



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

Organização genômica de genótipos diploides e
alotetraploides espontâneos e induzidos de *Arachis* L.
revelada por citogenética

Eliza Fabricio de Melo Bellard do Nascimento

Orientadora: Dra. Ana Cláudia Guerra de Araújo

Brasília – DF
Fevereiro/ 2021



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

Organização genômica de genótipos diploides e
alotetraploides espontâneos e induzidos de *Arachis L.*
revelada por citogenética

Eliza Fabricio de Melo Bellard do Nascimento

Orientadora: Dra. Ana Cláudia Guerra de Araújo

Tese apresentada ao Departamento de Botânica
do Instituto de Ciências Biológicas, da
Universidade de Brasília, como requisito
parcial para obtenção do grau de doutora em
Botânica.

Brasília – DF
Fevereiro/ 2021

Tese de autoria de Eliza Fabricio de Melo Bellard do Nascimento, intitulada “Organização genômica de genótipos diploides e alotetraploides espontâneos e induzidos de *Arachis L.* revelada por citogenética”, realizada junto ao Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília 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).

Banca examinadora:

Orientadora: Dra. Ana Cláudia Guerra de Araújo
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Membro interno: Dra. Regina Célia de Oliveira
Departamento de Botânica, Universidade de Brasília - UnB.

Membro externo: Dr. José Francisco Montenegro Valls
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Membro externo: Dra. Eliana Regina Forni Martins
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP.

Suplente: Dra. Marisa Toniolo Pozzobon
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

À Deus, aos meus pais, à minha família
e à minha sobrinha, Ana Sofia, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo durante os quatro anos de doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro para execução do projeto.

A Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP/DF) pelo apoio financeiro para execução do projeto.

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pelo espaço, infraestrutura e recursos operacionais disponibilizados para execução de todo meu projeto.

A minha querida orientadora, Dra. Ana Cláudia Guerra Araújo, que me acompanhou durante esses longos anos de formação acadêmica, da graduação ao doutorado, sempre com muito carinho, incentivo e aprendizado. Obrigada por acreditar e confiar em mim! Sentirei saudades.

A Dra. Ana Cristina Miranda Brasileiro e a Dra. Patrícia Messenberg Guimarães, pelo acolhimento e carinho de sempre, pelos constantes ensinamentos, correções e sugestões e pelos momentos de descontração.

A Ana Cristina Meneses Mendes Gomes (Aninha), pelo carinho de mãe com o qual me ensinou e me ajudou durante esse caminho.

Aos membros da minha banca, pelo interesse e disposição em me ajudar na melhora do meu trabalho final.

Ao Leandro Mesquita, por sempre cuidar com tanto carinho dos nossos amendoinas nas casas de vegetação.

Aos meus queridos amigos que integram ou de alguma forma já integraram o Laboratório de Interação Planta-Praga III da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Bruna Medeiros, Andressa Martins, Andreza Vidal, Artur Fonseca, Bruna Vidigal, Lara Marques, Ana Zotta e Larissa Arrais), muitíssimo obrigada por todo apoio e ajuda emocional, operacional e experimental. Cada um de vocês me ajudou a chegar aqui.

Ao meu noivo, Danillo Rabelo, pela paciência e carinho. Te amo!

A minha família, que torceu, que se preocupou, que incentivou e que vibrou com essa conquista. Muito obrigada pela ajuda e pela compreensão nos momentos difíceis. Amo vocês.

A Deus e minha mãezinha, Nossa Senhora, por serem tão bons comigo! Obrigada por sempre estarem comigo, me fortalecendo, me guiando e me abençoando. “Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu”. Eclesiastes 3:1.

A todos que me ajudaram, me incentivaram de alguma forma e torceram por mim, de perto ou de longe, muito obrigada!

Sumário

AGRADECIMENTOS	5
RESUMO	10
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS	16
LISTA DE ABREVIATURAS	17
INTRODUÇÃO GERAL	19
REVISÃO DA LITERATURA	23
1. O amendoim (<i>Arachis hypogaea</i> L.)	23
2. Classificação taxonômica do gênero <i>Arachis</i>	25
3. A origem do amendoim	28
4. O cultivo do amendoim por índios no Parque Indígena do Xingu	30
5. A importância de espécies silvestres e alotetraploides induzidos de <i>Arachis</i>	31
6. Conteúdo genômico de <i>Arachis</i> - elementos de transposição e sequências gênicas	33
JUSTIFICATIVA	39
OBJETIVOS	41
1. Geral	41
2. Específicos	41
CAPÍTULO I	42
Amendoim cultivado por indígenas brasileiros: origem, diversidade morfológica e seleção	42
1. INTRODUÇÃO	43
2. MATERIAL E MÉTODOS	46
2.1. Local de realização dos experimentos	46
2.2. Material vegetal	46
2.3. Obtenção de cromossomos metafásicos	48
2.4. Bandamento CMA ₃ /DAPI	48
2.5. Obtenção de sondas genômicas para GISH	49
2.5.1. Extração de DNA genômico	49
2.5.2. Síntese de sondas genômicas	50
2.6. Extração e síntese de sondas de DNAr para FISH	50
2.7. Incorporação de nucleotídeos marcados - <i>Dot blot</i>	50
2.8. Hibridização <i>in situ</i> - FISH e GISH	51
2.8.1. Pré-hibridização	51
2.8.2. Hibridização <i>in situ</i>	52
2.8.3. Pós-hibridização	52
2.8.4. Detecção dos sítios de hibridização	52
2.8.5. Montagem e análise das lâminas	53
3. RESULTADOS	54
3.1. Morfologia dos cromossomos	54
3.2. Bandamento de regiões heterocromáticas	54

3.3. Afinidades genômicas detectadas por GISH.....	57
3.4. Distribuição de sítios de DNAr detectados por FISH.....	59
4. DISCUSSÃO	62
CAPÍTULO II	68
Alotetraploidização induzida em <i>Arachis</i> : efeitos do choque genômico revelados por citogenética molecular.....	68
1. INTRODUÇÃO	69
2. MATERIAL E MÉTODOS	72
2.1. Material vegetal	72
2.2. Obtenção de cromossomos metafásicos.....	74
2.3. Bandamento CMA ₃ /DAPI	75
2.4. Obtenção de sondas genômicas para GISH	75
2.4.1. Extração de DNA genômico	75
2.4.2. Síntese de sondas genômicas	76
2.5. Extração e síntese de sondas de DNAr para FISH.....	76
2.6. Incorporação de nucleotídeos marcados - <i>Dot blot</i>	76
2.7. Hibridização <i>in situ</i> - FISH e GISH.....	77
3. RESULTADOS	78
3.1. Morfologia dos cromossomos.....	78
3.2. Bandamento de regiões heterocromáticas.....	78
3.3. Afinidade genômica detectada por GISH	81
3.4. Distribuição de sítios de DNAr detectados por FISH.....	84
4. DISCUSSÃO	87
CAPÍTULO III.....	91
Distribuição de sequências repetitivas (RT-LTR) e mapeamento de sequências gênicas em cromossomos de diferentes genótipos de <i>Arachis</i>	91
1. INTRODUÇÃO	92
2. MATERIAL E MÉTODOS	95
2.1. Material vegetal	95
2.2. Obtenção de cromossomos metafásicos.....	96
2.3. Obtenção de sondas de RT-LTR para FISH	96
2.3.1. Seleção de RT-LTR	96
2.3.2. Amplificação por PCR da transcriptase reversa dos RT-LTR.....	97
2.3.3. Síntese das sondas de RT-LTR.....	98
2.4. Obtenção de sondas a partir de sequências gênicas para FISH	98
2.4.1. Seleção de genes	98
2.4.2. Síntese de sondas a partir de sequências gênicas.....	98
2.5. Incorporação de nucleotídeos marcados - <i>Dot blot</i>	101
2.6. Hibridização <i>in situ</i>	102
3. RESULTADOS	103
3.1. Distribuição citogenética de RT-LTR.....	103
3.2. Mapeamento de sequências gênicas.....	104
3.2.1. Segmento genômico contendo o gene <i>AdEXLB8</i>	104

3.2.2. Genes NLRs.....	105
3.2.3. <i>GES</i>	106
4. DISCUSSÃO.....	108
REFERÊNCIAS.....	111

RESUMO

O amendoim cultivado (*Arachis hypogaea*) apresenta características como palatabilidade e alto valor nutritivo, que o tornaram fonte de alimento para diferentes culturas, como para os índios Kayabi, que habitam o Parque Indígena do Xingu, Brasil. Análises do germoplasma de *A. hypogaea* coletado nessa região apresentaram características morfológicas diferentes da variação já descrita para a espécie amplamente cultivada no mundo, levantando questionamentos sobre a possível contribuição de outras espécies em sua origem. Buscando compreender as razões para essas diferenças, alguns acessos coletados no Parque Indígena do Xingu e seus arredores foram citogeneticamente analisados e comparados com o amendoim cultivado e *A. monticola*. Os resultados mostraram que seus cariótipos são muito similares entre si, a *A. hypogaea* e *A. monticola*, sugerindo que a diversidade morfológica dentro desses acessos não está associada a uma origem diferente e, portanto, pode ser atribuída à plasticidade morfológica associada à seleção conduzida pelos indígenas. O amendoim é uma espécie alotetraploide, o que dificulta o avanço dos programas de melhoramento. Para superar a limitação de compatibilidade interespecíes por diferença de ploidia, uma estratégia consiste na obtenção de genótipos alotetraploides induzidos, que facilitam a transferência de alelos de interesse, além de serem fonte de estudos dos efeitos do choque genômico após a alotetraploidização. Dois alotetraploides induzidos (IpaDur1 e IpaDur2), obtidos a partir do cruzamento entre as espécies genitoras do amendoim foram citogeneticamente analisados e comparados com *A. hypogaea*, *A. monticola* e seus genitores diploides. Além desses dois alotetraploides induzidos, MagDur (*A. magna* x *A. duranensis*)^{4x} e ValSten (*A. valida* x *A. stenosperma*)^{4x} também foram analisados a fim de comprovar o sucesso da alotetraploidização induzida. Essas análises sugerem a instabilidade dos subgenomas induzidos, identificadas por alterações no número de sítios de DNA ribossômico (DNAR) 45S e recombinações entre os subgenomas A e B, como possíveis consequências da recente alotetraploidização. A citogenética molecular, além de sequências repetitivas de DNA, como de retrotransposons do tipo *Long Terminal Repeats* (RT-LTR), também permite mapear sequências gênicas por hibridização *in situ* por fluorescência (FISH). Buscando caracterizar a distribuição *in situ* de alguns RT-LTR e estabelecer o uso da citogenômica em *Arachis* com a localização de sequências gênicas, os genomas e transcritomas de espécies silvestres de *Arachis* foram explorados. Sequências gênicas responsivas a diferentes estresses foram selecionadas e utilizadas como sondas para FISH, tais como: o segmento genômico contendo a sequência de *AdEXLB8*, uma *Expansina-like* B isolada de *A. duranensis*; dois genes do tipo NLR (*Nucleotide Binding Leucine Rich Repeats*) e um gene pertencente à família das Estilbenos Sintases (*GES*). Em todos os genótipos analisados os resultados *in situ* corroboraram a localização previamente determinadas *in silico*. Pela primeira vez foram estabelecidos marcadores cromossomo-específicos a partir da sequência de dois genes, *AdEXLB8* e *GES* em *Arachis*. A partir desses experimentos, foi possível incrementar o cariótipo para espécies do gênero, contribuindo para o entendimento da estrutura e evolução desses genomas.

Palavras-chave: Alotetraploidização, amendoim, citogenômica, DNA ribossômico, instabilidade genômica, marcador cromossomo-específico, plasticidade morfológica, recombinação genômica, retrotransposons (LTR), sequências gênicas.

ABSTRACT

The cultivated peanut (*Arachis hypogaea*) has characteristics such as palatability and high nutritional value, which have made it a source of food for different cultures, such as the Kayabi Indians, who inhabit the Xingu Indigenous Park, Brazil. Analyses of the germplasm of *A. hypogaea* collected in this region showed different morphological characteristics from the variation already described for the species widely cultivated in the world, raising questions about the possible contribution of other species in its origin. In order to understand the reasons for these differences, some accessions collected in the Xingu Indigenous Park and its surroundings were cytogenetically analyzed and compared with cultivated peanut and *A. monticola*. The results showed that their karyotypes are very similar to each other, *A. hypogaea* and *A. monticola*, suggesting that the morphological diversity within these accessions is not associated with a different origin. Therefore, it can be attributed to the morphological plasticity associated with selection conducted by the indigenous. Peanut is an allotetraploid species, which makes it difficult to advance breeding programs. To overcome the interspecies compatibility limitation due to ploidy difference, a strategy consists of obtaining induced allotetraploid genotypes, which facilitate the transfer of alleles of interest, in addition to being a source of studies on the effects of genomic shock after allotetraploidization. Two induced allotetraploids (IpaDur1 and IpaDur2), obtained from the cross between the progenitor species of the peanut were cytogenetically analyzed and compared with the cultivated peanut, *A. monticola* and its diploid progenitors. In addition to these two induced allotetraploids, MagDur (*A. magna* x *A. duranensis*)^{4x} and ValSten (*A. valida* x *A. stenosperma*)^{4x} were also analyzed in order to prove the success of induced allotetraploidization. These analyses suggest the instability of the induced subgenomes, identified by changes in the number of 45S ribosomal DNA (rDNA) sites and recombination between A and B subgenomes, as possible consequences of the recent allotetraploidization. Molecular cytogenetics, in addition to repetitive DNA sequences, such as retrotransposons Long Terminal Repeats type (RT-LTR), also allows mapping gene sequences by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). In order to characterize the *in situ* distribution of some RT-LTR and establish the use of cytogenomics in *Arachis* with the location of gene sequences, the genomes and transcriptomes of wild *Arachis* species were explored. Gene sequences responsive to different stresses were selected and used as probes for FISH, such as: the genomic segment containing the *AdEXLB8* sequence, an *Expansina-like* B isolated from *A. duranensis*; two genes NLR type (Nucleotide Binding Leucine Rich Repeats) and one gene belonging to the family of the Stilbens Synthases (*GES*). In all genotypes analyzed, the results *in situ* corroborated the location previously determined *in silico*. For the first time, chromosome-specific markers were established from the sequence of two genes, *AdEXLB8* and *GES* in *Arachis*. From these experiments, it was possible to increase the karyotype for species of the genus, contributing to the understanding of the structure and evolution of these genomes.

Keywords: Allotetraploidization, chromosome-specific marker, cytogenomics, gene sequences, genomic instability, genomic recombination, morphological plasticity, peanut, retrotransposons (LTR), ribosomal DNA.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Mapa da produção mundial de amendoim por continente em 2020. Adaptado de FAOSTAT (2020). 24
- Figura 2:** Gráfico da produção de amendoim em toneladas (T) e área plantada em hectares (ha) no Brasil entre 1961 e 2018. Adaptado de FAOSTAT 2020. 25
- Figura 3:** Imagem esquemática da planta de amendoim (*A. hypogaea*) mostrando o hábito reprodutivo geocárpico, com a vagem localizada no interior do solo; sistema radicular axonomorfo ramificado; folhas quadrifolioladas; flores com corola amarela e sementes com tegumento avermelhado. Fonte: Herbário Universidade de Oxford. 28
- Figura 4:** Esquema do mapa geográfico do Brasil mostrando a localização do Parque Indígena do Xingu, localizado no estado do Mato Grosso (MT), local de coleta das sementes dos diferentes acessos de amendoins analisados. Adaptado de Freitas *et al.*, 2007. 45
- Figura 5:** Sementes das espécies analisadas e comparadas citogeneticamente mostrando as diferenças morfológicas entre elas. A) *A. hypogaea* Xingu/ Nambikwara (Of 115); B) *A. hypogaea* subsp. *hypogaea* var. *hypogaea* (Of 120); C) *A. hypogaea* tipo Xingu (Of 126); D) *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* var. *fastigiata* ‘IAC Tatu-ST’ e E) *A. monticola* (V 14165). 47
- Figura 6:** Esquema mostrando as principais etapas da hibridização *in situ* por fluorescência (FISH e GISH). 53
- Figura 7:** Cromossomos metafásicos de A) *A. hypogaea* tipo Xingu (Of 126); B) *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* var. *fastigiata* ‘IAC Tatu-ST’ e C) *A. monticola* (V 14165) após contracoloração com DAPI (branco) mostrando dez pares de cromossomos com bandas DAPI⁺, localizadas na região centromérica dos cromossomos do subgenoma A (setas vermelhas) e 10 pares sem bandas DAPI, correspondentes aos cromossomos do subgenoma B (setas verdes). A9: pequeno par A. A10: braço curto e segmento proximal do braço longo (*) e satélite (°). Barra: 5µm. 55
- Figura 8:** Cromossomos metafásicos de A/B) *A. hypogaea* tipo Xingu (Of 126); C/D) *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* var. *fastigiata* ‘IAC Tatu-ST’ e E/F) *A. monticola* (V 14165) mostrando bandas CMA₃⁺ (amarelo) nas regiões proximais dos cromossomos (setas). B, D e F) Sobreposição de imagens CMA₃⁺ (amarelo) e DAPI (azul). A10: braço curto e segmento proximal do braço longo (*) e satélite (°). Barra: 5µm. 56
- Figura 9:** Duplo GISH utilizando concomitantemente as sondas genômicas de *A. duranensis* (vermelho) e *A. ipaënsis* (verde) após contracoloração com DAPI (azul) nos cromossomos de A/B/C) *A. hypogaea* Xingu/ Nambikwara (Of 115); D/E/F) *A. hypogaea* subsp. *hypogaea* var. *hypogaea* (Of 120); G/H/I) *A. hypogaea* tipo Xingu (Of 126). C/F/I) Sobreposição de imagens após GISH com as duas sondas genômicas e contracoloração com DAPI (azul). A10: braço curto e segmento proximal do braço longo (*) e satélite (°). Barra: 5µm. 58

Figura 10: Duplo GISH utilizando concomitantemente as sondas genômicas de *A. stenosperma* (vermelho) e *A. magna* (verde) após contracoloração com DAPI (azul) nos cromossomos de A/B/C) *A. hypogaea* Xingu/ Nambikwara (Of 115); D/E/F) *A. hypogaea* subsp. *hypogaea* var. *hypogaea* (Of 120); G/H/I) *A. hypogaea* tipo Xingu (Of 126). C/F/I) Sobreposição de imagens após GISH com as duas sondas genômicas e contracoloração com DAPI (azul). A10: braço curto e segmento proximal do braço longo (*) e satélite (°). Barra: 5µm. 59

Figura 11: FISH utilizando concomitantemente as sondas de DNAr 5S (verde) e 45S (vermelho) após contracoloração com DAPI (azul). A) *A. hypogaea* tipo Xingu (Of 126); B) *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* var. *fastigiata* ‘IAC Tatu-ST’ e C) *A. monticola* (V 14165). B3 mostrando a co-localização de sítios de DNAr 5S e 45S; A10: braço curto e segmento proximal do braço longo (*) e satélite (°). Barra: 5µm. 60

Figura 12: Diagrama esquemático dos cariótipos de *A. hypogaea* tipo Xingu (Of 126); *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* var. *fastigiata* ‘IAC Tatu-ST’; *A. monticola* (V 14165); *A. duranensis* (V 14167); *A. stenosperma* (V 10309); *A. ipaënsis* (K 30076) e *A. magna* (K 30097) mostrando bandas DAPI⁺ (retângulos brancos), bandas CMA₃⁺ (elipses amarelas) e a distribuição dos sítios de DNAr 5S (elipses verdes) e 45S (elipses vermelhas). m: cromossomos metacêntricos. sm: cromossomos submetacêntricos..... 61

Figura 13: Sementes dos diferentes genótipos utilizados nas análises citogenéticas. A) IpaDur2 (*A. ipaënsis* x *A. duranensis*)^{4x}; B) IpaDur1 (*A. ipaënsis* x *A. duranensis*)^{4x}; C) *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* var. *fastigiata* ‘IAC Tatu-ST’; D) *A. monticola* (V 14165); E) *A. duranensis* (V 14167); F) *A. ipaënsis* (K 30076); G) MagDur (*A. magna* x *A. duranensis*)^{4x}; H) ValSten (*A. valida* x *A. stenosperma*)^{4x}; I) *A. magna* (K 30097); J) *A. duranensis* (K 7988); K) *A. valida* (K 30011) e L) *A. stenosperma* (V 10309). 73

Figura 14: Cromossomos metafásicos de A) IpaDur2 (*A. ipaënsis* x *A. duranensis*)^{4x}; B) IpaDur1 (*A. ipaënsis* x *A. duranensis*)^{4x}; C) *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* var. *fastigiata* ‘IAC Tatu-ST’; D) *A. monticola* (V 14165); E) MagDur (*A. magna* x *A. duranensis*)^{4x} e F) ValSten (*A. valida* x *A. stenosperma*)^{4x} mostrando bandas DAPI⁺ (branco) nas regiões centroméricas dos cromossomos do subgenoma A (setas vermelhas), ausentes nos cromossomos do subgenoma B (setas verdes). A9: pequeno par A. A10: braço curto e segmento proximal do braço longo (*) e satélite (°). Barra: 5µm. 80

Figura 15: Cromossomos metafásicos de A) IpaDur2 (*A. ipaënsis* x *A. duranensis*)^{4x}; B) IpaDur1 (*A. ipaënsis* x *A. duranensis*)^{4x} C) *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* var. *fastigiata* ‘IAC Tatu-ST’; D) *A. monticola* (V 14165); E) MagDur (*A. magna* x *A. duranensis*)^{4x} e F) ValSten (*A. valida* x *A. stenosperma*)^{4x} mostrando bandas CMA₃⁺ (amarelo) nas regiões proximais dos cromossomos (setas). A10: braço curto e segmento proximal do braço longo (*) e satélite (°). Barra: 5µm. 81

Figura 16: Cromossomos metafásicos de A, B, C) IpaDur2; D, E, F) IpaDur1; G, H, I) MagDur e J, K, L) ValSten, contracorados com DAPI (azul) após duplo GISH utilizando concomitantemente as sondas genômicas de seus respectivos genitores diploides: *A. duranensis* V 14167 (vermelho - A e D) e *A. ipaënsis* (verde - B e E); *A. duranensis* K 7988 (vermelho - G) e *A. magna* (verde - H) e *A. stenosperma* (vermelho - J) e *A. valida* (verde - K). C, F, I, L) Sobreposição de imagens após GISH com as duas sondas genômicas e contracoloração com DAPI (azul). A9: pequeno par A; *Inset* de B10 em

IpaDur2 (C) e IpaDur1 (F), mostrando o padrão de hibridização do tipo mosaico: bandamento intercalado das sondas genômicas de *A. duranensis* e *A. ipaënsis*. Barra: 5µm. 83

Figura 17: FISH utilizando concomitantemente as sondas de DNAr 5S (verde) e 45S (vermelho), após contracoloração com DAPI (azul). A) IpaDur2 (*A. ipaënsis* x *A. duranensis*)^{4x}; B) IpaDur1 (*A. ipaënsis* x *A. duranensis*)^{4x}; C) *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* var. *fastigiata* ‘IAC Tatu-ST’; D) *A. monticola* (V 14165); E) MagDur (*A. magna* x *A. duranensis*)^{4x} e F). ValSten (*A. valida* x *A. stenosperma*)^{4x}. A10: braço curto e segmento proximal do braço longo (*) e satélite (°). Barra: 5µm. 86

Figura 18: Diagrama esquemático dos cariótipos de IpaDur2 (*A. ipaënsis* x *A. duranensis*)^{4x}; IpaDur1 (*A. ipaënsis* x *A. duranensis*)^{4x}; MagDur (*A. magna* x *A. duranensis*)^{4x}; ValSten (*A. valida* x *A. stenosperma*)^{4x}; *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* var. *fastigiata* ‘IAC Tatu-ST’; *A. monticola* (V 14165); *A. duranensis* (V 14167/ K 7988); *A. ipaënsis* (K 30076), *A. stenosperma* (V 10309); *A. valida* (K 30011) e *A. magna* (K 30097) mostrando bandas DAPI⁺ (retângulos brancos), bandas CMA₃⁺ (elipses amarelas) e a distribuição dos sítios de DNAr 5S (elipses verdes) e 45S (elipses vermelhas). m: cromossomos metacêntricos. sm: cromossomos submetacêntricos. 87

Figura 19: Cromossomos metafásicos de A) *A. duranensis*; B) *A. ipaënsis*; C) *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* var. *fastigiata* ‘IAC Tatu-ST’ e D) IpaDur2 contracorados com DAPI (azul) após hibridização com a sonda do RT-LTR Apolo (verde) mostrando sinais difusos e pontuais, distribuídos nos cromossomos dos genomas e subgenomas A e B. Barra: 5µm. 104

Figura 20: Cromossomos metafásicos de A) *A. duranensis*; B) *A. ipaënsis*; C) *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* var. *fastigiata* ‘IAC Tatu-ST’ e D) IpaDur2 contracorados com DAPI (azul) após hibridização com a sonda do RT-LTR Mico (verde) mostrando sinais difusos e pontuais, distribuídos nos cromossomos dos genomas e subgenomas A e B. Barra: 5µm. 104

Figura 21: Cromossomos metafásicos de A) *A. duranensis*, B) *A. stenosperma*, C) *A. ipaënsis*, D) *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* var. *fastigiata* ‘IAC Tatu-ST’ e E) IpaDur2 contracorados com DAPI (azul) após hibridização com a sonda do segmento genômico que contém a sequência gênica cópia única de *AdEXLB8* (verde) localizada nos pares de cromossomos A5, para os genótipos com genoma/subgenoma A e B5 para o genoma B de *A. ipaënsis*. A5: Aradu.A05. Barra: 5µm. 105

Figura 22: Cromossomos metafásicos de A, B e C) *A. duranensis* contracorados com DAPI (azul) após hibridização concomitante com as sondas de *NLR1* (A- vermelho) e *NLR2* (B- verde). C) Sobreposição de imagens após FISH com as duas sondas NLRs e contracoloração com DAPI (azul). A1: *NLR1* (Aradu.A01); A6: *NLR2* (Aradu.A09) e A9: Aradu.A08. Barra: 5µm. 106

Figura 23: Cromossomos metafásicos de A/B) *A. duranensis* contracolorados com DAPI (azul), após hibridização com a sonda do gene pertencente à família das Estilbenos Sintases (*GES*) (verde) mostrando um único sítio de hibridização localizado em A4: Aradu.A04. Barra: 5µm. 107

Figura 24: Diagrama esquemático do cariótipo de *A. duranensis* (V 14167) mostrando bandas DAPI⁺ (retângulos brancos), bandas CMA₃⁺ (elipses amarelas), a distribuição dos sítios de DNAr 5S (elipses verdes) e DNAr 45S (elipses vermelhas) e a localização do segmento genômico contendo *AdEXLB8* e das sequências gênicas de *NLR1*, *NLR2* e *GES*. m: cromossomos metacêntricos. sm: cromossomos submetacêntricos..... 107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Espécies de *Arachis* utilizadas no estudo, estado, número de cromossomos, fórmula genômica, acesso, origem e obtenção de sementes..... 47

Tabela 2: Genótipos de *Arachis* utilizadas no estudo, estado, número de cromossomos, fórmula genômica, acesso, origem e obtenção de sementes..... 73

Tabela 3: Genótipos de *Arachis* utilizadas no estudo, estado, número de cromossomos, fórmula genômica, acesso, origem e obtenção de sementes..... 95

LISTA DE ABREVIATURAS

- CC-NB-LRR: *Coiled-coil - Nucleotide Binding Site - Leucine Rich Repeats*
- CMA₃: Cromomicina A3
- DAPI: 4', 6-diamidino-2-fenilindol
- DIRS: *Dictyostelium intermediate repeat sequence*
- DNAC: DNA complementar
- DNAR: DNA ribossômico
- ETs: Elementos de transposição
- FISH: Hibridização *in situ* por fluorescência
- Gb: Gigabases
- GES: gene pertencente à família das Estilbenos Sintases
- GISH: Hibridização *in situ* genômica
- LINES: *Long interspersed nuclear elements*
- LTR: *Long Terminal Repeats*
- Meio LB: Luria-Bertani
- Milhões de toneladas: Mt
- NLR: *Nucleotide Binding Leucine Rich Repeats*
- Pb: Pares de bases
- PBS: *Primer Binding Site*
- PLEs: *Penelope-like elements*
- PPT: *Polypurine Tract*
- QTLs: *Quantitative Trait Locus*
- RGAs: *Resistance Gene Analogs*
- RH: Resposta de Hipersensibilidade
- RNAm: RNA mensageiro
- RON: Região Organizadora de Nucléolos
- RT: Retrotransposons
- SAT: cromossomo satélite
- SINES: *Short interspersed nuclear elements*
- SNPs: *Single Nucleotide Polymorphism*
- TIR: *Terminal Inverted Repeats*
- TIR-NB-LRR: *Interleucin Receptor 1- Nucleotide Binding Site - Leucine Rich Repeats*
- TR: Transcriptase reversa

TSD: *Target Site Duplication*

INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Arachis* é originário da América do Sul e composto por 82 espécies arranjadas em nove seções taxonômicas (Krapovickas e Gregory 1994; Valls e Simpson 2005; Valls *et al.*, 2013; Valls e Simpson 2017). Entre elas está a seção *Arachis*, com grande relevância por apresentar o maior número de espécies do gênero, além de possuir a espécie cultivada, o amendoim (*Arachis hypogaea* L.) e seus genitores silvestres, *A. duranensis* Krapov. & W.C. Greg. e *A. ipaënsis* Krapov. & W.C. Greg. (Stalker 1991; Simpson *et al.*, 2001; Seijo *et al.*, 2004, 2007).

