaridades de sequências e relações estruturais (Wicker *et al.*, 2007). Finnegan (1989) propôs a primeira forma de classificação para os ETs, divididos de acordo com seu intermediário de transposição: o RNA, onde se encontram os elementos de Classe I ou retrotransposons, e o DNA, englobando os elementos de Classe II ou transposons de DNA.

A Classe I é composta por elementos que se translocam no interior de um mesmo núcleo utilizando RNA mensageiro (RNAm), sendo eles denominados: retrovírus e retrotransposons. Após a transcrição reversa do fragmento de DNA, a cópia de DNA complementar (DNAc) é inserida em um novo sítio do genoma. Esse processo não acarreta a perda de informação, apenas duplicação destas (Feschotte *et al.*, 2002).

A Classe II, ou transposons de DNA, engloba os elementos que possuem repetições terminais invertidas (TIR – *Terminal Inverted Repeats*) que codificam geralmente para uma única proteína, a transposase, responsável pela excisão e integração do elemento em outro sítio do genoma. Nesse processo, ao contrário do ocorre com os elementos de Classe I, a informação original é eliminada, restando apenas a cópia (Feschotte *et al.*, 2002).

Por apresentarem capacidade de transposição, os retrotransposons são considerados grandes contribuintes da fração repetitiva dos genomas (Kumar e Bennetzen, 1999; Sabot e Schulman, 2006). De acordo com as características da organização e filogenia do gene que codifica para a transcriptase reversa (TR), Wicker *et al* (2007) dividiram os ETs em cinco ordens: retrotransposons LTR (LTRs – *Long Terminal Repeats*), DIRS (*Dictyostelium intermediate repeat sequence*), PLEs (*Penelope-like elements*), LINEs (*Long interspersed nuclear elements*) e SINEs (*Short interspersed nuclear elements*).

Os RT-LTRs são bastante abundantes e análises de suas sequências possibilitam estimar a data de inserção do elemento no genoma hospedeiro (Xu e Wang, 2007). Os retrotransposons LTR são assim chamados porque possuem sequências LTR de centenas de pares de bases (pb) a 5 kb que os flanqueiam, sendo as regiões LTR 5' e LTR 3'

idênticas quando o elemento se insere no genoma hospedeiro. Além dessas sequências, os retrotransposons LTR possuem regiões *Target Site Duplication* (TSD), com 4-6 pb que flanqueiam as extremidades 5' e 3' do elemento atuando como sinal de inserção, regiões *Primer Binding Site* (PBS), com 18 pb na região 3' terminal do LTR 5' onde ocorre o início da transcrição reversa, e ainda a região *Polypurine Tract* (PPT), com 11-15 pb também envolvida na transcrição reversa.

Esses elementos possuem duas principais superfamílias: Ty1-*Copia* e Ty3-*Gypsy*, que se diferenciam pela semelhança entre as sequências e ordem de distribuição dos seus genes (Schulman, 2013). Os RT-LTR podem ser autônomos, pois contém necessariamente dois genes: o *gag*, que codifica uma proteína semelhante ao capsídeo viral e o *pol*, formado por quatro genes distintos, a protease (PR), responsável pela maturação da poliproteína; a integrase (IN), pela integração da cópia de DNA no genoma hospedeiro; a transcriptase reversa (TR) e RNase H (RH) pela síntese do DNAc a partir do RNAm (Smyth, 1993). Os LTR não-autônomos utilizam enzimas sintetizadas por outros elementos para realizar a sua movimentação (Wessler, 2006; Wicker *et al.*, 2007).

A indisponibilidade de genomas de referência já foi um fator limitante para análises evolutivas de retrotransposons, porém com o sequenciamento de genomas, intensificado nas últimas décadas, permitiu a investigação mais detalhada das relações evolutivas de cada grupo de ETs (Kolano *et al.*, 2013).

## **2.6. Hibridização in situ por fluorescência (FISH)**

Por técnicas de citogenética molecular, como FISH a distribuição de RT-LTR pertencentes às superfamílias Ty1-*Copia* e Ty3-*Gypsy* já foram investigadas em cromossomos de variadas espécies de plantas como girassol (*Helianthus* spp.) (Natali *et al.*, 2006), maçã (*Malus domestica*) (Sun *et al.*, 2008), ervilha (*Pisum sativum*) (Macas *et al.*, 2007), couve (*Brassica oleracea*) (Alix *et al.*, 2005), cebola (*Allium cepa*) (Pearce *et al.*, 1996) e soja (*Glycine max*) (Du *et al.*, 2010). Dependendo da espécie da planta e da família de RT-LTR analisada, a distribuição em cromossomos metafásicos pode variar, podendo ser uniforme ou não (Kumar e Bennetzen, 1999). Geralmente, os RT apresentam uma distribuição dispersa nos cromossomos, o que reflete seu mecanismo de transposição, sendo encontrados entre ou dentro de outras sequências repetitivas, ou ainda associados a regiões genômicas específicas (Heslop Harrison, 2000).

Muitas vezes, a localização preferencial de um elemento repetitivo pode ser camuflada por eventos de recombinação, mas de maneira geral, esses elementos podem ser

encontrados ao longo de todo o cromossomo, sem que haja ainda um padrão determinado de distribuição (Heslop Harrison *et al.*, 1997; Kumar e Bennetzen, 1999).

No amendoim, Patel *et al* (2004) identificaram transposons de DNA do tipo MITE em mutantes que apresentavam alta relação com ácido oléico (HO – *High Oleic*) devido a ocorrência de diferentes mutações identificadas em dois genes homeólogos (*ahFAD2A* e *ahFAD2B*). Eles constataram que a inserção de um elemento MITE na sequência do gene *ahFAD2B* causava o aparecimento desse novo fenótipo HO. Posteriormente foi investigada a diversidade genômica e a taxa de transposição do AhMITE, um transposons de DNA, que possivelmente afetou a regulação de vários genes do amendoim cultivado (Shirasawa *et al.*, 2012).

Nielen *et al.* (2010) caracterizaram o primeiro retrotransposon de amendoim pertencente à superfamília Ty3-*Gypsy*, denominado FIDEL (*Fairly long Inter-Dispersed Euchromatic LTR retrotransposon*). FISH revelou que FIDEL era mais frequente no subgenoma A do que no subgenoma B, com hibridização distribuída dispersamente nas regiões de eucromatina, ausente em centrômeros, regiões teloméricas e região organizadora nucleolar (RON). Esse padrão de distribuição desigual entre os subgenomas A e B possivelmente ocorreu devido à atividade de transposição ocorrida no genoma A, provavelmente após a divergência evolutiva das espécies genitoras.

Nielen *et al* (2012), descreveram outro retrotransposon, este pertencente à superfamília Ty1-*Copia*, denominado Matita, evidenciado após FISH, de forma similar nas regiões distais dos braços dos cromossomos dos subgenomas A e B do amendoim. Foi mostrado que a distribuição de Matita exibe uma tendência de ser mais abundante perto de análogos de genes de resistência do que de genes de cópia única (Nielen *et al.*, 2012).

Bertioli *et al* (2013) em um estudo sobre a estrutura genômica organizacional do amendoim através de clones BAC de *A. duranensis* hibridizados *in situ*, observou que a maioria do conteúdo repetitivo era explicado pelas diversas cópias de alguns RT-LTR, esse estudo além de corroborar a sintenia gênica entre *A. duranensis* e *A. ipaënsis*, mostrou que a remodelação genômica é principalmente devido a alterações no conteúdo repetitivo.

Vidigal (2014) realizou uma análise *in silico* dos componentes repetitivos dessas espécies silvestres diploides, mais especificamente dos RT-LTRs, e identificou 81 famílias em *A. duranensis* e 89 em *A. ipaënsis*. Alguns desses RT-LTR foram selecionados para mapeamento cromossômico em amendoim, onde mostraram-se com frequência e distribuição variada, corroborando o papel do DNA repetitivo na similaridade entre sequências desde a divergência dos genomas A e B.

Samoluk *et al* (2015) em uma análise filogenética e mapeamento do RT denominado ALI em cromossomos de espécies de *Arachis*, evidenciaram que a divergência desse elemento repetitivo teria ocorrido antes da diferenciação dos genomas genitores, sugerindo que a hibridação espontânea das duas espécies genitoras seguida de duplicação cromossômica pode não ter induzido uma explosão significativa de transposição. Estes estudos evidenciam a importância dos TEs, principalmente de RT-LTRs na organização e evolução do genoma de amendoim.

### 3. JUSTIFICATIVA

O recente sequenciamento das espécies genitoras do amendoim foi uma importante etapa para acelerar o entendimento da organização genética e genômica de espécies de *Arachis*, pois além de contribuir para a compreensão dos mecanismos moleculares e celulares que conferem crescimento, desenvolvimento, reprodução, respostas à doenças e estresses, auxilia o entendimento da expressão de características agronomicamente desejáveis, contribuindo assim para o desenvolvimento de novas ferramentas a serem utilizadas em programas de melhoramento genético por cruzamentos ou transformação.

Estabelecer mais detalhadamente a relação entre os genótipos do gênero *Arachis* é fundamental, pois possibilitará o uso amplo da diversidade genética presente nos genitores silvestres. Ferramentas citogenéticas tornaram-se estratégicas nesse sentido pois além de trazer uma caracterização dos genomas, ainda não determinada em particular para o alotetraploide sintético (*A. ipaënsis* x *A. duranensis*)<sup>4x</sup>, ajudam a explorar a organização, evolução e interação dos genomas.

A caracterização citogenética comparativa dos genótipos diploides e alotetraploides natural e sintético, determinando o conteúdo de DNA por citometria de fluxo; a organização geral dos genomas e subgenomas desses genótipos via GISH; a distribuição de bandas heterocromáticas por bandeamento cromossômico CMA<sub>3</sub>/DAPI; o número e a localização de regiões de DNAr e de RT-LTRs por FISH, podem trazer informações sobre consequências da hibridação, poliploidização e domesticação no gênero. Além de ser o primeiro relato de dados citogenéticos moleculares envolvendo esse alotetraploide sintético de *Arachis*.

A estratégia aqui apresentada visa contribuir com análises mais robustas de citogenética comparativa e evolutiva entre os alotetraploides natural e sintético juntamente com seus genitores silvestres, *A. duranensis* e *A. ipaënsis*. Esse tipo de análise é especialmente interessante para *A. hypogaea* por se tratar de uma espécie alotetraploide recente, de genoma grande e complexo, com grande quantidade de elementos repetitivos e de alto valor econômico mundial.

#### **4. HIPÓTESES**

A comparação da estrutura e organização genômica por citogenética molecular entre os genótipos tetraploides e diploides de *Arachis* trará informações sobre especificidade, frequência e localização preferencial de sequências repetitivas, tais como heterocromáticas, ribossômica e de retrotransposons. Os padrões estabelecidos no alotetraploide sintético obtido recentemente, comparados com os padrões obtidos em seus genitores silvestres e no alotetraploide natural, trarão informações sobre alterações na organização genômica. Essas alterações poderão ser relacionadas com os efeitos da hibridação e poliploidização na obtenção do sintético, e poderão ser associadas com a história evolutiva do amendoim.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. Objetivo geral**

Caracterizar e comparar citogeneticamente genótipos diploides, alotetraploides natural e sintético de *Arachis* através da distribuição cromossômica de sequências de DNA repetitivas utilizando ferramentas como citometria de fluxo, bandeamento de regiões heterocromáticas e técnicas moleculares como FISH e GISH para determinar e comparar a organização dos genomas dos genótipos e inferir sobre possíveis alterações estabelecidas durante a hibridação e tetraploidização do sintético, com aquelas obtidas durante a domesticação do amendoim.

### **5.2. Objetivos específicos**

- 1) Determinar e comparar o tamanho dos genomas por citometria de fluxo;
- 2) Obter lâminas histológicas contendo cromossomos metafásicos dos diferentes genótipos de *Arachis*.
- 3) Realizar o bandeamento cromossômico por CMA<sub>3</sub>/DAPI nos diferentes genomas.
- 4) Confeccionar sondas genômicas para GISH;
- 5) Selecionar famílias de RT-LTR para serem utilizadas como sondas para FISH.
- 6) Amplificar as sequências de DNA conservadas dos RT-LTR e de DNAr para confecção de sondas para FISH.
- 7) Determinar o padrão de distribuição de sinais de hibridização com sondas de DNA genômico, DNAr e de RT-LTR em cromossomos do alotetraploide sintético e comparar com *A. hypogaea*, *A. duranensis* e *A. ipaënsis*.

## 6. MATERIAL E MÉTODOS

### 6.1. Local de realização dos experimentos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Interação Planta-Praga III (LPP-III) e Laboratório de Bioimagem localizados no Prédio de Biotecnologia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - Brasília-DF, Brasil.

### 6.2. Material vegetal

Sementes dos genótipos de *A. duranensis*, *A. ipaënsis*, *A. hypogaea* e alotetraploide sintético (*A. ipaënsis* x *A. duranensis*)<sup>4x</sup> (Tab. 1), foram obtidas no Banco Ativo de Germoplasma (BAG - Embrapa Cenargen) e germinadas em potes contendo solo, mantidas em casa de vegetação situada na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

**Tabela 1:** Genótipos de *Arachis* utilizadas no estudo, estado, número de cromossomos, fórmula genômica, acesso, origem e fornecimento de sementes.

Genótipo	Estado	2n	Fórmula genômica	Acesso	Origem	Obtenção de sementes
<i>A. duranensis</i> Krapov. & W.C. Gregory	Silvestre	20	AA	V14167	Salta, Argentina	BAG*
<i>A. ipaënsis</i> Krapov. & W.C. Gregory	Silvestre	20	BB	K30076	Gran Chaco, Bolívia	BAG*
<i>A. hypogaea</i> subsp. <i>fastigiata</i> var. <i>fastigiata</i>	Cultivar	40	AABB	IAC Tatu-ST	Corrientes, Argentina	BAG*
( <i>A. ipaënsis</i> x <i>A. duranensis</i> ) <sup>4x</sup>	Sintético	40	BBAA	KG30076 x V14167	Faver <i>et al.</i> (2006)	BAG*

\*BAG: Banco Ativo de Germoplasma (Embrapa Cenargen)

### 6.3. Análise do conteúdo de DNA por citometria de fluxo

A determinação do conteúdo de DNA dos genótipos diploides de *A. duranensis* e *A. ipaënsis*, tetraploides *A. hypogaea* ‘Tatu’ e do alotetraploide sintético (Tab. 1), foi realizada por citometria de fluxo no Laboratório de Citogenética e Evolução Vegetal do departamento de Botânica do Centro Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, utilizando o método clássico desenvolvido por Galbraith *et al.* (1983) com modificações.

Para tal, folhas jovens dos diferentes genótipos foram coletadas em casa de vegetação na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. Com uma lâmina de bisturi foram cortados aproximadamente 50 mg do material vegetal em uma placa de petri contendo 1 ml de tampão de lise (WPB - *woody plant buffer*) (Loureiro *et al.*, 2007). Após o isolamento dos núcleos, as amostras foram filtradas em uma rede de

nylon com cerca de 50 µm. Em seguida os núcleos foram corados com 50 µg/ml do fluorocromo iodeto de propídeo e 50 µg/ml de RNase. Posteriormente as amostras foram inseridas no citômetro de fluxo CyFlow Space (Sysmex Partec GmbH) e a realização das análises realizadas com o *software* Formax versão 2.7. A determinação do conteúdo de DNA nuclear foi obtida pela comparação com os genomas de referência de *Solanum lycopersicum* e *Glycine max* sugeridos por Doležel *et al.* (1992).

#### **6.4. Coleta de pontas de raízes, isolamento do meristema radical e preparo de lâminas contendo cromossomos metafásicos**

Entre quinze e vinte dias após germinação, fragmentos de pontas de raízes com aproximadamente 5 mm de comprimento, correspondente ao meristema radical foram isoladas das plantas quando o solo apresentava temperatura de aproximadamente 25°C. As amostras foram imersas em solução de 8-hidroxiquinoleína 0,002 M por duas horas à temperatura ambiente, seguida por mais duas horas a 4°C. As amostras foram então incubadas em solução fixadora contendo etanol 100% e ácido acético glacial (3:1 v/v) por 1 hora a temperatura ambiente, seguida de troca por nova solução fixadora a 4°C por 12 horas, e armazenadas em etanol 70% a 4°C. As amostras foram pré-tratadas com tampão citrato de sódio 10 mM, pH 7,0 por 15 minutos à temperatura ambiente e digeridas celoliticamente em uma solução contendo enzimas proteolíticas: 0,6% de celulase “Onozuka” R-10 de *Trichoderma viride* (Serva 0,96 U/mg, cód. 16419); 5,4% de celulase de *Aspergillus niger* (Sigma 5,1 U/mg, cód. 2415) e 9% de pectinase Macerase de *Rhizopus* sp. (Calbiochem, 3.500 U/g, cód. 441201) por 2 horas a 37°C. As células meristemáticas foram então isoladas em uma gota de ácido acético 45% sobre uma lâmina histológica com auxílio de pinça e microscópio estereoscópico. O espalhamento das células meristemáticas foi realizado por pressão manual de uma lamínula sobre uma lâmina. As lâminas foram analisadas em microscópio com contraste de fase e aquelas contendo ao menos cinco conjuntos completos de cromossomos em metáfase, livres de restos citoplasmáticos e bem espalhados foram selecionadas para utilização em bandeamento CMA<sub>3</sub>/DAPI, FISH e GISH.

#### **6.5. Bandeamento cromossômico com CMA<sub>3</sub>/DAPI**

Para evidenciar cromossomos com regiões heterocromáticas ricas em sequências G-C e A-T foi utilizado respectivamente o bandeamento com os fluorocromos CMA<sub>3</sub> (Cromomicina A3) e DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol).

O bandeamento foi conduzido segundo Schweizer e Ambros (1994), com modificações. Foram dissolvidos 5 mg de CMA<sub>3</sub> em 10 ml da mistura de tampão McIlvaine pH 7,0 e água destilada (1:1, v/v), seguido pelo acréscimo de 10 µl de MgCl<sub>2</sub> 5M. As lâminas selecionadas após digestão enzimática foram armazenadas em recipiente fechado por 72 horas. Foi aplicado 20 µl/lâmina da solução de CMA<sub>3</sub> (0,5 mg/ml) para incubação por 1 hora na ausência de luz. Posteriormente o excesso de CMA<sub>3</sub> e as lamínulas foram removidos das lâminas com água destilada para aplicação de 20 µl/lâmina de DAPI (2 µg/ml) diluído em tampão McIlvaine para incubação por 30 minutos na ausência de luz. O excesso de DAPI foi removido com água destilada, e adicionados 20 µl/lâmina de meio de montagem glicerol/ McIlvaine (1:1, v:v) contendo 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>. As lâminas foram armazenadas por 72 horas a 4°C antes de serem analisadas ao microscópio.