A maioria das espécies da seção *Arachis* são diploides, com 20 cromossomos ($2n = 2x = 20$), enquanto *A. hypogaea*, juntamente com *A. monticola* Krapov. & Rigoni são tetraploides ($2n = 2x = 40$) (Krapovickas e Gregory 1994; Seijo *et al.*, 2004), com dois genomas distintos em seu núcleo: o subgenoma A, herdado de *A. duranensis* e o subgenoma B, herdado de *A. ipaënsis* (Seijo *et al.*, 2004; Robledo *et al.*, 2009; Robledo e Seijo 2010; Nascimento *et al.*, 2018).

Características específicas como palatabilidade, alto valor nutritivo e o fato de poder ser consumido *in natura* (Santos *et al.*, 2013) tornaram o amendoim fonte de alimento desde épocas pré-históricas (Bonavia 1982; Hammons 1994), até os dias atuais, em diferentes regiões do mundo e por diferentes culturas (Freitas *et al.*, 2003a). Um exemplo são os índios Kayabi, que habitam o Parque Indígena do Xingu, situado no estado de Mato Grosso, Brasil (Novaes 1985) e apresentam um complexo sistema de agricultura, onde o amendoim é uma das principais fontes de alimento (Freitas *et al.*, 2007; Silva 2009).

Durante as análises do germoplasma de *A. hypogaea* coletado no Parque Indígena do Xingu e seus arredores (Freitas e Valls 2001) foram observadas características morfológicas diferentes da variação já descrita para a espécie cultivada, levantando questionamentos sobre a possível contribuição de outras espécies diploides na formação do seu genoma, tais como *A. stenosperma* Krapov. & W.C. Greg. e *A. magna* Krapov., W.C. Greg. & C.E. Simpson, que apresentam semelhanças morfológicas com alguns acessos cultivados pelos indígenas (Freitas *et al.*, 2003a; Suassuna *et al.*, 2016).

Buscando compreender melhor as possíveis razões dessas diferenças morfológicas evidentes e exclusivas dos acessos de *A. hypogaea* cultivados pelos indígenas, alguns desses acessos oriundos do Parque Indígena do Xingu foram

citogeneticamente caracterizados e os padrões obtidos foram comparados com os padrões observados no amendoim cultivado e *A. monticola*. Essa foi a primeira investigação citogenética realizada em acessos indígenas de amendoim, cujas análises estão apresentadas no capítulo 1.

O amendoim apresenta baixo polimorfismo genético e menor variabilidade de características quando comparado às espécies silvestres próximas (Kochert *et al.*, 1991, 1996; Stalker 1995; Subramanian *et al.*, 2000; Gimenes *et al.*, 2002; Herselman 2003; Moretzsohn *et al.*, 2004; Varshney *et al.*, 2009; Bertioli *et al.*, 2016, 2019), que, adicionado ao fato de ser uma espécie tetraploide, com um genoma grande e complexo, dificulta o avanço mais expressivo dos programas de melhoramento. Uma importante estratégia que auxilia esses programas, consiste na obtenção e uso de plantas alotetraploides induzidas, obtidas a partir de espécies diploides silvestres, que servem como pontes para hibridação com o amendoim, facilitando a potencial transferência de alelos variados e de interesse, superando a limitação de compatibilidade interespecies por diferença de ploidia (Fávero *et al.*, 2006, 2015; Foncèka *et al.*, 2009; Leal-Bertioli *et al.*, 2015, Stalker 2017).

Entre diversos genótipos alotetraploides induzidos de *Arachis*, IpaDur1 (genoma BA), oriundo da hibridação entre *A. ipaënsis* (genoma B) e *A. duranensis* (genoma A) (Fávero *et al.*, 2006) foi citogeneticamente caracterizado e comparado com o amendoim cultivado (genoma AB) e seus genitores diploides, revelando a instabilidade dos subgenomas induzidos, possivelmente como consequência dos efeitos da hibridação/tetraploidização (Nascimento *et al.*, 2018). Uma nova caracterização citogenética utilizando IpaDur2 (artigo submetido para publicação), outro alotetraploide induzido com o mesmo *background* genômico de IpaDur1 (*A. ipaënsis* x *A. duranensis*)^{4x}, entretanto com análises abrangendo um maior número de gerações foi realizada com o objetivo de decifrar possíveis efeitos da alotetraploidização em diferentes gerações e ainda inferir sobre processos de evolução. Além disso, visando comprovar o sucesso da alotetraploidização induzida e analisar citogeneticamente os cromossomos dos seus subgenomas, foram avaliados outros dois alotetraploides induzidos: MagDur (*A. magna* K 30097 x *A. duranensis* K 7988)^{4x} e ValSten (*A. valida* K 30011 x *A. stenoperma* V10309)^{4x} (Gao *et al.* 2021), aqui apresentados no capítulo 2.

Na maioria das plantas, bem como em outros organismos eucariotos complexos, o genoma é composto principalmente por sequências repetitivas de DNA (Schmidt e Heslop-Harrison 1998). Majoritariamente, essas sequências correspondem a elementos de transposição (ETs) (Schulman 2013), onde se enquadram os retrotransposons (RT), principalmente aqueles que possuem sequências flanqueadoras do tipo *Long Terminal Repeats* (LTR), considerados os principais contribuidores das frações repetitivas dos genomas de plantas (Sanmiguel e Bennetzen 1998). Em *A. hypogaea* não é diferente, com tamanho do genoma estimado em 2,5 Gigabases (Gb) e aproximadamente 74% de sequências repetitivas, evoluiu por meio da intensa atividade desses TEs, além de deleções e recombinação homeóloga entre os subgenomas A e B (Bertioli *et al.*, 2019). O sequenciamento do genoma do amendoim e dos seus genitores diploides corroborou a alta frequência das sequências repetitivas, já que determinou tamanhos de 1,25 e 1,56 Gb contendo 61,7 e 68,5% de fração repetitiva respectivamente para *A. duranensis* e *A. ipaënsis*, além da ocorrência de diversos TEs, principalmente RTs do tipo LTR, com a maioria das famílias diferindo em frequência e abundância (Bertioli *et al.*, 2016, 2019; Nascimento *et al.*, 2018), sugerindo que os RT, principalmente os LTR, de fato apresentam papel importante ao longo da evolução, na remodelação desses genomas de *Arachis* (Nielen *et al.*, 2010, 2012; Bertioli *et al.*, 2013, 2016, 2019), aqui demonstradas via citogenética no capítulo 3.

Além do elevado conteúdo repetitivo, o genoma de organismos eucariotos é formado por DNA não-repetitivo, onde estão presentes os genes responsáveis pela codificação de proteínas (Flavell *et al.*, 1974). A citogenética molecular tem permitido mapear sequências gênicas por hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) em cromossomos de plantas, caracterizando a citogenômica (Danilova e Birchler 2008; Danilova *et al.*, 2014; Lou *et al.*, 2014). Buscando estabelecer o uso da citogenômica em *Arachis* através da localização de sequências gênicas nos genomas foram selecionadas sequências de DNA contendo genes, cuja modulação de sua expressão está associada à repostas a diferentes estresses (Guimarães *et al.*, 2017; Mota *et al.*, 2018). Esses genes incluem por exemplo, o segmento genômico contendo a sequência de *AdEXLB8*, uma *Expansina-like B* isolada de *A. duranensis* (Guimarães *et al.*, 2017), envolvida na plasticidade da parede celular (McQueen-Mason *et al.*, 1992) em resposta a múltiplos estresses bióticos e abióticos (Marowa *et al.*, 2016), dois genes do tipo NLR (*Nucleotide Binding Leucine Rich Repeats*) (Meyers *et al.*, 1999), associados à resistência ao nematoide das galhas, *Meloidogyne arenaria* (Clevenger *et al.*, 2017; Mota *et al.*, 2018)

e um gene pertencente à família das Estilbenos Sintases (*GES*), envolvido na biossíntese de Resveratrol, uma fitoalexina que também protege as plantas contra estresses bióticos e abióticos (Langcake e Pryce 1976; Sobolev *et al.*, 1995). A distribuição dessas sequências gênicas em cromossomos de diferentes genótipos de *Arachis* são demonstradas via citogenômica no capítulo 3.

Portanto, a proposta aqui apresentada visou determinar afinidades entre os genomas por hibridização *in situ* genômica (GISH); estabelecer padrões de distribuição de sequências repetitivas do tipo heterocromáticas, ribossômicas e de RT-LTR, bem como de sequências de DNA contendo genes associados à respostas a diferentes estresses em diferentes genótipos diploides e alotetraploides espontâneos e induzidos de *Arachis*.

REVISÃO DA LITERATURA

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

Entre as plantas cultivadas extensivamente no mundo, encontra-se o amendoim (*Arachis hypogaea*), uma leguminosa com propriedades nutricionais, elevado teor de vitaminas, sais, carboidratos e resveratrol, uma fitoalexina com princípios ativos que auxiliam na proteção da planta e contribuem para o bom funcionamento do sistema cardiovascular humano (Santos *et al.*, 2013). Suas sementes possuem alto valor nutritivo, compostas por 22 a 30% de proteínas, extremamente calóricas (596 calorias/100g de sementes), com até 50% de óleo, incluindo o oleico e linoleico (Knauff *et al.*, 1993; Grosso *et al.*, 1997; Sanders 2002), o que as torna um excelente suplemento proteico na produção de alimentos enriquecidos, demonstrando um grande potencial no combate à fome e desnutrição em países em desenvolvimento (Singh e Simpson 1994; Janila *et al.*, 2016). Os grãos de amendoim podem ser consumidos *in natura*, por isso são utilizados como fonte de alimento há milhões de anos, até os dias atuais, por povos de diferentes culturas (Freitas *et al.*, 2003a). Atualmente, o amendoim é cultivado nos trópicos e subtropicais e é uma cultura relevante na agricultura de subsistência em continentes como Ásia e África (Chirinos 2011).

Em termos de produção de oleaginosas, o amendoim ocupa o quarto lugar na produção mundial em milhões de toneladas (Mt), ficando atrás da soja (*Glycine max* L. Merr.; produção de 362,85 Mt/ano), canola (*Brassica napus* L.; 70,79 Mt/ano) e girassol (*Helianthus annuus* L.; 56,78 Mt/ano), com uma área plantada de 27,32 milhões de hectares e produção de 46,06 de Mt/ano na safra de 2020 (USDA-FAS 2020). A China está à frente da cadeia de produção (17,5 Mt), seguida pela Índia (5,5 Mt), Nigéria (3,9 Mt), e Estados Unidos (2,66 Mt) (Fig. 1) (USDA-FAS 2020).

O Brasil já foi um grande produtor de amendoim, porém atualmente apresenta menos de 1% da produção mundial (544,8 mil toneladas/ ano) na safra de 2019/20, com uma área plantada de 153,3 mil hectares (Conab 2020; USDA-FAS 2020). A produção do grão está concentrada principalmente nas regiões Sul e Sudeste, onde o estado de São Paulo responde por mais de 95% da produção nacional (539,1 mil toneladas/ ano) (Conab 2020), com destaque para as regiões da Alta Mogiana (Dumont, Jaboticabal, Ribeirão Preto e Sertãozinho) e Alta Paulista (Tupã e Marília). Cerca de 80% dessa produção é

destinada à exportação, enquanto o restante é destinado para as fábricas de doces (Conab 2020).

Na década de 1970, alterações no cenário agrícola brasileiro como a expansão de culturas como a soja, laranja e cana-de-açúcar, somadas a custos crescentes na produção de amendoim, associado ao baixo rendimento por área e suscetibilidade às variações climáticas, doenças e pragas resultaram na redução do cultivo nacional de amendoim (Freitas *et al.*, 2003b). Contudo, o incentivo à implementação de tecnologias agrícolas, resultando no aumento da qualidade das sementes gerou o aumento da produção em função da área plantada a partir de 2003 (Fig. 2) (FAOSTAT 2020). Entretanto, quando comparado com outros produtos agrícolas no Brasil, o amendoim não possui expressão econômica, já que grande parte da produção tem caráter de subsistência (destinada ao consumo doméstico), portanto não está incluída nas estatísticas de produção (Santos *et al.*, 2013; Conab 2020).

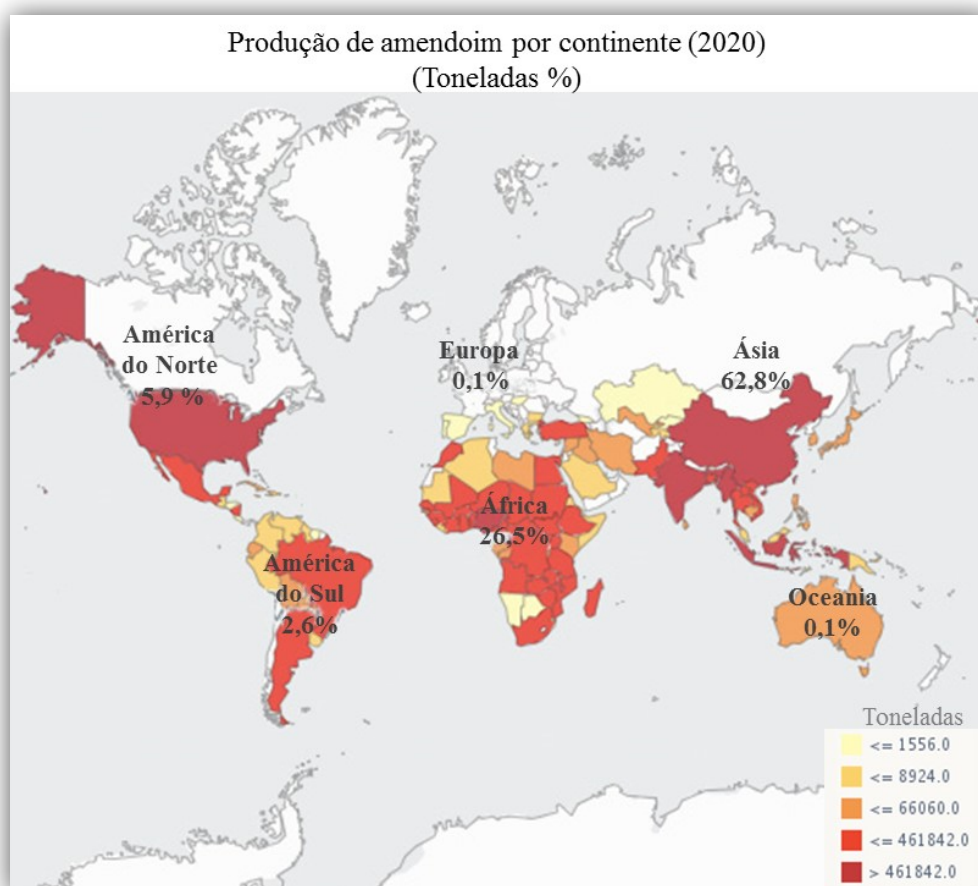


Figura 1: Mapa da produção mundial de amendoim por continente em 2020. Adaptado de FAOSTAT (2020).

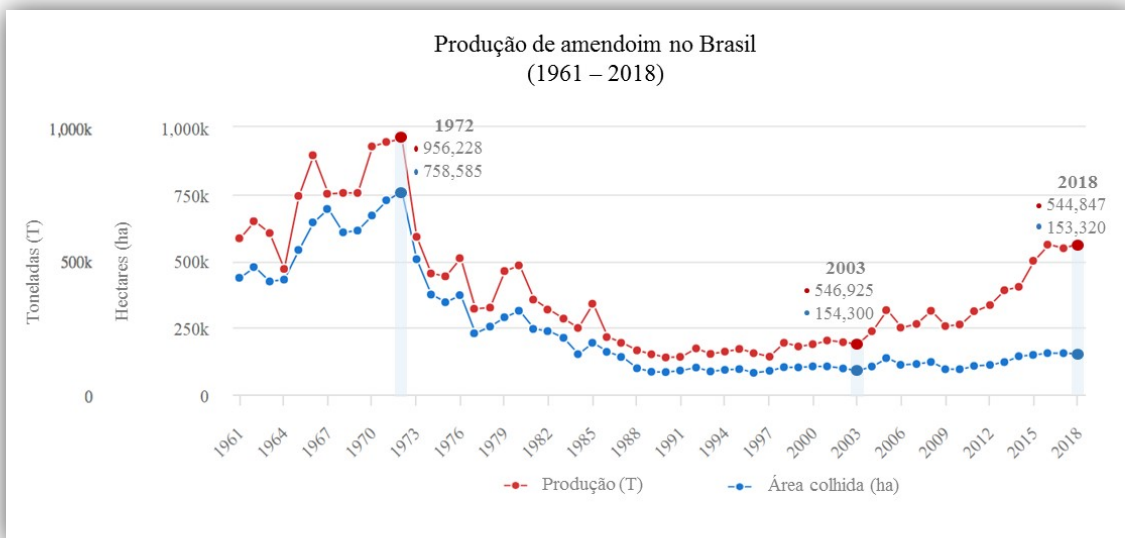


Figura 2: Gráfico da produção de amendoim em toneladas (T) e área plantada em hectares (ha) no Brasil entre 1961 e 2018. Adaptado de FAOSTAT 2020.

2. Classificação taxonômica do gênero *Arachis*

O gênero *Arachis* é objetivo de diferentes estudos devido à sua importância agrônoma, principalmente pela ampla utilização dos grãos da espécie cultivada (*A. hypogaea*) na alimentação humana. Além disso, existem espécies silvestres empregadas largamente na cobertura de solos para o controle da erosão e de ervas daninhas; forrageiras, oferecendo alimento para animais; recuperação de solos para adubação verde e ainda utilizadas como plantas ornamentais (Otero 1941; Kerridge e Handy 1994).

Originário da América do Sul, o gênero *Arachis* pertence à família Fabaceae ou Leguminosae, subfamília Papilionoideae, clado Dalbergioide e é composto por 82 espécies formalmente reconhecidas. Com base nas relações filogenéticas, similaridades morfológicas, compatibilidade de cruzamentos interespecíficos, viabilidade de pólen, número e morfologia cromossômica essas espécies são distribuídas taxonomicamente em nove seções: *Arachis*, *Caulorrhizae*, *Erectoides*, *Extranervosae*, *Heteranthae*, *Procumbentes*, *Rhizomatosae*, *Trierectoides* e *Triseminatae* (Krapovickas e Gregory 1994; Valls e Simpson 2005; Valls *et al.*, 2013; Valls e Simpson 2017). A seção *Arachis*, com 32 espécies descritas, é amplamente estudada por conter a espécie cultivada, *A. hypogaea* e seus genitores silvestres, *A. duranensis* e *A. ipaënsis* (Krapovickas e Gregory 1994; Seijo *et al.*, 2004, 2007; Bertioli *et al.*, 2019, 2020).

Devido à grande variabilidade morfológica observada em *A. hypogaea*, a espécie é classificada em duas subespécies: *hypogaea* e *fastigiata* Waldron, a primeira

classificada em duas variedades botânicas: *hypogaea* e *hirsuta* Köhler, e a subespécie *fastigiata* classificada em quatro variedades: *fastigiata*, *vulgaris* Harz, *aequatoriana* Krapov. & WC. Greg. e *peruviana* Krapov. & WC. Greg. (Krapovickas e Gregory 1994).

As espécies do gênero encontram-se naturalmente distribuídas em cinco países da América do Sul: Argentina, Bolívia, Paraguai, Uruguai e Brasil, este considerado uma grande área de diversidade genética, e importante fonte de germoplasma de algumas espécies, já que 65 ocorrem no Brasil e 48 são consideradas endêmicas de sua flora (Krapovickas e Gregory 1994; Valls e Simpson 2005; Valls *et al.*, 2013).

A primeira classificação do amendoim foi realizada por Lineu em 1753, que denominou o gênero *Arachis* (do grego “*arachos*”, que significa erva daninha) e a espécie *hypogaea* (que significa aposento subterrâneo) (Fig. 3). Krapovickas e Gregory (1994) caracterizaram as espécies do gênero como anuais, bianuais ou perenes, podendo ser eretas, decumbentes, procumbentes, rizomatozas ou estoloníferas. Apresentam sistema radicular axonomorfo, com ramificações ou nós, suas folhas são quadrifolioladas ou trifolioladas e as flores são autógamas e sésseis, em sua maioria com corola alaranjada ou amarela. Os frutos são geocárpicos, com 1 a 5 sementes, que por sua vez são lisas, com tegumento com cores variadas (Fig. 3). Uma peculiaridade existente no gênero é a geocarpia, com a presença do ginóforo (“peg”, do latim *paxillus*), uma estrutura de frutificação formada após a polinização, como consequência da expansão de um meristema intercalar localizado abaixo do ovário. Essa estrutura apresenta geotropismo positivo, originando a vagem no interior do solo (geocarpia) e abriga o embrião em sua região apical (Smith 1950).

O amendoim, juntamente com *A. monticola*, espécie considerada ancestral tetraploide silvestre de *A. hypogaea* (Kochert *et al.*, 1991; Lu e Pickersgill 1993; Grabile *et al.*, 2012; Bertioli *et al.*, 2019, Yin *et al.*, 2020) são espécies tetraploides ($2n = 4x = 40$). Contudo, a maioria das espécies do gênero, incluindo *A. duranensis* e *A. ipaënsis*, são diploides ($2n = 2x = 20$), além da existência de quatro espécies com 18 cromossomos: *A. decora* Krapov., W.C. Greg. & Valls, *A. palustris* Krapov., W.C. Greg. & Valls, *A. porphyrocalyx* Valls & C.E. Simpson e *A. praecox* Krapov., W.C. Greg. & Valls (Krapovickas e Gregory 1994; Peñaloza e Valls 1997; Lavia 1998, 1999; Peñaloza 2000; Peñaloza e Valls 2005; Valls e Simpson 2005). A espécie tetraploide (*A. hypogaea*) tornou-se isolada reprodutivamente de seus genitores silvestres, fato que levou a uma variabilidade genética reduzida, quando comparada às espécies silvestres, que apresentam maior resistência e tolerância a diferentes fatores bióticos e abióticos, características essas

de interesse para o melhoramento do amendoim (Krapovickas e Gregory 1994; Subramanian *et al.*, 2000; Valls e Simpson 2005; Fávero *et al.*, 2006, 2015; Foncèka *et al.*, 2009; Guimarães *et al.*, 2010, 2012; Morgante *et al.*, 2013; Leal-Bertioli *et al.*, 2015; Clevenger *et al.*, 2017).

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 por apresentar um pequeno par de cromossomos, chamado de par A (Husted 1936), que quando comparado aos demais cromossomos apresenta maior condensação da cromatina na região centromérica, além de apresentar bandas heterocromáticas de DNA ricas em nucleotídeos A-T, que podem ser evidenciadas em todos os seus cromossomos pelo tratamento com DAPI (4', 6-diamidino-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 identificadas com DAPI (Smartt *et al.*, 1978; Smartt e Stalker 1982; Seijo *et al.*, 2004; Robledo e Seijo 2010). Já o genoma D, descrito para *A. glandulifera* (Stalker), possui cariótipo assimétrico, sem a presença do par A, composto por cromossomos submetacêntricos e subteloacêntricos, caracterizado pela presença de apenas oito pares de cromossomos com bandas DAPI positivas (DAPI⁺) com tamanho e intensidade variáveis e localizadas principalmente nas regiões pericentroméricas (Stalker 1991; Fernández e Krapovickas 1994; Robledo e Seijo 2008).

Ainda 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* Krapov. & W.C. Greg. e *A. trinitensis* Krapov. & W.C. Greg. e genoma K: *A. batizocoi* Krapov. & W.C. Greg., *A. cruziana* Krapov., W.C. Greg. & C.E. Simpson e *A. krapovickasii* C.E. Simpson, D. E. Williams, Valls & I.G. Vargas, com bandas centroméricas DAPI⁺ na maior parte dos cromossomos, diferindo uma das outras na quantidade e distribuição da heterocromatina. Com o genoma B, permaneceram *A. ipaënsis*, *A. gregoryi* C.E. Simpson, Krapov. & Valls, *A. valida* Krapov. & W.C. Greg., *A. magna* Krapov., W.C. Greg. & C.E. Simpson e *A. williamsii* Krapov. & W.C. Greg.. Através de análises da distribuição de sequências de DNA ribossômico (DNAr) e análises da organização da heterocromatina

no genoma, Silvestri *et al.* (2015) propuseram o genoma G ($2n = 18$) para *A. decora*, *A. palustris* e *A. praecox*.