## **6.6. Obtenção de sondas genômicas para GISH**

### **a) Extração de DNA genômico dos genótipos diploides e tetraploides**

Para a extração do DNA total dos genótipos diploides e tetraploides foram utilizadas folhas jovens coletadas antes da expansão foliar total. O protocolo de extração de DNA foi realizado com base em CTAB (Brometo de Cetil Trimetil Amônio) (Ferreira e Grattapaglia, 1998) com modificações. Aproximadamente 200 mg de folha foram macerados em nitrogênio líquido e acrescidos de 700 µL de CTAB 2% (CTAB 2% (p/v); NaCl a 1,4 M; Tris-HCl a 100 mM e pH 8,0; EDTA a 20 mM; β-mercaptoetanol 0,2% (v/v) em tubos Eppendorf de 2 mL. As amostras foram incubadas a 65° C por 50 minutos, em seguida acrescidas de 700 µL da solução clorofórmio-isoamílico (24:1) e misturadas até a formação de uma emulsão. As amostras foram centrifugadas a 13.200 rpm por 15 minutos e a fase aquosa foi transferida para dois novos tubos (1,5 mL). Foram então adicionados 600 µL de tampão CTAB 1% (CTAB 1% (p/v); Tris-HCl a 50 mM e pH 8,0; EDTA a 20 mM) e os tubos foram agitados e centrifugados a 13.200 rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e o precipitado dos dois tubos foi ressuspensão em 300 µL de NaCl a 1,2 M. O volume dos dois tubos foi transferido para um único tubo, totalizando 600 µL. As amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. O DNA foi precipitado com 1 mL de etanol absoluto sob agitação lenta. As amostras foram centrifugadas a 13.200 rpm por 2 minutos e o sobrenadante descartado. O precipitado foi lavado duas vezes com 500 µL de etanol 70%, ressuspensão em 100 µL de água estéril com 0,01 mg/mL de RNase-A e incubado a 37° C por 10 minutos e

posteriormente mantidos a -20° C. A quantificação foi realizada em gel de agarose 1% utilizando um marcador de peso molecular (*High Mass Ladder* 176 Invitrogen).

#### **b) Confeção das sondas genômicas**

Para obtenção de sondas de DNA genômico dos genótipos diploides e tetraploides foram utilizados 1µg de DNA purificado para marcação pelo método de *Nick Translation*, que usa as enzimas Desoxirribonuclease 1 (DNAse 1) e DNA polimerase 1. A solução contendo essas enzimas proporciona uma incorporação elevada de nucleotídeos marcados, gerando fragmentos de 200 a 300 pb. Essas sondas foram marcadas com digoxigenina-11-dUTP e CY3-dUTP utilizando o *kit - Nick Translation Mix* (Roche cód. 11745808910). As sondas foram purificadas por precipitação etanólica, ressuspensas em 20 µL de água *MilliQ* estéril e mantidas a -20° C.

### **6.7. Obtenção de sondas para FISH**

#### **a) Extração e confeção de sondas ribossômicas**

Clones contendo as sequências correspondentes ao DNA ribossômico 5S e 18S-5.8S-25S oriundas de *Lotus japonicus* (Pedrosa *et al.*; 2002) e *Arabidopsis thaliana* (Wanzenböck *et al.*; 1997) foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Citogenética e Evolução Vegetal do departamento de Botânica do Centro Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE.

Para a extração do DNAr 5S e 18S-5.8S-25S foi utilizado o *Kit illustra plasmidPrep Midi Flow* (GE Heltcare, cód. 28904267) de acordo com o protocolo do fabricante.

Para obtenção de sondas de DNAr foi utilizado o método de *Nick Translation* como descrito no item 6.6-b.

#### **b) Obtenção de sondas de retrotransposons LTR**

##### *Seleção de retrotransposons LTR*

Foram selecionados os RT-LTR das famílias RE128-84 pertencente à superfamília Ty1-*Copia*, Pipoka (superfamília Ty3-*Gypsy*) e Athena não-autônomo, previamente identificadas em *A. ipaënsis* (genoma B) (Vidigal, 2014). Essas famílias foram escolhidas porque *in silico* diferem entre si na superfamília e na frequência em que ocorrem nos genomas de *A. duranensis* e *A. ipaënsis*. Por apresentarem sequências com alto nível de conservação entre os elementos de uma mesma família, as sequências de DNA que

codificam a TR de RE128-84 e Pipoka, bem como sequências altamente conservadas de Athena, família não autônoma desprovida de TR foram identificadas e amplificadas por PCR para obtenção de sondas marcadas.

#### *Amplificação das sequências conservadas de DNA dos RT-LTR por PCR.*

A obtenção de DNA para realização dos experimentos foi feita a partir dos plasmídeos previamente construídos por Vidigal (2014), os quais continham as sequências dos retrotransposons LTR selecionados, clonados em vetor TOPO TA (Invitrogen). Testes foram feitos a fim de confirmar a presença e fidelidade das sequências das transcriptases reversas correspondentes as famílias dos retrotransposons LTR selecionados. Para isso a presença e o tamanho do inserto foram detectados a partir de digestão enzimática com a enzima EcoRI (Invitrogen) e do sequenciamento e análises de dados (Vidigal, 2014).

Para realizar as reações de PCR foi utilizado o mesmo protocolo para todas as sequências conservadas dos RT- LTR selecionados. No total foram utilizados 25 µL de reação de amplificação por PCR em Mastercycler® (Eppendorf, USA ): 2,5 µL de tampão para PCR sem MgCl<sub>2</sub> (10%) (Invitrogen); 1 µL de MgCl<sub>2</sub> a 50 mM (Invitrogen); 0,3 µL de cada *primer* a 10 µM; 0,3 µL de dNTPs a 10 mM, 0,15 µL de *Taq* Polymerase (*Taq Recombinant*-Invitrogen) e 1 µL de DNA molde (20 ng de DNA de plasmídeo). Ciclo utilizado em termociclador Eppendorf foi: 5 minutos a 94° C; 35 ciclos de 30 segundos a 94° C, 30 segundos de 55° a 66° C, dependendo do par de iniciadores, 30 segundos a 72° C; e 7 minutos a 72° C. O tamanho do fragmento amplificado foi verificado por eletroforese feita em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio a uma concentração de 0,5 µg/mL em tampão TAE 1X (40 mM de Tris-acetato e 1 mM de EDTA pH 8,0). A eletroforese foi realizada durante 40 minutos sob voltagem constante de 70V (Volts). A visualização dos fragmentos foi realizada sob luz ultravioleta (UV) em foto-documentador ImageQuant300 (*GE Healthcare Life Sciences*). Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit *GFX™ PCR DNA and Band Purification* (*GE Healthcare*), de acordo com o protocolo do fabricante.

#### *Confecção de sondas de retrotransposons LTR*

Para a obtenção de sondas de DNA marcadas a partir das sequências dos genes que codificam a TR das famílias de RT-LTR RE 128-84, Pipoka e Athena foram utilizados de 200-300 ng de cada um dos fragmentos amplificados. Para a marcação das sondas foi utilizado método *Random Primer*, que utiliza sequências randômicas de hexa ou

heptanucleotídeos como iniciadores. Neste método a reação de polimerização é catalisada pelo fragmento *Klenow* da DNA polimerase I, com incorporação de dNTPs marcados e não marcados fornecidos para a reação. As sondas foram marcadas com digoxigenina-11-dUTP adicionada aos reagentes do *kit* BioPrime Array CGH Genomic Labelling System (Invitrogen cód. 18095-011). Todas as sondas foram purificadas por precipitação etanólica, ressuspensas em 20 µL de água *MilliQ* estéril e mantidas a -20° C.

### **6.8. Verificação da incorporação de nucleotídeos marcados nas sondas (*dot blot*)**

Para verificação da incorporação de nucleotídeos marcados nas sondas foi realizado o teste de *dot blot*, onde um fragmento de membrana *Hybond-N+* (Amersham, Pharmacia Biotech) foi recortado e colocado em uma placa de Petri de 55 mm de diâmetro contendo 3 mL de tampão 1 (Tris-HCl 100 mM pH 7,5; NaCl 15 mM) por 5 minutos. A membrana foi removida e, 0,5µL da sonda foi aplicada na membrana e armazenada à temperatura ambiente por 5 minutos. Após esse tempo, a membrana contendo as sondas foi imersa novamente em 5 mL do tampão 1 por 1 minuto, seguida pela imersão em tampão 2 (reagente de bloqueio dissolvido em tampão 1 a uma concentração final de 0,5% p/v) e incubada sob agitação leve por 30 minutos. O tampão 2 foi descartado e na placa de Petri contendo a membrana foi acrescido 500 µL de solução de detecção (anti-digoxigenina conjugada com fosfatase alcalina diluída no Tampão 1 na proporção de 1:1000) incubada a 37° C sob leve agitação por 30 minutos. Foram adicionados 5 mL de tampão 1 por 10 minutos à temperatura ambiente. O Tampão 1 foi removido e 5 mL de Tampão 3 (Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM; MgCl<sub>2</sub> 50 mM) foram adicionados à placa, incubada por mais 5 minutos. O Tampão 3 foi removido e 1 mL da solução NBT/BCIP (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate / nitro blue tetrazolium*) foi adicionada à membrana, incubada por 5 minutos no escuro. A membrana foi removida da placa, lavada e seca entre papéis filtro. A detecção dos nucleotídeos marcados é observada pela presença de um ponto, que varia com uma coloração de cinza claro até marrom escuro, conforme a concentração da sonda.

### **6.9. Distribuição *in silico* dos RT-LTR selecionados**

A distribuição *in silico* dos membros de cada uma destas três famílias de RT-LTR foi realizada nas pseudomoléculas de *A. duranensis* e *A. ipaënsis* em conformidade com PeanutBase, usando a ferramenta BLAT (peanutbase, 2016).

## **6.10. FISH e GISH**

Os experimentos de hibridização *in situ* foram conduzidos segundo Schwarzacher e Heslop-Harrison, (2000) com adaptações. A diferença entre os experimentos de FISH e GISH está apenas no tipo de sonda utilizada para hibridização, onde as sondas para GISH formam obtidas a partir do DNA genômico total das espécies diploides e tetraploides.

### **a) Pré-hibridização**

As lâminas contendo cromossomos metafásicos foram pré-tratadas em solução fixadora contendo etanol 100% e ácido acético glacial (3:1; v/v) por 20 minutos à temperatura ambiente; incubadas em etanol 100% por 5 minutos, seguido de troca por novo etanol 100% por mais 5 minutos. Foram aplicados 100 µl de RNase DNase *free* (10 mg/ml) em cada lâmina para incubação por 1 hora a 37°C. As lâminas foram lavadas em SSC 2X por 2 minutos e posteriormente incubadas em solução aquosa de HCl 0,01M por mais 2 minutos. Foram aplicados sobre cada lâmina 100 µl de pepsina (10 mg/ml) para incubação por 5 minutos a 37°C, em câmara úmida. Logo após, as lâminas foram lavadas em água destilada, seguida por SSC 2X por 5 minutos e incubadas em solução de paraformaldeído 4% por 10 minutos à temperatura ambiente e em capela de exaustão. As lâminas foram novamente lavadas em tampão SSC 2X por 2 minutos, repetindo o procedimento por mais uma vez. As lâminas foram então desidratadas em série etanólica crescente (70, 85 e 100%) por 2 minutos em cada solução.

### **b) Hibridização**

Foi preparada uma solução de hibridização com estringência estimada de 76%, em um volume final de 16 µl/lâmina. Nessa solução foram adicionados 10 µl de formamida 100% (50%); 2 µl de tampão SSC 20X (2X) e 4 µl de sulfato de dextrana 50% (10%). Foram utilizadas duas sondas (50 ng/µl) diferentes por lâmina, onde 2 µl de cada sonda foram adicionadas aos 16 µl da solução de hibridização, formando um total de 20 µl, que em seguida foram desnaturadas a 75°C por 10 minutos e imediatamente colocadas a 4°C para evitar o reanelamento do DNA. As sondas foram aplicadas nas lâminas e cobertas com lamínula para a desnaturação do DNA dos cromossomos em placa aquecedora a 75°C por 5 minutos. A hibridização ocorreu por 12-16 horas a 37°C em câmara úmida.

### **c) Lavagens estringentes pós-hibridização**

Após a hibridização, as lâminas foram lavadas em tampão SSC 2X e SSC 0,1X a 42°C e posteriormente em SSC 2X à temperatura ambiente. Essa combinação de temperatura e concentração de sal nos tampões correspondem a aproximadamente 73% de estringência.

#### **d) Detecção dos sítios de hibridização**

As lâminas foram incubadas em tampão de detecção (Tween 20 0,2% e SSC 20X) por 5 minutos. Posteriormente foram adicionados 50 µl de solução de bloqueio (BSA 5% e tampão de detecção) em cada lâmina para incubação por 30 minutos a 37°C em câmara úmida. A detecção de sonda marcada com digoxigenina foi feita com 1 µl/lâmina de anticorpo anti-digoxigenina conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (2,5 µg/ml) (Roche Diagnostics; cód. 11207741910), diluído em 20 µl/lâmina de solução de bloqueio.

Após aplicação da solução de detecção, as lâminas foram cobertas com anteparo e incubadas por 1 hora a 37°C em câmara úmida. Logo após foram feitas três lavagens com tampão de detecção por 8 minutos cada a 42°C.

#### **e) Montagem e análise das lâminas**

Foram aplicados 20 µl/lâmina da solução DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) (20 µl a 100 µg/ml) diluído em 980 µl de Vectashild. As lâminas foram armazenadas em ambiente livre de umidade e luz a 4°C e analisadas em microscópio epifluorescente Axiophot (Zeiss, Alemanha). As imagens foram digitalmente adquiridas com o *software* Axiovision 4.8 e tratadas igualmente no *software* Adobe Photoshop CS3 versão 10.0 utilizando apenas funções que afetam toda a imagem, de maneira equivalente.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Análise do conteúdo de DNA por citometria de fluxo

As análises realizadas por citometria de fluxo para determinar o conteúdo de DNA (2C) dos genótipos estudados estão apresentados na tabela 2. Os genótipos apresentaram coeficiente de variação (CV) < 5%, estabelecido como um bom critério de aceitação conforme Galbraith *et al.* (2002). A soma dos valores 2C determinados para as duas espécies diploides é maior do que o valor determinado tanto para *A. hypogaea*, quanto para o alotetraploide sintético, valores que não apresentaram diferença significativa entre si.

**Tabela 2:** Genótipos de *Arachis* analisados por citometria de fluxo, acesso, nível de ploidia, conteúdo de DNA (2C) em picogramas, coeficiente de variação (CV) e estimativa do tamanho em pares de base (Gb).

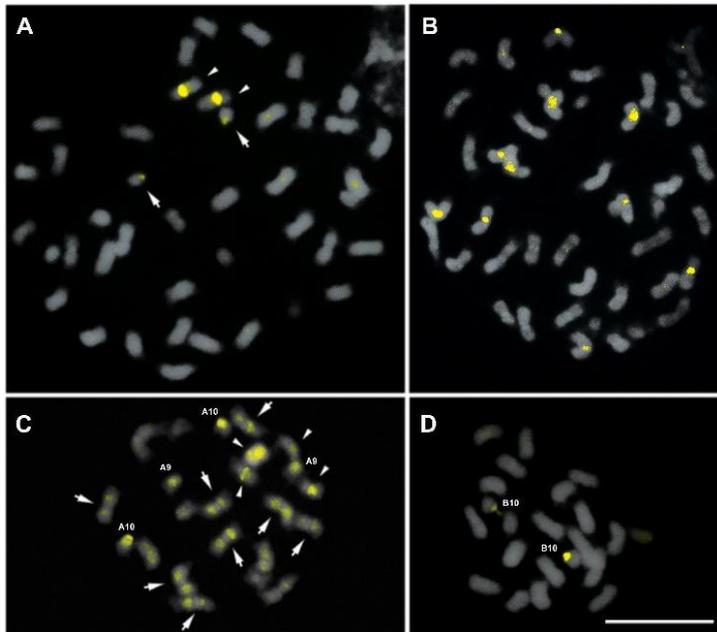
Genótipo	Ploidia	Acesso	2C (pg)	CV (%)	Gb
<i>A. duranensis</i>	2X	V14167	2,62	2,67	1,28
<i>A. ipaënsis</i>	2X	K30076	3,35	4,14	1,63
<i>A. hypogaea</i>	4X	IAC Tatu-ST	5,71	3,25	2,79
Alotetraploide sintético	4X	KG30076 x V14167	5,92	2,36	2,89

### 7.2. Bandeamento cromossômico com CMA<sub>3</sub>/DAPI

Resultados do bandeamento cromossômico com CMA<sub>3</sub>/DAPI evidenciaram diferenças entre os números de bandas heterocromáticas CMA<sup>+</sup> nos diferentes genótipos analisados. Ao analisar os cromossomos do alotetraploide sintético foi possível observar bandas CMA<sup>+</sup> em apenas dois pares de cromossomos, ambos com identificação não precisa: um par com bandas distais presentes nas constrições secundária (A10 ou B10), e o outro com banda centromérica (A02 ou B10). Os cromossomos do subgenoma A apresentaram bandas DAPI<sup>+</sup> nas regiões centroméricas de nove pares, não detectadas em um par com constrição secundária, correspondente a A10 (Fig. 1A). Em de *A. hypogaea* observou-se bandas CMA<sup>+</sup> presentes nas regiões pericentroméricas de seis pares de cromossomos. Enquanto que o padrão de bandas DAPI<sup>+</sup> foi semelhante ao observado no alotetraploide sintético (Fig 1B).

Em *A. duranensis* oito pares de cromossomos apresentaram bandas CMA<sup>+</sup>: quatro pares com duas bandas pericentroméricas, três pares, incluindo o pequeno par 'A' com bandas centroméricas, e um par com bandas distais (A10). Nove pares de cromossomos apresentaram regiões centroméricas DAPI<sup>+</sup> (Fig. 1C). Em *A. ipaënsis*, apenas um par de cromossomos (B10) apresentou bandas CMA<sup>+</sup> presentes nas regiões distais da constrição secundária, enquanto nenhuma banda centromérica DAPI<sup>+</sup> foi detectada (Fig. 1D).

É importante ressaltar que o bandeamento cromossômico com DAPI pela técnica CMA<sub>3</sub>/DAPI, não pôde ser evidenciado com clareza após a aquisição de imagens. Por isso as bandas DAPI<sup>+</sup> são melhor identificadas com tratamento DAPI após FISH.



**Figura 1:** Bandeamento cromossômico com CMA<sub>3</sub> (amarelo) e DAPI (cinza) em cromossomos metafásicos do allotetraploide sintético (A), mostrando dois pares de cromossomos com bandas CMA<sup>+</sup>: um com bandas distais na constrição secundária (A10 ou B10) (setas) e outro com bandas centroméricas (A02 ou B10) (cabeças de seta). CMA<sub>3</sub> em *A. hypogaea* (B), com seis pares de cromossomos com bandas CMA<sup>+</sup> nas regiões pericentroméricas. Ambos os allotetraploides com bandas DAPI<sup>+</sup> nas regiões centroméricas de nove pares de cromossomos do subgenoma A. Em *A. duranensis* (C) quatro pares de cromossomos com duas bandas pericentroméricas CMA<sup>+</sup> (setas), três pares com bandas centroméricas (cabeças de seta), incluindo o par 'A' e bandas distais no par A10. Nove pares de cromossomos com centrômeros DAPI<sup>+</sup>.

Em *A. ipaënsis* (D) apenas um par de cromossomos (B10) com bandas CMA<sup>+</sup> nas regiões distais, sem bandas DAPI<sup>+</sup>. Barra: 5µm.

### 7.3. GISH

#### *Sondas genômicas dos allotetraploides*

Sinais de hibridização nos cromossomos do allotetraploide sintético usando a sonda genômica de *A. hypogaea* foram evidentes em todos os cromossomos, de ambos os subgenomas, exceto em um par de cromossomos do subgenoma A e em todos os centrômeros A. A hibridização na região distal de todos os cromossomas foi discreta (Fig. 2A). Padrões semelhantes foram observados nos cromossomas do allotetraploide sintético quando hibridizados com sonda genômica do próprio sintético.

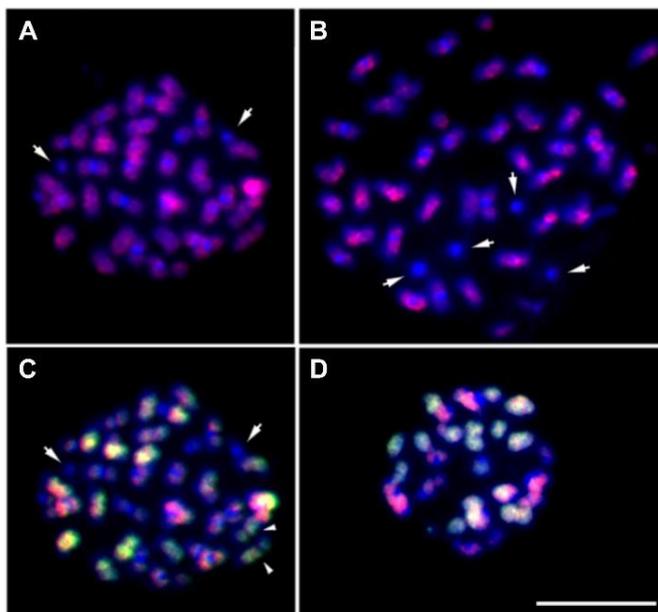
Cromossomas de *A. hypogaea* hibridizados com a sonda genômica do allotetraploide sintético gerou sinais evidentes em todos os cromossomos, exceto em dois pares do subgenoma A. Centrômeros dos cromossomos do subgenoma A, bem como regiões distais de todos os cromossomos, de ambos os subgenomas não mostraram sinais de hibridização. Já a hibridização com a sonda genômica de *A. hypogaea* evidenciou sinais mais fortes em todos os cromossomos, incluindo os braços e as regiões distais, porém ausentes nos centrômeros do subgenoma A (Fig. 2B).

#### *Sondas genômicas dos diploides*

O duplo GISH realizado em cromossomos do alotetraploide sintético e de *A. hypogaea*, com sondas de DNA genômico de *A. duranensis* e *A. ipaënsis* geraram intensos sinais de hibridização das sondas genômicas nos dois genótipos. Assim como o observado em *A. hypogaea* (Seijo *et al.*, 2007), o duplo GISH gerou nos dois genótipos tetraploides a hibridização de sondas genômicas de *A. duranensis* preferencialmente pelo subgenoma A e *A. ipaënsis* pelo subgenoma B.

Nos cromossomos do alotetraploide sintético, sinais de sobreposição, ou seja, co-localização de ambas as sondas na mesma região do genoma foram observados ao longo dos braços da maioria dos cromossomos de ambos os subgenomas. Por outro lado, as regiões distais, os centrômeros e um único par do subgenoma A, não mostraram sinais evidentes de hibridização com nenhuma das sondas utilizadas. Já os centrômeros do subgenoma B, mostraram alguns sinais de hibridização mais evidente com a sonda de *A. ipaënsis*, enquanto as regiões distais não mostraram sinais de hibridização. Um único par de cromossomos do subgenoma B, sem identificação assertiva, mostrou um padrão de bandas diferenciado ao longo dos braços e incluindo a região centromérica: três bandas evidenciadas com a sonda de *A. duranensis* (genoma A) intercaladas por três bandas evidenciadas pela sonda de *A. ipaënsis* (genoma B), sem sinais nas regiões distais (Fig. 2C).

Quase os mesmos padrões de hibridização foram observados em *A. hypogaea*, exceto que a intensidade de sinais sobrepostos foi discretamente mais fraca. A ausência de sinais nos centrômeros do subgenoma A foi menos evidente e nenhum cromossomo do subgenoma B apresentou o padrão de marcação alternada (Fig. 2D).



**Figura 2:** Cromossomos metafásicos dos alotetraploides, sintético e natural após GISH com sondas genômicas e contracolorados com DAPI (azul), evidenciado nos centrômeros do subgenoma A. Alotetraploide sintético (A) com sonda genômica de *A. hypogaea* (rosa) distribuída em quase todos os cromossomos, ausente nos centrômeros e em um par de cromossomos do subgenoma A (setas), não detectada nas regiões distais de todos os cromossomos. *Arachis hypogaea* (B) com sonda genômica do alotetraploide sintético (rosa) presente em quase todos os cromossomos, ausente nos centrômeros e em dois pares do subgenoma A (setas), não detectada nas regiões distais de todos os cromossomos. Duplo GISH com sondas genômicas de *A. duranensis* (vermelho) e *A. ipaënsis* (verde) nos cromossomos do alotetraploide sintético (C) hibridizadas em ambos os subgenomas, mais evidente no

subgenoma A, com sonda de *A. duranensis* e vice-versa. Sobreposição de sinais (amarelo) observada ao longo dos braços da maioria dos cromossomos. Regiões distais, centrômeros do subgenoma A e um par de cromossomos A (setas) não mostraram sinais evidentes com nenhuma sonda. Um único par de cromossomos

do subgenoma B com padrão alternado de bandas entre as duas sondas, incluindo as regiões centroméricas, excluindo as regiões distais (cabecas de seta). *Arachis hypogaea* (D) com padrão semelhante ao observado no sintético, exceto que a intensidade de sinais e sobreposição são mais fracas. Barra: 5µm.

#### 7.4. Distribuição *in silico* dos RT-LTRs

Os fragmentos amplificados correspondentes às sequências de DNA conservadas entre os membros das famílias de RT-LTRs RE128-84, Pipoka e de Athena foram utilizados para confecção de sondas marcadas para FISH. Cada uma destas sequências é altamente conservada entre os membros da mesma família, mas diferente entre as famílias de RT-LTR (Tab. 3).

**Tabela 3:** Sequências de DNA da TR dos membros das famílias de RT-LTRs RE 128-84 e Pipoka e da região interna altamente conservada de Athena.

Retrotransposons LTR	Iniciadores	Tamanho do fragmento (bp)	Sequências de DNA conservadas
<b>RE128-84_autonomo</b>	RE128-84-FWD CCACTAGATCCTCAAGCAAG RE128-84-REV AGAAGGCACTAAGCCTTTC	558	AGCAAGAAGCAAGTAGAACCGAGCAATGTTGCCTTCT TGTCCCAATGGAGCCTCTCAATGTGAAACAAGATCT TGAAGACCCCTCATGGGTTAAAGCCATGGAAAAAGAG CTGGCACAAATTTGAAAAGAATGAGGTGTGGACACTTG TACCAAATCCAATGATAAGAAGGTAACCGGTACAAG GTGGATTTTTAAAAATAAATTTGGTTGAGGATGGTAGTG TTGTTCGTAACAAGGCTAGATTAATGGCCCAAGGTTA CGATCAAGAAGAAGGAATTTGATTTTGATGAGTCATTTT CCCCGGTAGCTAGAATGGAAGCAATTAGGTTGCTTCT TGCCTATGCTGCCCCACAAGGGTTTTCAAGATGTTCCA AATGGATGTCAGATGTGCATTCCTTAATGGTTTTATAG ATAGGGAAGTATTTGTGACTCAACCCCTCGGTTTTGAA
<b>Pipoka_autonomo</b>	Pipoka-FWD CCACATTGCTTTAGAGGATC Pipoka-VER GCTTGTCAAAGCCTCCATGC	535	AAGAAAAACAACCTTTACATGCCCTTTGGCACTTA TGCTTACAAGCGTATGCCATTTGGCTTATGCAACGCA CCGGTAACTTTCCAAAGGTGTATGATGAGCATAATTTGC AGATCTTCAAGAGCATTGGATGGAGGTGTTCATGGAC GATTTTGTGCTATGGGACTCTTTTGTATCTTTGCTTG GACAACCTTGCAAAAAGTGTGGAGAGGTGTACTAAAA CAAATATTGCTTAAATTTTGAGAAGTGTCTTTTATGG TTAGACAAGGTATTGTTTTAGGACACATTTACTCTAAC GATGGTATTTCTATGGATCCAGCAAAGATAAATGTTAT ATCTAGTTTACCTTACCCTCTCCGAGAGGGAAGTC CGTGCCTTCTTGGACATACAGGTTTTTACTGGTGATT TATTAAGGACTTTAGCAAAGGTGGCATTACCTCTATCTT GATTTGTGCAAAAAGACGTTGAATTTGATCGAAGCAA AGAGT
<b>Athena_não-autonomo</b>	Athena-FWD CCATCATAATTATCATAGTTGTGG Athena-REV CTCCAAACCAAGAGGGTGATAAC	618	TTATGGAAAGGAAGGGATCCATAACTCATCCCAAGT CAAGGTTTCAATTACGTTTTAAACCACTTTTTTCATCAATT TTGAGTCTTACTTGTTTATATTAGATACATAGTTCTTTT ATTCTTCAATTAGTTTATTAATTACAATTTTGCCTTGT CTTTTATCTCTTTATTTGTTTACTTCAAACATTTGAAAACC CTTTTGTCTTCAACAACCAATTTTATGCACTTTGTGTCA CTAGTTCCTAGGGAGAACAATACTCTCGGTATATAT ATTTGCTTTGAATTGTGACAATCTTTAGAGTAAATAATTT GACTATTGGCCAATTTGTTGGTTGGAAGCTATACTTGCA ACGAAGATCTATTTGGAGAAAATTTCAACCTTACAATT TGGTCTTTGTCAAATTTTGGCGCCGTTGCGGGGAGCT AATGTCATGAGTGCTATATTTTGGTTGTTGTAATAATGT CCATAGTATGAATAGATACTTTTGGTTGCTTGTTTAT TTTGTGGTAAATTAGGATTTTGTATTTTGTAAATTGAT GTCTTTAGTTGTATTTTCAATTTTCTCTATGA

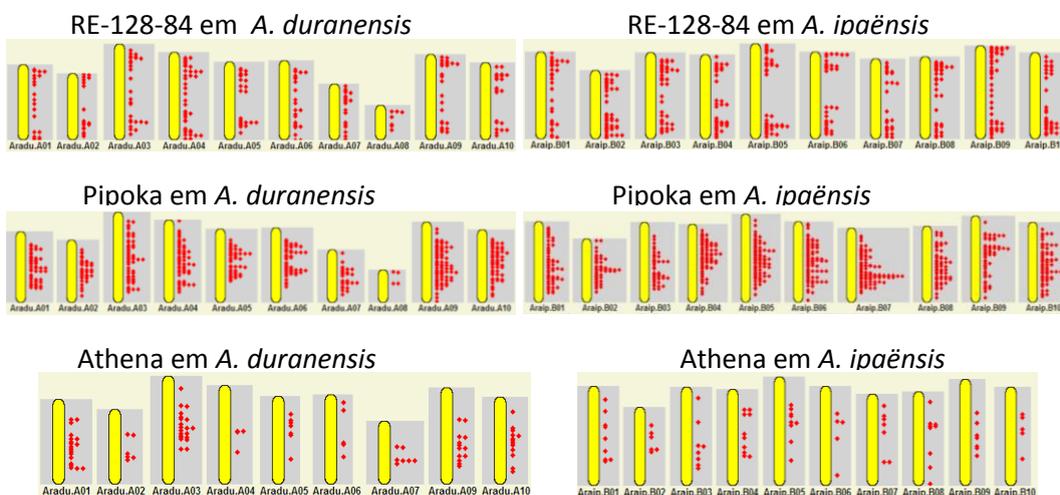
Essas sequências de DNA conservadas, que caracterizam os membros das famílias de RT-LTR foram utilizadas como sequências de consulta na análise *in silico* utilizando a ferramenta BLAT, associada com os dados disponíveis no PeanutBase (peanutbase, 2016). O número de *hits* com no mínimo 70% de identidade entre as sequências de *A. duranensis* e *A. ipaënsis* foi de 227 e 361 para RE 128-84; 466 e 649 para Pipoka e 98 e 75 para Athena, respectivamente. A partir desses dados, estimou-se que os membros de RE128-84 abrangem

dos genomas diploides cerca de 1,20% e 1,17%, Pipoka 2,81% e 6,09% e Athena 0,77% e 1,19% respectivamente.

A distribuição *in silico* dos membros da família RE128-84 nas pseudomoléculas de *A. duranensis* (genoma A) e *A. ipaënsis* (genoma B) (peanutbase, 2016) indicou a sua presença em todas elas, com maior frequência em *A. ipaënsis*. Foram determinados pelo menos 30 *hits* por pseudomolécula de *A. ipaënsis*, onde apenas B01 e B07 apresentaram menos de 25 *hits*. Em *A. duranensis*, apenas A04 apresentou mais de 35 *hits*, enquanto A03 e A09 com cerca de 25, e as demais pseudomoléculas com menos de 20 *hits*. A maioria das pseudomoléculas dos dois genomas apresentaram esses membros distribuídos ao longo dos braços, incluindo as regiões centroméricas e estendendo-se até as regiões distais. Entretanto, esses membros não foram observados nas regiões centroméricas das pseudomoléculas 02, 05 e 10 em ambos os genomas, bem como em B06 e B07 de *A. ipaënsis*.

Os membros da família Pipoka apresentaram-se distribuídos em todas as pseudomoléculas de ambos os genomas, em maior frequência do que RE-128-84 e Athena e mais abundantes em *A. ipaënsis*. A08 de *A. duranensis* apresentou apenas quatro *hits*, enquanto as demais pseudomoléculas, de ambas as espécies, apresentaram mais de 50 *hits*, dispersos ao longo dos braços incluindo os centrômeros. As regiões distais de alguns cromossomos não apresentaram *hits*, exceto em A09 e em B02, B06 e B09.

A família Athena, com menor número de membros, também é mais abundante em *A. ipaënsis* e a maior frequência de *hits* (10 ou pouco mais) foi detectada em A01, A03, A09, A10 e em B04 e B08, enquanto a menor frequência (menos de dez *hits*) em A04, A05, A06 e em B02, B03, B05, B06, B07, B09 e B10. Esses membros foram encontrados, em geral, ao longo dos braços, principalmente concentrados nas regiões pericentroméricas e ausentes nas regiões distais de ambos os genomas (Fig. 3).

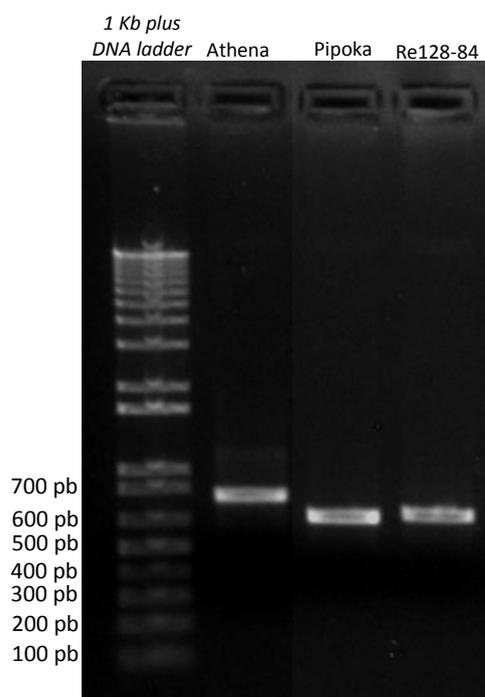


**Figura 3:** Distribuição *in silico* das famílias de RT-LTR RE128-84, Pipoka e Athena nas pseudomoléculas de *A. duranensis* e *A. ipaënsis*.

## 7.5. Sondas para FISH

### 7.5.1 Amplificação das sequências conservadas nas famílias de RT-LTR

Os fragmentos obtidos pelas reações de amplificação por PCR, a partir dos plasmídeos contendo as sequências da TR das famílias RE128-4, Pipoka e da região interna altamente conservada de Athena foram purificados e utilizados para confecção de sondas de DNA marcadas para FISH. Os fragmentos amplificados apresentaram o tamanho esperado, de 618, 535 e 558 pb, para os RT-LTR pertencentes às famílias Athena, Pipoka e RE 128-8 respectivamente (Fig. 4).