Figura 3: Imagem esquemática da planta de amendoim (*A. hypogaea*) mostrando o hábito reprodutivo geocárpico, com a vagem localizada no interior do solo; sistema radicular axonomorfo ramificado; folhas quadrifolioladas; flores com corola amarela e sementes com tegumento avermelhado. Fonte: Herbário Universidade de Oxford.

3. A origem do amendoim

Análises de diferentes coleções de germoplasma das espécies silvestres e de *A. hypogaea*, obtidas na Argentina, Paraguai, Brasil, Bolívia, Uruguai, Peru e Equador confirmaram a origem sul-americana do gênero *Arachis*, com provável centro de origem no Brasil Central, em uma região que se estende do sudoeste do Mato Grosso do Sul ao sul de Goiás (Gregory e Gregory 1976; Wynne *et al.*, 1989; Hammons 1994; Valls 2000).

O amendoim é uma espécie alotetraploide recente ($2n = 4x = 40$), com bandas heterocromáticas distinguindo dois componentes genômicos: o subgenoma A, herdado de *A. duranensis*, com bandas heterocromáticas evidenciadas com DAPI, e o genoma B, herdado de *A. ipaënsis*, que não apresenta esse padrão de bandas heterocromáticas (Seijo *et al.*, 2004; Robledo *et al.*, 2009; Robledo e Seijo 2010; Nascimento *et al.*, 2018). O cariótipo de *A. hypogaea*, determinado por Seijo *et al.*, (2004) equivale à soma dos cariótipos das espécies diploides silvestres *A. duranensis* e *A. ipaënsis*. Posteriormente, Seijo *et al.*, (2007), através da hibridização *in situ* genômica (GISH), reforçaram a hipótese da origem do amendoim, fundamentados na evidente hibridização preferencial para cada subgenoma, utilizando sondas obtidas a partir do DNA genômico de cada uma dessas espécies diploides. Além disso, Fávero *et al.*, (2006), por meio de cruzamentos entre esses diploides, produziram com sucesso um alotetraploide induzido, que após cruzamentos subsequentes entre esse novo alotetraploide e cultivares de amendoim, geraram híbridos altamente férteis.

A história do amendoim cultivado está amplamente relacionada com sua evolução e domesticação. Apesar de sua importância econômica e dos muitos estudos realizados para desvendar os caminhos evolutivos percorridos pelo amendoim (Kochert *et al.*, 1991; Seijo *et al.*, 2004, 2007; Grabiele *et al.*, 2012; Bertioli *et al.*, 2016, 2019, 2020), sua origem ainda é discutida.

Análises do genoma, somadas a estudos botânicos, geográficos e achados arqueológicos do Peru, datados com mais de 3.700 anos, indicam que o amendoim tenha surgido entre 5.000 e 10.000 anos atrás (Bonavia 1982; Hammons 1994; Krapovickas e Gregory 1994, Bertioli *et al.*, 2019, 2020). Essa hipótese é corroborada por estudos que sugerem a origem híbrida do amendoim a partir das espécies diploides silvestres *A. duranensis* e *A. ipaënsis* (Seijo *et al.*, 2004, 2007; Fávero *et al.*, 2006; Bertioli *et al.*, 2016, 2019, 2020). A hipótese de múltiplas origens para cada subespécie, provavelmente envolvendo diferentes espécies diploides foi sugerida em diferentes estudos (Singh e Moss 1982; Krapovickas e Gregory 1994; Zhang *et al.*, 2016), no entanto, devido à limitada variabilidade genética observada, a maioria dos autores sustenta a hipótese de que as seis variedades botânicas apresentam uma origem genética única (Kochert *et al.*, 1996; Raina *et al.*, 2001; Milla *et al.*, 2005; Bertioli *et al.*, 2016, 2019), a partir do cruzamento das espécies diploides *A. duranensis* e *A. ipaënsis*, que após a tetraploidização espontânea originou um alotetraploide fértil com vigor híbrido (Kochert *et al.*, 1991, 1996; Subramanian *et al.*, 2000; Gimenes *et al.*, 2002; Herselman 2003;

Moretzsohn *et al.*, 2004; Varshney *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2016; Bertioli *et al.*, 2016, 2019). Além disso, acredita-se que *A. monticola* deva ser considerado o ancestral tetraploide imediato do qual *A. hypogaea* surgiu em diferentes sistemas agroecológicos durante a domesticação e expansão da cultura (Kochert *et al.*, 1991; Lu e Pickersgill 1993; Grabiele *et al.*, 2012; Bertioli *et al.*, 2019).

4. O cultivo do amendoim por índios no Parque Indígena do Xingu

O amendoim foi selecionado por meio de diferentes processos de domesticação, que o tornou morfológicamente diferente de seus genitores diploides, com plantas mais robustas e vagens e sementes maiores (Krapovickas e Gregory 1994). A evidente variação morfológica de *A. hypogaea* é observada em cerca de 700 acessos pertencentes as duas subespécies, *hypogaea* e *fastigiata*, subdivididas em seis variedades: *hypogaea*, *hirsuta*, *fastigiata*, *vulgaris*, *aequatoriana* e *peruviana* (Krapovickas e Gregory 1994). Entretanto, há um grande grupo de acessos de amendoins encontrados nos vales dos rios Guaporé e Xingu cuja classificação pareceu ser mais complexa (Freitas e Valls 2001).

A seleção e domesticação do amendoim desde muito tempo é realizada por indígenas sul-americanos, como aqueles pertencentes à tribo Kayabi, no Parque Indígena do Xingu, situado na região nordeste do Estado de Mato Grosso, na região central do Brasil, que envolve uma área de transição entre os biomas Cerrado e Floresta Amazônica (Novaes 1985). Atualmente, essa área é considerada um importante centro de diversidade de amendoim (Freitas *et al.*, 2007), juntamente com a Cordilheira dos Andes na Bolívia e a Costa Pacífica do Equador (Krapovickas 1995). A tribo Kayabi está localizada na área leste do Parque e apresenta um complexo sistema de agricultura, que além da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), tem o amendoim como uma das principais fontes de alimento (Freitas *et al.*, 2007; Silva 2009).

Os índios Kayabi, também chamados de Kawaiwet, apresentam o Tupi como tronco linguístico e têm o costume de construir suas aldeias bem próximas a locais de plantio com um tipo de solo específico, denominado por eles de “terra preta”, com grande quantidade de matéria orgânica, rico em nutrientes e ideal para o cultivo de alimentos básicos, como o amendoim (Silva 2009; Suassuna *et al.*, 2016).

O germoplasma coletado na região do Parque e seus arredores compreendeu um grande número de acessos locais (Freitas *et al.*, 2007), hoje mantidos na Coleção de Base (Colbase) de germoplasma vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia,

Brasília-DF, Brasil. Durante a análise desse material foram observadas características morfológicas que excedem as variações já descritas para *A. hypogaea*, como na forma, tamanho, textura e cor das vagens e sementes (Freitas e Valls 2001; Suassuna *et al.*, 2016), trazendo questões a respeito da possível contribuição do genoma de outras espécies diploides, que não as mesmas do amendoim cultivado, na origem desses acessos (Freitas *et al.*, 2007).

Como o Parque Indígena do Xingu é considerado um centro de diversidade do amendoim (Freitas *et al.*, 2007), análises mais detalhadas são necessárias para incentivar estudos de filogenia, estratégicos para a conservação de germoplasma e caracterização dos acessos para agregação de valor e potencial uso em programas de melhoramento genético do amendoim.

5. A importância de espécies silvestres e alotetraploides induzidos de *Arachis*

Por meio da seleção de algumas características, tais como arquitetura da planta e formato das sementes, totalmente diferentes de seus genitores, o amendoim foi domesticado e tornou-se uma cultura relevante no mundo, com vantagens melhor adaptadas ao cultivo devido ao vigor oriundo da heterose e aumento do tamanho das células, tecidos e órgãos resultantes da tetraploidização (Hilu 1993). Consequentemente, a variabilidade morfológica do amendoim, representada pelas diferentes subespécies e variedades descritas, provavelmente decorrem da pressão seletiva em diferentes ambientes agroecológicos, que induziu deleções e recombinações genômicas entre os subgenomas A e B, que possivelmente promoveram essa plasticidade morfológica (Seijo *et al.*, 2007; Grabiele *et al.*, 2012; Bertoli *et al.*, 2019).

A menor variabilidade genética do amendoim e a diferença de ploidia com as espécies silvestres são barreiras que dificultam o avanço mais acelerado e eficiente dos programas de melhoramento genético do amendoim. Por outro lado, as espécies silvestres de *Arachis*, selecionadas naturalmente ao longo da evolução, em ambientes diversos e sob estresses bióticos e abióticos distintos, constituem uma ampla fonte de diversidade alélica que pode ser utilizada de diferentes formas para a incorporação de características desejáveis ao amendoim (Simpson *et al.*, 1993; Leal-Bertoli *et al.*, 2015).

O amendoim cultivado apresenta suscetibilidade a diferentes estresses bióticos e abióticos, o que reflete negativamente em sua produção. Com isso, diversos trabalhos têm

concentrado seus esforços no germoplasma silvestre de *Arachis*, especialmente das espécies diploides portadoras dos genomas A e B, a fim de identificar novas fontes de alelos de resistência para introgressão no amendoim cultivado (Stalker *et al.*, 2013, 2017). Como detectado em *A. duranensis* com genes que conferem resistência a seca (Guimarães *et al.*, 2012, 2017; Brasileiro *et al.*, 2015), em *A. magna*, resistente à mancha castanha (*Cercospora arachidicola*), mancha preta (*Cercosporidium personatum*) e ferrugem (*Puccinia arachidis*) (Fávero *et al.*, 2009, 2015), e em *A. stenosperma*, resistente ao nematoide das galhas (*M. arenaria*) (Proite *et al.*, 2008; Guimarães *et al.*, 2010; Morgante *et al.*, 2013; Clevenger *et al.*, 2017; Mota *et al.*, 2018).

Plantas alotetraploides induzidas obtidas a partir da hibridação entre duas espécies silvestres diploides, seguida da tetraploidização com o uso de colchicina (Simpson 2001; Fávero *et al.*, 2006, 2015; Leal-Bertioli *et al.*, 2015) são utilizadas como pontes em cruzamentos com cultivares de amendoim visando à transferência de alelos de interesse em programas de melhoramento genético. Nesse contexto, esses alotetraploides induzidos, além de facilitar a transferência de alelos oriundos dos genomas silvestres superando a limitação de compatibilidade interespecies de diferença de ploidia, contribuem para a determinação de possíveis efeitos da hibridação/ poliploidização, evolução e domesticação dos genomas (Simpson 2001; Fávero *et al.*, 2006, 2015; Foncèka *et al.*, 2009; Leal-Bertioli *et al.*, 2015; Nascimento *et al.*, 2018).

As espécies silvestres *A. duranensis* e *A. ipaënsis*, genitoras do amendoim, apresentam modelos para o conhecimento sobre sua estrutura e conteúdo genômico. Para acelerar o processo de melhoramento e conseqüentemente a obtenção de cultivares com características agronomicamente desejáveis, estudos estratégicos estão sendo realizados. É o caso de IpaDur1, resultante da combinação entre *A. ipaënsis* e *A. duranensis* (Fávero *et al.*, 2006), que foi caracterizado e comparado com o alotetraploide espontâneo e seus genitores silvestres, revelando semelhanças entre eles, porém com diferenças detectadas em alguns aspectos da organização e composição do genoma, como a recombinação entre os subgenomas demonstrada via GISH e a perda de sítios de DNAr 45S, revelando a instabilidade dos subgenomas induzidos, possivelmente por diferentes caminhos de hibridação/ tetraploidização e diferentes processos evolutivos (Nascimento *et al.*, 2018).

Novos estudos citogenéticos foram conduzidos com o alotetraploide induzido IpaDur2 (*A. ipaënsis* x *A. duranensis*)^{4x}, recentemente obtido (Bertioli *et al.*, 2019), incluindo análises desde a 1º geração, logo após a alotetraploidização, até a 3ª geração e os padrões comparados com a 10ª geração de IpaDur1, *A. hypogaea* e *A. monticola*. Além

desses, outros alotetraploides tais como MagDur (*A. magna* x *A. duranensis*)^{4x} e ValSten (*A. valida* x *A. stenosperma*)^{4x} (Gao *et al.*, 2021) também foram caracterizados citogeneticamente a fim de determinar possíveis efeitos da hibridação/ tetraploidização a curto e a longo prazo e inferir sobre evolução e domesticação entre os genomas de *Arachis*.

6. Conteúdo genômico de *Arachis* - elementos de transposição e sequências gênicas

O genoma de organismos eucariotos complexos, assim como o genoma de plantas é diferenciado em DNA codificante e não codificante (Flavell *et al.*, 1974). O DNA não codificante é composto por íntrons e mais predominantemente, por sequências de DNA repetitivas, tais como sequências satélites, teloméricas, centroméricas e elementos de transposição (ETs). Os ETs ocupam a maior porção dos genomas eucarióticos, em particular das plantas e são organizados em função das respostas às pressões seletivas que ocorreram durante a evolução, podendo apresentar distribuição dispersa ou em blocos consecutivos (*tandem*) no genoma (Schmidt e Heslop-Harrison 1998; Saze e Kakutani 2011).

Os ETs têm capacidade de se mover no genoma por meio da transposição, e com isso podem alterar padrões de expressão de genes, gerando alterações funcionais, principalmente se inseridos dentro ou próximos às regiões promotoras de genes (Kashkush *et al.*, 2003; Saze e Kakutani 2011). Podem ainda ser responsáveis pela junção de segmentos de DNA durante sua transposição, alterando a colinearidade existente entre genomas, alavancando a expansão e evolução da estrutura genômica, portanto, assumindo um papel importante na evolução dos organismos (Kidwell e Lisch 1997).

A capacidade de movimentação dos TEs ao longo do genoma foi identificada pela primeira vez no milho (*Zea mays* L.) por Barbara McClintock (1950), quebrando o paradigma de que o genoma é um conjunto estático de informações transmitidas entre gerações. Desde então, maior atenção tem sido dada a esse tipo de sequência, presente em quase todos os eucariotos (Wicker *et al.*, 2007), formando até 45% do genoma humano (Lander *et al.*, 2001) e ultrapassando 80% do genoma em algumas plantas, como no milho (Meyers *et al.*, 2001), com capacidade de persistir nos genomas, gerar mutações deletérias e beneficiar-se da maquinaria celular de replicação para a conservação de suas cópias (Orgel e Crick 1980).

Com base no seu mecanismo de transposição os TEs foram classificados em elementos de Classe I ou retrotransposons, onde o intermediário de transposição é o RNA e os elementos de Classe II ou transposons, onde o intermediário de transposição é o DNA. Os elementos de ambas as classes são ainda diferenciados em autônomos, com capacidade de codificar todos os fatores necessários para facilitar a transposição e os não autônomos, formados por elementos que requerem um elemento autônomo da mesma família para fornecer os fatores necessários à transposição (Wicker *et al.*, 2007).

A Classe I, usa o mecanismo de “copiar e colar”, 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, não acarretando a perda de informações, apenas duplicando sequências (Feschotte *et al.*, 2002; Wicker *et al.*, 2007). De acordo com as características da organização e filogenia do gene que codifica para a transcriptase reversa (TR), Wicker *et al.*, (2007) também dividiram os TEs 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 elementos da Classe II, através de um intermediário de DNA, empregam um mecanismo de “cortar e colar” e geralmente estão presentes em níveis mais baixos dentro dos genomas quando comparados aos retrotransposons. Esses elementos 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 que ocorre com os elementos de Classe I, a informação original é perdida, restando apenas a cópia (Feschotte *et al.*, 2002; Wicker *et al.*, 2007).

Dentre os retrotransposons, os RT que possuem sequências flanqueadoras do tipo LTR (RT-LTRs) são os principais componentes da fração repetitiva de genomas de plantas, constituindo até 80% de grandes genomas (Sanmiguel e Bennetzen 1998). 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). Suas sequências LTR apresentam centenas de pares de bases (pb) que os flanqueiam, onde as regiões LTR 5’ e LTR 3’ são idênticas quando o elemento se insere no genoma hospedeiro. Além dessas sequências, os RT-LTR possuem ainda três regiões distintas: *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 a região *Polypurine Tract* (PPT), com 11-15 pb também envolvida na transcrição reversa (Feschotte *et al.*, 2002; Wicker *et al.*, 2007).

O tamanho de genoma do amendoim foi inicialmente reportado por Tensch e Greilhuber (2000, 2001), com aproximadamente 2,8 Gb, composto por uma fração que variava de alta a raramente repetitiva ocupando aproximadamente 64% do genoma e por sequências cópia-única, ocupando cerca de 36% do genoma (Dhillon *et al.*, 1980). Com o sequenciamento do genoma do amendoim, o tamanho foi definido como 2,5 Gb, onde 74% do genoma é representado por DNA repetitivo (Bertioli *et al.*, 2019). Esses dados foram estimados por Bertioli *et al.*, (2016), com o sequenciamento dos genomas de referência das espécies genitoras do amendoim, determinado para *A. duranensis* e *A. ipaënsis* respectivamente em 1,25 e 1,56 Gb de tamanho e 61,7 % e 68,5 % de ETs, indicando que não houve nenhuma grande alteração no tamanho do genoma desde a poliploidização.

Estudos demonstram uma alta colinearidade gênica entre marcadores moleculares, em mapas genéticos de ligação construídos a partir das espécies diploides de *Arachis* com genomas A e B, indicando baixa divergência evolutiva entre eles (Moretzsohn *et al.*, 2009; Bertioli *et al.*, 2009; Shirasawa *et al.*, 2013). Apesar da alta sintenia gênica dos subgenomas do amendoim com os genomas dos seus genitores diploides, há indicativos de reorganização dos subgenomas no alotetraploide, sugerindo que o amendoim sofreu uma remodelação genômica, ou durante sua formação, ou ao longo de sua evolução. Sabe-se que essas alterações, em sua maioria, estão associadas à dinâmica de frações de DNA repetitivas que divergiram diferentemente durante a evolução, juntamente com deleções e recombinações gênicas entre os subgenomas alotetraploides (Bertioli *et al.*, 2009, 2013, 2016, 2019; Moretzsohn *et al.*, 2013; Shirasawa *et al.*, 2013).

Nas sequências de DNA não-repetitivo, caracterizadas por apresentar baixo número de cópias, estão os genes, responsáveis pela codificação das proteínas estruturais, presentes em vias metabólicas, sinalizadoras ou de defesa (Flavell *et al.*, 1974; Schmidt e Heslop-Harrison 1998). Nesse contexto, os genes de resistência, por permitirem a ativação de defesa das plantas, são a chave para muitas interações planta-patógeno, resultando na habilidade de resposta rápida, como a primeira linha de defesa ao ataque de patógenos (Kourelis *et al.*, 2018).

O amendoim cultivado é suscetível ao nematoide das galhas, *M. arenaria*, fitopatógeno que afeta a qualidade dos grãos, resultando na perda significativa da produção (Bailey 2002; Ibrahim *et al.*, 2011). Por outro lado, algumas das espécies silvestres diploides mostram uma maior resistência a este patógeno, como observado em *A. stenosperma*, por meio da manifestação da Resposta de Hipersensibilidade (RH) (Proite *et al.*, 2007), desencadeada por genes de resistência (Dang *et al.*, 2013), e da identificação de QTLs (Quantitative Trait Locus) associados à redução da formação de galhas e produção de ovos (Leal-Bertioli *et al.*, 2016). Além disso, estudos envolvendo bibliotecas de cDNA, macroarranjo, sequenciamento massal e análise de expressão por PCR quantitativo em *A. stenosperma* e *A. duranensis* têm apontado alguns genes candidatos potencialmente envolvidos na resistência ao ataque deste patógeno (Proite *et al.*, 2007; Guimaraes *et al.*, 2010, 2015; Morgante *et al.*, 2013).

Nas plantas, a principal classe de genes de resistência são os NLRs (*Nucleotide Binding Leucine Rich Repeats*), que consistem em um sítio de ligação de nucleotídeos com repetições ricas em leucina, subdivididos em duas classes: *Toll Interleucin Receptor 1* (TIR-NB-LRR) e *Coiled-coil* (CC-NB-LRR) (Meyers *et al.*, 1999). O primeiro levantamento sobre genes do tipo RGAs (*Resistance Gene Analogs*) em *Arachis* revelou 78 NLRs, todos com função desconhecida (Bertioli *et al.*, 2003). Posteriormente, centenas de RGAs foram isolados de diferentes cultivares de amendoim (Yuksel *et al.*, 2005; Ratnaparkhe *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012). Análises dos genes tipo NLRs nas espécies genitoras do amendoim, *A. duranensis* e *A. ipaënsis*, identificaram 300 representantes NLRs, classificados em quatro tipos de famílias (Bertioli *et al.*, 2016; Song *et al.*, 2017), entretanto com um número relativamente pequeno de genes envolvidos nas respostas de defesa contra nematoides (Zheng *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2017). Recentemente, a partir das análises do transcrito de *A. stenosperma*, esses genes foram associados à resistência ao nematoide da galha (Clevenger *et al.*, 2017; Mota *et al.*, 2018), revelando genes relacionados à imunidade da planta com perfis de expressão contrastantes, responsáveis por desencadear cascatas de defesa em espécies silvestres de *Arachis* (Mota *et al.*, 2018).

Além dos NLRs, diferentes classes de genes estão envolvidas nos mecanismos de defesa das plantas, como as expansinas, proteínas localizadas na parede celular, envolvidas na extensão e relaxamento das células dos tecidos em crescimento (McQueen-Mason *et al.*, 1992). Nas plantas, as expansinas também estão relacionadas às respostas a diferentes estresses bióticos e abióticos, como déficit hídrico, salinidade, frio, calor,

estresse oxidativo, ataque de herbívoros e infecção de fitopatógenos (Marowa *et al.*, 2016), indicando que essas proteínas, de fato, constituem um componente comum na resposta das plantas a estresses múltiplos e simultâneos. A superfamília da expansina é classificada em quatro subfamílias: α -expansina (*EXPA*), β -expansina (*EXPB*), expansina-like A (*EXLA*) e expansina-like B (*EXLB*) (Kende *et al.*, 2004). No entanto, os mecanismos não enzimáticos pelos quais as expansinas influenciam a capacidade das plantas de resistir aos estresses associados são incertos.

Nos últimos anos, espécies silvestres de *Arachis* têm sido exploradas como fontes de alelos para aumentar a adaptabilidade ambiental, estabelecer genes candidatos, marcadores genéticos e sequências genômicas para o melhoramento do amendoim (Brasileiro *et al.*, 2015; Janila *et al.*, 2016). O potencial dos genes codificadores da expansina para aumentar a tolerância ao estresse, associado ao conhecimento limitado de seus papéis nas respostas das plantas aos estímulos ambientais, destaca a importância da caracterização da superfamília da expansina e seus mecanismos funcionais.

Nesse contexto, para estabelecer a citogenômica em *Arachis* foram selecionadas sequências de DNA contendo genes candidatos, cuja modulação de sua expressão está associada a respostas a diferentes estresses (Guimarães *et al.*, 2010, 2012, 2017; Morgante *et al.*, 2013; Clevenger *et al.*, 2017; Mota *et al.*, 2018). Além dos NLRs e das expansinas, esses genes incluem um gene pertencente à família das Estilbenos Sintases (*GES*), que permite a biossíntese de Resveratrol, uma fitoalexina que também protege as plantas contra estresses bióticos e abióticos, sintetizado naturalmente pelas espécies do gênero *Arachis* (Landcake e Pryce 1976; Sobolev *et al.*, 1995).

Espécies de plantas com genomas grandes e complexos, como o amendoim, apresentam alta porcentagem de sequências de DNA repetitivas (Bertioli *et al.*, 2019), o que dificulta o mapeamento comparativo de alguns tipos de sequências, como clones BACs (*Bacterial artificial chromosome*), a fim de estabelecer, por exemplo, relações evolutivas entre cromossomos de espécies relacionadas via FISH (Janda *et al.* 2006; Zhang *et al.* 2004). Nesse contexto, sondas a partir de sequências gênicas, como DNA cópia-única, além de estabelecer marcadores cromossomo-específico, permitem um mapeamento comparativo e uma análise evolutiva (Aliyeva-Schnorr *et al.* 2016; Danilova *et al.* 2012, 2014), como já estabelecido no trigo (*Triticum aestivum* L.), com sondas de DNA cópia-única a partir do gene acetil-CoA carboxilase usadas em várias espécies diploides e poliploides relacionadas (Danilova *et al.*, 2012, 2014, 2017), capazes de detectar translocações e rearranjos cromossômicos (Danilova *et al.* 2012).

JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos, análises citogenéticas utilizadas para a identificação e caracterização de cromossomos em diferentes espécies de plantas forneceram informações valiosas para comparar espécies ou identificar variações inter e intraespecíficas. A FISH, desenvolvida há mais de 30 anos, tem sido a ferramenta que mais mudou o paradigma na pesquisa citogenética, capaz de responder questões relacionadas à estrutura e evolução dos genomas (Jiang 2019).

Nesse sentido, a citogenética molecular, amplamente utilizada no gênero *Arachis*, ajudará em três questões importantes sobre diferentes genótipos diploides e alotetraploide, espontâneos e induzidos pertencentes ao gênero, abrangendo desde a caracterização básica de cromossomos até a citogenômica:

1) A alta variabilidade morfológica observada em *A. hypogaea* é evidente, como observado pela sua divisão taxonômica em duas subespécies e seis variedades botânicas (Krapovickas e Gregory 1994). Entretanto, há um grande grupo de amendoins coletados no Parque Indígena do Xingu, Mato Grosso, Brasil, que extrapolam essa variabilidade morfológica, tornando a classificação taxonômica mais complexa, além de levantar o questionamento sobre a origem desses acessos: teriam eles a mesma origem do amendoim cultivado difundido em todo o mundo? A citogenética molecular, além de determinar as espécies genitoras desses acessos, ajudou a compreender essas diferenças morfológicas e permitiu inferir sobre os processos de domesticação e evolução do amendoim.

2) A interação entre dois genomas diferentes em um mesmo núcleo ainda é pouco compreendida em *Arachis*. Nesse sentido, alotetraploides induzidos obtidos a partir da hibridação entre as espécies genitoras do amendoim cultivado, *A. duranensis* e *A. ipaënsis* (IpaDur1 e IpaDur2), consistiram em uma importante fonte de estudo dos efeitos do choque genômico após a alotetraploidização, o que evidenciou citogeneticamente a instabilidade genômica dos neopoliploides, de forma a mimetizar o que provavelmente ocorreu durante a origem espontânea do amendoim.

3) A citogenética molecular também tem permitido mapear sequências gênicas por FISH em cromossomos de plantas, (Danilova *et al.*, 2014). Sondas sintetizadas a partir dessas sequências podem ser usadas entre genótipos relacionadas, permitindo o mapeamento citogenético comparativo dessas espécies. Nesse contexto, o banco de dados de transcritomas de *Arachis*, que contém genes cuja expressão diferencial está associada

à repostas a diferentes estresses, foi explorado para a seleção de genes a serem mapeados em diferentes genótipos de *Arachis* buscando estabelecer o uso da citogenômica no gênero e ampliar o conhecimento sobre a localização dessas sequências gênicas. O estabelecimento da citogenômica incrementou as análises citogenéticas comparativas entre os genótipos relacionados, contribuindo para o entendimento da estrutura e evolução desses genomas, além de permitir a expansão do conhecimento sobre genes associados à repostas a diferentes estresses em *Arachis*.