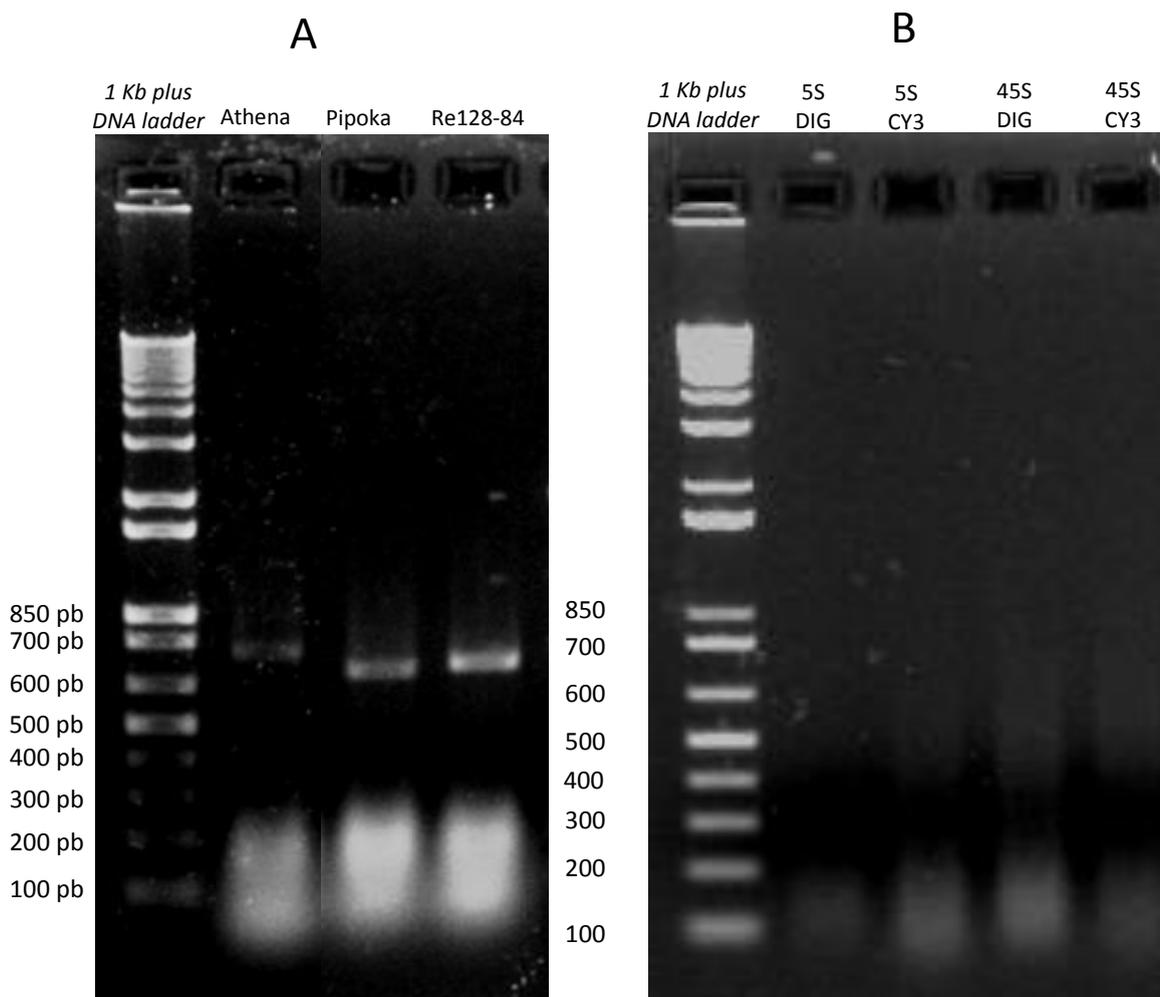
**Figura 4:** Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio mostrando a amplificação das sequências da TR dos RT-LTR pertencentes às famílias Pipoka e RE128-84 e da sequência conservada de Athena, indicando os tamanhos dos fragmentos amplificados por PCR, respectivamente com 535, 558 e 618pb. O marcador utilizado foi o *1Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen).

### 7.5.2. Confecção de sondas e confirmação da incorporação de nucleotídeos marcados (dot blot)

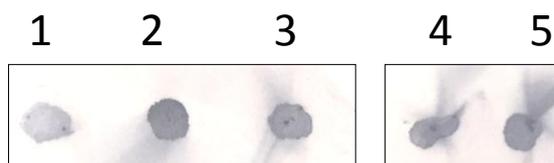
Sondas respectivas a cada fragmento obtido por PCR correspondentes às sequências da TR das famílias RE128-84 e Pipoka, e da região interna altamente conservada de Athena foram confeccionadas pelo método de *Random Primer* utilizando nucleotídeos marcados com digoxigenina (Dig-11 dUTP) e seus tamanhos e concentração estimado em gel de agarose (Fig. 5A). Sondas respectivas as sequências de DNAr foram obtidas pelo método

de *Nick Translation* utilizando nucleotídeos conjugados com o fluoróforo CY3-dUTP e seus tamanhos e concentração estimado em gel de agarose (Fig. 5B). Todas s sondas continham entre 200 e 300 pb e 50 ng/μl de concentração.

Análises para a confirmação da incorporação de nucleotídeos marcados com dig-11 dUTP nas sondas de RT-LTRs confeccionadas foram confirmadas pelo teste de *dot blot* (Fig. 6).



**Figura 5:** Geis de agarose 1% corado com brometo de etídio mostrando o tamanho e concentração estimada das sondas confeccionadas a partir da sequência do gene que codifica a TR dos retrotransposons LTR pertencentes às famílias Pipoka e RE128-84 e da sequência conservada de Athena (A) marcadas com digoxigenina (DIG 11-dUTP), e da as sondas de DNAr 5S e 18S-5.8S-25S (B) marcadas com digoxigenina e CY3-dUTP. O marcador utilizado foi o *1Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen).



**Figura 6:** Membrana de Nylon após *dot blot* das sondas de DNA confirmando a incorporação de nucleotídeos marcados com digoxigenina (DIG 11-dUTP) dos RT-LTR pertencentes às famílias Athena (1), Pipoka (2) e RE128-84 (3) e de DNAr 5S (4) e 18S-5.8S-25S (5).

## 7.6. FISH

Para realização de FISH foram selecionadas lâminas contendo no mínimo cinco conjuntos completos de cromossomos metafásicos dos genótipos diploides *A. duranensis* e *A. ipaënsis*, e dos genótipos tetraploides *A. hypogaea* e alotetraploide sintético (*A. duranensis* x *A. ipaënsis*).

### 7.6.1. Sondas de DNAr

As hibridizações com as sondas de DNAr 5S e 18S-5.8S-25S apresentaram sinais de hibridização detectáveis em todos os genótipos analisados. O número de sítios com as sondas de DNAr 5S e 45S assim como demonstrado por Seijo *et al.* (2004) foram confirmados para *A. duranensis*, *A. ipaënsis* e *A. hypogaea*, e descrito para o alotetraploide sintético com diferenças relevantes.

#### *DNAr 5S*

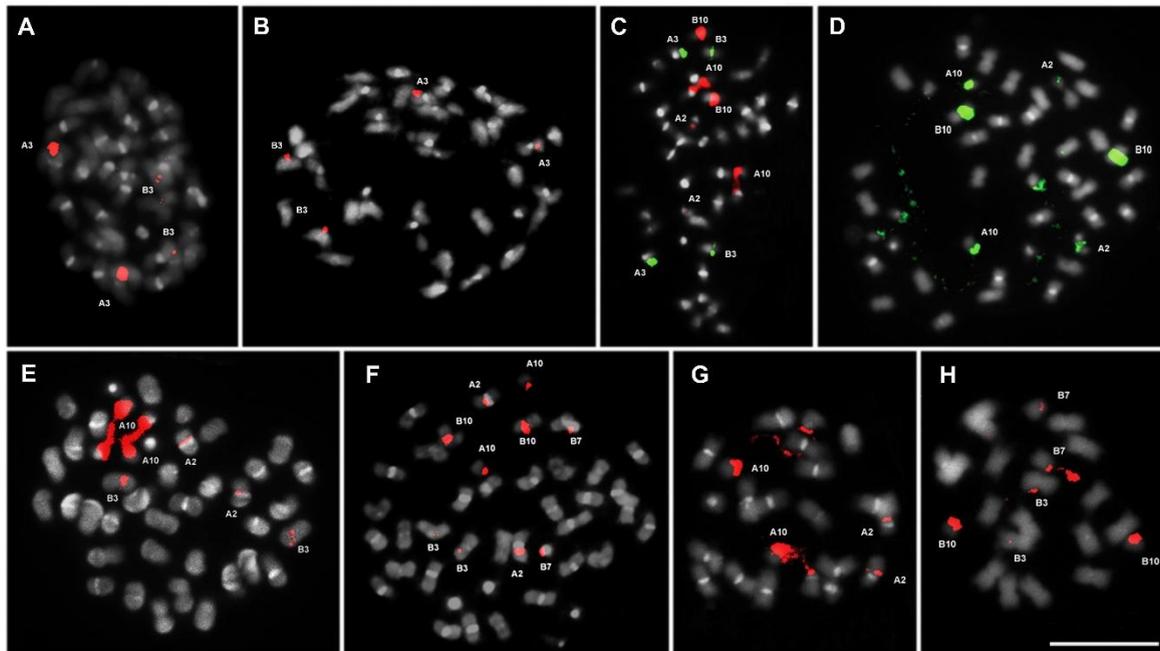
O número de sítios após hibridização com sondas de DNAr 5S no alotetraploide sintético mostrou marcações distais em um par de cromossomos do subgenoma A e outras próximas aos centrômeros de um par do subgenoma B (Fig. 7A e 7C). Esses pares de cromossomos provavelmente equivalem aos pares A03 e B03 de *A. hypogaea*, uma vez que são morfologicamente equivalentes (Fig. 7B). No alotetraploide sintético os sítios de hibridização no par A03 é mais forte quando comparado ao B03. Diferentemente do sintético, os sítios 5S do par A03 do alotetraploide natural e de *A. duranensis* foram localizados próximos aos centrômeros. Já os sítios de hibridização detectadas no par B03 de ambos os alotetraploides e de *A. ipaënsis* apresentaram similaridade na localização e na intensidade.

#### *DNAr 45S*

Hibridização com sonda de DNAr 18S-5.8S-25S (45S) nos cromossomos do alotetraploide sintético produziu somente seis sítios nos pares A02, A10 e B10. O par A02 mostrou os sítios de hibridização mais fracos, localizados próximos aos centrômeros, e B10 foi os mais evidentes, também próximos às regiões centroméricas. Os sítios no par A10 foram identificados nas regiões satélites, separados pela constrição secundária, com uma Região Organizadora de Nucléolos ativa (RON). Nenhuma co-localização de sítios 5S e 45S foi observada no par B03 (Fig. 7C e 7D).

Diferentemente do sintético, em *A. hypogaea* foram detectados a presença de cinco pares de sítios de hibridização, respectivamente nos pares de cromossomos A02, A10, B3, B7 e B10. O par A10 apresentou os sinais mais fortes, situados nos cromossomos satélites, separados pela constrição secundária, com uma RON ativa detectada. Já os sítios nos pares A02, B03 e B10 foram observados nas regiões pericentroméricas, onde os sítios em B03 foram mais discretos. No par B07 os sítios foram localizados nas regiões distais (Figs. 7E e 7F).

Análises em *A. duranensis* corroboraram a presença de quatro sítios 45S nos pares de cromossomos A02 e A10, com uma única RON ativa em A10, assim como observado em ambos os alotetraploides. Os sítios no par A10 foram mais fortes no alotetraploide natural e em *A. duranensis* do que no sintético (Fig. 7G). A hibridização em *A. ipaënsis* corroborou a presença de seis sítios 45S nos pares B03, B07 e B10 como observado no subgenoma B de *A. hypogaea*, mas diferindo do sintético, que apresentou um único sítio observado no par B10. Os sítios no par B10 foram localizados na região satélite, separados pela constrição secundária, com presença de RON ativa. Os sítios nos pares B03 e B07 de *A. ipaënsis* foram semelhantes aos observados em *A. hypogaea*, considerando-se a localização e a intensidade do sinal (Fig. 7H).



**Figura 7:** Cromossomos metafásicos dos genótipos alotetraploides e diploides após FISH com sondas de DNAr e contracolorados com DAPI (cinza), evidenciado em branco nos centrômeros do subgenoma A. FISH com sonda de DNAr 5S nos cromossomos do alotetraploide sintético (A- vermelho e C- verde) com sítios presentes nas regiões distais do par A03, e próximos ao centrômeros do par B03, semelhantes aos sítios 5S em *A. hypogaea* (B). FISH com sonda de DNAr 45S no alotetraploide sintético (C- vermelho e D- verde) com seis sítios nos cromossomos A02, A10 e B10. O par A02 com sinais mais fracos, próximos aos centrômeros e B10, mais evidentes, também próximos aos centrômeros. Sítios em A10 localizados nas regiões satélites com RON. Diferindo do sintético, *A. hypogaea* (E e F) com dez sítios nos cromossomos A02, A10, B3, B7 e B10. O par A10 com sinais mais fortes, localizados nas regiões satélites com RON (E). Sítios em A02, B03 e B10

nas regiões pericentroméricas, mais discretos em B03 e em B07 localizados nas regiões distais. Em *A. duranensis* (G) com presença de quatro sítios nos pares de cromossomos A02 e A10, com RON em A10. Em *A. ipaënsis* (H) presença de seis sítios nos pares de cromossomos B03, B07 e B10. Sítios em B10 foram localizados nos satélites com NOR. Sítios em B03 e B07 foram semelhantes aos observados em *A. hypogaea* (F), mas diferindo do sintético com sítios observados apenas no par B10 (B). Barra: 5µm.

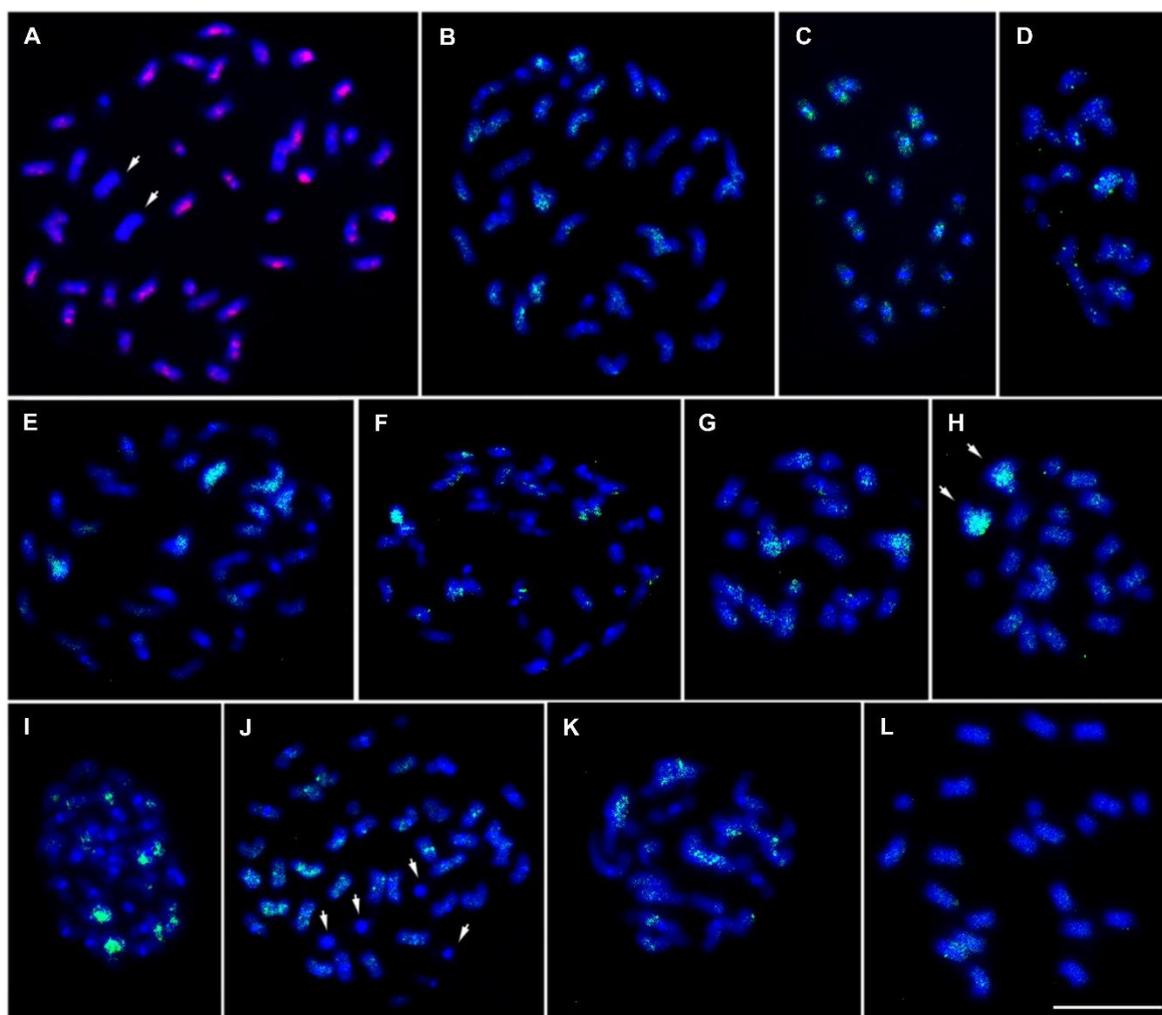
### 7.6.2. Sondas de RT-LTR

As hibridizações com as sondas correspondentes as regiões conservadas dos RT-LTR pertencentes às famílias RE128-84, Pipoka e Athena geraram sinais distribuídos em vários, mas não em todos os cromossomos dos genótipos analisados.

FISH com a sonda do RT-LTR RE128-84 no alotetraploide sintético mostrou um padrão de marcação difuso, localizado principalmente nas regiões pericentroméricas dos cromossomos do subgenoma A, exceto em um único par que não apresentou marcação. Os sinais estavam distribuídos ao longo dos braços e centrômeros de todos os cromossomos do subgenoma B, mas ausentes nas regiões distais dos cromossomos de ambos os subgenomas (Fig. 8A). Nos cromossomos de *A. hypogaea*, assim como observado no sintético, a sonda hibridizou de forma difusa, porém em todos os cromossomos (Fig. 8B). Em *A. duranensis* o padrão observado também foi difuso, entretanto os sinais estavam localizados nos braços, centrômeros e nas regiões distais de todos os cromossomos (Fig. 8C). Diferentemente, em *A. ipaënsis* o padrão de hibridização foi mais pontual e fraco, distribuído ao longo da maioria dos cromossomos (Fig. 8D).

A hibridização com sonda Pipoka nos cromossomos do alotetraplóide sintético apresentou um padrão de hibridização difuso, com sinais localizados nos braços e centrômeros de ambos os subgenomas, mais evidentes em alguns cromossomos do subgenoma A e ausentes nas regiões distais de todos os cromossomos (Fig. 8E). Em *A. hypogaea* a maioria dos cromossomos mostrou sinais pontuais, principalmente pericentroméricos, em ambos os subgenomas, embora não detectados em alguns cromossomos de ambos os subgenomas (Fig. 8F). Nos cromossomos de *A. duranensis* foi observado um padrão de hibridização difuso, com sinais presentes nos braços e centrômeros de todos os cromossomos, mais discreto nos pares A09 e A10 e ausente na região distal de todos os cromossomos (Fig. 8G). Em de *A. ipaënsis* os sinais também se mostraram difusos, distribuídos em todos os cromossomos, mais evidentes em dois pares (Fig. 8H).

A hibridização com sonda Athena no alotetraploide sintético gerou padrão de hibridização difuso, com sinais presentes nos braços e centrômeros da maioria dos cromossomos do subgenoma B, não detectados na maioria dos cromossomos do subgenoma A e ausentes nas regiões distais de ambos os subgenomas (Fig. 8I). Nos cromossomos de *A. hypogaea* os sinais também apresentaram um padrão difuso, presentes nos braços e centrômeros de todos os cromossomos de ambos os subgenomas, ligeiramente mais evidentes em alguns cromossomos do subgenoma B e mais discreto nos pares A09 e A10 (Fig. 8J). Em *A. duranensis* os sinais de hibridização foram difusos, presentes nos braços e centrômeros de quase todos os cromossomos e ausentes nas regiões distais de todos (Fig. 8K). Assim como os demais genótipos, os cromossomos de *A. ipaënsis* apresentaram sinais com padrão difuso presentes em todos os cromossomos (Fig. 8 L).



**Figura 8:** Cromossomos metafásicos dos genótipos alotetraploides e diploides após FISH com sondas de RT-LTR e contracolorados com DAPI (azul), evidenciado nos centrômeros do subgenoma A. Alotetraploide sintético (A, E e I), *A. hypogaea* (B, F e J), *A. duranensis* (C, G e K) e *A. ipaënsis* (D, H e L), após FISH com as sondas RE128-84 (A, B, C e D), Pipoka (E, F, G e H) e Athena (I, J, K e L). Sonda RE128-84 no alotetraploide sintético (A) com sinais difusos e pericentroméricos nos cromossomos do subgenoma A, exceto em um par sem marcação (setas). Distribuídos nos braços e centrômeros de todos os cromossomos do subgenoma B e ausentes nas regiões distais de ambos os subgenomas, assim como observado em todos os cromossomos de *A. hypogaea* (B). Em *A. duranensis* (C) o padrão também foi difuso e localizado nos braços, centrômeros e nas regiões distais de todos os cromossomos. Em *A. ipaënsis* (D) o padrão de hibridização foi

pontual e presente em quase todos os cromossomos. Sonda Pipoka no alotetraplóide sintético (E) mostrou padrão difuso, localizado nos braços e centrômeros de ambos os subgenomas, mais evidente em alguns cromossomos do subgenoma A e ausente na região distal de todos os cromossomos. Em *A. hypogaea* (F), a maioria dos cromossomos mostrou sinais pontuais e principalmente pericentroméricos em ambos os subgenomas. Em *A. duranensis* (G) o padrão foi difuso, presente nos braços e centrômeros de todos os cromossomos, mais discreto nos pares A09 e A10 e ausente na região distal de todos os cromossomos. Em *A. ipaënsis* (H) os sinais também foram difusos em todos os cromossomos, mais fortes em dois pares (setas). Sonda Athena no alotetraplóide sintético (I) os sinais apresentaram um padrão difuso, presentes nos braços e centrômeros da maioria dos cromossomos do subgenoma B, não detectado na maioria dos cromossomos do subgenoma A e ausentes nas regiões distais. Em *A. hypogaea* (J) com padrão também difuso, distribuído nos braços e centrômeros de todos os cromossomos e mais discreto nos pares A09 e A10. Em *A. duranensis* (K) os sinais de hibridização foram difusos, presentes nos braços e centrômeros de quase todos os cromossomos e ausentes nas regiões distais. Em *A. ipaënsis* (L) o padrão também foi difuso e presente em todos os cromossomos. Barra: 5µm.

## 8. DISCUSSÃO

O amendoim cultivado (*A. hypogaea*), originado a partir da hibridação das espécies silvestres *A. duranensis* e *A. ipaënsis*, seguida de uma tetraploidização espontânea, originou o ‘amendoim ancestral’ há alguns milhões de anos atrás (Kochert *et al.*, 1996; Stalker *et al.*, 1995; Singh *et al.*, 1996; Simpson *et al.*, 2001; Seijo *et al.*, 2004; Morethzson *et al.*, 2004; Robledo e Seijo, 2010; Bertoli *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2016). Assim, o amendoim possui dois componentes genômicos (A e B), cada um com dez pares de cromossomos, já caracterizados citogeneticamente (Seijo *et al.*, 2007; Wynne *et al.*, 1989; Robledo *et al.*, 2009; Samoluk *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016). Esses componentes, designados como subgenomas no alotetraploide, não mostram evidências de recombinação genética, pois comportam-se de forma independente e inteiramente regular para formação de bivalentes durante a meiose (Husted, 1936; Singh e Moss, 1982; Smartt, 1990). Apesar da alta sintonia gênica dos subgenomas do alotetraploide com os genomas dos seus genitores, há indicativos de reorganização dos subgenomas (Bertoli *et al.*, 2009, 2013; Shirasawa *et al.*, 2013; Morethzson *et al.*, 2013), sugerindo que o amendoim sofreu uma remodelação genômica, ou durante sua formação ou ao longo de sua evolução. Embora pouco tenha sido demonstrado até o momento em termos de organização estrutural dos genomas de *Arachis*, sabe-se que essas alterações, em sua maioria, estão associadas à dinâmica de frações de DNA repetitivas.

Assim como em outras espécies, a origem poliploide do amendoim, oriunda da hibridação entre duas espécies pode ser considerada suficiente para estabelecer barreiras que impedem o fluxo gênico. Levando a espécie poliploide a um isolamento reprodutivo (Ramsey e Schemske, 1998). Entretanto, a poliploidia implica em ajustes moleculares e fisiológicos, que incluem rearranjos genômicos com troca ou perda de genes, alteração na expressão e silenciamento de genes, além do controle epigenético (Madlung, 2013). O que de fato desempenha um importante papel na origem e evolução de genomas (Yoo *et al.*, 2013).

A diferença de ploidia entre as espécies silvestres e a baixa variabilidade genética do amendoim cultivado são barreiras que dificultam o seu melhoramento, contudo estudos envolvendo espécies silvestres para a incorporação de características desejáveis em amendoim são desenvolvidos (Simpson *et al.*, 1993; Garcia *et al.*, 1996; Isleib *et al.*, 2001). Entre eles, uma estratégia importante para auxiliar esses programas de melhoramento envolve a manipulação interespecífica de níveis de ploidia, o que gera novos genótipos como fontes de variabilidade, que podem superar barreiras reprodutivas e adicionar variedades para o germoplasma. Isso pode se dar por meio de hibridações conduzidas com genótipos diploides silvestres seguidas por poliploidizações via agentes químicos,

resultando em poliploides sintéticos que servem de pontes de hibridação com o amendoim para facilitar a transferência de caracteres de interesse (Fávero *et al.*, 2006).

Esses alopoliploides sintetizados a partir de genitores selecionados, também são excelentes materiais para se verificar a ocorrência de eventos genéticos e epigenéticos recentes, para estudos sobre evolução, organização do genoma e introgressão da variabilidade desejada a partir de espécies relacionadas, principalmente por meio da comparação com poliploides naturais próximos e seus genitores.

Em alopoliploides, seus diferentes genomas normalmente estão relacionados entre si, o que resulta em redundância genética no genoma, incluindo proximidade de genes e genomas duplicados (Soltis *et al.*, 2016). Como primeiramente sugerido por McClintock (1984), o ‘choque genômico’ pode ser uma resposta programada a estresses tais como a poliploidização, que pode induzir várias modificações, que normalmente são mais evidentes em alo do que autopoliploides devido as incompatibilidades entre seus diferentes subgenomas. Alterações genéticas e epigenéticas como rearranjos cromossômicos, remodelação da cromatina, mudanças no número e distribuição de sequências de DNA repetitivas, expressão de genes, perda/ ganho de genes, metilação do DNA e modificação das histonas, além da ativação de elementos transponíveis são vastamente descritas em ambos os tipos de alotetraploides, naturais e sintéticos (Comai, 2000; Ma e Gustafson, 2005; Feldman e Levy, 2012; Cheng *et al.*, 2012; Lisch e Bennetzen, 2011; Soltis *et al.*, 2016).

De fato, alotetraploides recentes mostram desde estabilidade genômica até rearranjos bastante evidentes, logo após sua formação ou ao longo de gerações iniciais, sem previsão de quando ou quais efeitos de poliploidização ocorrerão nos subgenomas ( Buggs *et al.*, 2011). No entanto, parece que a maioria das modificações em alopoliploides sintéticos ocorre logo após a poliploidização, como respostas genéticas de curto prazo resultantes da recombinação e ativação de ETs durante a hibridação (Chen *et al.*, 2016; Gautam *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016).

Aproveitando a existência de vários alotetraploides sintéticos, oriundos de cruzamentos de espécies diploides silvestres de *Arachis*, o genótipo (*A. ipaënsis* 'K30076' x *A. duranensis* 'V14167')<sup>4x</sup> (Fávero *et al.*, 2006) foi aqui explorado. Esse alotetraploide sintético possui um *background* genômico que mimetiza o do amendoim, além das sequências de referência dos genomas dos seus progenitores recém disponibilizadas (Bertioli *et al.*, 2016; peanutbase, 2016). Portanto, além da origem genômica conhecida, esse sintético não sofreu forças evolutivas e conseqüentemente, toda e qualquer alteração em sua estrutura e organização genômica, é oriunda dos eventos de hibridação/tetraploidização sintética durante sua formação.

O estudo citogenético molecular comparativo conduzido com esses alotetraploides, sintético e natural incluíram análises desde o tamanho dos genomas, até sua composição, e foram estendidos

aos seus genitores. Inferências sobre potenciais efeitos de hibridação, poliploidização e evolução são aqui discutidas e um conhecimento adicional sobre a organização do genoma de *Arachis* e o papel de sequências de DNA repetitivas durante esses eventos, um pouco melhor compreendido.

Apesar das similaridades entre os subgenomas do alotetraploide sintético, do amendoim e dos genomas A e B de seus genitores, rearranjos genômicos foram aqui identificados, provavelmente resultantes de perdas e adições de bandas durante a formação do sintético, sem que com isso houvesse alteração significativas no tamanho do genoma esperado. De fato, perda/ganho de bandas são extremamente comuns em alopoliplóides, como já demonstrado em *Arabidopsis*, *Triticum* e *Brassica* verificar para as 3 espécies (Song *et al.*, 1993, Shaked *et al.*, 2001; Ma e Gustafson, 2005; Eilam *et al.*, 2008; Bento *et al.*, 2015; Glover *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016). Portanto, uma análise mais aprofundada foi realizada para comparar citogeneticamente a composição dos subgenomas no sintético com os demais genótipos.

Redução no tamanho do genoma alopoliplóide pode ocorrer pela redução das cópias de genes homeólogos, e assim evitar redundância de genes. Essa redução gênica favorece o comportamento diploide dos subgenomas que mais tarde auxilia na estabilização genômica (Feldman e Levy, 2012). No entanto, as mudanças de tamanho de genomas podem ocorrer ou não, e caso ocorram, são espécies/ genótipos dependentes (Madlung, 2013).

O tamanho estimado dos genomas de *A. hypogaea*, *A. duranensis* 'V14167' e *A. ipaënsis* 'K30076' em pg corroboram os dados disponíveis no site do Kew Garden (Royal Botanic Gardens, 2016), trazendo maior confiança para a estimativa realizada para o tamanho do genoma do alotetraploide sintético, de 2,89 Gb, bastante similar ao de *A. hypogaea*. Entretanto, o tamanho do genoma do amendoim aqui estabelecido, bem como em outras publicações prévias (Dhillon *et al.*, 1980; Arumuganathan e Earle, 1991; Singh, 1996; Temsch e Greilhuber, 2000; Samouluk *et al.*; 2015; Bertoli *et al.*, 2016) indicam uma pequena redução do tamanho do seu genoma (4%) em relação a soma do tamanho dos genomas de seus genitores, redução também observada no genoma do sintético, entretanto menor (1%).

As supressões do genoma podem acarretar alterações em seu tamanho e são geralmente atribuídas a imediata eliminação não aleatória de sequências de DNA não codificantes e deleções de genes (redundantes), como observado em *A. thaliana* (Hu *et al.*, 2011) durante a alopoliplóidização. Essas supressões imediatamente após a hibridação podem ser seguidas por metilação extensa do DNA, outro mecanismo de silenciamento/ativação de genes que pode reprimir a atividade de ETs e outras sequências de DNA (Song

e Cheng, 2015), que resultam também na redução do tamanho dos genomas. Portanto, os dados aqui obtidos indicam que o tamanho dos genomas dos alotetraploides, natural e sintético foi estabelecido durante sua formação, ou seja, na hibridação/poliploidização e, se houve supressão genômica nos subgenomas, ocorreu durante sua formação, e não subsequentemente, ao longo das gerações.

Os subgenomas do amendoim compartilham muitas sequências de DNA, mas também apresentam divergências entre si e em relação aos genomas diploides dos seus genitores, como mostrado por meio da distribuição desigual de algumas frações repetitivas de DNA (Patel *et al.*, 2004, Nielen *et al.*, 2010, 2012). Buscando identificar regiões cromossômicas e sequências de DNA diferentes entre esses genótipos, diferentes técnicas citogenéticas foram aplicadas para os diferentes genótipos.

Inicialmente, foi analisada a presença de bandas CMA<sub>3</sub>, que correspondem a regiões do DNA ricas em sequências de nucleotídeos C – G (Summer, 1990). Essas bandas foram muito mais evidentes em *A. duranensis*, presentes em oito pares de cromossomos, do que em *A. ipaënsis*, em apenas um par, bem como em *A. hypogaea*, com uma maior quantidade de bandas, quando comparado ao alotetraploide sintético. Entretanto nenhum alotetraploide apresentou o somatório das espécies genitoras. Esses dados indicam que possivelmente algumas regiões heterocromáticas alteraram sua organização em ambos os alotetraploides, possivelmente modificando seu grau de condensação de forma a dificultar ou mesmo impedir o acesso desse fluoróforo à cromatina dessa região. Essa alteração é mais evidente no alotetraploide recente, que poderá alterar a configuração dessas regiões ao longo da evolução para uma forma mais próxima a do amendoim ou de seus progenitores ou ainda manter-se estável nessa condição.

Definitivamente, bandas DAPI<sup>+</sup> também estão presentes em centrômeros dos cromossomos do subgenoma A do alotetraploide sintético, mas não nos centrômeros dos cromossomos do subgenoma B, o que está em acordo com os dados aqui obtidos e com outros previamente publicados para o amendoim, *A. duranensis* e *A. ipaënsis* (Seijo *et al.*, 2004, 2007; Robledo e Seijo, 2010). Como esperado, a fluorescência de DAPI após FISH foi muito mais evidente do que aquela após bandeamento por CMA/DAPI. Isso porque nos procedimentos de FISH, os cromossomos são pré-tratados com digestão e desnaturação durante a pré-hibridização, o que facilita a penetração e estabilização desse fluoróforo nos cromossomos (Barros e Guerra, 2009).

Como esperado, o duplo GISH com sondas genômicas de *A. duranensis* e *A. ipaënsis* confirmou que a maioria dos cromossomos dos subgenomas dos alotetraploides natural e

sintético, juntamente com os genomas A e B das espécies diploides, de fato compartilham muitas sequências de DNA. Essas semelhanças podem ser observadas principalmente ao longo dos braços dos cromossomos. Entretanto, assim como em Seijo *et al.* (2007), também foram detectadas regiões sem hibridização com nenhuma sonda, correspondentes a sequências de DNA repetitivas, corroborando que grande parte da fração repetitiva presente nos componentes genômicos ou subgenomas A e B são divergentes (Seijo *et al.*, 2007; Bertoli *et al.*; 2013).

Resultados de GISH com sondas genômicas tetraploides evidenciaram a ausência de sinais de hibridização nos centrômeros do subgenoma A de ambos os alotetraploides e ausência de sinais com as sondas diploides apenas no sintético, evidenciadas principalmente no pequeno par 'A', caracterizado pela alta condensação da heterocromatina. Tal fato pode ser explicado por uma possível reestruturação dessas regiões heterocromáticas, de forma a dificultar ou impedir a hibridização das sondas. Este padrão também pode ser reflexo de diferentes acessibilidade das sondas genômica com as sequências homólogas ao longo dos cromossomos, como consequência dos processos de pré-hibridização na técnica de FISH, exemplo o uso de pepsina para expor o DNA às sondas (Seijo *et al.*, 2007). Também foi observada a ausência de sinais de hibridização nas regiões distais dos cromossomos, o que pode ser devido a condensação diferencial da cromatina, já que nas metáfases selecionadas para FISH, os cromossomos normalmente não são muito condensados para facilitar o mapeamento. Nessas condições, a cromatina é menos compacta, conseqüentemente menor intensidade de sinais nas regiões cromossômicas distais são detectadas.

O único par de cromossomos referentes ao subgenoma B do alotetraploide sintético, que apresenta bandas intercaladas com maior associação genômica ora com o genoma A, ora com o genoma B, é um par que claramente apresenta reorganização cromossômica, exclusiva no sintético e, portanto continuarão a ser analisadas em detalhe.

Alterações do genoma envolvem majoritariamente diferenças na distribuição e frequência de TEs. Entretanto, deve também ser considerado que sequências com baixo número de cópias e de DNA repetitivo, incluindo genes e sequências não codificadoras, também podem ser eliminadas durante a aloploidização (Salina *et al.*, 2004). Outras sequências também podem ser modificadas e perdidas ou mesmo alteradas epigeneticamente, como demonstrado para *A. suecica*, que perdeu cerca de 92% das bandas genitoras (Mandakova, 2016). Além disso, rearranjos em larga escala, incluindo perda de heterocromatina telomérica também já foram descritos em aloploidoides de *Triticale* (*Triticum aestivum* x *Secale cereale*) e mais recentemente em *Paspalum plicatulum*

(Weihmüller, 2014). Todas essas possíveis alterações poderiam ter ocorrido nesses alotetraploides de *Arachis*. Mas possivelmente, essas alterações provocaram um ‘choque transcriptômico’ e alterações epigenéticas no amendoim. Essas mudanças são normalmente seguidas por deleções de sequências, que podem ser responsáveis por aumentar a diversidade, plasticidade e variação do genótipo, permitindo a heterose e conferindo competência para as adaptações (Shaked *et al.*, 2001; Kashkush *et al.*, 2002, 2003b; Feldman e Levy, 2012), conforme vemos no amendoim, mas ainda não passível de detecção no sintético.

Por outro lado, aloploidos sintéticos de *Hibiscus* (Salinas, 2004), *Gossypium* (Liu *et al.*, 2005) e *Brassica* (Axelsson *et al.*, 2000) mantiveram os elementos genéticos de seus genitores, corroborando que não existem regras ou padrões que definem a reorganização de subgenomas em alotetraploides.