OBJETIVOS

1. Geral

Caracterizar e comparar via citogenética molecular a organização genômica de genótipos diploides e alotetraploides espontâneos e induzidos de *Arachis*, a fim de determinar as espécies genitoras do amendoim cultivado por indígenas do Parque Xingu; identificar alterações citogenéticas decorrentes do choque genômico após alotetraploidização e estabelecer o uso da citogenômica no gênero por meio da localização de marcadores cromossomo-específicos a partir de sequências gênicas e contribuir para o entendimento da estrutura e evolução desses genomas.

2. Específicos

- ✓ Estabelecer padrões de distribuição de regiões heterocromáticas através do bandamento cromossômico CMA₃/DAPI nos genótipos diploides e alotetraploides espontâneos e induzidos *Arachis*;
- ✓ Estabelecer afinidades genômicas via GISH entre os diferentes genótipos;
- ✓ Mapear a distribuição de sequências repetitivas do tipo ribossômicas e RT-LTR nos cromossomos dos diferentes genótipos;
- ✓ Mapear a distribuição de sequências gênicas nos diferentes genótipos;
- ✓ Identificar sinais de reorganização genômica nos alotetraploides espontâneos e induzidos;
- ✓ Inferir sobre os efeitos da tetraploidização na organização dos subgenomas dos alotetraploides a partir da comparação entre os genótipos espontâneos e induzidos.

CAPÍTULO I

Amendoim cultivado por indígenas brasileiros: origem, diversidade morfológica e seleção

1. INTRODUÇÃO

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é uma espécie alotetraploide recente, com origem estimada entre 5.000 e 10.000 anos atrás (Bonavia 1982; Hammons 1994; Krapovickas e Gregory 1994, Bertioli *et al.*, 2019, 2020), a partir da hibridação das espécies silvestres diploides *A. duranensis* e *A. ipaënsis* que espontaneamente tiveram seus cromossomos duplicados após a poliploidização (Singh 1986; Kochert *et al.*, 1996; Seijo *et al.*, 2004, 2007; Fávero *et al.*, 2006; Bertioli *et al.*, 2013, 2016). Os registros arqueológicos mais antigos do amendoim referem-se ao material encontrado na costa árida do Peru, correspondendo ao chamado Período Inicial, datado de 3.800 a 2.900 AP, o que evidencia a importância do amendoim desde as eras passadas (Pickersgill e Heiser 1977), com seu cultivo distribuído por todo o mundo, incluindo indígenas da América do Sul e algumas tribos brasileiras.

O amendoim cultivado tem sido selecionado por diferentes processos de domesticação há muito tempo, revelando aspectos morfológicos diferentes daqueles descritos para as espécies genitoras (Krapovickas e Gregory 1994). Devido à alta variabilidade morfológica observada em *A. hypogaea*, a espécie está taxonomicamente classificada em duas subespécies e seis variedades botânicas (Krapovickas e Gregory 1994). Entretanto há um grande grupo de amendoins encontrados nos vales dos rios Guaporé e Xingu, Mato Grosso, Brasil, que extrapolam essa variabilidade morfológica, tornando a classificação taxonômica mais complexa (Freitas e Valls 2001). Esse é o caso dos acessos de amendoins cultivados pelos índios da tribo Kayabi, que habitam o Parque Indígena do Xingu, situado na região nordeste do Estado de Mato Grosso, na região central do Brasil (Novaes 1985) (Fig. 4).

Atualmente, mais de 4.000 índios de 14 etnias diferentes, pertencentes a seis famílias linguísticas, vivem no parque, o que evidencia a grande diversidade cultural existente nessa região. Não muito tempo atrás, com o objetivo de caracterizar e conservar o germoplasma de amendoim dessa região, algumas expedições científicas tiveram a oportunidade de coletar um grande número de acessos na região do Parque Xingu e arredores (Freitas *et al.*, 2007) e depositar na Coleção de Base (Colbase) de Germoplasma Vegetal localizada na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília – DF, Brasil.

Durante análises morfológicas de alguns desses acessos foram observadas características diferentes daquelas descritas para o amendoim cultivado (Freitas e Valls 2001; Freitas *et al.*, 2007; Suassuna *et al.*, 2016), levantando o questionamento sobre a origem desses acessos: teriam eles a mesma origem do amendoim cultivado difundido em todo o mundo? Apesar dessas diferenças morfológicas relatadas para os diferentes acessos coletados no Parque Indígena do Xingu, eles são classificados como *A. hypogaea*. No entanto, a possível contribuição de outras espécies com genomas A e B na formação desses acessos é frequentemente considerada, tais como a participação das espécies diploides *A. stenosperma* (genoma A) e *A. magna* (genoma B), que além de apresentarem semelhanças morfológicas com as sementes dos acessos de amendoim cultivado pelos indígenas (Freitas *et al.*, 2003a; Suassuna *et al.*, 2016), apresentam populações naturais geograficamente próximas ao que hoje é o Parque Indígena do Xingu, como *A. stenosperma* (Freitas *et al.*, 2003a).

Portanto, para melhor compreender as razões que justifiquem as diferenças morfológicas observadas nos diferentes acessos de *A. hypogaea* oriundos do Parque Indígena do Xingu e inferir sobre os processos de domesticação e evolução do amendoim foram realizadas análises citogenéticas de alguns desses acessos. Os resultados foram comparados com os padrões citogenéticos já estabelecidos para o amendoim cultivado e *A. monticola*, sempre relacionando os padrões detectados com os observados nas espécies diploides: *A. duranensis*, *A. ipaënsis*, *A. stenosperma* e *A. magna*.

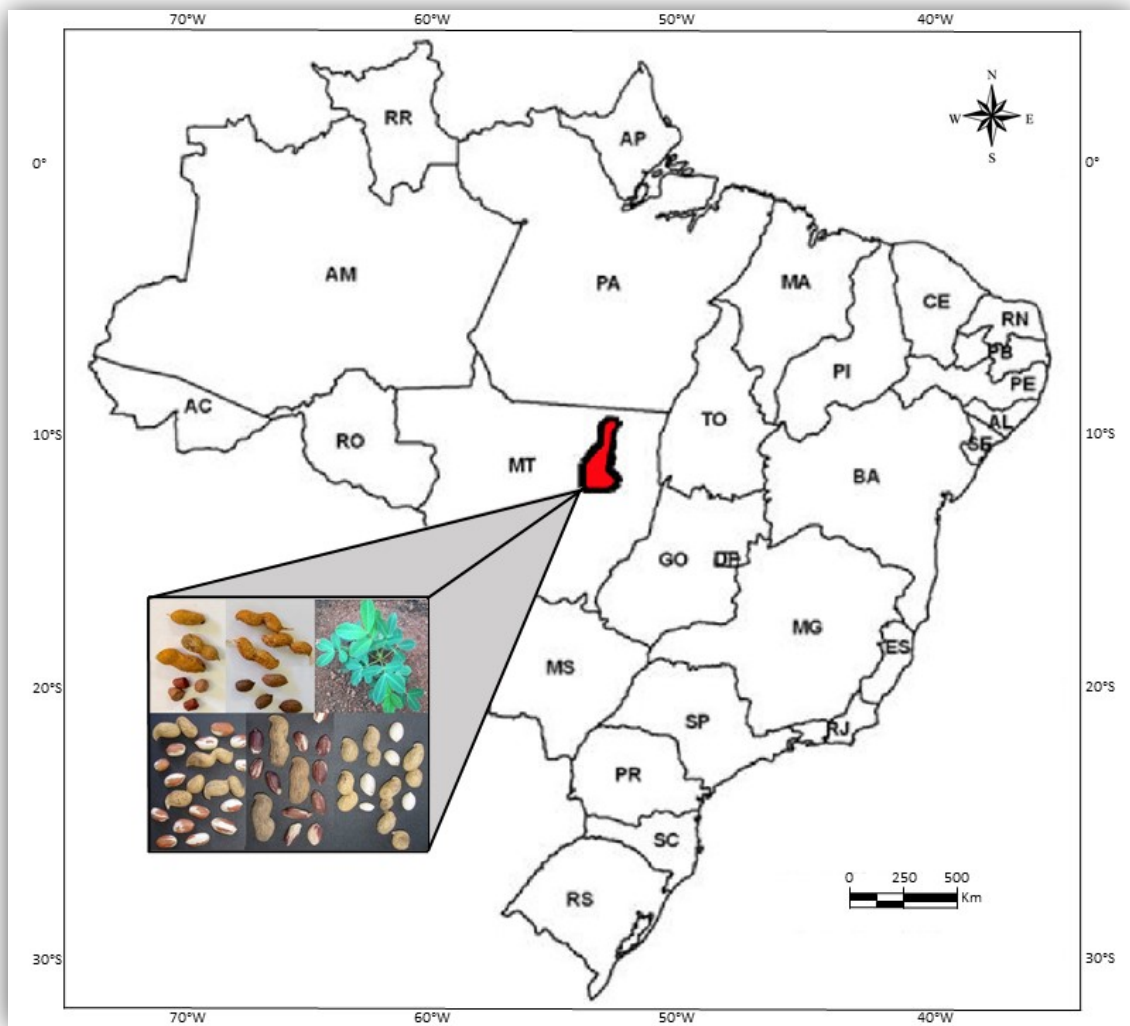


Figura 4: Esquema do mapa geográfico do Brasil mostrando a localização do Parque Indígena do Xingu, localizado no estado do Mato Grosso (MT), local de coleta das sementes dos diferentes acessos de amendoins analisados. Adaptado de Freitas *et al.*, 2007.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local de realização dos experimentos

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

2.2. Material vegetal

Para análises citogenéticas foram utilizadas raízes de plantas obtidas após a germinação de sementes de três acessos de *A. hypogaea* do Parque Indígena do Xingu (Of 115, Of 120 e Of 126), juntamente com *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* var. *fastigiata* 'IAC Tatu-ST' e *A. monticola* (V 14165). Para síntese de sondas de DNA genômico utilizadas na GISH foram utilizadas folhas de plantas com 4 semanas de idade das espécies diploides *A. duranensis* (V 14167), *A. stenosperma* (V 10309), *A. ipaënsis* (K 30076) e *A. magna* (K 30097). As sementes das espécies utilizadas nesse estudo foram obtidas da Coleção de Base (Colbase) de Germoplasma Vegetal de *Arachis* localizada na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, listadas na tabela 1.

A seleção dos três diferentes acessos de *A. hypogaea* oriundos do Parque Indígena do Xingu foi baseada nas diferenças morfológicas observadas entre eles, relacionadas a forma, tamanho, textura e cor das vagens e sementes (Suassuna *et al.*, 2016). O acesso Of 115 (Xingu/ Nambikwara), designado como 'intermediário', possui características comuns os outros dois tipos, Nambikwara e Xingu, com vagens retas, cristas longitudinais grossas e proeminentes, casca dura com constrição moderada no meio da vagem e sementes vermelhas (Fig. 5A); O acesso Of 120 (*A. hypogaea* subsp. *hypogaea* var. *hypogaea*), cultivado a mais tempo pelos índios Kayabi, é conhecido como "amendoim do campo", e tem características semelhantes às de *A. monticola*, com cor creme e sem constrição na casca, entretanto com sementes maiores (Fig. 5B). Já o acesso Of 126 (*A. hypogaea* tipo Xingu), tem casca fina e lisa, constrição profunda no meio da vagem, que pode ser facilmente quebrada em dois segmentos e suas sementes são púrpuras escuras (Fig. 5C). Para fins comparativos, as sementes do amendoim cultivado (Fig. 5D) e *A. monticola* (Fig. 5E) também foram incluídas na figura 5.

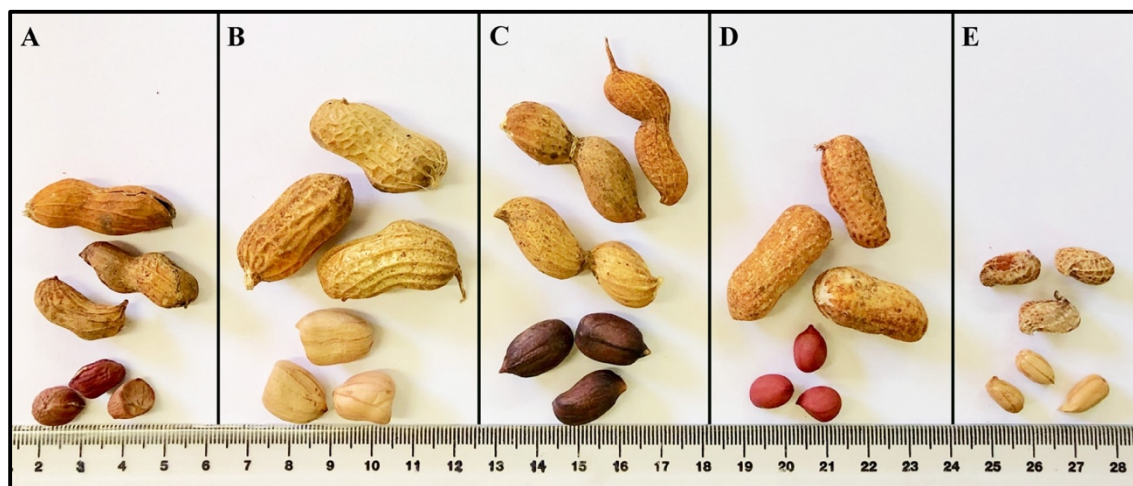


Figura 5: Sementes das espécies analisadas e comparadas citogeneticamente mostrando as diferenças morfológicas entre elas. **A)** *A. hypogaea* Xingu/ Nambikwara (Of 115); **B)** *A. hypogaea* subsp. *hypogaea* var. *hypogaea* (Of 120); **C)** *A. hypogaea* tipo Xingu (Of 126); **D)** *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* var. *fastigiata* ‘IAC Tatu-ST’ e **E)** *A. monticola* (V 14165).

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

Espécies	Estado	2n	Fórmula Genômica	Acesso	Origem	Obtenção de sementes
<i>A. hypogaea</i> “Xingu/Nambikwara” intermediária	Cultivar	40	AABB	Of 115	Aldeia Kayabi Ilha Grande, Brasil	Colbase
<i>A. hypogaea</i> subsp. <i>hypogaea</i> var. <i>hypogaea</i>	Cultivar	40	AABB	Of 120	Aldeia Kayabi Ilha Grande, Brasil	Colbase
<i>A. hypogaea</i> tipo “Xingu”	Cultivar	40	AABB	Of 126	Aldeia Kayabi Ilha Grande, Brasil	Colbase
<i>A. hypogaea</i> subsp. <i>fastigiata</i> var. <i>fastigiata</i>	Cultivar	40	AABB	‘IAC Tatu-ST’	Corrientes, Argentina	Colbase
<i>A. monticola</i>	Silvestre	40	AABB	V 14165	Jujuy, Argentina	Colbase
<i>A. duranensis</i>	Silvestre	20	AA	V 14167	Salta, Argentina	Colbase
<i>A. stenosperma</i>	Silvestre	20	AA	V 10309	Mato Grosso, Brasil	Colbase
<i>A. ipaënsis</i>	Silvestre	20	BB	K 30076	Gran Chaco, Bolívia	Colbase

<i>A. magna</i>	Silvestre	20	BB	K 30097	Santa Cruz, Bolívia	Colbase
-----------------	-----------	----	----	---------	------------------------	---------

Colbase: Coleção de Base de Germoplasma Vegetal de *Arachis* - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF.

2.3. Obtenção de cromossomos metafásicos

Entre quinze e vinte dias após a germinação das sementes, a região apical das raízes (aproximadamente 5 mm de comprimento), de pelo menos 5 plantas de cada espécie foram isoladas, pré-tratadas com solução de 8-hidroxiquinoleína 2 mM por 3 horas a temperatura ambiente e posteriormente incubadas em solução fixadora contendo etanol 100% e ácido acético glacial (3:1; v/v) por 1 hora, a temperatura ambiente, seguida da troca por nova solução fixadora mantida por 12 horas, a 4 °C. As amostras foram armazenadas em etanol 70% a -20 °C (Fernández e Krapovickas 1994). As pontas de raízes foram incubadas em tampão citrato de sódio 10 mM, pH 7,0 por 15 minutos, a temperatura ambiente e digeridas celuloliticamente em uma solução contendo enzimas proteolíticas (2 % de celulase “Onozuka” R-10 de *Trichoderma viride* - Serva 0,96 U/mg, cód. 16419 e 20 % pectinase de *Aspergillus niger* - Sigma 5,1 U/mg, cód. 2415), por 2 horas a 37 °C (Schwarzacher e Heslop-Harrison 2000). As células meristemáticas foram então isoladas em uma gota de ácido acético 45%, sobre uma lâmina histológica com auxílio de pinça e microscópio estereoscópico Zeiss (Zeiss, Oberkochen, Alemanha). As lâminas com os cromossomos foram analisadas em modo contraste de fase no microscópio Axioskop Zeiss (Zeiss, Oberkochen, Alemanha) e aquelas contendo ao menos cinco conjuntos completos de cromossomos em metáfase, livres de restos citoplasmáticos e com cromossomos bem espalhados foram selecionadas para bandamento CMA₃/DAPI, FISH e GISH. As lamínulas foram removidas após imersão das lâminas em nitrogênio líquido. As lâminas secaram a temperatura ambiente por 24 horas e foram mantidas a -20 °C.

2.4. Bandamento CMA₃/DAPI

Para evidenciar cromossomos com regiões heterocromáticas ricas em sequências G-C e A-T foi realizado o bandamento com os fluorocromos CMA₃ (Cromomicina A3) e DAPI (4', 6-diamidino-2- fenilindol), segundo Schweizer e Ambros (1994). As lâminas selecionadas foram armazenadas em recipiente fechado por 72 horas. Posteriormente 20

μl / lâmina da solução de CMA_3 (0,5 mg/mL) dissolvido em tampão McIlvaine pH 7,0, acrescidos de MgCl_2 5M foram aplicados sobre as lâminas, mantidas no escuro por 1 hora. O excesso de CMA_3 foi removido com água destilada e 20 μl /lâmina de DAPI (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) diluído em tampão McIlvaine pH 7,0 foram aplicados sobre as lâminas, novamente mantidas no escuro por 30 minutos. O excesso de DAPI foi removido com água destilada, e então foram adicionados 20 μl /lâmina de meio de montagem Vectashild (Vector Laboratories, Burlingame, California-USA). As lâminas foram armazenadas por 72 horas a 4 °C antes das análises em microscópio epifluorescente Axiophot Zeiss (Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

2.5. Obtenção de sondas genômicas para GISH

2.5.1. Extração de DNA genômico

A extração de DNA genômico foi realizada a partir de folhas jovens das espécies diploides de *Arachis* (Tab. 1), com base no protocolo CTAB (Brometo de Cetil Trimetil Amônio) (Ferreira e Grattapaglia 1998). Aproximadamente 200 mg de folhas foram maceradas em tubos *Eppendorf* de 2 mL contendo nitrogênio líquido. Posteriormente foram acrescentados aos tubos 700 μL de tampão CTAB 2% [CTAB 2% (p/v); NaCl 1,4 M; Tris-HCl 100 mM pH 8,0; EDTA 20 mM e β -mercaptoetanol 0,2% (v/v)], para incubação a 65 °C, por 50 minutos. Em seguida foram acrescentados 700 μL da solução de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1; v/v), misturadas até a formação de uma emulsão. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 15 minutos e a fase aquosa foi transferida para dois novos tubos *Eppendorf* de 1,5 mL. Foram então adicionados 600 μL de tampão CTAB 1% [CTAB 1% (p/v); Tris-HCl 50 mM pH 8,0 e EDTA 20 mM], agitados e centrifugados a 13.000 rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e o precipitado dos dois tubos foi misturado com 300 μL de NaCl 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 transferido para um novo tubo. O DNA foi precipitado com 1 mL de etanol absoluto sob agitação lenta, seguido de centrifugação a 13.200 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado duas vezes com 500 μL de etanol 70%, misturado em 100 μL de água estéril contendo 0,01 mg/mL de RNase-A, e incubado a 37 °C por

10 minutos. Posteriormente os tubos foram mantidos a -20 °C. A quantificação de DNA foi realizada em gel de agarose 1% corado com *SYBR Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen, cód. 1135054) utilizando o marcador molecular *1 Kb Plus DNA ladder* (Invitrogen, cód. 1076018).

2.5.2. Síntese de sondas genômicas

Para obtenção de sondas a partir do DNA genômico das espécies diploides de *Arachis* (Tab. 1), foram utilizados 1µg de DNA purificado, marcados com digoxigenina-11-dUTP e Cy3-dUTP pelo método de *Nick Translation* com o kit *Nick Translation Mix* (Roche, cód. 11745808910), que utiliza as enzimas Desoxirribonuclease 1 (DNAse 1) e DNA polimerase 1, proporcionando uma incorporação elevada de nucleotídeos marcados, gerando fragmentos com 200 a 300 pb. As sondas foram purificadas por precipitação etanólica e misturadas em 20 µL de água MilliQ estéril, mantidas a -20 °C.

2.6. Extração e síntese de DNAr para FISH

Clones contendo as sequências correspondentes ao DNAr 5S de *Lotus japonicus* (Pedrosa *et al.*, 2002) e 18S-5.8S-25S de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Wanzenböck *et al.*, 1997) foram cedidas pelo Laboratório de Citogenética e Evolução Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE. A extração do DNAr foi realizada com o kit *Illustra plasmid Prep Midi Flow* (GE Heltcare, cód. 28904267) e a síntese das sondas foi realizada pelo método de *Nick Translation*, utilizando o kit *Nick Translation Mix* (Roche, cód. 11745808910), de acordo com as instruções do fabricante.

2.7. Incorporação de nucleotídeos marcados - *Dot blot*

Para verificar a incorporação de nucleotídeos marcados e estimar a concentração das sondas foi realizado o teste *dot blot*, segundo Brasileiro e Carneiro (2015). Um fragmento de membrana *Hybond-N+* (Amersham, Pharmacia Biotech) foi recortado e colocado em uma placa de Petri com 55 mm de diâmetro, contendo 3 mL de tampão 1 (Tris-HCl 100 mM pH 7,5 e NaCl 15 mM) por 5 minutos. A membrana foi removida e o excesso de líquido foi absorvido entre papéis filtro. 0,5 µL da sonda, em diferentes concentrações (1:10, 1:100 e 1:1000) foram aplicados à membrana, mantida em

incubação à temperatura ambiente por 5 minutos. A membrana foi novamente imersa em 5 mL do tampão 1 por 1 minuto, posteriormente imersa em tampão 2 (BSA 5% 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 removido e 500 µL de solução de detecção (anticorpo anti-digoxigenina conjugado com fosfatase alcalina diluído em tampão 1 1:1000; v/v) foram adicionados à membrana, que posteriormente foi incubada a 37 °C sob leve agitação por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 5 mL de tampão 1, mantido por 10 minutos à temperatura ambiente. Após a remoção do tampão 1, 5 mL de tampão 3 (Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM e MgCl₂ 50 mM) foram adicionados à placa, mantida em incubação por mais 5 minutos. O tampão 3 foi removido e 1 mL da solução NBT/BCIP (azul nitro de tetrazólio/fosfato 5-bromo-4-cloro-3-indolil) foi adicionada à membrana, incubada por 5 minutos no escuro. A membrana foi removida da placa, lavada em água corrente e seca entre papéis filtro. A detecção dos nucleotídeos marcados foi confirmada com a observação de pontos (*dots*), cuja coloração varia conforme a concentração da sonda, desde cinza claro (menos concentrada) até marrom escuro (mais concentrada).

2.8. Hibridização *in situ* - FISH e GISH

As hibridizações *in situ* foram realizadas como descrito em Schwarzacher e Heslop-Harrison (2000), como ilustrado na figura 6. As etapas e condições de hibridização foram as mesmas para FISH e GISH, independentemente do tipo de sonda utilizada.

2.8.1. Pré-hibridização

As lâminas contendo cromossomos metafásicos foram pré-tratadas com uma solução fixadora contendo etanol 100% e ácido acético glacial (3:1; v/v) por 20 minutos à temperatura ambiente, posteriormente incubadas em etanol 100% por 5 minutos, seguida por incubação em novo etanol 100% por mais 5 minutos. Foram aplicados 100 µl/lâmina de RNase A (10 mg/mL) para incubação por 1 hora a 37 °C. As lâminas foram lavadas em tampão citrato de sódio (SSC) 2X por 2 minutos e posteriormente foram aplicados 100 µl/lâmina de pepsina (10 mg/mL) para incubação por 15 minutos a 37 °C, em câmara úmida. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água destilada e SSC 2X

por 5 minutos e incubadas em solução de paraformaldeído 4% por 10 minutos à temperatura ambiente, em capela de exaustão. As lâminas foram novamente lavadas em tampão SSC 2X por 2 minutos e desidratadas em série etanólica com concentrações crescente (70, 85 e 100%) por 2 minutos em cada solução.

2.8.2. Hibridização *in situ*

A solução de hibridização foi preparada com uma estringência estimada em 76% pela adição de 10 µl de formamida 100% (50%); 2 µl de tampão SSC 2X e 4 µl de sulfato de dextrana 50% (10%). Duas sondas diferentes (50 ng/µL cada) foram utilizadas concomitantemente em cada lâmina, por meio da adição de 2 µl de cada sonda aos 16 µl da solução de hibridização. Em seguida as sondas foram desnaturadas a 75 °C por 10 minutos e imediatamente colocadas a 4 °C. 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. O tempo para hibridização foi de aproximadamente 14 horas a 37 °C, usando câmara úmida.

2.8.3. Pós-hibridização

As lâminas foram lavadas em tampão SSC 2X e 0,1X a 42 °C por 5 minutos em cada. Essa combinação de temperatura e concentração dos tampões correspondem a 73% de estringência.

2.8.4. Detecção dos sítios de hibridização

As lâminas foram incubadas em tampão de detecção (Tween 20 0,2% e SSC 20X) por 5 minutos. Posteriormente 50 µl/lâmina de solução de bloqueio (BSA 5% dissolvido em tampão de detecção) foram adicionados e mantidos por 30 minutos a 37 °C, em câmara úmida. As sondas marcadas com digoxigenina foram detectadas com anticorpo anti-digoxigenina conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (2,5 µg/mL) (Roche, cód. 11207741910), diluído em 20 µl da solução de bloqueio. As lâminas foram incubadas por 1 hora a 37 °C, em câmara úmida. Posteriormente, foram lavadas com tampão de detecção a 42 °C por 8 minutos.

2.8.5. Montagem e análise das lâminas

Foram aplicados 20 µl/lâmina da solução DAPI (100 µg/mL), diluído em 980 µl de Vectashild (Vector Laboratories, Burlingame, California-USA). As lâminas foram armazenadas a 4 °C por 12 horas e posteriormente analisadas no microscópio epifluorescente Axiophot Zeiss (Zeiss, Oberkochen, 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.

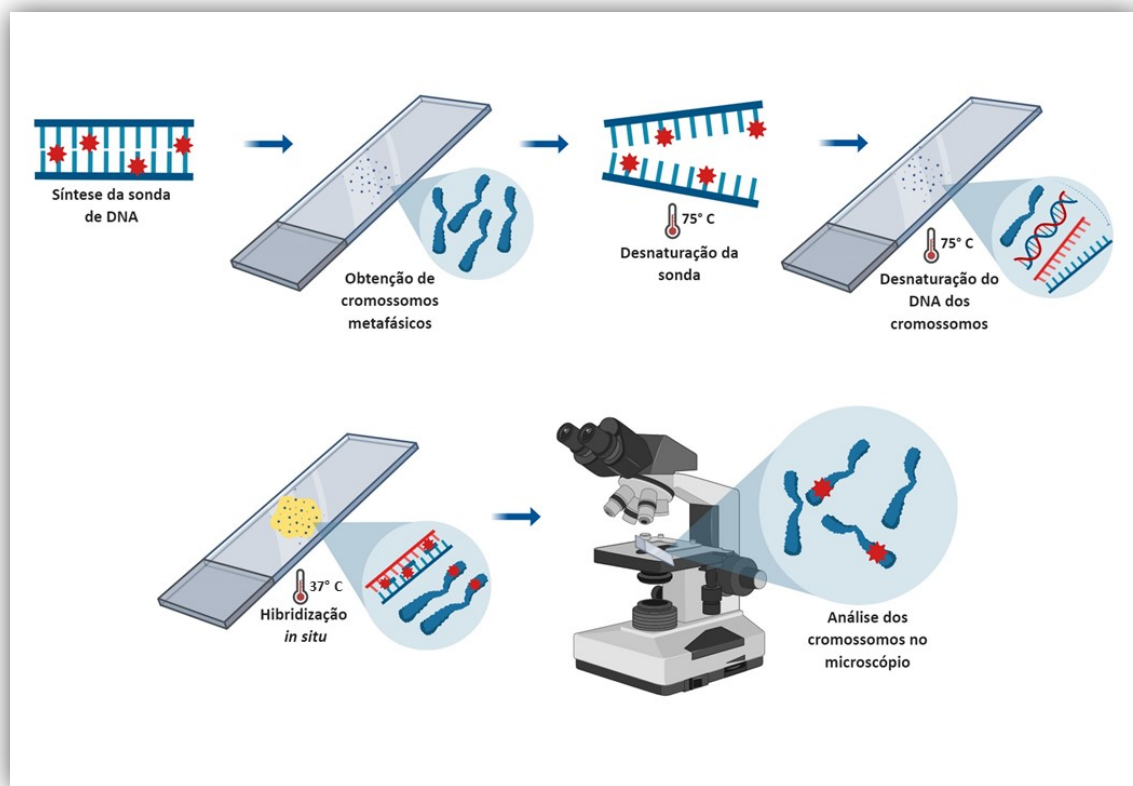


Figura 6: Esquema mostrando as principais etapas da hibridização *in situ* por fluorescência (FISH e GISH).

3. RESULTADOS

3.1. Morfologia dos cromossomos

Quando analisados citogeneticamente, os cromossomos dos três acessos do amendoim cultivado pelos índios Kayabi foram muito similares entre si. Portanto, foi definido o uso das imagens apenas do acesso Of 126, representando os três acessos nas figuras a seguir. Os acessos analisados apresentaram 40 cromossomos (Fig. 7A), assim como o amendoim cultivado (Fig. 7B) e *A. monticola* (Fig. 7C), sendo 36 cromossomos metacêntricos e quatro submetacêntricos. De acordo com os cromossomos correspondentes em *A. duranensis*, *A. hypogaea*, *A. monticola* e IpaDur1 (Seijo *et al.*, 2004; Robledo *et al.*, 2009; Robledo e Seijo 2010; Nascimento *et al.*, 2018), foi observado nos três acessos, um par de cromossomos com constrição secundária e um segmento satélite (SAT) localizado próximo ao segmento proximal do braço longo, designado A10. Da mesma forma, o pequeno par A, facilmente detectado devido à alta condensação da heterocromatina e presença de banda DAPI⁺ no centrômero, foi designado como A9.

3.2. Bandamento de regiões heterocromáticas

O bandamento de regiões heterocromáticas ricas em nucleotídeos G-C evidenciadas com CMA₃ foi similar nos três acessos de amendoim do Parque Indígena do Xingu, com bandas CMA₃⁺ localizadas nas regiões proximais dos pares A10 e B10 (Figs. 8A e B), igualmente observadas nas espécies diploides, *A. duranensis* e *A. ipaënsis* e no alotetraploide induzido IpaDur1, como mostrado anteriormente por Nascimento *et al.*, (2018). No entanto, o padrão encontrado nos acessos indígenas diferiu daquele presente em *A. hypogaea*, que além de bandas CMA₃⁺ em A10 e B10, apresentou bandas em mais três pares de cromossomos: A2, B3 e B7 (Figs. 8C e D) e *A. monticola*, com bandas CMA₃⁺ em A2 e A10, mas ausentes em B10 (Figs. 8E e F).

O padrão de bandamento de regiões heterocromáticas ricas em sequências nucleotídeos A-T evidenciadas com DAPI também foi similar entre os acessos do Parque Indígena do Xingu (Fig. 8B), *A. hypogaea* (Fig. 8D) e *A. monticola* (Fig. 8F), com bandas DAPI⁺ observadas nas regiões centroméricas de dez pares de cromossomos, correspondentes aos cromossomos do subgenoma A, enquanto os outros dez pares sem bandas DAPI⁺, correspondiam aos cromossomos do subgenoma B, de acordo com o

padrão descrito anteriormente para as espécies de *Arachis* com genomas A e B (Seijo *et al.*, 2004; Robledo *et al.*, 2009; Robledo e Seijo 2010; Nascimento *et al.*, 2018).

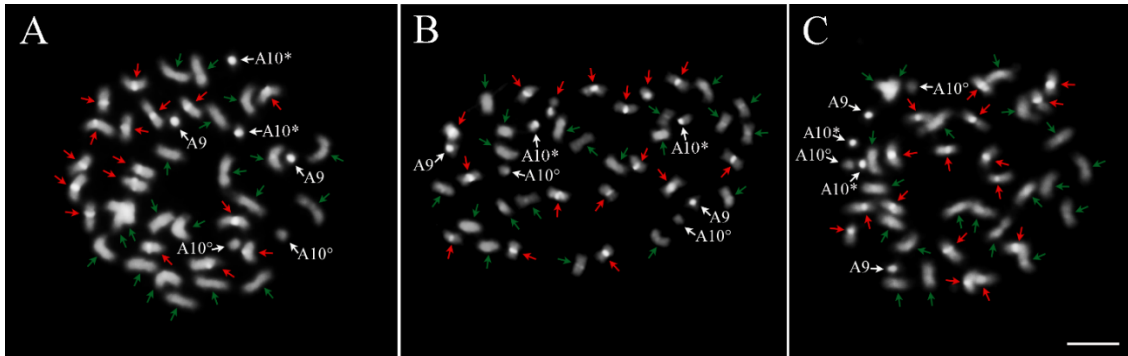


Figura 7: Cromossomos metafásicos de **A)** *A. hypogaea* tipo Xingu (Of 126); **B)** *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* var. *fastigiata* 'IAC Tatu-ST' e **C)** *A. monticola* (V 14165) após contracoloração com DAPI (branco) mostrando dez pares de cromossomos com bandas DAPI⁺, localizadas na região centromérica dos cromossomos do subgenoma A (setas vermelhas) e 10 pares sem bandas DAPI, correspondentes aos cromossomos do subgenoma B (setas verdes). A9: pequeno par A. A10: braço curto e segmento proximal do braço longo (*) e satélite (°). Barra: 5µm.

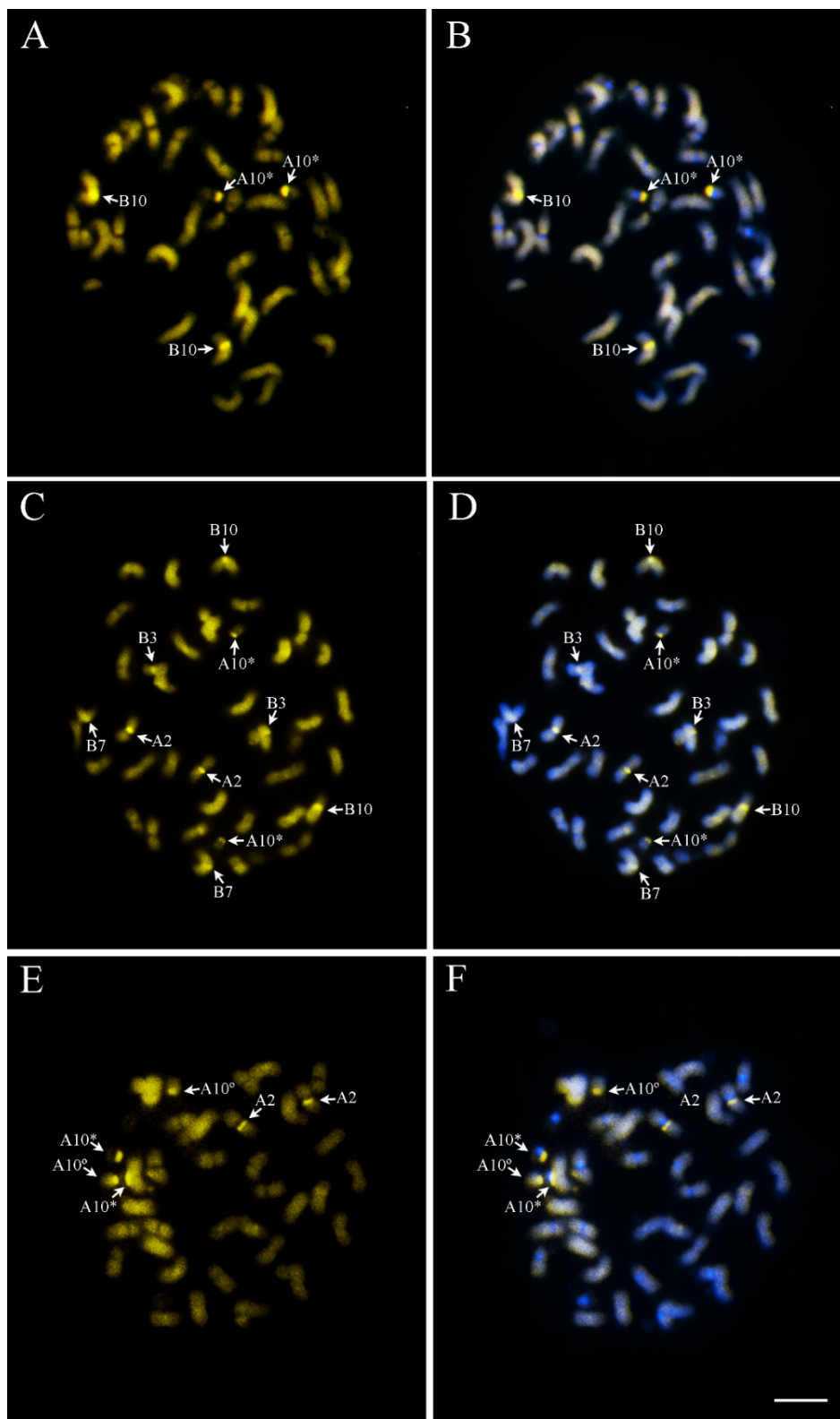


Figura 8: Cromossomos metafásicos de **A/B)** *A. hypogaea* tipo Xingu (Of 126); **C/D)** *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* var. *fastigiata* 'IAC Tatu-ST' e **E/F)** *A. monticola* (V 14165) mostrando bandas CMA₃⁺ (amarelo) nas regiões proximais dos cromossomos (setas). B, D e F) Sobreposição de imagens CMA₃⁺ (amarelo) e DAPI (azul). A10: braço curto e segmento proximal do braço longo (*) e satélite (°). Barra: 5µm.

3.3. Afinidades genômicas detectadas por GISH

O duplo GISH realizado simultaneamente com duas sondas das espécies diploides: *A. duranensis* (genoma A) e *A. ipaënsis* (genoma B) nos cromossomos dos três acessos de amendoim cultivado pelos índios mostrou que cada uma dessas sondas hibridizou preferencialmente com os cromossomos do seu subgenoma correspondente, ou seja, a sonda de *A. duranensis* hibridizou extensivamente com os cromossomos do subgenoma A (Figs. 9A, D e G), enquanto a sonda de *A. ipaënsis* hibridizou fortemente com os cromossomos do subgenoma B (Figs. 9B, E e H).

Os sinais de hibridização foram evidentes em todos os cromossomos, de ambos os subgenomas dos três acessos de amendoim cultivado pelos índios. Entretanto, não foram detectados sinais de hibridização nos cromossomos A9; braço curto e segmento proximal do braço longo de A10; centrômeros dos cromossomos do subgenoma A e regiões terminais de todos os cromossomos. Além disso, a sobreposição dos sinais de hibridização das duas sondas genômicas, isto é, ambas as sondas hibridizadas com a mesma região do genoma foram observados na maioria dos cromossomos, em ambos os subgenomas (Figs. 9C, F e I).

Resultados similares de hibridização utilizando essas mesmas sondas foram descritos para os cromossomos de *A. hypogaea*, *A. monticola* e IpaDur1 (Seijo *et al.*, 2007; Nascimento *et al.*, 2018), sugerindo que os principais contribuintes dos genomas desses alotetraploides são compartilhados pelos três acessos de *A. hypogaea* do Parque Indígena do Xingu.

Uma vez que *A. stenosperma* e *A. magna* foram espécies consideradas potenciais participantes na formação do genoma desses acessos de amendoim cultivado pelos índios, sondas genômicas de ambas as espécies foram também hibridizadas simultaneamente nos cromossomos dos acessos do Parque. Os sinais de hibridização gerados com a sonda genômica de *A. stenosperma* foram observados principalmente nos cromossomos do subgenoma A (Figs. 10A, D e G), enquanto os sinais gerados pela sonda genômica de *A. magna* foram fracos, e dispersos nos cromossomos do subgenoma B (Figs. 10B, E e H).

Comparativamente, as hibridizações com as sondas dos diferentes genomas diploides geram sinais de hibridização essencialmente mais evidentes com as sondas de *A. duranensis* e *A. ipaënsis* em relação a *A. stenosperma* e *A. magna*.

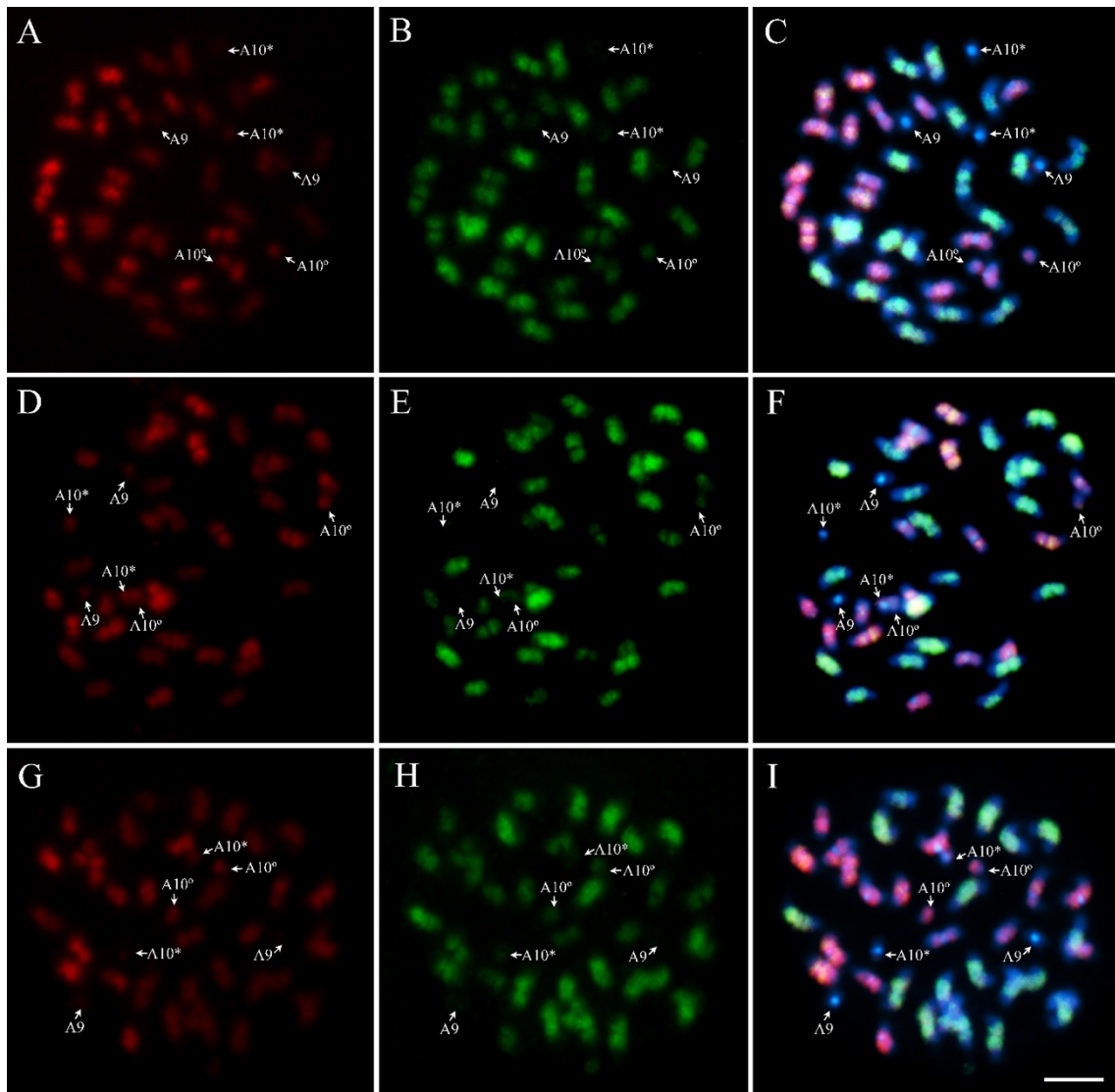


Figura 9: Duplo GISH utilizando concomitantemente as sondas genômicas de *A. duranensis* (vermelho) e *A. ipaënsis* (verde) após contracoloração com DAPI (azul) nos cromossomos de **A/B/C** *A. hypogaea* Xingu/ Nambikwara (Of 115); **D/E/F** *A. hypogaea* subsp. *hypogaea* var. *hypogaea* (Of 120); **G/H/I** *A. hypogaea* tipo Xingu (Of 126). **C/F/I** Sobreposição de imagens após GISH com as duas sondas genômicas e contracoloração com DAPI (azul). A10: braço curto e segmento proximal do braço longo (*) e satélite (°). Barra: 5µm.

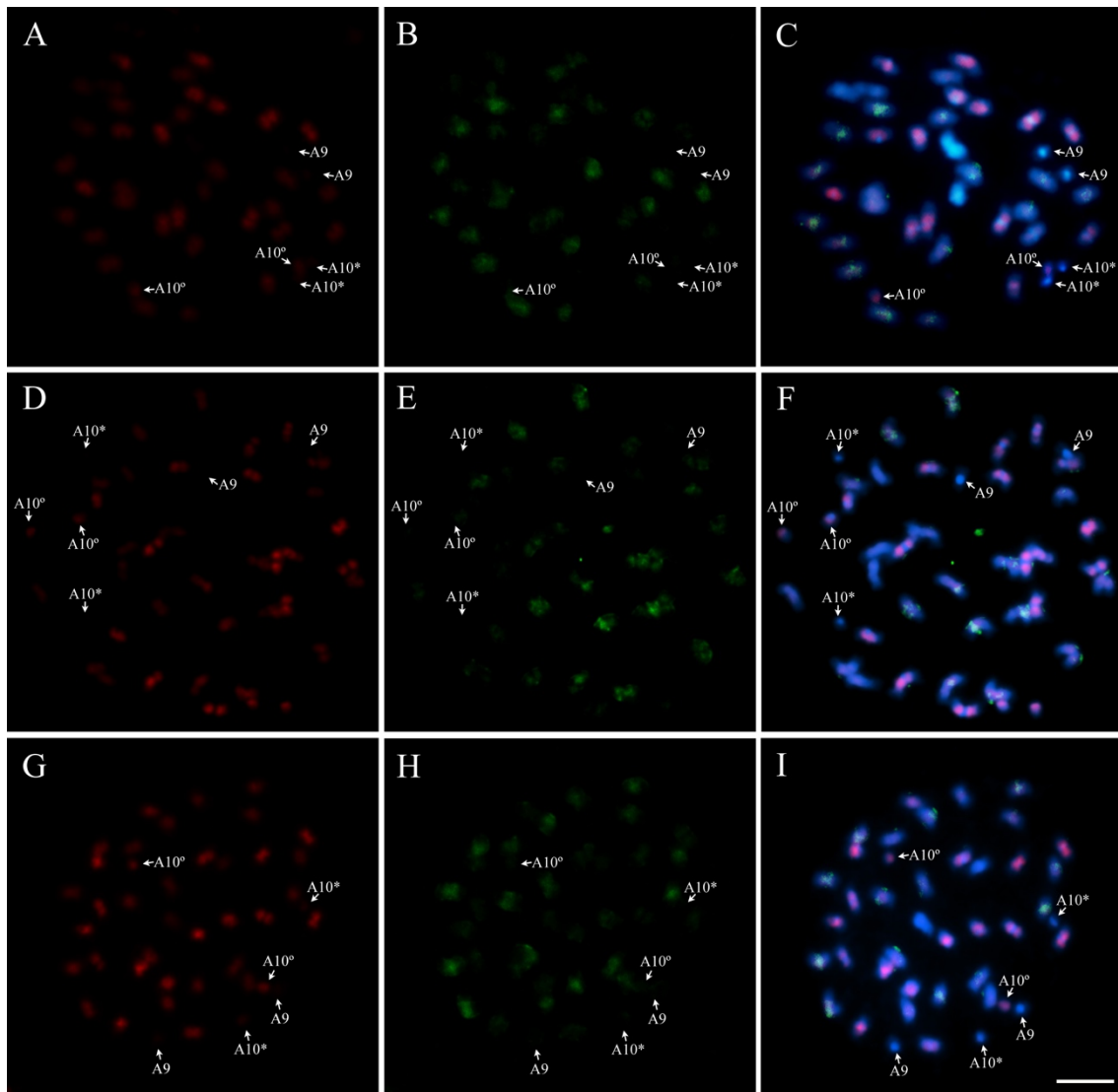


Figura 10: Duplo GISH utilizando concomitantemente as sondas genômicas de *A. stenosperma* (vermelho) e *A. magna* (verde) após contracoloração com DAPI (azul) nos cromossomos de **A/B/C** *A. hypogaea* Xingu/ Nambikwara (Of 115); **D/E/F** *A. hypogaea* subsp. *hypogaea* var. *hypogaea* (Of 120); **G/H/I** *A. hypogaea* tipo Xingu (Of 126). C/F/I Sobreposição de imagens após GISH com as duas sondas genômicas e contracoloração com DAPI (azul). A10: braço curto e segmento proximal do braço longo (*) e satélite (°). Barra: 5µm.

3.4. Distribuição de sítios de DNAr detectados por FISH

O número, tamanho e posição dos sítios de DNAr 5S foi similar nos três acessos de amendoim cultivado pelos índios (Fig. 11A), *A. hypogaea* (Fig. 11B) e *A. monticola* (Fig. 11C), com sítios localizados nas regiões proximais dos braços curtos dos pares de cromossomos A3 e B3, representando um caráter aditivo das espécies genitoras diploides, *A. duranensis* e *A. ipaënsis*, similar ao descrito para os alotetraploides espontâneos e induzidos de *Arachis* (Seijo *et al.*, 2004; Robledo *et al.*, 2009; Robledo e Seijo 2010; Nascimento *et al.*, 2018).

O número, tamanho e posição dos sítios de DNAr 45S também foram similares nos três acessos de amendoim cultivado pelos índios (Fig. 11A), *A. hypogaea* (Fig. 11B) e *A. monticola* (Fig. 11C), e da mesma forma, correspondendo ao somatório dos sítios encontrados em *A. duranensis* e *A. ipaënsis* (Seijo *et al.*, 2004; Robledo *et al.*, 2009; Robledo e Seijo 2010; Nascimento *et al.*, 2018). Os sítios de hibridização foram localizados nas regiões proximais dos braços longos dos pares de cromossomos A2 e B10; regiões proximais dos braços curtos de B3 e nas regiões terminais dos braços curtos de B7. Já em A10, os sítios estavam localizados nas regiões proximais dos braços longos e nos segmentos SAT, como indicativo de RON (Região Organizadora de Nucléolos) observada pela distensão da cromatina.

A co-localização dos sítios de DNAr 5S e 45S no par B3 foi observada nos três acessos de amendoim cultivado pelos índios (Fig. 11A), *A. hypogaea* (Fig. 11B) e *A. monticola* (Fig. 11C), assim como anteriormente descrito para esses alotetraploides e *A. ipaënsis* (Seijo *et al.*, 2004; Robledo *et al.*, 2009; Robledo e Seijo 2010).

Estes resultados estão resumidos esquematicamente no cariótipo (Fig. 12), que mostra a distribuição das bandas positivas CMA₃/DAPI e a distribuição dos sítios de DNAr 5S e 45S nos cromossomos *A. hypogaea* tipo Xingu (Of 126), representando os três acessos estudados, *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* var. *fastigiata* ‘IAC Tatu-ST’, *A. monticola* (V 14165), *A. duranensis* (V 14167), *A. stenosperma* (V 10309), *A. ipaënsis* (K 30076) e *A. magna* (K 30097).

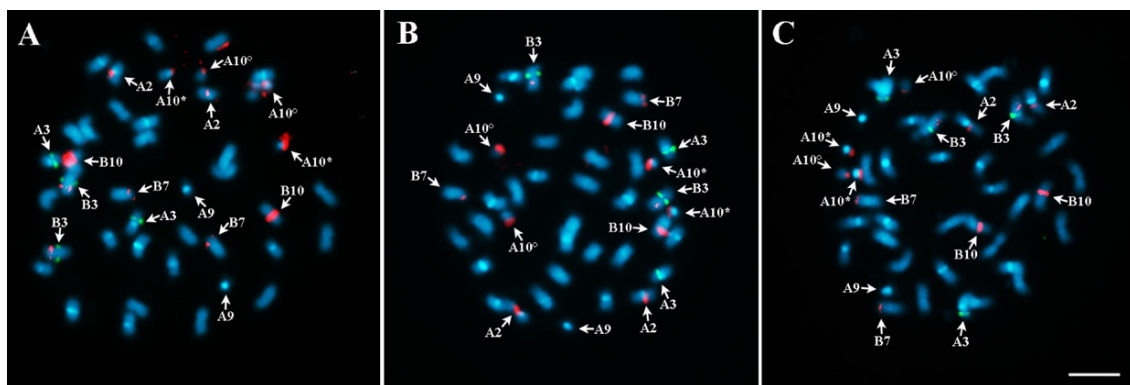


Figura 11: FISH utilizando concomitantemente as sondas de DNAr 5S (verde) e 45S (vermelho) após contracoloração com DAPI (azul). **A)** *A. hypogaea* tipo Xingu (Of 126); **B)** *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* var. *fastigiata* ‘IAC Tatu-ST’ e **C)** *A. monticola* (V 14165). B3 mostrando a co-localização de sítios de DNAr 5S e 45S; A10: braço curto e segmento proximal do braço longo (*) e satélite (°). Barra: 5μm.