Mecanismos como metilação de DNA, modificações nas histonas, remodelação de cromatina e silenciamento por RNA de interferência (RNAi) ou por pequenos RNAs (siRNA) podem desencadear alterações na organização da cromatina de genomas diferentes em um mesmo núcleo. Recentemente, Zhang *et al.* (2016) revelou posições variadas ou mesmo ausência de sequências em cromossomos de *A. hypogaea* que deveriam ser identificadas por hibridização com sondas correspondentes a sequências de DNA conservadas presentes em centrômeros e telômeros.

Devido à conservação de sequências entre os genomas eucarióticos, independentemente de sua distribuição ou estado funcional em cada genoma, os DNAr são frequentemente usados como sondas em análises citogenéticas (Chen *et al.*, 1999; Hwang *et al.*, 2009; Waminal *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2012; Bhowmick *et al.*, 2016). As unidades de DNAr são distribuídas em *tandem*, em um ou vários loci (Hemleben e Zentgraf, 1994). O DNAr 45S é composto pelos genes que codificam as proteínas 18S, 5.8S e 25S, pelos espaçadores internos transcritos (ITS) e por espaços intergênicos, enquanto que o DNAr 5S codifica 120pb do RNAr 5S. Essas sequências gênicas são altamente conservadas, enquanto que as regiões espaçadoras são suficientemente diferentes para serem distinguidas em diferentes espécies. Portanto, FISH utilizando sondas de DNAr 5S e 45S foi aqui realizada pela primeira vez para identificar os loci de DNAr nos cromossomos do alotetraploide sintético.

O número de loci de DNAr 5S para o alotetraploide sintético foi o esperado, já que se apresentaram de maneira semelhante ao observado para o amendoim e suas espécies genitoras. No entanto, a localização distal do locus nos cromossomos do par A03 do

sintético difere daquela pericentromérica no A03 de *A. duranensis* e *A. hypogaea*, sugerindo uma possível translocação deste segmento durante a formação do sintético.

O número de loci de DNAr 45S nos cromossomos do alotetraploide sintético é menor do que a observada em *A. hypogaea* e seus genitores. A perda desses loci ocorreram nos cromossomos oriundos de *A. ipaënsis*, confirmando assim uma subtração de sequências de forma uniparental. Rearranjos em DNAr 45S também têm sido observadas em híbridos entre *Nicotiana* e *Atropa* (Borisjuk *et al.*, 1988), espécies de *Medicago* (Cluster *et al.*, 1996), *Triticum* (Shcherban *et al.*, 2008; Baum e Feldman, 2010) e *Tragopogon* (Malinska *et al.*, 2010). Por outro lado, tais rearranjos estão ausentes em *Brassica* (Delseny *et al.*, 1990; Bennett e Smith, 1991) e *Arabidopsis* (Chen *et al.*, 1998).

Embora existam alotetraploides que conservem o número e posição dos loci de DNAr iguais aos de seus genitores, a reorganização é bastante comum, incluindo perda de apenas uma das espécies genitoras (Renny-Byfield *et al.*, 2011; Kovarik *et al.*, 2012; Weiss-Schneeweiss *et al.*, 2012; Zozomová-Lihová *et al.*, 2014). Essa redução é explicada pelo seu carácter não-aditivo (Snowdon *et al.*, 1997, Ozkan *et al.*, 2003, Yoshikazu *et al.*, 2006), que pode reduzir seu número por uma rápida reorganização genoma/cromossômica (Wendel, 2000; Heslop-Harrison e Schwarzacher, 2011).

Apesar da ocorrência da RON no cromossomo B10 de *A. ipaënsis*, ambos os alotetraploides apresentaram apenas uma RON no par de cromossomos A10 oriundos de *A. duranensis*, genitor materno do amendoim, porém genitor paterno do sintético, indicando que o silenciamento da RON foi cromossomo específico, independente dos genitores. Estes dados confirmam a predominância nucleolar de *A. duranensis* nos alotetraploides. Da mesma forma, no alotetraploide natural *A. suecica* é relatado que genes de RNAr paternos de *A. thaliana* foram silenciados. Uma explicação plausível para a perda de RON em B10 nos alotetraploides de *Arachis* poderia ser pela localização desta sequência muito próximas às regiões terminais dos cromossomos, assim como em *A. suecica*, onde a RON perdida estava localizada na região terminal dos cromossomos 2 e 4. Essa perda poderia se dar pela ruptura da fita dupla de DNA nos cromossomos próximos a RON, provocando sua remoção (Loyd e Bomblies, 2016).

Outra explicação poderia ser a ruptura de um cromossomo, seguida pela perda ou translocação de segmentos cromossômicos, ou ainda, uma ruptura do cromossomo mediada por ETs (McClintock, 1952). Genes silenciados de um ou ambos genitores em alotetraploides sintéticos recentes são frequentes (Soltis *et al.*, 2016; Loyd e Bomblies, 2016), principalmente de DNAr através de regulação epigenética, detectada pela primeira

vez por Navashin (1934). Estas alterações são consequências de fatores genéticos (Flavell, 1986) e epigenéticos, incluindo modificações de histonas na cromatina (Chen *et al.*, 1998) e siRNAs (Preuss *et al.*, 2008) buscando estabilizar a incompatibilidade entre os subgenomas.

Por fim, estes rearranjos instantâneos após a alopoliploidização, principalmente em sequências de DNA organizadas em *tandem* (Kolano *et al.*, 2013) sugerem que os subgenomas do alotetraploide sintético de *Arachis* estão sob uma regulação bastante fina e coordenada (Salina *et al.*, 2004), incluindo o comportamento funcional cromossômico como os de DNAr 45S.

Elementos transponíveis são frações de DNA repetitivas, geralmente localizadas em regiões heterocromáticas, sendo os principais responsáveis pelas variações nos tamanhos dos genomas (San Miguel e Bennetzen, 1998). Também estão relacionados ao silenciamento de genes, principalmente por meio de metilação ou alterações em regiões promotoras (This *et al.*, 2007; Yao *et al.*, 2001; Vendramin *et al.*, 2014). Modificações envolvendo a regulação de genes são muitas vezes desencadeadas por condições ambientais adversas e diferentes estresses, tais como hibridação e poliploidização em plantas. Embora pouco se compreenda sobre a dinâmica de RTs autônomos em alopoliploides sintéticos (Kashkush *et al.*, 2003b), sabe-se que a transposição dos ETs é mais intensa após alopoliploidização, que provoca um aumento no número de cópias dos ETs, com ou sem modificações nas suas sequências.

Os retrotransposons, por possuírem capacidade de transposição ao longo do genoma, principalmente os do tipo LTR, são considerados os maiores contribuidores da fração repetitiva de grandes genomas (Kumar e Bennetzen, 1999; Sabot e Schulman, 2006), podendo ultrapassar 80% em algumas espécies vegetais (SanMiguel e Bennetzen, 1998). Mediante tal importância, e alta frequências desses elementos em genomas de *Arachis* (Nielen *et al.*, 2012; Moretzsohn *et al.*, 2013; Bertoli *et al.*, 2016), esse estudo incluiu análises de três tipos de ETs, mais especificamente dos membros de duas famílias de RT-LTR autônomas, e de uma família não autônoma. A distribuição e frequência de seus membros foi determinada *in silico* em pseudomoléculas dos genótipos diploides e sua distribuição *in situ* mapeada em cromossomos dos quatro genótipos em estudo.

O mapeamento *in silico* dos RT-LTR confirmou que o maior número de membros e de cópias são daqueles do tipo autônomos, sendo Pipoka, o mais abundante, seguido por RE128-84 e Athena, não autônomo. O mapeamento *in situ* desses RT-LTR por FISH nos genótipos diploides é equivalente a distribuição observada *in silico*. A distribuição desses

elementos nos quatro genótipos é predominantemente difusa, o que reflete seu mecanismo de transposição, e distribuídos ao longo da maioria dos cromossomos, principalmente nas regiões pericentroméricas. O padrão de distribuição pontual, tipicamente encontrado quando a hibridização ocorre com sequências mais agrupadas em *tandem* foi detectado para membros de RE-128-84 em *A. ipaënsis* e de Pipoka em *A. hypogaea*, mas não no sintético.

Essas análises sugerem que esses RT-LTRs constituem um caráter não-aditivo, independente do tamanho ou níveis de ploidia, já que apresentam uma frequência e distribuição similar entre os genótipos.

Como os padrões de distribuição desses RT-LTRs em *A. hypogaea* são mais próximos daqueles de seus genitores, possivelmente esse alotetraploide sintético ainda poderá passar por alterações, que possivelmente remodelarão seus subgenomas de forma mais similar a de seus genitores. Essas modificações, controladas ou não por mecanismos epigenéticos, devem se assemelhar aos acontecimentos ocorridos em espécies aloploidoides naturais (Książczyk *et al.*, 2011). Entretanto, serão necessárias novas análises incluindo outros elementos, e em novas gerações desse sintético para se poder concluir sobre sua evolução.

Conforme a distribuição *in silico* em pseudomoléculas e *in situ* nos cromossomos de todos os genótipos, as regiões pericentroméricas incluem muitos membros das três famílias de RT-LTRs, de forma similar a relatada para *Arabidopsis*, onde RTs estão preferencialmente agrupados nessas regiões (Peterson-Burch *et al.*, 2004) e quinoa (Kolano *et al.*, 2013). A alta frequência de RT-LTRs nessas regiões poderia também desencadear a remodelagem da cromatina, já que muitos desses RTs são responsivos a estresses como a hibridação. Uma possível consequência dessa remodelagem poderia ser uma maior condensação do DNA dessa região, o que justificaria a possível falta de acesso dos fluoróforos nas regiões centroméricas durante esse estudo e alterações na localização de sequências conservadas de centrômeros nos cromossomos de *A. hypogaea* (Zhang *et al.*, 2016).

Esta primeira análise citogenética de um alotetraploide sintético de *Arachis* (*A. ipaënsis* x *A. duranensis*)<sup>4</sup> demonstra que seus subgenomas estão organizados morfológicamente como nos genitores diploides, incluindo a maior parte da suas estruturas e sequências. Entretanto, também está evidente que algumas mudanças ocorreram durante a hibridação/tetraploidização durante a formação desse genótipo. Entre essas alterações, foram detectadas perda, ganho e rearranjo de alguns segmentos de DNA, perda de locus 45S oriundo do genitor materno *A. ipaënsis*, inativação de RON e diferenças na distribuição

de LTR-RT. Além disso, alterações que possivelmente remodelaram regiões centroméricas dos cromossomos dos alotetraploides, principalmente naqueles do subgenoma A do sintético ocorreram, presumindo que a acessibilidade de alguns marcadores citogenéticos utilizados em GISH, CMA e FISH não foram detectados nessas regiões.

Esses dados, associados a outras análises podem trazer novos *insights* sobre a história genômica do amendoim, e de outros aloploiploides do gênero, como *A. monticola*. Os dados também poderão contribuir para o enriquecimento do mapeamento citogenético de sequências repetitivas, retrotransposons e genes, bem como auxiliar na identificação de marcadores citogenéticos cromossomo específicos, representando, portanto, uma contribuição significativa para os estudos relacionados com o sequenciamento do genoma do amendoim em andamento e para compreensão geral da evolução dos genomas de *Arachis*.

## 9. CONCLUSÃO

Nesta primeira análise citogenética comparativa de um alotetraploide sintético de *Arachis* (*A. ipaënsis* x *A. duranensis*)<sup>4x</sup> que possui o mesmo *background* do amendoim cultivado (*A. hypogaea*), foi demonstrado semelhanças com seu homólogo natural e seus genitores diploides, como o tamanho do genoma correspondente a soma dos seus genitores e similaridade com o amendoim; intensidade e posição de bandas centroméricas DAPI<sup>+</sup>; número de loci de DNAr 5S e em alguns loci de DNAr 45S com presença de RONS.

Entretanto, alterações genômicas estabelecidas em sua origem também foram detectadas. De fato, alguns aspectos da organização e composição dos subgenomas do sintético diferem das observadas nas espécies genitoras, e em menor grau, das observadas em *A. hypogaea*. Rearranjos de alguns segmentos de DNA nos subgenomas do sintético como a perda de loci 45S de *A. ipaënsis*; a inativação da RON no subgenoma B; ausência de bandas evidenciando regiões heterocromáticas CMA<sup>+</sup> e diferenças na frequência e distribuição de RT-LTRs foram detectados. Concluindo que realmente a poliploidia implica muito mais do que a união de dois genomas em um mesmo núcleo, mas também na participação de vastos ajustes moleculares e fisiológicos, que incluem rearranjos genômicos, além do controle epigenético.

Estas análises trazem novos *insights* sobre a história genômica do amendoim. Os dados podem ser usados para enriquecer o mapeamento citogenético de sequências repetitivas, retrotransposons e identificação de marcadores citogenéticos cromossomo específicos, representando, portanto, uma contribuição significativa para estudos relacionados com o contínuo sequenciamento do genoma do amendoim e para a compreensão geral da evolução dos genomas de *Arachis*.

## **10. PERSPECTIVAS**

Tendo em vista os resultados obtidos nesse trabalho, pretende-se estender as análises citogenéticas aqui realizadas em um projeto de doutorado, ampliando o número de genótipos silvestres, bem como de alotetraploides naturais e sintéticos, abordando inclusive técnicas citogenômicas com intuito de selecionar sequências de DNA de interesse, tais como genes associados à reposta a diferentes estresses que podem ser utilizadas como sondas e assim desenvolver marcadores cromossomo-específicos, além de trazer maiores informações sobre os genes-alvo, que possibilitaram juntamente com as análises de sequências repetitivas o entendimento da estrutura e evolução do genoma do amendoim e das espécies relacionadas, podendo ainda facilitar a introgressão de características de interesse nos cultivares comerciais.

## 11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alix K e Heslop-Harrison JS. 2004. The diversity of retroelements in diploid and allotetraploid *Brassica* species. *Plant Mol Biol* 6:895-909.

Alix K, Ryder CD, Moore J, King GJ, Pat Heslop-Harrison JS. 2005. The genomic organization of retrotransposons in *Brassica oleracea*. *Plant Mol Biol* 59:839-851.

Arumuganathan K e Earle ED. 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol. Biol.* 9: 208-218.

Axelsson T, Shavorskaya O e Lagercrantz U. 2001. Multiple flowering time QTLs within several *Brassica* species could be the result of duplicated copies of one ancestral gene. *Genome* 44: 856-864.

Barros AE e Guerra MS. 2009. The meaning of DAPI bands observed after C-banding and FISH procedures. *Biotechnic e Histochemistry* 85: 115-125.

Baum BR, Feldman M. 2010. Elimination of 5S DNA unit classes in newly formed allopolyploids of the genera *Aegilops* and *Triticum*. *Genome* 53, 430–438

Bennett, R.I., and Smith, A.G. 1991. The complete nucleotide sequence of the intergenic spacer region of an rDNA operon from *Brassica oleracea* and its comparison with other crucifers. *Plant Mol. Biol.* 16: 1095-1098.

Bento M, Tomás D, Viegas W e Silva M. 2015. Unravelling genome dynamics in *Arabidopsis* synthetic auto and allopolyploid species. *Biologia Plantarum* 59: 661-670.

Bertioli DJ, Moretzsohn MC, Madsen LH, Sandal N, Leal-Bertioli SCM, Guimarães PM, Hougaard BK, Fredslund J, Schauser L, Nielsen AM, Sato S, Tabata S, Cannon S, Stougaard J. 2009. An analysis of synteny of *Arachis* with *Lotus* and *Medicago* sheds new light on the structure, stability and evolution of legume genomes. *BMC Genomics* 10:45.

Bertioli DJ, Vidigal BS, Nielsen S, Ratnaparkhe MB, Lee TH, Leal-Bertioli SCM, Kim C, Guimaraes PM, Seijo G, Schwarzacher T, Paterson AH, Heslop-Harrison P, Araujo ACG. 2013. The repetitive component of the A genome of peanut (*Arachis hypogaea*) and its role in remodelling intergenic sequence space since its evolutionary divergence from the B genome. *Annals of Botany* 112:545-559.

Bertioli DJ, Cannon SB, Froenicke, Huang G, Farmer AD, Cannon EKS, Liu X, Gao D, Clevenger J, Dash S, Ren L, Moretzsohn MC, Shirasawa K, Huang W, Vidigal B, Abernathy B, Chu Y, Niederhuth CE, Umale P, Araújo ACG, Kozik A, Kim KD, Burow MD, Varshney RK, Wang X, Zhang X, Barkley N, Guimarães PM, Isobe S, Guo B, Liao B, Stalker HT, Schmitz RJ, Brian e Scheffler, Leal-Bertioli SCM, Xun X, Jackson SA, Michelmore R and Ozias-Akins P. 2016. The genome sequences of *Arachis duranensis* and *Arachis ipaënsis*, the diploid ancestors of cultivated peanut. *Nature Genetics*. doi:10.1038/ng.3517.

Bhattacharyya MK, Smith AM, Ellis TH, Hedley C, Martin C. 1990. The wrinkled-seed character of pea described by Mendel is caused by a transposon-like insertion in a gene encoding starch-branching enzyme. *Cell* 60:115-22.