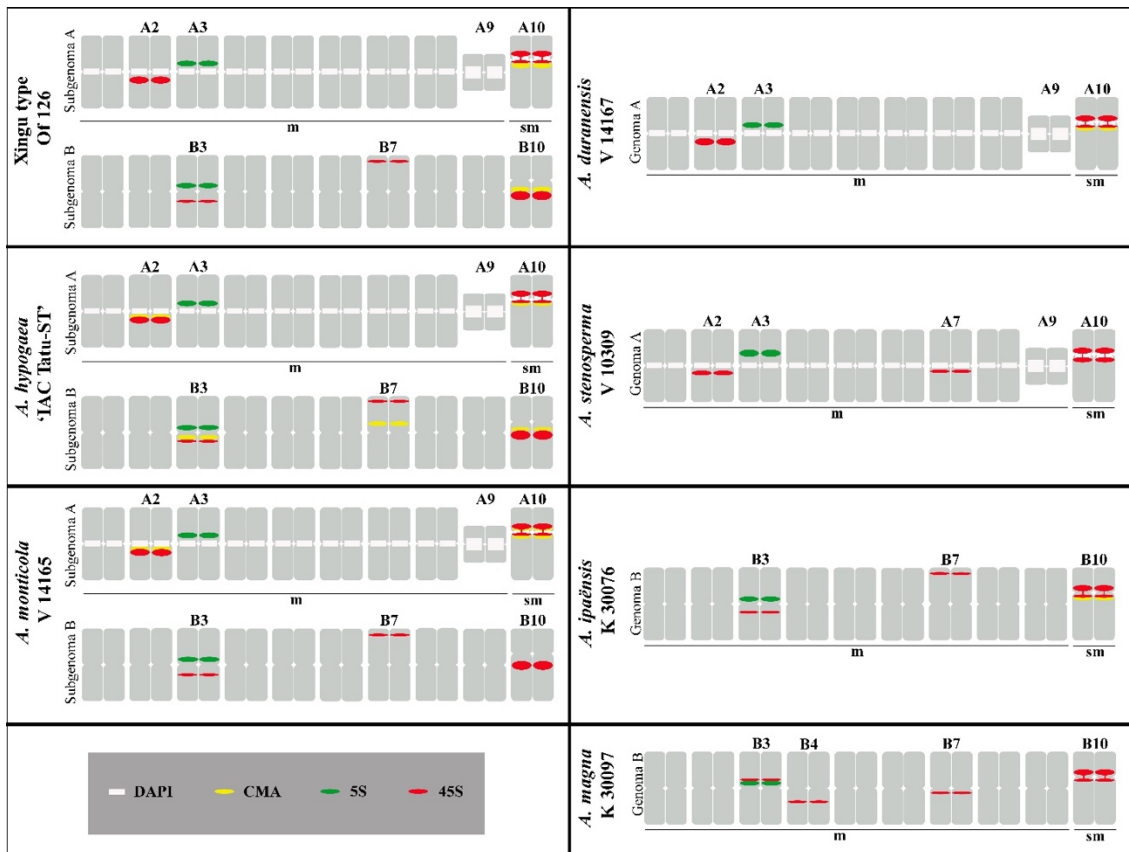


Figura 12: Diagrama esquemático dos cariótipos de *A. hypogaea* tipo Xingu (Of 126); *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* var. *fastigiata* 'IAC Tatu-ST'; *A. monticola* (V 14165); *A. duranensis* (V 14167); *A. stenosperma* (V 10309); *A. ipaënsis* (K 30076) e *A. magna* (K 30097) mostrando bandas DAPI⁺ (retângulos brancos), bandas CMA₃⁺ (elipses amarelas) e a distribuição dos sítios de DNAr 5S (elipses verdes) e 45S (elipses vermelhas). m: cromossomos metacêntricos. sm: cromossomos submetacêntricos.

4. DISCUSSÃO

Com base em marcadores microssatélites do tipo SSR, altos níveis de variação genética foram detectados nos acessos de *A. hypogaea* oriundos do Parque Indígena do Xingu (Freitas *et al.*, 2007). Nesse estudo, 31 acessos coletados na região do Parque e arredores foram classificados em três grupos de similaridade. Embora pertencendo ao mesmo grupo étnico (Kayabi), os acessos de amendoim cultivados pelas aldeias são geneticamente diferentes, sugerindo que a troca de material entre elas é extremamente rara, justificando a existência de diferentes tipos de amendoim na região (Freitas *et al.*, 2007). Apesar das diferenças morfológicas e das variações genéticas mostradas pelos marcadores microssatélites, este estudo citogenético não detectou diferenças evidentes entre os três acessos de amendoins oriundos do Parque Indígena do Xingu analisados (Of 115, Of 120 e Of 126).

O padrão de distribuição de bandas heterocromáticas DAPI⁺ detectadas nos cromossomos dos três acessos cultivados pelos índios, *A. hypogaea* 'IAC Tatu-ST' e *A. monticola*, bem como o padrão descrito anteriormente para o alotetraploide induzido IpaDur1 (Nascimento *et al.*, 2018), correspondem à soma dos padrões encontrados em *A. duranensis* e *A. ipaënsis*, sugerindo que a organização das sequências de DNA ricas em nucleotídeos A-T nos cromossomos A é mantida mesmo quando o genoma está alotetraploidizado. As bandas centroméricas DAPI⁺ são igualmente conservadas nesses alotetraploides, independente da origem (espontânea ou induzida) e do papel masculino ou feminino desempenhado pelas espécies genitoras.

A distribuição de bandas CMA₃⁺ nos cromossomos dos três acessos de amendoim cultivado pelos índios também corresponde à soma das espécies diploides, *A. duranensis* e *A. ipaënsis*, similar ao padrão encontrado também em IpaDur1 (Nascimento *et al.*, 2018). Entretanto, esse padrão difere daquele encontrado nos alotetraploides espontâneos, tanto o amendoim cultivado, quanto o silvestre *A. monticola*. Sabe-se que as bandas CMA₃⁺ estão altamente associadas ao DNAr e RONS (Schweizer 1976; Sato e Yoshioka 1984; Deiana *et al.*, 2000; Guerra 2000; Penãloza e Valls 2005; Silva *et al.*, 2010), uma vez que compreendem regiões flanqueadas por heterocromatina rica em C-G, o que explica a co-localização dessas regiões (Salvadori *et al.*, 1995; Deiana *et al.*, 2000). A associação entre DNAr e bandas CMA₃⁺ é total apenas em *A. hypogaea* 'IAC Tatu-ST', onde é evidente a correspondência entre número, posição e intensidade das bandas CMA₃⁺ e dos sítios de DNAr 45S, sugerindo o mesmo tipo de heterocromatina entre elas

(Galasso *et al.*, 1996; Cerbah *et al.*, 1998). No entanto, nem todas as regiões com heterocromatina rica em G-C reagem igualmente ao CMA₃⁺ (Schwarzacher e Schweizer 1982; Kenton 1991), como observado nos outros genótipos alotetraploides e diploides aqui estudados, onde a correspondência das bandas CMA₃⁺ e sítios de DNAr 45S são detectadas apenas quando as bandas CMA₃⁺ estão associadas a um grande sítio de DNAr 45S, correspondente a RONS.

Variações na distribuição das bandas CMA₃⁺ também foram relatadas para outras espécies de plantas e seus genótipos relacionados, revelando diferenças na heterocromatina rica em nucleotídeos G-C (Schweizer 1981; Guerra 2000; Carvalho *et al.*, 2005; Cabral *et al.*, 2006). Além disso, é reconhecido que a maioria das espécies de plantas possui pelo menos um par de cromossomos contendo RON, portanto, pelo menos um par de cromossomos exibindo bandas CMA₃⁺ correspondentes (Morawetz 1986; Röser 1994; Guerra 2000). Assim como nos três acessos de amendoim cultivado pelos índios e IpaDur1 (Nascimento *et al.*, 2018), algumas espécies como *Hedera helix* L. (König *et al.*, 1987) e *Cicer arietinum* L. (Galasso *et al.*, 1996) têm apenas um ou dois pares de bandas CMA₃⁺, em uma posição cromossômica muito semelhante à da RON, embora apresentem mais sítios de DNAr 45S.

Portanto, a ausência de correspondência total entre as bandas CMA₃⁺ e os sítios de DNAr 45S em alguns genomas de *Arachis* pode ser resultado de possíveis variações na composição das bases de DNA, afetando os padrões de fluorescência obtidos. Por exemplo, variações na acessibilidade do DNA podem resultar em distribuição diferencial de proteínas, associadas aos cromossomos e à remodelação das fibras da cromatina que podem influenciar na detecção do CMA₃⁺ (Schweizer 1981). No entanto, os sítios de DNAr 45S também podem ser muito pequenos e as bandas CMA₃⁺ correspondentes exibirem bandas com baixa intensidade que não podem ser detectadas (Zoldos *et al.*, 1999; Marcon *et al.*, 2003, 2005), como em *Citrus* L. (Carvalho *et al.*, 2005) e *Maxillaria Ruiz & Pav.* (Cabral *et al.*, 2006).

Inúmeros processos podem estar envolvidos na remodelação da cromatina. Essas alterações são principalmente determinadas por códigos epigenéticos específicos, como a metilação da citosina e alterações após a tradução das histonas (Neves *et al.*, 2005), que afetam a estrutura da cromatina e a interação com os fluoróforos (Cabral *et al.*, 2006). Como os sítios esperados de DNAr 45S foram detectados em todos os genótipos após a hibridação *in situ*, considera-se que a heterocromatina é organizada de maneira diferente

nesses genótipos de *Arachis*, onde, dependendo dos níveis de condensação, a detecção de bandas de CMA₃⁺ pode ou não ser favorecida (Schwezer 1981).

Os resultados de GISH com sondas genômicas de *A. duranensis* e *A. ipaënsis* foram similares aos anteriormente determinados para *A. hypogaea*, *A. monticola* e IpaDur1 (Seijo *et al.*, 2007; Nascimento *et al.*, 2018). A hibridização preferencial bem caracterizada de cada sonda diploide permitiu a identificação dos cromossomos dos subgenomas A e B em todos os acessos. Além disso, a sobreposição de sinais após hibridização simultânea, está de acordo com o determinado para os outros alotetraploides, refletindo a elevada presença de elementos repetitivos, compartilhados entre os subgenomas A e B (Bertioli *et al.*, 2016, 2019; Nascimento *et al.*, 2018).

Nos três acessos de amendoim cultivados pelos índios, assim como nos demais alotetraploides (Seijo *et al.*, 2007; Nascimento *et al.*, 2018), os pares de cromossomos A9 e A10, juntamente com as regiões terminais de todos os cromossomos e centrômeros dos cromossomos do subgenoma A mostram pouca afinidade com as sondas genômicas. Em A9, A10 e nas regiões terminais dos cromossomos, esse resultado pode ser reflexo do baixo conteúdo de DNA repetitivo. Como essas regiões são ricas em genes (Bertioli *et al.*, 2016), provavelmente apresentam cromatina descondensada, o que justifica a baixa intensidade de fluorescência após GISH (Seijo *et al.*, 2007; Nascimento *et al.*, 2018). Embora os centrômeros sejam as regiões mais condensadas dos cromossomos, facilitando a hibridização, as regiões centroméricas do subgenoma A de *Arachis* são evidenciadas apenas por DAPI. Os fracos sinais de hibridização nessas regiões podem estar relacionados a diferentes níveis de acessibilidade das sondas às sequências homólogas (Seijo *et al.*, 2007). A acessibilidade também depende da organização da sequência de DNA, determinada pelas famílias de sequências repetitivas de DNA organizadas em *tandem* presentes na região. É importante notar que uma exposição mais longa ao tratamento enzimático poderia melhorar a hibridização, mas de fato resultaria em uma perda considerável da morfologia cromossômica.

A hibridização simultânea com as sondas genômicas de *A. stenosperma* e *A. magna* apresentou níveis de afinidade com os cromossomos bem menor do que a observada com as sondas de *A. duranensis* e *A. ipaënsis*. Esta é uma evidência citogenética chave, que as últimas espécies citadas são as doadoras dos genomas dos acessos do Parque Indígena do Xingu, e que a contribuição de *A. stenosperma* ou *A. magna*, mesmo com semelhanças morfológicas das vagens e sementes, é muito improvável. De fato, o centro de origem de *A. stenosperma* está próximo ao Parque Indígena do Xingu e a hibridização com sua sonda

genômica mostra sinais evidentes, o que indica semelhanças entre elementos repetitivos compartilhados pelos genomas A de *A. duranensis* e *A. stenosperma* (Moretzsohn *et al.*, 2013; Shirasawa *et al.*, 2013; Bertioli *et al.*, 2013, 2016).

Além disso, a análise de afinidade usando SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) específicos de *A. stenosperma*, realizadas paralelamente às análises citogenéticas em cinco acessos do Xingu (Of 115, Of 120, Of 122, Of 126 e Of 128), *A. hypogaea* e *A. monticola* não mostrou nenhum sinal significativo com *A. stenosperma* (Nascimento *et al.*, 2020). Adicionalmente, sequências de íntrons do subgenoma A e seus homólogos no subgenoma B foram sequenciadas em sete acessos de *A. hypogaea*, representando ambas as subespécies e as seis variedades, além de um acesso coletado no Parque Indígena do Xingu (Of 122), mostrando que os subgenomas A e B de todos os genótipos analisados foram agrupados com *A. duranensis* e *A. ipaënsis*, respectivamente, e separadamente de todas as outras espécies diploides, incluindo *A. stenosperma* (Moretzsohn *et al.*, 2013). Também é importante mencionar que os padrões resultantes da recombinação entre os genomas ancestrais A e B são extremamente similares em mais de 200 genótipos de *A. hypogaea*, e outros três acessos do Xingu (Of 292, Of 299 e Of 303) (Bertioli *et al.*, 2019). Juntos, esses estudos corroboram a origem compartilhada e a similaridade entre os acessos do Xingu e os acessos representantes das duas subespécies e seis variedades de *A. hypogaea*.

Nos três acessos do Xingu, o número dos sítios de DNAr 5S corresponderam à soma dos sítios encontrados em *A. duranensis*, *A. ipaënsis*, *A. stenosperma* e *A. magna* (Seijo *et al.*, 2004; Robledo *et al.*, 2009; Robledo e Seijo 2010), com distribuição similar a do amendoim cultivado, *A. monticola* e IpaDur1 (Seijo *et al.*, 2004; Nascimento *et al.*, 2018), confirmando a estabilidade das sequências de DNAr 5S nos genomas de *Arachis*.

A distribuição dos sítios de DNAr 45S nos três acessos do Xingu, detectados nos pares de cromossomos A2, A10, B3, B7 e B10 foi similar a *A. hypogaea* e *A. monticola* (Seijo *et al.*, 2004; Nascimento *et al.*, 2018), porém diferente daquela observada em IpaDur1, onde sinais de hibridização não foram detectados em B3 e B7. A ausência de detecção de sinais de hibridização de DNAr 45S em IpaDur1 pode estar relacionada ao fato de ter como genitor materno, *A. ipaënsis*, de maneira inversa dos demais alotetraploides, cujo genitor feminino é *A. duranensis* (Nascimento *et al.*, 2018). Apesar dessa diferença, a presença da RON nos cromossomos do subgenoma A desses alotetraploides de *Arachis* corrobora a dominância nucleolar do genoma A oriundo de *A.*

duranensis após a alotetraploidização, conforme descrito anteriormente para o IpaDur1 e outros alotetraploides espontâneos de *Arachis* (Nascimento *et al.*, 2018).

Os sítios de DNAr 45S nos três acessos de amendoim cultivado pelos índios também foram similares a soma daqueles encontrados em *A. duranensis* (A2 e A10) e *A. ipaënsis* (B3, B7 e B10), mas diferente do número e localização dos sítios presentes em *A. stenosperma* (A2, A10 e A7) (Robledo *et al.*, 2009) e *A. magna* (B3, B7, B10 e B4) (Robledo e Seijo 2010). A análise citogenética anteriormente realizada em cinco acessos brasileiros de *A. magna* (V 13748, V 13765, V 14724, V 14727 e V 14750) identificou polimorfismos nos sítios de DNAr 45S (Custódio *et al.*, 2013), e esses vários padrões também diferiram do encontrado no acesso K 30097 aqui estudado. De fato, é importante ressaltar que os padrões observados nesses acessos de *A. magna* foram diferentes daqueles observados nos subgenomas B dos acessos do Parque Indígena do Xingu. Por outro lado, o acesso V 14165 de *A. monticola*, apresentou padrões de distribuição de DNAr e afinidade genômica mostrada por GISH similares aqueles previamente determinados para outros três acessos (Sn 2774, Sn 2775 e K 30062) (Seijo *et al.*, 2004). Além disso, a genotipagem (SNPs) de outros cinco acessos de *A. monticola* (Sc 21768, Sc 21769, K 30062, K 30063 e Ba 7264) (Nascimento *et al.*, 2020) confirmou a alta similaridade entre eles, sugerindo que os acessos de *A. monticola* são geneticamente muito próximos entre si, e compartilham inúmeras características, incluindo os padrões citogenéticos aqui estudados, o que permitiu a generalização da conclusão citogenética baseada em nossos experimentos com o acesso argentino de *A. monticola*.

Ao considerar outras espécies diploides de *Arachis* com genomas A e B e comparar com os acessos cultivados pelos indígenas, é possível observar diferenças na morfologia dos cromossomos; variação nas regiões heterocromáticas e cromossomos SAT (Robledo *et al.*, 2009; Robledo e Seijo 2010); número, tamanho e localização de sítios de DNAr 45S e variabilidade nas RONS (Seijo *et al.*, 2004; Robledo *et al.*, 2009; Robledo e Seijo 2010). Além disso, a baixa afinidade genômica dessas espécies diploides detectada após GISH também é observada quando hibridizada nos cromossomos de *A. hypogaea* e *A. monticola* (Raina e Mukai 1999; Seijo *et al.*, 2007), reforçando a hipótese de que *A. duranensis* e *A. ipaënsis* são de fato, as espécies mais próximas dos alotetraploides aqui estudados, assim como no amendoim cultivado e *A. monticola*.

De modo geral, a maioria das diferenças citogenéticas detectadas entre os acessos do Xingu, *A. hypogaea* 'IAC Tatu-ST' e *A. monticola* estão relacionadas à distribuição das bandas CMA₃⁺, mais especificamente nos cromossomos B3, B7 e B10, sugerindo que

o subgenoma B, herdado de *A. ipaënsis*, pode ser mais afetado pela alotetraploidização do que o subgenoma A. Diferenças nos cromossomos B3 e B7 também foram observadas no alotetraploide induzido, IpaDur1 (Nascimento *et al.*, 2018), onde os sítios de DNAr 45S não foram detectados. Além disso, os cromossomos B10 deste alotetraploide mostram um indicativo de recombinação entre os subgenomas A e B, evidenciado por um padrão mosaico de marcação após duplo GISH. Finalmente, os estudos de genotipagem via SNPs detectaram deleções e recombinações, como tetrassomia e troca de blocos de DNA e alelos intercalados ao longo dos segmentos cromossômicos entre os subgenomas alotetraploides induzidos (Bertioli *et al.*, 2019). Esses dados reforçam a ideia de que a instabilidade genômica pode estar afetando mais a reorganização dos cromossomos B.

Embora classificados como *A. hypogaea*, os acessos do Xingu apresentam características morfológicas, principalmente nos frutos, que superam a variação descrita para a espécie. Esses resultados sugerem que os acessos do Xingu experimentaram um processo distinto de evolução sob seleção artificial, em relação aos demais acessos de *A. hypogaea*, apesar de serem originários das mesmas espécies diploides, a situação taxonômica desses acessos do Xingu merece uma investigação mais aprofundada.

A hipótese de que todas as variedades e subespécies de *A. hypogaea* se originaram de um único alotetraploide, ou que poderiam ter surgido de populações alotetraploides originárias das mesmas duas espécies diploides (Seijo *et al.*, 2007, Bertioli *et al.*, 2019, 2020), é aqui reforçada. Nossos resultados sugerem fortemente a mesma origem para os diferentes acessos do Xingu e as duas subespécies de *A. hypogaea*.

Concluimos que a variabilidade morfológica existente nos três acessos do Xingu não se deve à participação de diferentes espécies diploides em sua origem, mas é principalmente resultante da plasticidade morfológica e seleção feita por esses indígenas brasileiros.

CAPÍTULO II

Alotetraploidização induzida em *Arachis*: efeitos do choque genômico revelados por citogenética molecular

1. INTRODUÇÃO

A poliploidia, determinada como a multiplicação do genoma completo, ocorreu ao longo do tempo evolutivo na maioria das angiospermas (Wendel 2015). Além disso, cerca de metade das espécies de plantas superiores sofreram eventos mais recentes de poliploidização, mostrando que é um processo naturalmente contínuo (Soltis *et al.*, 2015). Dois tipos principais de poliploidia podem ser identificados: a autopoliploidia, que consiste na duplicação do conjunto de cromossomos da própria espécie, e a alopoliploidia, onde ocorre a fusão de genomas de espécies diferentes em uma única célula, com a duplicação de todo genoma (Stebbins 1971; Wendel e Doyle 2005; Soltis e Soltis 2016).

Nas plantas, quando o novo poliploide é viável, a duplicação pela união de diferentes genomas normalmente é vantajosa, pois pode trazer a heterose (vigor híbrido) e a redundância de genes, além de proporcionar modificações fenotípicas favoráveis para maior capacidade de adaptação a novos nichos ecológicos (Comai 2005; Soltis *et al.*, 2014; Soltis e Soltis 2016; Van de Peer *et al.*, 2017). Entretanto, a alopoliploidização torna esse híbrido sexualmente incompatível com seus genitores diploides relacionados e assim, pode eventualmente induzir a especiação desse novo híbrido poliploide (Ramsey e Schemske 1998; Adams e Wendel 2005).

O genoma alopoliploide pode sofrer alterações estruturais e funcionais que podem incluir rearranjos cromossômicos, recombinações homólogas, deleções gênicas e variações epigenéticas (Soltis *et al.*, 2015; Soltis e Soltis 2016). Os efeitos dessas alterações são descritos como choque genômico (McClintock 1983). Entretanto, a maior parte dessas mudanças podem variar em diferentes poliploides, e em grande parte, ainda não foram totalmente reveladas (Soltis *et al.*, 2015).

No gênero *Arachis*, a maioria das espécies são diploides, com 20 cromossomos ($2n = 2x = 20$), enquanto o amendoim cultivado (*A. hypogaea*) e *A. monticola*, são os únicos alotetraploides da seção, com 40 cromossomos ($2n = 2x = 40$) (Krapovickas e Gregory 1994), ambos resultantes da hibridação entre as espécies silvestres diploides *A. duranensis* e *A. ipaënsis* (Seijo *et al.*, 2007; Bertoli *et al.*, 2019).

Por apresentar um genoma grande e complexo, com elevado conteúdo repetitivo, o amendoim só teve seu sequenciamento completo disponível em 2019 (Bertoli *et al.*, 2019). Apesar da alta sintenia gênica dos subgenomas A e B do amendoim com os genomas dos seus genitores diploides (Bertoli *et al.*, 2016), há indicativos de

reorganização dos seus subgenomas, sugerindo que o amendoim sofreu uma remodelação genômica, ou durante sua formação, ou ao longo de sua evolução. Sabe-se que essas alterações, em sua maioria, estão associadas com as deleções e recombinações homeólogas entre os subgenomas alotetraploides, além da dinâmica de frações de DNA repetitivas que divergiram diferentemente durante a evolução (Bertioli *et al.*, 2016, 2019; Moretzsohn *et al.*, 2013; Shirasawa *et al.*, 2013; Leal-Bertioli *et al.*, 2015, 2018).

O amendoim apresenta base genética estreita em decorrência do isolamento genético por diferença de ploidia das outras espécies do gênero, o que acarretou em limitações para o seu melhoramento genético (Simpson *et al.*, 1993; Leal-Bertioli *et al.*, 2015). Embora várias espécies diploides de *Arachis* tenham sido cultivadas antes do alotetraploide, apenas *A. hypogaea* foi completamente domesticado e disperso ao redor do mundo para se tornar uma cultura de importância mundial (Bertioli *et al.*, 2019). Isso indica que a poliploidia foi um fator positivo para a expansão de nicho e domesticação na seção *Arachis* (Marchant *et al.*, 2016).

As limitações para o melhoramento genético do amendoim em função da diferença de ploidia com as outras espécies do gênero, têm sido reduzidas por meio do uso de alotetraploides induzidos, obtidos a partir do cruzamento seguido pela duplicação de cromossomos induzida por colchicina, entre diferentes espécies silvestres diploides (Simpson *et al.*, 1993; Fávero *et al.*, 2006, 2015; Foncèka *et al.*, 2009, Leal-Bertioli *et al.*, 2015, Stalker 2017), com maior resistência a diferentes estresses bióticos e abióticos (Foncèka *et al.*, 2009; Guimarães *et al.*, 2010, 2012; Morgante *et al.*, 2013; Leal-Bertioli *et al.*, 2015; Clevenger *et al.*, 2017), facilitando a transferência de alelos, superando a limitação de compatibilidade interespecies (Simpson *et al.*, 1993).

Nesse sentido, essas plantas, além de estratégicas em programas de melhoramento genético e conseqüentemente a obtenção de cultivares com características agronomicamente desejáveis, consistem também em uma poderosa fonte de estudo dos efeitos do choque genômico após a alotetraploidização, de forma a mimetizar o que provavelmente possa ter ocorrido durante a origem espontânea do amendoim.

Alguns padrões citogenéticos foram estabelecidos para o alotetraploide induzido IpaDur1 (*A. ipaënsis* x *A. duranensis*)^{4x}, resultante da combinação entre *A. ipaënsis* e *A. duranensis* (Fávero *et al.*, 2006), que quando comparados aos padrões do amendoim cultivado revelaram diferenças na organização e composição de seus subgenomas (Nascimento *et al.*, 2018). Neste estudo, a partir de um novo alotetraploide induzido, IpaDur2 (*A. ipaënsis* x *A. duranensis*)^{4x} (Bertioli *et al.*, 2019), além de verificar as

semelhanças e diferenças com IpaDur1 e compará-las com os alotetraploides espontâneos, *A. hypogaea* e *A. monticola*, objetivou-se a determinação dos possíveis efeitos da hibridação e poliploidização a curto prazo, em uma análise que abrangeu desde a 1º geração, até a 3º de IpaDur2. Além disso, visando comprovar o sucesso da alotetraploidização induzida e analisar citogeneticamente os cromossomos dos seus subgenomas, foram avaliados outros dois alotetraploides induzidos: MagDur (*A. magna* K 30097 x *A. duranensis* K 7988)^{4x} e ValSten (*A. valida* K 30011 x *A. stenosperma* V10309)^{4x} (Gao *et al.* 2021).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Para comparação citogenética com os alotetraploides espontâneos e determinação dos possíveis efeitos da hibridação e poliploidização foram utilizadas sementes referentes a 1º, 2º e 3º geração de um novo alotetraploide induzido de *Arachis*, IpaDur2 (*A. ipaënsis* K 30076 x *A. duranensis* V 14167)^{4x} (Bertioli *et al.*, 2019), 10ª geração de IpaDur1 (*A. ipaënsis* K 30076 x *A. duranensis* V 14167)^{4x} (Fávero *et al.*, 2006), *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* var. *fastigiata* ‘IAC Tatu-ST’ e *A. monticola* (V 14165) (Fig. 13). Para avaliação do sucesso da alotetraploidização induzida de novos híbridos foram utilizadas sementes de MagDur (*A. magna* K 30097 x *A. duranensis* K 7988)^{4x} (não publicado) e ValSten (*A. valida* K 30011 x *A. stenosperma* V 10309)^{4x} (Gao *et al.* 2021) (Fig. 13). Para síntese de sondas de DNA genômico utilizadas na GISH foram utilizadas as espécies diploides *A. duranensis* (V 14167), *A. duranensis* (K 7988), *A. stenosperma* (V 10309), *A. ipaënsis* (K 30076), *A. magna* (K 30097) e *A. valida* (K 30011). As sementes foram obtidas da Coleção de Base (Colbase) de Germoplasma Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, Brasil e Universidade da Georgia (UGA), Georgia, EUA, todas listadas na tabela 2.

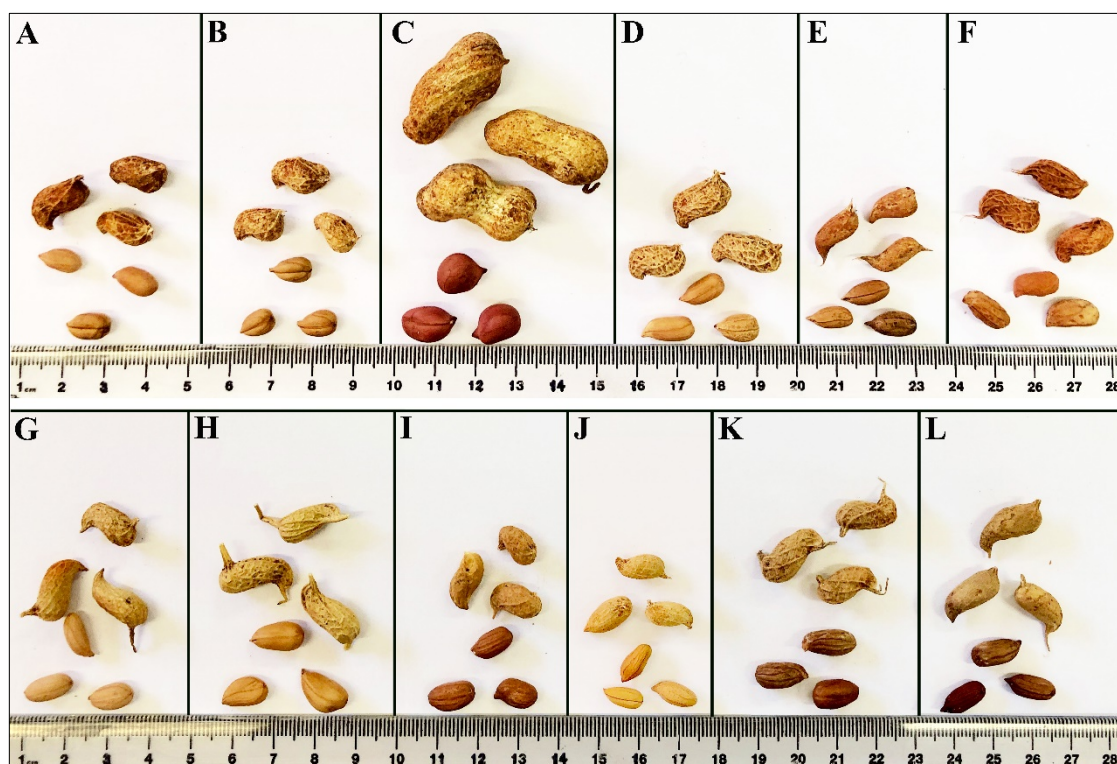


Figura 13: Sementes dos diferentes genótipos utilizados nas análises citogenéticas. **A)** IpaDur2 (*A. ipaënsis* x *A. duranensis*)^{4x}; **B)** IpaDur1 (*A. ipaënsis* x *A. duranensis*)^{4x}; **C)** *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* var. *fastigiata* ‘IAC Tatu-ST’; **D)** *A. monticola* (V 14165); **E)** *A. duranensis* (V 14167); **F)** *A. ipaënsis* (K 30076); **G)** MagDur (*A. magna* x *A. duranensis*)^{4x}; **H)** ValSten (*A. valida* x *A. stenosperma*)^{4x}; **I)** *A. magna* (K 30097); **J)** *A. duranensis* (K 7988); **K)** *A. valida* (K 30011) e **L)** *A. stenosperma* (V 10309).

Tabela 2: Genótipos de *Arachis* utilizadas no estudo, estado, número de cromossomos, fórmula genômica, acesso, origem e obtenção de sementes.

Genótipo	Estado	2n	Fórmula Genômica	Acesso	Origem	Obtenção de sementes
IpaDur2	Induzido	40	BBAA	(<i>A. ipaënsis</i> K 30076 x <i>A. duranensis</i> V 14167) ^{4x}	(Bertioli <i>et al.</i> , 2019)	Universidade da Georgia (UGA)
IpaDur1	Induzido	40	BBAA	(<i>A. ipaënsis</i> K 30076 x <i>A. duranensis</i> V 14167) ^{4x}	(Fávero <i>et al.</i> , 2006)	Colbase
MagDur	Induzido	40	BBAA	(<i>A. magna</i> K 30097 x <i>A. duranensis</i> K 7988) ^{4x}	(não publicado)	Universidade da Georgia (UGA)
ValSten	Induzido	40	BBAA	(<i>A. valida</i> K 30011 x <i>A. stenosperma</i> V 10309) ^{4x}	(Gao <i>et al.</i> 2021)	Universidade da Georgia (UGA)
<i>A. hypogaea</i> subsp. <i>fastigiata</i> var. <i>fastigiata</i>	Cultivar	40	AABB	‘IAC Tatu-ST’	Corrientes, Argentina	Colbase

<i>A. monticola</i>	Silvestre	40	AABB	V 14165	Jujuy, Argentina	Colbase
<i>A. duranensis</i>	Silvestre	20	AA	V 14167	Salta, Argentina	Colbase
<i>A. duranensis</i>	Silvestre	20	AA	K 7988	Salta, Argentina	Colbase
<i>A. stenosperma</i>	Silvestre	20	AA	V 10309	Mato Grosso, Brasil	Colbase
<i>A. ipaënsis</i>	Silvestre	20	BB	K 30076	Gran Chaco, Bolívia	Colbase
<i>A. magna</i>	Silvestre	20	BB	K 30097	Santa Cuz, Bolívia	Colbase
<i>A. valida</i>	Silvestre	20	BB	K 30011	Mato Grosso, Brasil	Colbase

Colbase: Coleção de Base de Germoplasma Vegetal de *Arachis* - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF.

2.2. Obtenção de cromossomos metafásicos

Após a germinação das sementes, a região apical das raízes, com aproximadamente 5 mm de comprimento, de pelo menos 5 plantas de cada genótipo foram isoladas, pré-tratadas com solução de 8-hidroxiquinoleína 2 mM por 3 horas, a temperatura ambiente e posteriormente incubadas em solução fixadora contendo etanol 100% e ácido acético glacial (3:1; v/v) por 1 hora, a temperatura ambiente, seguida da troca por nova solução fixadora mantida por 12 horas, a 4 °C. As amostras foram armazenadas em etanol 70% a -20 °C (Fernández e Krapovickas 1994). As pontas de raízes foram incubadas em tampão citrato de sódio 10 mM, pH 7,0 por 15 minutos, a temperatura ambiente e digeridas celuloliticamente em uma solução contendo enzimas proteolíticas (2 % de celulase “Onozuka” R-10 de *Trichoderma viride* - Serva 0,96 U/mg, cód. 16419 e 20 % pectinase de *Aspergillus niger* - Sigma 5,1 U/mg, cód. 2415), por 2 horas a 37 °C (Schwarzacher e Heslop-Harrison 2000). As células meristemáticas foram então isoladas em uma gota de ácido acético 45%, sobre uma lâmina histológica com auxílio de pinça e microscópio estereoscópico Zeiss (Zeiss, Oberkochen, Alemanha). As lâminas com os cromossomos foram analisadas em modo contraste de fase no microscópio Axioskop Zeiss (Zeiss, Oberkochen, Alemanha) e aquelas contendo ao menos cinco conjuntos completos de cromossomos em metáfase, livres de restos citoplasmáticos e com cromossomos bem espalhados foram selecionadas para

bandamento CMA₃/DAPI, FISH e GISH. As lamínulas foram removidas após imersão das lâminas em nitrogênio líquido. As lâminas secaram a temperatura ambiente por 24 horas e foram mantidas a -20 °C.

2.3. Bandamento CMA₃/DAPI

O bandamento com os fluorocromos CMA₃ e DAPI para evidenciar cromossomos com regiões heterocromáticas ricas em sequências G-C e A-T foi realizado segundo Schweizer e Ambros (1994). As lâminas selecionadas foram armazenadas em recipiente fechado por 72 horas. Posteriormente 20 µl/ lâmina da solução de CMA₃ (0,5 mg/mL) dissolvido em tampão McIlvaine pH 7,0, acrescidos de MgCl₂ 5M foram aplicados sobre as lâminas, mantidas no escuro por 1 hora. O excesso de CMA₃ foi removido com água destilada e 20 µl/lâmina de DAPI (2 µg/mL) diluído em tampão McIlvaine pH 7,0 foram aplicados sobre as lâminas, novamente mantidas no escuro por 30 minutos. O excesso de DAPI foi removido com água destilada, e então foram adicionados 20 µl/lâmina de meio de montagem Vectashild (Vector Laboratories, Burlingame, California-USA). As lâminas foram armazenadas por 72 horas a 4 °C antes das análises em microscópio epifluorescente Axiophot Zeiss (Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

2.4. Obtenção de sondas genômicas para GISH

2.4.1. Extração de DNA genômico

Com base no protocolo CTAB (Brometo de Cetil Trimetil Amônio) (Ferreira e Grattapaglia 1998) foi realizada a extração de DNA genômico a partir de folhas jovens das espécies diploides de *Arachis* (Tab. 2). Aproximadamente 200 mg de folhas foram maceradas em tubos *Eppendorf* de 2 mL contendo nitrogênio líquido. Posteriormente foram acrescentados aos tubos 700 µL de tampão CTAB 2% [CTAB 2% (p/v); NaCl 1,4 M; Tris-HCl 100 mM pH 8,0; EDTA 20 mM e β-mercaptoetanol 0,2% (v/v)], para incubação a 65 °C, por 50 minutos. Em seguida foram acrescentados 700 µL da solução de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1; v/v), misturadas até a formação de uma emulsão. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 15 minutos e a fase aquosa foi transferida para dois novos tubos *Eppendorf* de 1,5 mL. Foram então adicionados 600 µL de tampão CTAB 1% [CTAB 1% (p/v); Tris-HCl 50 mM pH 8,0 e

EDTA 20 mM], agitados e centrifugados a 13.000 rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e o precipitado dos dois tubos foi misturado com 300 µL de NaCl 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 transferido para um novo tubo. O DNA foi precipitado com 1 mL de etanol absoluto sob agitação lenta, seguido de centrifugação a 13.200 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado duas vezes com 500 µL de etanol 70%, misturado em 100 µL de água estéril contendo 0,01 mg/mL de RNase-A, e incubado a 37 °C por 10 minutos. Posteriormente os tubos foram mantidos a -20 °C. A quantificação de DNA foi realizada em gel de agarose 1% corado com *SYBR Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen, cód. 1135054) utilizando o marcador molecular *1 Kb Plus DNA ladder* (Invitrogen, cód. 1076018).

2.4.2. Síntese de sondas genômicas

Para obtenção de sondas a partir do DNA genômico das espécies diploides de *Arachis* (Tab. 1), foram utilizados 1µg de DNA purificado, marcados com digoxigenina-11-dUTP e Cy3-dUTP pelo método de *Nick Translation* com o *kit Nick Translation Mix* (Roche, cód. 11745808910). As sondas foram purificadas por precipitação etanólica e misturadas em 20 µL de água MilliQ estéril, mantidas a -20 °C.

2.5. Extração e síntese de DNAr para FISH

Clones contendo as sequências correspondentes ao DNAr 5S de *Lotus japonicus* (Pedrosa *et al.*, 2002) e 18S-5.8S-25S de *Arabidopsis thaliana* (Wanzenböck *et al.*, 1997) foram cedidas pelo Laboratório de Citogenética e Evolução Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE. A extração do DNAr foi realizada com o *kit Illustra plasmid Prep Midi Flow* (GE Heltcare, cód. 28904267) e a síntese das sondas foi realizada pelo método de *Nick Translation*, utilizando o *kit Nick Translation Mix* (Roche, cód. 11745808910), de acordo com as instruções do fabricante.

2.6. Incorporação de nucleotídeos marcados - *Dot blot*

O teste *dot blot* foi realizado segundo Brasileiro e Carneiro (2015). Um fragmento de membrana *Hybond-N+* (Amersham, Pharmacia Biotech) foi recortado e colocado em uma placa de Petri com 55 mm de diâmetro, contendo 3 mL de tampão 1 (Tris-HCl 100 mM pH 7,5 e NaCl 15 mM) por 5 minutos. A membrana foi removida e o excesso de líquido foi absorvido entre papéis filtro. 0,5 µL da sonda, em diferentes concentrações (1:10, 1:100 e 1:1000) foram aplicados à membrana, mantida em incubação à temperatura ambiente por 5 minutos. A membrana foi novamente imersa em 5 mL do tampão 1 por 1 minuto, posteriormente imersa em tampão 2 (BSA 5% 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 removido e 500 µL de solução de detecção (anticorpo anti-digoxigenina conjugado com fosfatase alcalina diluído em tampão 1 1:1000; v/v) foram adicionados à membrana, que posteriormente foi incubada a 37 °C sob leve agitação por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 5 mL de tampão 1, mantido por 10 minutos à temperatura ambiente. Após a remoção do tampão 1, 5 mL de tampão 3 (Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM; MgCl₂ 50 mM) foram adicionados à placa, mantida em incubação por mais 5 minutos. O tampão 3 foi removido e 1 mL da solução NBT/BCIP (azul nitro de tetrazólio/fosfato 5-bromo-4-cloro-3-indolil) foi adicionada à membrana, incubada por 5 minutos no escuro. A membrana foi removida da placa, lavada em água corrente e seca entre papéis filtro. A detecção dos nucleotídeos marcados foi confirmada com a observação de pontos (*dots*) na membrana *Hybond-N+*.

2.7. Hibridização *in situ* - FISH e GISH

A técnica de hibridização *in situ* foi realizada como descrito em Schwarzacher e Heslop-Harrison (2000), conforme descrito no subitem 2.8 do capítulo I. As etapas e condições de hibridização foram as mesmas para FISH e GISH, independentemente do tipo de sonda utilizada.

3. RESULTADOS

3.1. Morfologia dos cromossomos

Os cromossomos das três gerações de IpaDur2 (Fig. 14A) e a 10^a geração de IpaDur1 (Fig. 14B) foram muito similares entre si e com os alotetraploides espontâneos, *A. hypogaea* (Fig. 14C) e *A. monticola* (Fig. 14D), além de representarem a soma do observado nos genitores diploides, *A. ipaënsis* e *A. duranensis* (Seijo *et al.*, 2004; Robledo *et al.*, 2009; Robledo e Seijo 2010; Nascimento *et al.*, 2018), com 40 cromossomos, sendo 36 metacêntricos e quatro submetacêntricos.

Da mesma forma, MagDur (Fig. 14E) e ValSten (Fig. 14F) também apresentaram número e morfologia dos cromossomos equivalentes aos de seus genitores diploides (Robledo *et al.*, 2009; Robledo e Seijo 2010). Ambos apresentaram 40 cromossomos, MagDur com 36 metacêntricos e quatro submetacêntricos e ValSten com 38 cromossomos metacêntricos e dois submetacêntricos.

Em todos os genótipos o pequeno par de cromossomos A (A9) foi identificado pela alta condensação da heterocromatina, assim como A10 identificado como cromossomo SAT, ambos característicos do genoma A.

3.2. Bandamento de regiões heterocromáticas

O padrão de bandamento de regiões heterocromáticas DAPI⁺ foi detectado nas regiões centroméricas dos cromossomos correspondentes ao subgenoma A, não detectado nos cromossomos do subgenoma B de IpaDur2 (Fig. 14A), IpaDur1 (Fig. 14B), *A. hypogaea* (Fig. 14C) e *A. monticola* (Fig. 14D), assim como descrito anteriormente para as outras espécies de *Arachis* com genomas A e B (Seijo *et al.*, 2004; Robledo *et al.*, 2009; Robledo e Seijo 2010; Nascimento *et al.*, 2018).

Da mesma forma, em MagDur (Fig. 14E) e ValSten (Fig. 14F) o padrão de bandas DAPI⁺ foi detectado nas regiões centroméricas dos cromossomos correspondentes ao subgenoma A, não detectado nos cromossomos do subgenoma B (Robledo *et al.*, 2009; Robledo e Seijo 2010). Uma exceção foi observada no par B3 de ValSten, que apesar de ser um cromossomo metacêntrico do subgenoma B, exibiu uma banda DAPI⁺ na região

distal do braço curto, o que está de acordo com a descrição do cromossomo correspondente na espécie diploide *A. valida*, genitor materno (Robledo e Seijo 2010).

O bandamento CMA₃ também foi similar entre IpaDur2 (Fig. 15A) e IpaDur1 (Fig. 15B), com a presença de dois pares de cromossomos com bandas CMA₃⁺ localizadas nas regiões proximais de A10 e B10, equivalente ao observado nas espécies genitoras diploides (Nascimento *et al.*, 2018). No entanto, o padrão encontrado nesses alotetraploides induzidos diferiu do detectado em *A. hypogaea*, que além das bandas CMA₃⁺ observadas em A10 e B10, apresentou bandas adicionais em A2, B3 e B7 (Fig. 15C) e *A. monticola*, com bandas CMA₃⁺ observadas em A10, adicionais em A2 e não detectadas em B10 (Fig. 15D).

O bandamento CMA₃ detectado em MagDur (Fig. 15E) e ValSten (Fig. 15F) foi similar ao observado em IpaDur2 e IpaDur1, com bandas CMA₃⁺ observadas nas regiões proximais de A10 e B10.

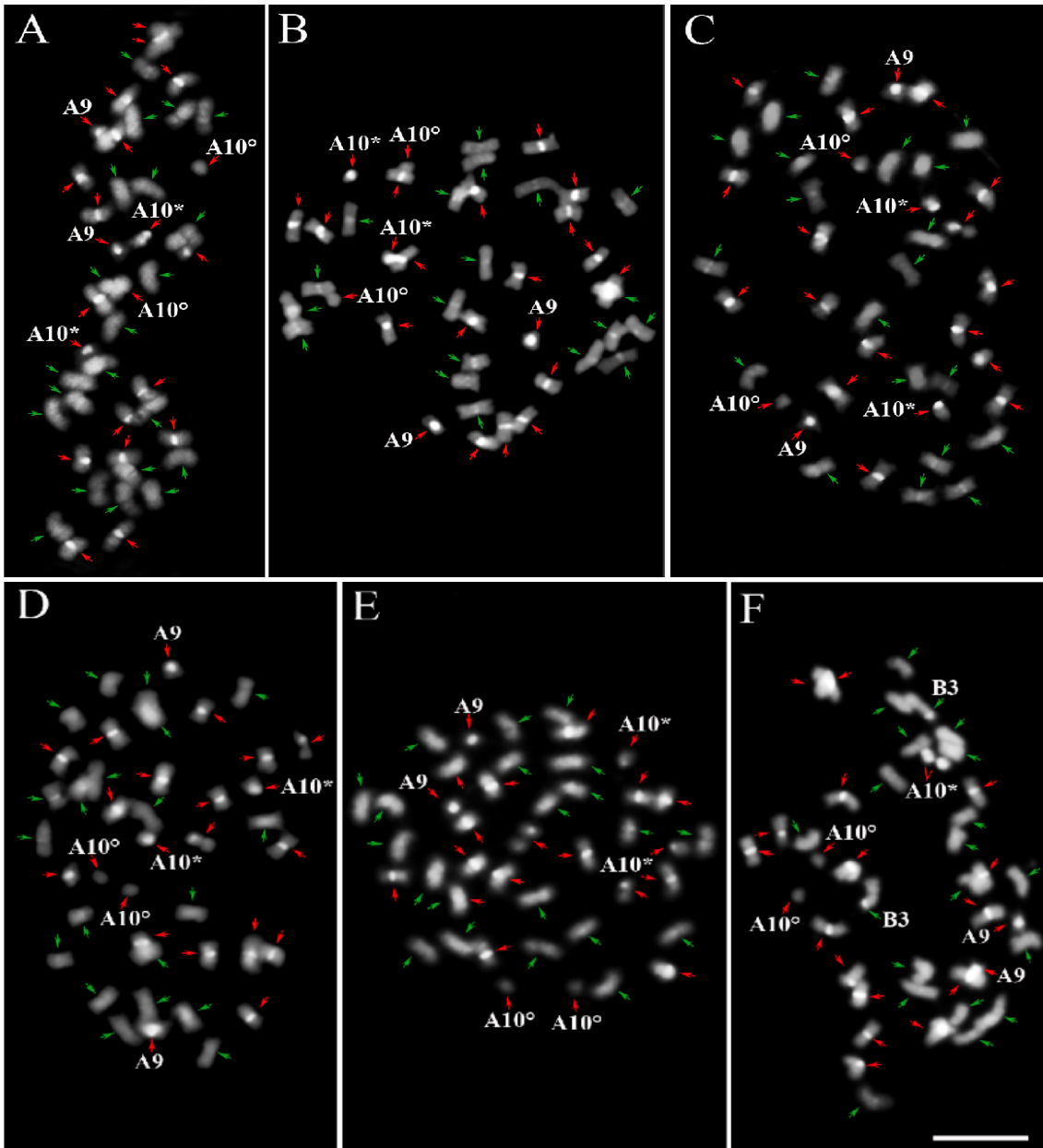


Figura 14: Cromossomos metafásicos de **A)** IpaDur2 (*A. ipaënsis* x *A. duranensis*)^{4x}; **B)** IpaDur1 (*A. ipaënsis* x *A. duranensis*)^{4x}; **C)** *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* var. *fastigiata* ‘IAC Tatu-ST’; **D)** *A. monticola* (V 14165); **E)** MagDur (*A. magna* x *A. duranensis*)^{4x} e **F)** ValSten (*A. valida* x *A. stenosperma*)^{4x} mostrando bandas DAPI⁺ (branco) nas regiões centroméricas dos cromossomos do subgenoma A (setas vermelhas), ausentes nos cromossomos do subgenoma B (setas verdes). A9: pequeno par A. A10: braço curto e segmento proximal do braço longo (*) e satélite (°). Barra: 5µm.

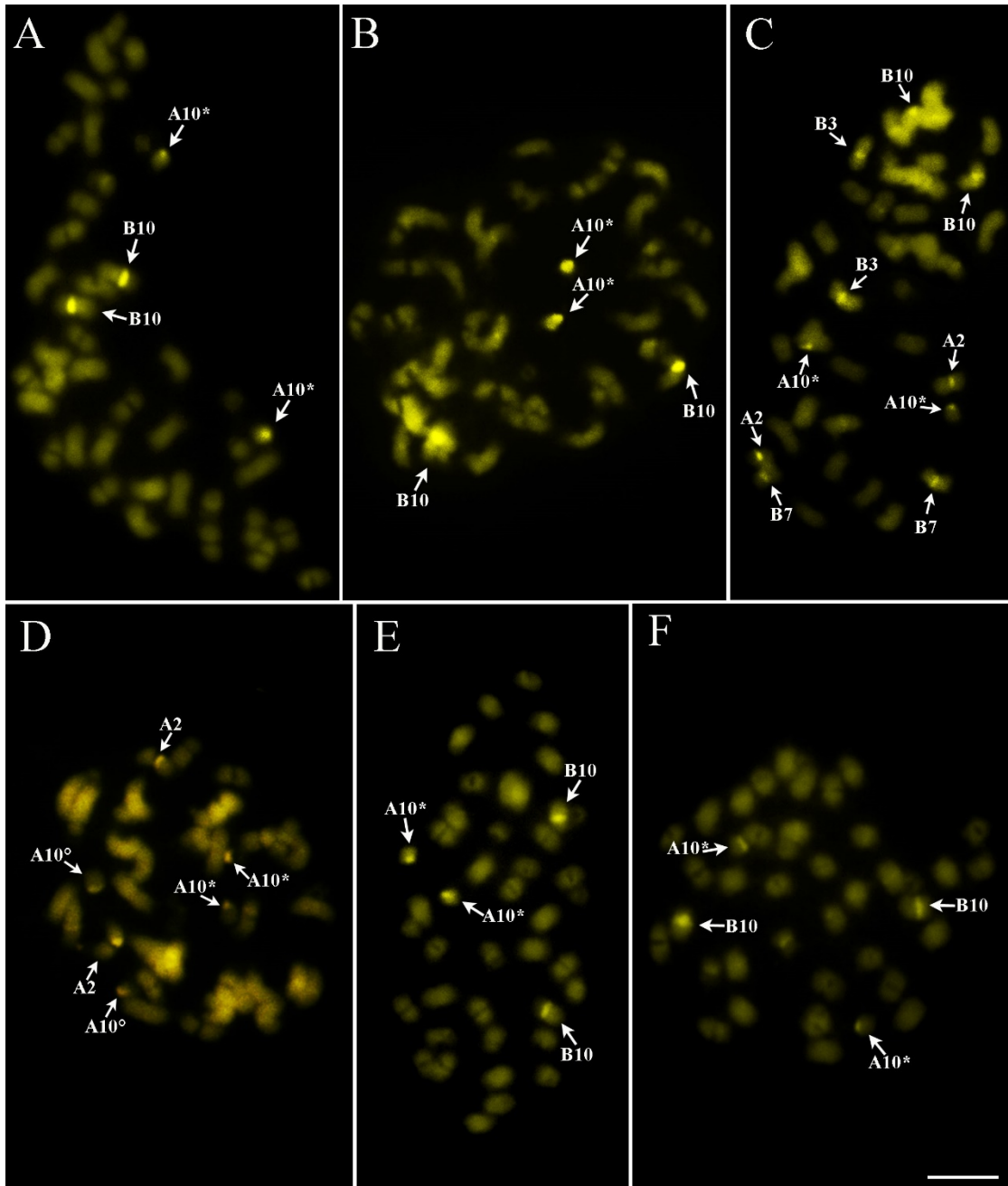


Figura 15: Cromossomos metafásicos de **A)** IpaDur2 (*A. ipaënsis* x *A. duranensis*)^{4x}; **B)** IpaDur1 (*A. ipaënsis* x *A. duranensis*)^{4x}; **C)** *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* var. *fastigiata* ‘IAC Tatu-ST’; **D)** *A. monticola* (V 14165); **E)** MagDur (*A. magna* x *A. duranensis*)^{4x} e **F)** ValSten (*A. valida* x *A. stenosperma*)^{4x} mostrando bandas CMA₃⁺ (amarelo) nas regiões proximais dos cromossomos (setas). A10: braço curto e segmento proximal do braço longo (*) e satélite (°). Barra: 5µm.