- Bhowmick BK, Yamamoto M, Jha S. 2016. Chromosomal localization of 45S rDNA, sex-specific C values, and heterochromatin distribution in *Coccinia grandis* (L.) Voigt. *Protoplasma* 253: 201-209
- Bonavia D.1982. Precerá mico peruano, Los Gavilanes, oasis en la historia del hombre. Corporación Financiera de Desarrollo S.A. COFIDE e Instituto Arqueológico Alemán.
- Borisjuk NV, Momot VP, Gleba Y. 1988. Novel class of rDNA repeat units in somatic hybrids between *Nicotiana* and *Atropa*. *Theoretical Applied Genetics* 76: 108-112
- Buggs RJ, Zhang L, Miles N, Tate JA, Gao L, Wei W, Schnable PS, Barbazuk WB, Soltis PS, Soltis DE. 2011. Transcriptomic shock generates evolutionary novelty in a newly formed, natural allopolyploid plant. *Curr Biol* 21:551-556.
- Burow MD, Simpson CE, Faries MW, Starr JL, Paterson AH. 2009. Molecular biogeographic study of recently described B- and A-genome *Arachis* species, also providing new insights into the origins of cultivated peanut. *Genome* 52:107-119.
- Burow MD, Simpson CE, Starr JL, Paterson AH. 2001. Transmission genetics of chromatin from a synthetic amphidiploid to cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.): Broadening the gene pool of a monophyletic polyploid species. *Genetics* 159:823-837.
- Bundock P e Hooykaas P. 2005. An *Arabidopsis* hAT-like transposase is essential for plant development. *Nature* 436:282-284.
- Chen Q, Conner RL, Laroche A, Thomas JB. 1998. Genome analysis of *Thinopyrum intermedium* and *Thinopyrum ponticum* using genomic *in situ* hybridization. *Genome* 41: 580–586.
- Chen ZJ, Comai L, Pikaard CS. 1998. Gene dosage and stochastic effects determine the severity and direction of uniparental ribosomal RNA gene silencing (nucleolar dominance) in *Arabidopsis* allopolyploids. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 95:14891–14896.
- Chen JF, Staub JE, Adelberg JW, Jiang J. 1999. Physical mapping of 45S rRNA genes in *Cucumis* species by fluorescence *in situ* hybridization. *Canadian Journal of Botany* 77: 389-393.
- Chen X, Li H, Pandey MK, Yang Q, Wang X, Garg V, Li H, Chi X, Doddamani D, Hong Y, Upadhyaya H, Guo H, Khan AW, Zhu F, Zhang X, Pan L, Pierce GL, Zhou G, Krishnamohan KVS, Chen M, Zhong N, Agarwal G, Li S, Chitikineni A, Zhang GQ, Sharma S, Chen N, Liu H, Janila P, Li, S, Wang M, Wang T, Sun J, Li X, Li C, Wang M, Yu L, Wen S, Singh S, Yang Z, Zhao J, Zhang C, Yu Y, Bi J, Zang X, Liu ZJ, Paterson AH, Wang S, Liang X, Varshney RK and Yu S. 2016. Draft genome of the peanut A-genome progenitor (*Arachis duranensis*) provides insights into geocarpy, oil biosynthesis, and allergens. *PNAS*. 1600899113.
- Cheng , Xianhong G, Mayank G; Lei K e Zaiyun L. 2012. Cytoplasmic and genomic effects on meiotic pairing in *Brassica* hybrids and allotetraploids from pair crosses of three cultivated diploids. *Genetics* 191: 725-38.

Chirinos FV. 2011. Breeding for Early Maturity in Peanuts (*Arachis hypogaea* L.) using Traditional Methods and Marker Assisted Selection (MAS). North Carolina State University.

Cluster PD, Calderini O, Pupilli F, Crea F, Damiani F, Arcioni S. 1996. The fate of ribosomal genes in three interspecific somatic hybrids of *Medicago sativa*: three different outcomes including the rapid amplification of new spacer-length variants. *Theoretical and Applied Genetics* 93: 801-808.

Comai L. 2000. Genetic and epigenetic interactions in allopolyploid plants. *Plant Molecular Biology* 43: 387-399.

Conab - Companhia Nacional de Abastecimento. 2015. Acompanhamento da safra de grãos brasileiros. Safra 2014/15. Tabela 13. Acessado em 4 de maio de 2015, disponível em [www.conab.gov.br](http://www.conab.gov.br).

Cordaux R, Udit S, Batzer MA, Feschotte C. 2006. Birth of a chimeric primate gene by capture of the transposase gene from a mobile element. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103:8101-8106.

Delseny M, McGrath JM, This P, Chevre AM, Quiros CF. 1990. Ribosomal RNA genes in diploid and amphidiploid *Brassica* and related species: organization, polymorphism, and evolution. *Genome* 33: 733-744.

Dhillon SS, Rake AV, Miksche JP. 1980. Reassociation kinetics and cytophotometric characterization of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *DNA Plant Physiol* 65:1121-1127.

Doležel J, Sgorbati S, Lucretti S. 1992. Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiologia Plantarum* 85: 625-631.

Du J, Tian Z, Hans CS, Laten HM, Cannon SB, Jackson SA, Shoemaker RC, Ma J. 2010. Evolutionary conservation, diversity and specificity of LTR-retrotransposons in flowering plants: insights from genome-wide analysis and multi-specific comparison. *The Plant Journal* 63: 584-598.

Eilam T, Anikster Y, Millet E, Manisterski J e Feldman M. 2008. Nuclear DNA amount and genome downsizing in natural and synthetic allopolyploids of the genera *Aegilops* and *Triticum*. *Genome National Research* 51: 616-27.

Estep MC, DeBarry JD, Bennetzen JL. 2013. The dynamics of LTR retrotransposon accumulation across 25 million years of panicoid grass evolution. *Heredity* 110: 194-204.

Fávero AP, Simpson CE, Valls JFM e Vello NA. 2006. Study of the evolution of cultivated peanut through crossability studies among *Arachis ipaënsis*, *A. duranensis* and *A. hypogaea*. *Crop Sci* 46:1546-1552.

Fávero AP, Santos FR, Simpson CE, Valls JFM e Vello NA. 2015. Successful crosses between fungal-resistant wild species of *Arachis* (section *Arachis*) and *Arachis hypogaea*. *Genetics and Molecular Biology* 38: 353-365.

- Fedoroff N. 2000. Transposons and genome evolution in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:7002-7007.
- Feldman M e Levy AA. 2012. Genome Evolution Due to Allopolyploidization in Wheat. *Genetics* 192: 763-774.
- Fernández A e Krapovickas A. 1994. Cromossomas y evolución en *Arachis* (Leguminosaea). *Bonplandia* 8: 187-220.
- Ferreira ME e Grattapaglia D. 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN.
- Feschotte C, Jiang N, Wessler SR. 2002. Plant transposable elements: where genetics meets genomics. *Nat Rev Genet* 3:329-341.
- Finnegan DJ. 1989. Eukaryotic transposable elements and genome evolution. *Trends Genet* 5:103-107.
- Flavell RB, Bennet MD, Smith JB. 1974. Genome size and proposition of repeated nucleotide sequence DNA in plants. *Biochemical Genetics* 12:257-269.
- Flavell, R.B. 1986. The structure and control of expression of ribosomal RNA genes. In: Mifflin B (ed) *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology* 3: 252-74.
- Freitas FO, Penaloza APS, Valls JFM. 2003a. O amendoim contador de história. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, n.107. 12p
- Freitas FO, Margarido MA, Negri NA. Modelo de previsão para área plantada com amendoim das águas no estado de São Paulo. *Informações Econômicas*, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 21-27, fev. 2003b.
- Galbraith DW, Lambert G, Macas J e Doležel J. 2002. Current protocols in cytometry. In: *Analysis of nuclear DNA content and ploidy in higher plants* (Robinson J, Azmi A and Tutois S, eds.). John Wiley e Sons, Inc., New York.
- Garcia G.M, Stalker HT, Shroeder E, Kochert G. 1996. Identification of RAPD, SCAR, and RFLP markers tightly linked to nematode resistance genes introgressed from *Arachis cardenasii* into *Arachis hypogaea*. *Genome* 39:836-845.
- Gautam M, Dang Y, Ge X, Shao Y e Li Z. 2016. Genetic and Epigenetic Changes in Oilseed Rape (*Brassica napus* L.) Extracted from Intergeneric Allopolyploid and Additions with *Orychophragmus*. *Front Plant Sci* 7: 438.
- Galbraith DW, Harkins KR, Maddox JM, Ayres NM, Sharma DP, Firoozabady E. 1983. Rapid flow cytometric analysis of the cell-cycle in intact plant-tissues. *Science* 220: 1049-1051.
- Gimenes MA, Lopes CR, Valls JFM. 2002. Genetic relationships among *Arachis* species based on AFLP. *Genetics and Molecular Biology* 5:349-353.

Glover NM, Redestig H e Dessimoz C. 2016. Homoeologs: What Are They and How Do We Infer Them? Trends in Plant Science: 21-7.

Godoy IJ, Moraes SA, Zanotto MD, Santos RC. 1999. Melhoramento do amendoim. In: A. Borem (Ed.), Melhoramento de espécies cultivadas. Viçosa: UFV. pp. 51-94.

Grabiele M, Chalup L, Robledo G, Seijo, JG.2012. Genetic and geographic origin of domesticated peanut as evidenced by 5S rDNA and chloroplast DNA sequences. Plant Syst Evol 298: 1151-1165.

Gregory MP e Gregory WC. 1979. Exotic germplasm of *Arachis* L. interspecific hybrids. Journal of Heredity 70: 185-193.

Greilhuber J. 2005. Intraspecific variation in genome size in angiosperms: identifying its existence. Ann Bot (Lond) 95:91–98.

Guimarães PM, Garsmeur O, Proite K, Leal-Bertioli SC, Seijo G, Chaine C, Bertioli DJ, D'Hont A. 2008. BAC libraries construction from the ancestral diploid genomes of the allotetraploid cultivated peanut. BMC Plant Biology, 8:14.

Guo YL. 2011. The *Arabidopsis lyrata* genome sequence and the basis of rapid genome size change. Nat Genet. 43: 476-481.

Hammons, RO. 1994. The origin and history of the groundnut. Em: Smartt, J. The Groundnut Crop. A scientific basis for improvement. London, Chapman e Hall, 24-42.

Hemleben V e Zentgraf U. 1994. Structural organisation and regulation of transcription by RNA polymerase I of plant nuclear ribosomal genes. In: L N (eds). Results and Problems in Cell Differentiation 20: Plant Promoters and Transcription Factors. Springer-Verlag: Berlin/Heidelberg, pp 3–24.

Herselman L. 2003. Genetic variation among Southern African cultivated peanut (*A. hypogaea* L.) genotypes as revealed by AFLP analysis. Euphytica 133:319-327.

Heslop-Harrison JS, Brandes A, Taketa S, Schmidt T, Vershinin AV, Alkhimova EG, Kamm A, Doudrick RL, Schwarzacher T, Katsiotis A, Kubis S, Kumar A, Pearce SR, Flavell AJ, Harrison GE. 1997. The chromosomal distributions of Ty1-copia group retrotransposable elements in higher plants and their implications for genome evolution. Genetica 100:197-204.

Heslop-Harrison JS. 2000. Comparative Genome Organization in Plants: From Sequence and Markers to Chromatin and Chromosomes. The Plant Cell 12:617-635.

Heslop-Harrison JS, Schwarzacher T. 2011. Organisation of the plant genome in chromosomes. The Plant Journal 66, 18-33.

Hilu KW. 1993. Polyploidy and the evolution of domesticated plants. American Journal of Botany 80:1494-1499.

Holbrook CC e Stalker HT. 2003. Peanut breeding and genetic resources. Plant Breeding Reviews 22: 297-356.

Hu TT, Pattyn P, Bakker EG, Cao J, Cheng JF, Clark FM, Fahlgren N, Fawcett JA, Grimwood J, Gundlach H, Haberer G, Hollister JD, Ossowski S, Ottillar RP, Salamov AA, Schneeberger K, Spannagl M, Wang X, Yang L, Nasrallah ME, Bergelson J, Carrington JC, Gaut BS, Schmutz J, Mayer KFX, Peer YV, Grigoriev IV, Nordborg M, Weigel D e Guo YL. 2011. The *Arabidopsis lyrata* genome sequence and the basis of rapid genome size change. *Nat Genet.* 43: 476-481.

Hudson ME, Lisch DR, Quail PH. 2003. The FHY3 and FAR1 genes encode transposase-related proteins involved in regulation of gene expression by the phytochrome A-signaling pathway. *Plant J* 34:453-471.

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

Hwang Y, Kim H, Kwon S, Yang T, Ko H, Park B, Chung J, Lim K. 2009. Karyotype analysis of three *Brassica* species using five different repetitive DNA markers by fluorescence in situ hybridization. *Horticulture, Environment, and Biotechnology* 27: 456-463.

Isleib TG, Holbrook CC, Gorbet DW. 2001. Use of plant introductions in peanut cultivar development. *Peanut Science* 28: 96-113.

Kashkush K, Feldman M, Levy AA. 2002. Gene loss, silencing and activation in a newly synthesized wheat allotetraploid. *Genetics.* 160:1651-1659.

Kashkush K, Feldman M, Levy AA. 2003a. Transcriptional activation of retrotransposons alters the expression of adjacent genes in wheat. *Nat Genet* 33:102-106.

Kashkush K, Feldman M, Levy AA. 2003b. Transcriptional activation of retrotransposons alters the expression of adjacent genes in wheat. *Nat Genet* 33:102-106.

Kidwell MG e Lisch DR. 1997. Transposable elements as source of variation in animals and plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:7704-7711.

Knauff DA, Moore KM, Gorbet DW. 1993. Further Studies On The Inheritance Of Fatty Acid Composition In Peanut1. *Peanut Science* 20:74-76.

Kochert G, Halward T, Branch WD, Simpson CE. 1991. RFLP variability in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and wild species. *Theoretical and Applied Genetics* 81:565-570.

Kochert G, Stalker HT, Gimenes M, Galgaro L, Lopes CR, Moore K. 1996. RFLP and cytogenetic evidence on the origin and evolution of allotetraploid domesticated peanut, *Arachis hypogaea* (Leguminosae). *American Journal of Botany* 83:1282–1291.

Kolano B, Bednara E, Weiss-Schneeweiss H. 2013. Isolation and characterization of reverse TRfragments of LTR retrotransposons from the genome of *Chenopodium quinoa* (Amaranthaceae). *Plant Cell Rep* 32:1575-1588.

- Kovarik, A.; Renny-Byfield, S.; Grandbastien, MA.; Leitch, A. 2012. Evolutionary implications of genome and karyotype restructuring in *Nicotiana tabacum* L. In: Soltis, PS.; Soltis, DE., editors. Polyploidy and Genome Evolution. Springer; Heidelberg: p. 209-224.
- Krapovickas A e Gregory WC. 1994. Taxonomía del género *Arachis* (Leguminosae). *Bonplandia* 8:1-186.
- Książczyk T, Kovarik A, Eber F, Huteau V, Khaitova L, Tesarikova Z, Coriton O, Chèvre AM. 2011. Immediate unidirectional epigenetic reprogramming of NORs occurs independently of rDNA rearrangements in synthetic and natural forms of a polyploid species *Brassica napus*. *Chromosoma* 120: 557-71.
- Kumar A e Bennetzen JL. 1999. Plant retrotransposons. *Annu Rev Genet* 33:479-532.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 409:860-921.
- Lavia GI. 1998. Karyotypes of *Arachis palustris* and *A. praecox* (Section *Arachis*), two species with basic chromosome number  $x=9$ . *Cytologia* 63:177-181.
- Lavia GI. 1999. Caracterización cromosómica del germoplasma de maní. PhD Thesis, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba.
- Lavin M, Pennington RT, Klitgaard BB, Sprent JI, deLima HC, Gasson PE. 2001. The dalbergioid legumes (Fabaceae): Delimitation of a pantropical monophyletic clade. *American Journal of Botany* 88:503-533.
- Leal-Bertioli SCM, Shirasawa K, Abernathy B, Moretzsohn M, Chavarro C, Clevenger J, Ozias-Akins P, Jackson S, Bertioli. 2015. Tetrasomic Recombination Is Surprisingly Frequent in Allotetraploid *Arachis*. *Genetics*: 199, 1093-1105.
- Lewis G, Schrire B, Muackinder B, Lock M. 2005. *Legumes of the World*. Kew: Royal Botanic Gardens.
- Lin R, Ding L, Casola C, Ripoll DR, Feschotte C, Wang H. 2007. Transposase-derived transcription factors regulate light signaling in *Arabidopsis*. *Science* 318:1302-1305. Erratum in: *Science* 318:1866.
- Liu SH, Wang KB, Song GL, Wang CY, Liu F, Li SH, Zhang XD e Wang YH. 2005. Primary investigation on GISH-NOR in cotton. *Chinese Science Bulletin* 50: 425-429.
- Lisch D e Bennetzen JL. 2011. Transposable element origins of epigenetic gene regulation. *Curr Opin Plant Biol* 14:156-161.
- Loureiro J, Rodriguez E, Doležel J, Santos C. 2007. Two New Nuclear Isolation Buffers for Plant DNA Flow Cytometry: A Test with 37 Species. *Annals of Botany* 100: 875–888.
- Loyd A e Bomblies K. 2016. Meiosis in autopolyploid and allopolyploid *Arabidopsis*. *Plant Biology* 30:116-122.

- Ma XF e Gustafson JP. 2005. Genome evolution of allopolyploids: a process of cytological and genetic diploidization. *Cytogenetic and genome research* 109: 236-49.
- Macas J, Neumann P, Navrátilová A. 2007. Repetitive DNA in the pea (*Pisum sativum* L.) genome: comprehensive characterization using 454 sequencing and comparison to soybean and *Medicago truncatula*. *BMC Genomics* 8:427.
- Madlung A. 2013. Polyploidy and its effect on evolutionary success: old questions revisited with new tools. *Heredity* 110:99-104.
- Malinska H, Tate JA, Matyasek R, Leitch AR, Soltis DE, Soltis PS, Kovarik A. 2010. Similar patterns of rDNA evolution in synthetic and recently formed natural populations of *Tragopogon* (Asteraceae) allotetraploids. *BMC Evolutionary Biology* 10:291.
- Mandakova T e Lysak MA. 2016. Chromosome Preparation for Cytogenetic Analyses in *Arabidopsis*. *Protocols in Plant Biology* 1: 43-51.
- Martins R e Perez LH. 2006. Amendoim: inovação tecnológica e substituição das importações, Brasil, 1996-2005. *Informações Econômicas*. Instituto de Economia Agrícola 36:7-19.
- McClintock B. 1950. The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proc Natl Acad Sci USA* 36:344-355.
- McClintock. 1952. Chromosome organization and gene expression. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 16: 13-47.
- McClintock B. 1984. The significance of responses of the genome to challenge. *Science* 226: 792-801.
- Meyers BC, Tingey SV, Morgante M. 2001. Abundance, distribution, and transcriptional activity of repetitive elements in the maize genome. *Genome Res* 11:1660-1676.
- Moretzsohn MC, Hopkins MS, Mitchell SE, Kresovich S, Valls JFM, Ferreira ME. 2004. Genetic diversity of peanut (*Arachis hypogaea* L.) and its wild relatives based on the analysis of hypervariable regions of the genome. *BMC Plant Biol* 4:11.
- Moretzsohn M, Barbosa A, Alves-Freitas D, Teixeira C, Leal-Bertioli S, Guimaraes P, Pereira R, Lopes C, Cavallari M, Valls J, Bertioli D, Gimenes M. 2009. A linkage map for the B-genome of *Arachis* (Fabaceae) and its synteny to the A-genome. *BMC Plant Biol* 9:40.
- Moretzsohn MC, Gouvea EG, Inglis PW, Leal-Bertioli SCM, Valls JFM, Bertioli DJ. 2013. 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* 111:113-126.
- Natali L, Santini S, Giordani T, Minelli S, Maestrini P, Cionini PG, Cavallini A. 2006. Distribution of Ty3-gypsy and Ty1-copia-like DNA sequences in the genus *Helianthus* and other Asteraceae. *Genome*. 49:64-72.

- Navashin N. 1934. Chromosome Alterations Caused by Hybridization and Their Bearing upon Certain General Genetic Problems. *Cytologia* 5: 169-203.
- Nielen S, Campos-Fonseca F, Leal-Bertioli S, Guimarães P, Seijo G, Town C, Arrial R, Bertioli D. 2010. FIDEL - a retrovirus-like retrotransposon and its distinct evolutionary histories in the A- and B-genome components of cultivated peanut. *Chromosome Research* 18:227-46.
- Nielen S, Vidigal BS, Leal-Bertioli SCM, Ratnaparkhe M, Paterson AH, Garsmeur O, AD'Hont, Guimarães PM, Bertioli DJ. 2011. Matita, a new retroelement from peanut: characterization and evolutionary context in the light of the *Arachis* A–B genome divergence. *Molecular Genetics and Genomics* 287: 21–38.
- Nielen S, Vidigal BS, Leal-Bertioli SCM, Ratnaparkhe M, Paterson AH, Garsmeur O, D'Hont A, Guimarães PM, Bertioli DJ. 2012. Matita, a new retroelement from peanut: characterization and evolutionary context in the light of the *Arachis* A–B genome divergence. *Mol Genet Genomics* 287:21-38.
- Orgel LE e Crick FH. 1980. Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature* 284:604-607.
- Ozkan H, Tuna M, Arumuganathan K. 2003. Nonadditive changes in genome size during allopolyploidization in the wheat (*Aegilops-Triticum*) group. *Journal of Heredity* 94: 260-264
- Park M, Park J, Kim S, Kwon JK, Park HM, Bae IH, Yang TJ, Lee YH, Kang BC, Choi D. 2012. Evolution of the large genome in *Capsicum annuum* occurred through accumulation of single-type long terminal repeat retrotransposons and their derivatives. *Plant J* 69:1018-1029.
- Patel M, Jung S, Moore K, Powell G, Ainsworth C, Abbott A. 2004. High-oleate peanut mutants result from a MITE insertion into the *FAD2* gene. *Theoretical and Applied Genetics* 108:1492-1502.
- Peanutbase. 2016. Acessado em 12 de abril de 2016. Disponível em [www.peanutbase.org](http://www.peanutbase.org).
- Pearce SR, Pich U, Harrison G, Flavell AJ, Heslop-Harrison JS, Schubert I, Kumar A. 1996. The Ty1-copia group retrotransposons of *Allium cepa* are distributed throughout the chromosomes but are enriched in the terminal heterochromatin. *Chromosome Res* 4:357-364.
- Pedrosa A, Sandal N, Stougaard J, Schweizer D, Bachmair A. 2002. Chromosomal Map of the Model Legume *Lotus japonicus*. *Genetics* 161: 1661–1672.
- Penãloza APS e Valls JFM. 1997. Contagem do número cromossômico em acessos de *Arachis decora* (Leguminosae). In: Veiga RFA, Bovi MLA, Betti JA, Voltan RBQ (eds) Simpósio Latino-Americano de Recursos Genéticos Vegetais, vol. 1 Campinas. Programas e Resumos. Campinas: IAC/Embrapa-Cenargen, p. 39.
- Peñaloza APS. 2000. Citogenética das espécies silvestres do gênero *Arachis* (Leguminosae). In: Cavalcanti TB, Walter BMT, Pereira da Silva G, Ramos AE, Ribeiro JF, Silva MC, Alves

RNB and Dias TAB (eds). Tópicos Atuais em Botânica: Palestras Convidadas do 51º Congresso Nacional de Botânica. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/Sociedade Botânica do Brasil, Brasília, pp 45-49.

Penãoza APS e Valls JFM. 2005. Chromosome number and satellited chromosome morphology of eleven species of *Arachis* (Leguminosae). *Bonplandia* 14: 65–72.

Peterson-Burch BD, Nettleton D e Voytas DF. 2004. Genomic neighborhoods for *Arabidopsis* retrotransposons: a role for targeted integration in the distribution of the Metaviridae. *Genome Biol.* 5: 5-10.

Preuss SB, Costa-Nunes P, Tucker S, Pontes O, Lawrencw RJ, Mosher R, Kasschau KD, Carrington JS, Baulcombe DC, Viegas W, Pikaard CS. 2008. Multimegabase silencing in nucleolar dominance involves siRNA-directed DNA 658 methylation and specific methylcytosine-binding proteins. *Mol Cell* 32: 673-684.

Raina, S. N. and Y. Mukai. 1999. Genomic *in situ* hybridization in *Arachis* (Fabaceae) identifies the diploid wild progenitors of cultivated (*A. hypogaea*) and related wild (*A. monticola*) peanut species. *Plant Systematics and Evolution* 214 (1): 251-262

Ramsey J e Schemske DW. 1998. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annu Rev Ecol Syst* 29:467-501.

Renny-Byfield S, Chester M, Kovarik A, Comber, SCL, Grandbastien MA, Deloger M, Nichols RA, Macas J, Novák P, Chase MW, Leitch AR. 2011. Next Generation Sequencing Reveals Genome Downsizing in Allotetraploid *Nicotiana tabacum*, Predominantly through the Elimination of Paternally Derived Repetitive DNAs. *Mol. Biol. Evol.* 28:2843-2854.

Robledo G e Seijo G. 2008. Characterization of the *Arachis* (Leguminosae) D genome using fluorescence *in situ* hybridization (FISH) chromosome markers and total genome DNA hybridization. *Genetics and Molecular Biology* 31:717-724.

Robledo G, Lavia GI, Seijo G. 2009. Species relations among wild *Arachis* species with the A genome as revealed by FISH mapping of rDNA loci and heterochromatin detection. *Theoretical and Applied Genetics* 118:1295-1307.

Robledo G e Seijo G. 2010. Species relationships among the wild B genome of *Arachis* species (section *Arachis*) based on FISH mapping of rDNA loci and heterochromatin detection: a new proposal for genome arrangement. *Theoretical and Applied Genetics* 121:1033-1046.

Royal Botanic Gardens, Kew: Plant DNA C-values database. 2016. Acessado em 10 de maio de 2016. Disponível em [kew.org/cvalues/](http://kew.org/cvalues/).

Sabot F e Schulman AH. 2006. Parasitism and the retrotransposon life cycle in plants: a hitchhiker's guide to the genome. *Heredity* 97:381-388.

Salina EA, Numerova OM, Ozkan H, Feldman M. Genome. 2004. Alterations in subtelomeric tandem repeats during early stages of allopolyploidy in wheat. *National Research Canada* 47: 860-7.

- Samoluk SS, Robledo G, Podio M, Chalup L, Ortiz JPA, Pessino SC, Seijo JG. 2015. First insight into divergence, representation and chromosome distribution of reverse transcriptase fragments from L1 retrotransposons in peanut and wild relative species. *Genetica*. DOI 10.1007/s10709-015-9820-y
- SanMiguel P e Bennetzen JL. 1998. Evidence that a Recent Increase in Maize Genome Size was Caused by the Massive Amplification of Intergene Retrotransposons. *Annals of Botany* 82 (SupplementA): 37-44.
- Santos RC, Freire RMM, Lima LM. O agronegócio do amendoim no Brasil. 2. ed. rev. e ampl. Brasília: Embrapa, 2013.
- Schmidt T e Heslop Harrison JS. 1998. Genomes, genes and junk: the large scale organization of plant chromosomes. *Trends Plant Sci* 3:195-199.
- Schulman AH. 2013. Retrotransposon replication in plants. *Curr Opin Virol* 3:604-614.
- Schwarzacher T e Heslop-Harrison, JS (2000). Practical *in situ* Hybridization. Oxford, UK: Bios.
- Schweizer D e Ambros PF. 1994. Chromosome banding. In: *Methods in Molecular Biology*. Gosden JR, Humana Press, Totowa 97-112.
- Seijo JG, Lavia GI, Fernandez A, Krapovickas A, Ducasse D, Moscone AA. 2004. Physical mapping of 5S and 18S-25S rRNA genes as evidence that *Arachis duranensis* and *A. ipaensis* are the wild diploid progenitors of *A. hypogaea* (Leguminosae). *American Journal of Botany* 91: 1294–1303.
- Seijo JG, Lavia GI, Fernández A, Krapovickas A, Ducasse DA, Bertioli DJ, Moscone EA. 2007. Genomic relationships between the cultivated peanut (*Arachis hypogaea*, Leguminosae) and its close relatives revealed by double GISH. *Am J Bot.* 94:1963-1971.
- Shaked H, Kashkush K, Ozkan H, Feldman M e Levy AA. 2001. Sequence elimination and cytosine methylation are rapid and reproducible responses of the genome to wide hybridization and allopolyploidy in wheat. *Plant Cell* 13: 1749-1759.
- Shcherban AB, Sergeeva EM, Badaeva ED, Salina EA. 2008. Analysis of 5S rDNA changes in synthetic allopolyploids *Triticum x Aegilops*. *Molecular Biology*, 42: 536-542.
- Shirasawa K, Hirakawa H, Tabata S, Hasegawa M, Kiyoshima H, Suzuki S, Sasamoto S, Watanabe A, Fujishiro T, Isobe S. 2012. Characterization of active miniature inverted-repeat transposable elements in the peanut genome. *Theor Appl Genet* 124:1429-1438.
- Shirasawa H, Bertioli DJ, Varshney RK, Moretzsohn MC, Leal-Bertioli SC, Thudi M, Pandey MK, Rami JF, Foncéca D, Gowda MV, Qin H, Guo B, Hong Y, Liang X, Hirakawa H, Tabata S, Isobe S. 2013. Integrated consensus map of cultivated peanut and wild relatives reveals structures of the A and B genomes of *Arachis* and divergences with other legume genomes. *DNA Research* 20:173-184.

- Silvestri MC, Ortiz AM, Lavia GI. 2015. rDNA loci and heterochromatin positions support a distinct genome type for 'x = 9 species' of section *Arachis* (*Arachis*, Leguminosae). *Plant Syst Evol* 301: 555-562.
- Simpson CE, Starr JL, Nelson SC, Woodard KE, Smith OD. 1993. Registration of TxAG6 and TxAG7 peanut germplasm. *Crop Science* 33: 1418.
- Simpson CE, Krapovickas A, Valls, JFM. 2001. History of *Arachis*, including evidence of *A. hypogaea* L. Progenitors. *Peanut Science* 28:78-80.
- Singh AK e Moss JP. 1982. Utilization of wild relatives in genetic improvement of *Arachis hypogaea* L. Part 2. Chromosome complements of species in the section *Arachis*. *Theoretical and Applied Genetics* 61:305-314.
- Singh AK. 1986. Utilization of wild relatives in the genetic improvement of *Arachis hypogaea* L. Part 8. Synthetic amphidiploids and their importance in interspecific breeding. *Theor Appl Genet* 72:433-439.
- Singh KP, Raina SN, Singh AK. 1996. Variation in chromosomal DNA associated with the evolution of *Arachis* species. *Genome* 39:890-7.
- Smartt J, Gregory WC, Gregory MP. 1978. The genomes of *Arachis hypogaea* L.: Cytogenetic studies of putative genome donors. *Euphytica* 27:665-675.
- Smartt J e Stalker HT. 1982. Speciation and cytogenetics in *Arachis*. In: Pattee HE e Young CT (eds). *Peanut Science and Technology*. Yoakum, TX: American Peanut Research and Education Society pp. 21-49.
- Smartt J. 1990. The groundnut, *Arachis hypogaea* L. In: Smartt J (ed). *Grain legumes: evolution and genetic resources*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, pp. 30-84.
- Smyth DR. 1993. Plant Retrotransposons. In: Verna P (ed.). *Control of Gene Expression* CRC Press. New York.
- Snowdon RJ, KoÈhler W, KoÈhler A. 1997. Chromosomal localization and characterization of rDNA loci in the *Brassica* A and C genomes. *Genome* 40: 582-587.
- Soltis PS e Soltis DE. 2000. The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:7051-7057.
- Soltis DE, Misra BB, Shan S, Chen S and Soltis PS. 2016. Polyploidy and the proteome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* 1864: 896-907.
- Song K, Tang K, Osborn T. 1993. Development of synthetic *Brassica* amphidiploids by reciprocal hybridization and comparison to natural amphidiploids. *Theoretical and Applied Genetics* 86: 811-821.
- Song Q e Chen ZJ. 2015. Epigenetic and developmental regulation in plant polyploids. *Plant Biology* 24: 101-109.

Stalker HT. 1991. A new species in section *Arachis* of peanuts with a D genome. *American Journal of Botany* 78: 630–637.

Stalker HT e Simpson CE. 1995. Germplasm resources in *Arachis*. In: Pattee HE e Stalker HT. (Eds). *Advances in Peanut Science*, APRES, Stillwater, OK. Cap. 2, pp 14-53.

Subramanian V, Gurtu S, Nageswara Rao RC, Nigam SN. 2000. Identification of DNA polymorphism in cultivated groundnut using random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. *Genome* 43:656-660.

Sumner AT. 1990. Chromosome Banding. *Unwin Hyman* 155 – 186.

Sun HY, Dai HY, Zhao GL, Ma Y, Ou CQ, Li H, Li LG, Zhang ZH. 2008. Genome- wide characterization of long terminal Repeat-retrotransposons in apple reveals the differences in heterogeneity and copy number between *Ty1-copia* and *Ty3-gypsy* retrotransposons. *J Integr Plant Biol.* 50:1130-1139.

Temsch EM e Greilhuber J. 2000. Genome size variation in *Arachis hypogaea* and *A. monticola* re-evaluated. *Genome* 43:449-51.

Temsch EM e Greilhuber J. 2001. Genome size in *Arachis duranensis*: a critical study. *Genome* 44:826-30.

This P, Lacombe T, Cadle-Davidson M, Owens CL. 2007. Wine grape (*Vitis vinifera* L.) color associates with allelic variation in the domestication gene *VvmybA1*. *Theor Appl Genet* 114:723–730.

USDA-FAS. 2016a. Table 13: Peanut Area, Yield, and Production. Acessado em 02 de março de 2016, disponível em USDA - United States Department of Agriculture/FAZ - Foreign Agricultural Service:

USDA-FAS. 2016b. Table 01: Major Oilseeds: World Supply and Distribution (Commodity View). Acessado em 02 de março de 2016, disponível em USDA - United States Department of. Service: <http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/oilseeds.pdf>.

Valls JFM e Simpson CE. 2005. New species of *Arachis* from Brazil, Paraguay, and Bolivia. *Bonplandia* 14:35-64.

Valls JFM, Costa LC, Custodio AR. 2013. A novel trifoliolate species of *Arachis* (Fabaceae) and further comments on the taxonomic section *Trirectoides*. *Bonplandia* 22 (1): 91-97.

Varshney RK, Bertoli DJ, Moretzsohn MC, Vadez V, Krishnamurthy L, Aruna R, Nigam SN, Moss BJ, Seetha K, Ravi K, He G, Knapp SJ, Hoisington DA. 2009. The first SSR- based genetic linkage map for cultivated groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Theor Appl Genet* 118:729-739.

Vendramin E, Pea G, Dondini L, Pacheco I, Dettoni MT, Gazza L, Scalabrin S, Strozzi F, Tartarini S, Bassi D, Verde I, Rossini L. 2014. A unique mutation in a MYB gene cosegregates with the nectarine phenotype in peach. *PLoS ONE* 9:e90574.

- Vidigal BS. Estudo dos genomas A e B de *Arachis*. 2014. Tese de doutorado. Pós-Graduação em Biologia Molecular. Universidade de Brasília.
- Waminal NE, Kim N-S, Kim HH. 2011. Dual-color FISH karyotype analyses using rDNAs in three *Cucurbitaceae* species. *Genes & Genomics* 33: 521-528.
- Wanzenböck EM, Schöfer C, Schweizer D, Bachmair A. 1997. Ribosomal transcription units integrated via T-DNA transformation associate with the nucleolus and do not require upstream repeat sequences for activity in *Arabidopsis thaliana*. *The plant journal* 11: 1007–1016.
- Weihmüller E, Beltrán C, Sartor M, Espinoza F, Spampinato C ; Pessino S. 2014. Genetic response of *Paspalum plicatulum* to genome duplication. *Genetica* 142: 227-234.
- Weiss-Schneeweiss H, Blösch C, Turner B, Villaseñor JL, Stuessy TF, Schneeweiss GM. 2012. The promiscuous and the chaste: frequent allopolyploid speciation and its genomic consequences in American daisies (*Melampodium* sect. *Melampodium*; *Asteraceae*). *Evolution* 66:211-228.
- Wendel JF. 2000. Genome evolution in polyploids. *Plant Molecular Biology* 42: 225-249.
- Wessler SR. 2006. Transposable elements and the evolution of eukaryotic genomes.. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:17600-1.
- Wynne JC, Haiward T e Knauff D A. 1989. Cytogenetics and genetics of *Arachis*. *Critical reviews in plant sciences* 8: 189-220.
- Wicker T, Sabot F, Hua-Van A, Bennetzen JL, Capy P, Chalhoub B, Flavell A, Leroy P, Morgante M, Panaud O, Paux E, SanMiguel P, Schulman AH. 2007. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nat Rev Genet* 8:973-982
- Wicker T, Buchmann JP, Keller B. 2010. Patching gaps in plant genomes results in gene movement and erosion of colinearity. *Genome Res* 20:1229-1237.
- Xu Z e Wang H. 2007. LTR\_FINDER: an efficient tool for the prediction of full-length LTR retrotransposons. *Nucleic Acids Res* 35:W265-W268.
- Yao J, Dong Y, Morris B. 2001. Parthenocarpic apple fruit production conferred by transposon insertion mutations in a MADS-box transcription factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:1306–1311.
- Yoshikazu H, Matoba H, Kondo K . 2006. Physical mapping of ribosomal RNA genes in the genus *Artemisia* L. (*Asteraceae*). *Caryologia* 59: 312-318.
- Yoo MJ, Szadkowski E, Wendel JF. 2013. Homoeolog expression bias and expression level dominance in allopolyploid cotton. *Heredity* 110:171-180.
- Zhang L, Yang X, Tian L , Chen L e Yu W. 2016. Identification of peanut (*Arachis hypogaea*) chromosomes using a fluorescence *in situ* hybridization system reveals multiple

hybridization events during tetraploid peanut formation. *New Phytologist* doi: 10.1111/nph.13999.

Zozomová-Lihová J, Mandáková T, Kovariková A, Muhlhausen A, Mummenhoff K, Lysak MA, Kovarik A. 2014. When fathers are instant losers: homogenization of rDNA loci in recently formed *Cardamine × schulzii* trigenomic allopolyploid. *New Phytologist* 203:1096-1108.