3.3. Afinidade genômica detectada por GISH

O duplo GISH realizado simultaneamente com sondas das espécies diploides *A. duranensis* (genoma A) e *A. ipaënsis* (genoma B) nos cromossomos de IpaDur2 (Figs. 16A, B e C) e IpaDur1 (Figs. 16D, E e F), confirmou a hibridização preferencial dos cromossomos do subgenoma A com as sondas de *A. duranensis*, enquanto os

cromossomos do subgenoma B apresentaram maior afinidade com as sondas de *A. ipaënsis*, similar ao detectado em *A. hypogaea* e *A. monticola* (Seijo *et al.*, 2007; Nascimento *et al.*, 2018, 2020). Nos pares de cromossomos B10 de IpaDur2 (Fig. 16C) e IpaDur1 (Fig. 16F) o padrão de hibridização detectado foi diferente dos demais, com o aspecto de coloração em mosaico, característico por apresentar um bandamento intercalado das sondas genômicas de *A. duranensis* e *A. ipaënsis*, mais evidente em IpaDur1, como descrito anteriormente em Nascimento *et al.* (2018) do que em IpaDur2.

O duplo GISH realizado simultaneamente nos cromossomos de MagDur (Figs. 16G, H e I), com sondas das espécies diploides *A. duranensis* (genoma A) e *A. magna* (genoma B) e ValSten (Figs. 16J, K e L), com sondas de *A. stenosperma* (genoma A) e *A. valida* (genoma B) confirmou a hibridização preferencial dos cromossomos dos subgenomas A com as sondas de *A. duranensis* e *A. stenosperma*, enquanto os cromossomos dos subgenomas B apresentaram maior afinidade com as sondas de *A. magna* e *A. valida*, respectivamente. Nenhum padrão de hibridização com aspecto mosaico foi observado nesses alotetraploides.

Após a GISH com sondas de seus respectivos genitores diploides, todos os alotetraploides induzidos apresentaram sinais de hibridização evidentes em todos os cromossomos, de ambos os subgenomas. Entretanto, no par A9, centrômeros dos cromossomos do subgenoma A e regiões terminais de todos os cromossomos não foi possível detectar sinais de hibridização. Além disso, sinais de sobreposição de hibridização, isto é, ambas as sondas hibridizadas com a mesma região do genoma foram observados na maioria dos cromossomos em todos os alotetraploides induzidos.

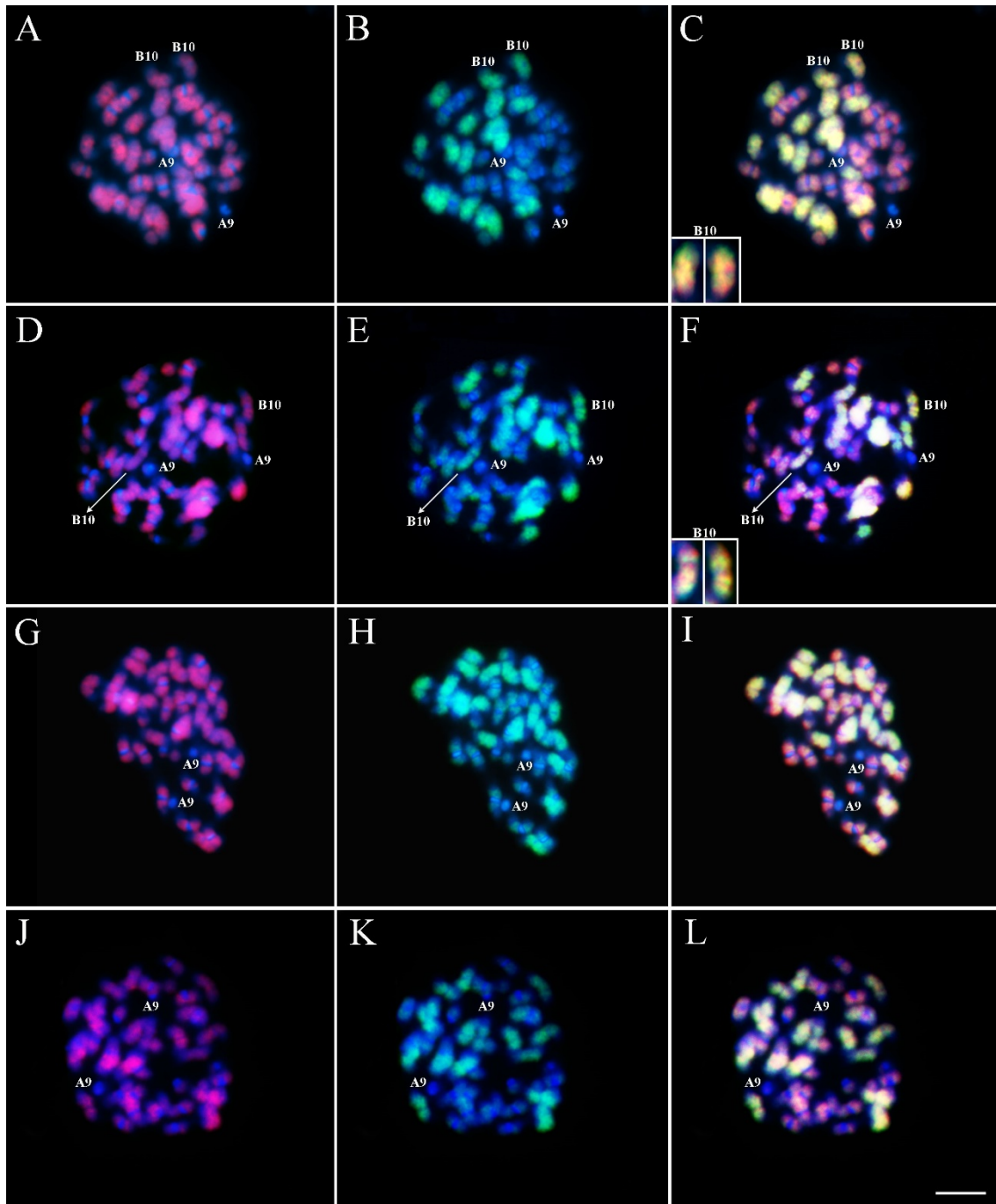


Figura 16: Cromossomos metafásicos de **A, B, C**) IpaDur2; **D, E, F**) IpaDur1; **G, H, I**) MagDur e **J, K, L**) ValSten, contracolorados com DAPI (azul) após duplo GISH utilizando concomitantemente as sondas genômicas de seus respectivos genitores diploides: *A. duranensis* V 14167 (vermelho - A e D) e *A. ipaënsis* (verde - B e E); *A. duranensis* K 7988 (vermelho - G) e *A. magna* (verde - H) e *A. stenosperma* (vermelho - J) e *A. valida* (verde - K). C, F, I, L) Sobreposição de imagens após GISH com as duas sondas genômicas e contracoloração com DAPI (azul). A9: pequeno par A; *Inset* de B10 em IpaDur2 (C) e IpaDur1 (F), mostrando o padrão de hibridização do tipo mosaico: bandamento intercalado das sondas genômicas de *A. duranensis* e *A. ipaënsis*. Barra: 5µm.

3.4. Distribuição de sítios de DNAr detectados por FISH

Em todos os alotetraploides, espontâneos e induzidos, o número de sítios de DNAr 5S foi correspondente a soma do detectado nos respectivos genitores diploides. Os sítios estavam localizados nas regiões proximais dos braços curtos dos pares A3 e B3 de IpaDur2 (Fig. 17A), IpaDur1 (Fig. 17B), *A. hypogaea* (Fig. 17C), *A. monticola* (Fig. 17D), MagDur (Fig. 17E) e ValSten (Fig. 17F), similar ao observado nos genótipos diploides e alotetraploides com genomas A e B de *Arachis* (Seijo *et al.*, 2004; Robledo *et al.*, 2009; Robledo e Seijo 2010; Nascimento *et al.*, 2018, 2020).

Após as hibridizações com as sondas de DNAr 45S o número, tamanho e posição dos sítios foram similares em IpaDur2 (Fig. 17A), *A. hypogaea* (Fig. 17C) e *A. monticola* (Fig. 17D), com cinco sítios correspondentes à soma do encontrado em *A. duranensis* e *A. ipaënsis* (Seijo *et al.*, 2004; Robledo *et al.*, 2009; Robledo e Seijo 2010; Nascimento *et al.*, 2018). Entretanto, diferente do observado em IpaDur1 (Fig. 17B), sem sítios detectados nos pares B3 e B7, como anteriormente descrito em Nascimento *et al.* (2018).

Em IpaDur2, IpaDur1 (exceto para B3 e B7), *A. hypogaea* e *A. monticola* os sítios foram localizados nas regiões proximais dos braços longos de A2 e B10, regiões proximais dos braços curtos de B3 e nas regiões terminais dos braços curtos de B7. Os pares de cromossomos A10 apresentaram sítios nas regiões proximais dos braços longos e nos segmentos SAT, como indicativo de RON, que pode ser observada pela distensão da cromatina.

É importante salientar que nem todas as metáfases de IpaDur2 analisadas apresentaram os cinco sítios esperados de DNAr 45S (equivalente ao somatório das espécies genitoras). Mesmo que oriundas da mesma raiz, algumas metáfases apresentaram apenas três sítios de DNAr 45S, assim como IpaDur1.

Assim como observado em IpaDur1 (Fig. 17B), o número de sítios de DNAr 45S em MagDur (Fig. 17E) não correspondeu a soma dos seus genitores diploides, onde, dos seis sítios esperados (quatro de *A. magna* e dois de *A. duranensis*) (Robledo *et al.*, 2009; Robledo e Seijo 2010), apenas cinco sítios foram detectados e localizados nas regiões proximais dos braços longos de A2, B3 e B10, na região intersticial do braço longo de B4 e na região proximal do braço longo e segmentos SAT de A10, enquanto nenhum sítio foi detectado em B7.

Em ValSten (Fig. 17F), o número de sítios de DNAr 45S foi um caráter aditivo de seus genitores diploides, *A. valida* e *A. stenosperma* (Robledo *et al.*, 2009; Robledo e Seijo 2010), com sítios distribuídos nas regiões proximais dos braços longos de A2, A7, B4, B7 e B10, nas regiões terminais dos braços curtos de B10 e na região proximal do braço longo e segmentos SAT de A10 (Robledo *et al.*, 2009; Robledo e Seijo 2010).

A co-localização dos sítios de DNAr 5S e 45S nos pares de cromossomos B3 foi observada IpaDur2 (Fig. 17A), *A. hypogaea* (Fig. 17C), *A. monticola* (Fig. 17D) e MagDur (Fig. 17E), similar ao observado nos genótipos diploides e alotetraploides com genoma/ subgenoma B de *Arachis* (Seijo *et al.*, 2004; Robledo *et al.*, 2009; Robledo e Seijo 2010; Nascimento *et al.*, 2018, 2020).

Esses resultados estão resumidos esquematicamente em forma de cariótipos (Fig. 18) mostrando a distribuição das bandas positivas CMA₃/DAPI e sítios de DNAr 5S e 45S nos cromossomos de IpaDur2 (*A. ipaënsis* K 30076 x *A. duranensis* V 14167)^{4x}, IpaDur1 (*A. ipaënsis* K 30076 x *A. duranensis* V 14167)^{4x}, MagDur (*A. magna* K 30097 x *A. duranensis* K 7988)^{4x}, ValSten (*A. valida* K 30011 x *A. stenosperma* V 10309)^{4x}, *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* var. *fastigiata* ‘IAC Tatu-ST’, *A. monticola* (V 14165), *A. duranensis* (V 14167) e *A. ipaënsis* (K 30076), *A. stenosperma* (V 10309), *A. valida* (K 30011) e *A. magna* (K 30097).

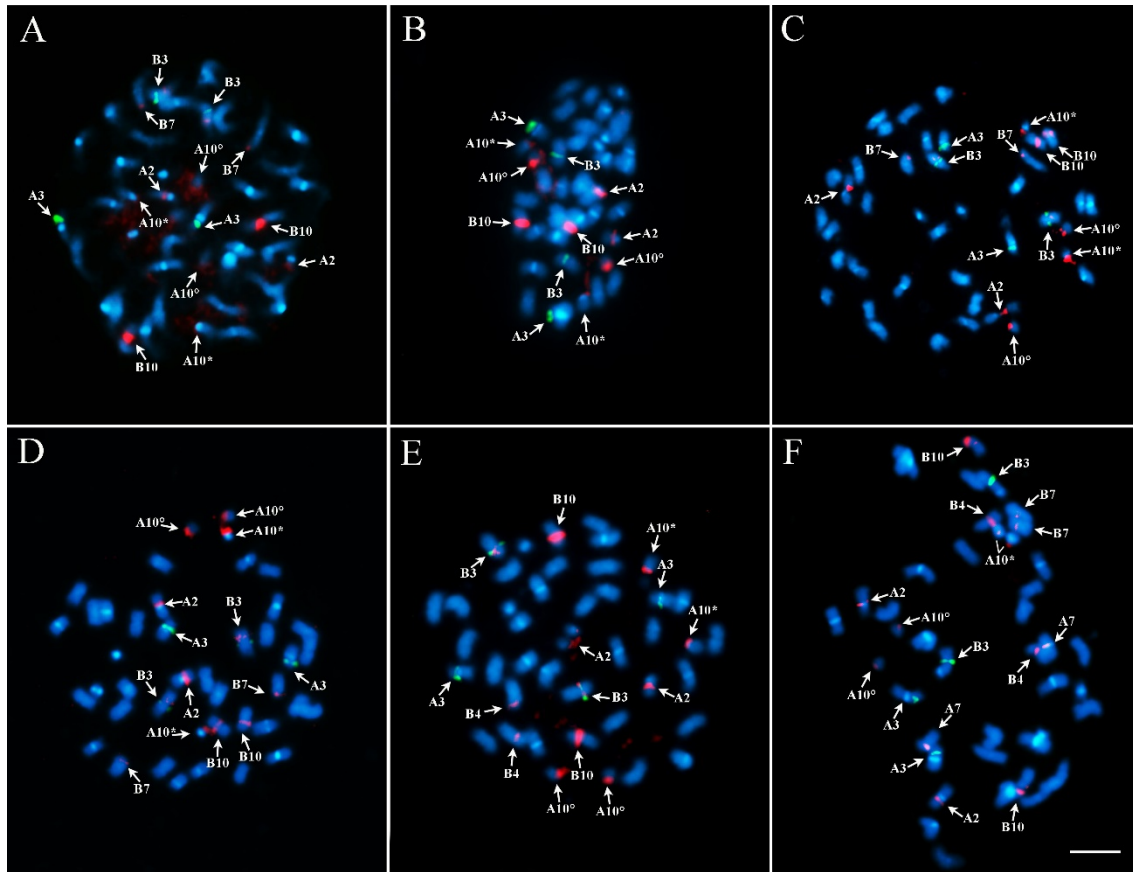


Figura 17: FISH utilizando concomitantemente as sondas de DNAr 5S (verde) e 45S (vermelho), após contracoloração com DAPI (azul). **A)** IpaDur2 (*A. ipaënsis* x *A. duranensis*)^{4x}; **B)** IpaDur1 (*A. ipaënsis* x *A. duranensis*)^{4x}; **C)** *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* var. *fastigiata* ‘IAC Tatu-ST’; **D)** *A. monticola* (V 14165); **E)** MagDur (*A. magna* x *A. duranensis*)^{4x} e **F)** ValSten (*A. valida* x *A. stenosperma*)^{4x}. A10: braço curto e segmento proximal do braço longo (*) e satélite (°). Barra: 5µm.

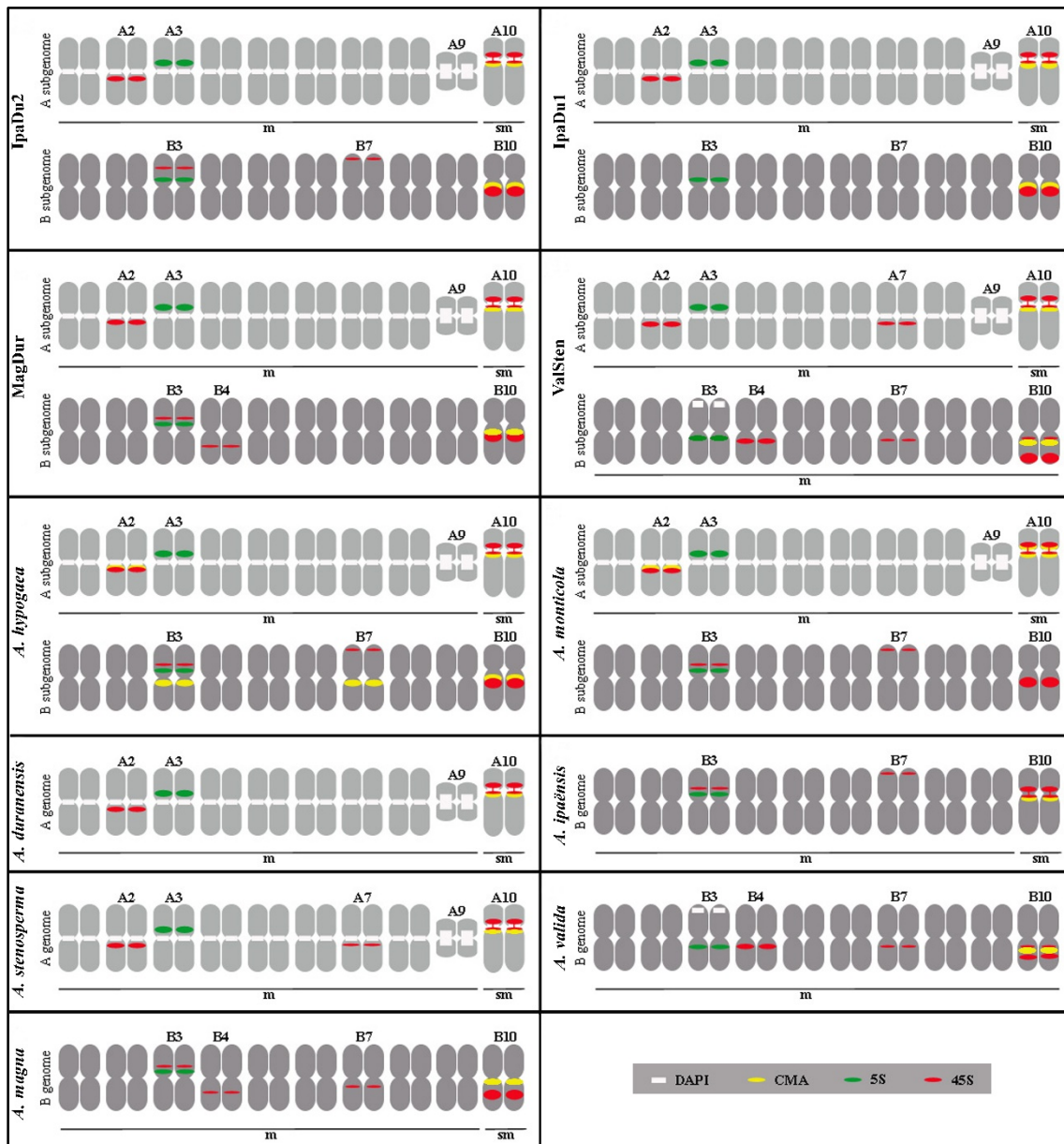


Figura 18: Diagrama esquemático dos cariótipos de IpaDur2 (*A. ipaënsis* x *A. duranensis*)^{4x}; IpaDur1 (*A. ipaënsis* x *A. duranensis*)^{4x}; MagDur (*A. magna* x *A. duranensis*)^{4x}; ValSten (*A. valida* x *A. stenosperma*)^{4x}; *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* var. *fastigiata* 'IAC Tatu-ST'; *A. monticola* (V 14165); *A. duranensis* (V 14167/ K 7988); *A. ipaënsis* (K 30076), *A. stenosperma* (V 10309); *A. valida* (K 30011) e *A. magna* (K 30097) mostrando bandas DAPI⁺ (retângulos brancos), bandas CMA₃⁺ (elipses amarelas) e a distribuição dos sítios de DNAr 5S (elipses verdes) e 45S (elipses vermelhas). m: cromossomos metacêntricos. sm: cromossomos submetacêntricos.

4. DISCUSSÃO

O amendoim cultivado (*A. hypogaea*) é um alotetraploide de origem recente com genoma AB, formado a partir das espécies diploides, *A. duranensis* (V 14167) e *A. ipaënsis* (K 30076), ambas com genomas completos sequenciados e com alta identidade genética com os subgenomas A e B do amendoim cultivado (Bertioli *et al.*, 2016, 2019). A disponibilidade de representantes tão próximos aos ancestrais do amendoim cultivado e seu uso na obtenção de aloploidos induzidos é uma ferramenta significativa que permitiu mimetizar a origem do amendoim e auxiliou na compreensão do que provavelmente ocorreu durante sua origem espontânea.

O estudo citogenético desses alotetraploides induzidos comprovou o sucesso da alotetraploidização induzida para os quatro alotetraploides induzidos: IpaDur1, IpaDur2, MagDur e ValSten, evidenciando similaridades entre eles e seus genitores diploides, confirmando a conservação da morfologia dos cromossomos em alotetraploides de *Arachis* após a poliploidização, seja ela espontânea ou induzida e independentemente do tempo de formação e domesticação.

Em todos os genótipos aqui analisados, o padrão de bandas heterocromáticas DAPI⁺ correspondeu à soma do padrão encontrado nas espécies com genoma A, o que indica a conservação da organização das sequências de DNA ricas em nucleotídeos A-T nos centrômeros dos cromossomos A.

A distribuição de bandas CMA₃⁺ nos cromossomos dos quatro alotetraploides induzidos foi similar entre eles e também correspondeu à soma daquelas encontradas nas espécies genitoras com genomas A e B, similar ao padrão encontrado anteriormente em IpaDur1 (Nascimento *et al.*, 2018). Entretanto, esse padrão diferiu do encontrado nos alotetraploides espontâneos: *A. hypogaea* e *A. monticola*, que também diferiram entre si, como demonstrado recentemente em Nascimento *et al.* (2020). Essa dissimilaridade na distribuição de bandas CMA₃⁺ entre os alotetraploides espontâneos e induzidos reflete a diferença na organização da heterocromatina, que dependendo do seu nível de condensação, não permite a detecção de bandas de CMA₃⁺ (Schwezer 1981). Essas alterações estruturais, evidentes entre o amendoim cultivado, *A. monticola* e os alotetraploides induzidos, sugere que, de alguma forma os processos de domesticação e evolução da espécie cultivada pode ter resultado na condensação de determinados segmentos, facilitando sua detecção nesses cromossomos.

A hibridização preferencial bem caracterizada de cada sonda diploide após a GISH permitiu a identificação dos cromossomos dos subgenomas A e B em todos os genótipos analisados. Além disso, esse estudo revelou possíveis efeitos do choque genômico após a alotetraploidização, detectado em diferentes indivíduos de diferentes gerações, como observado pelo padrão mosaico em IpaDur2 e IpaDur1, refletindo a recombinação entre os subgenomas A e B, confirmando a instabilidade dos subgenomas induzidos.

Por muito tempo, foi assumido que esses alotetraploides apresentavam um genoma formado pela soma de cada subgenoma A e B em partes iguais, com fórmula genômica AABB, e que o emparelhamento na meiose seria exclusivamente por cromossomos homólogos. No entanto, rearranjos genômicos com composição AAAA ou BBBB, caracterizando a recombinação homeóloga foram relatados entre os subgenomas (Leal-Bertioli *et al.*, 2015, 2018; Bertioli *et al.*, 2019). Alterações estruturais nos genomas de IpaDur1 e IpaDur2 também foram detectadas pela genotipagem via SNPs, que mostram polimorfismos significativos entre os diferentes indivíduos analisados (artigo submetido para publicação). Apesar da maioria dos loci apresentarem a composição esperada AABB, em todos os cromossomos haviam loci AAAA ou BBBB, indicando recombinação homeóloga.

Em 2008, no âmbito do Programa Desafio de Geração (www.generationcp.org), sementes de IpaDur1 foram distribuídas a diferentes grupos de pesquisa (Senegal, EUA, Argentina e Brasil), tornando-se um bem público. Com isso, estudos citogenéticos independentes foram realizados por diferentes grupos revelando diferenças em algumas análises. Um exemplo, são os resultados de Nascimento *et al.* (2018) e Seijo *et al.* (2018), onde apesar de ambos sugerirem a estabilidade macroestrutural do cariótipo, o número de sítios de DNAr 45S detectáveis foi diferente.

Nesse trabalho, foram detectadas diferenças entre IpaDur1 e IpaDur2, e até mesmo entre diferentes metáfases oriundas da mesma raiz em IpaDur2, onde algumas metáfases apresentaram apenas três sítios de DNAr 45S, assim como IpaDur1 (Nascimento *et al.*, 2018) e outras apresentaram cinco sítios, como em Seijo *et al.* (2018). Essa variação na detecção de sítios de DNAr 45S pode ser explicada pela alta instabilidade do genoma recentemente tetraploidizado, onde a remodelação da cromatina poderia alterar a detecção dos sítios após a hibridização das sondas (Liu e Wendel, 2002, 2003; Neves *et al.*, 2005). Inúmeros processos podem estar envolvidos na remodelação da cromatina. Essas alterações são principalmente determinadas por códigos epigenéticos

específicos, como metilação da citosina e alterações pós-traducionais nas histonas (Neves *et al.*, 2005), que afetam a estrutura da cromatina e a interação com os fluoróforos (Cabral *et al.*, 2006).

Essas alterações cromossômicas são consistentes com aquelas observadas em outros neopoliploides (Chester 2015; Xiong *et al.*, 2011), como já demonstrado em *Arabidopsis* (Bento *et al.*, 2015), *Triticum* (Shaked *et al.*, 2001; Eilam *et al.*, 2008) e *Brassica* (Song *et al.*, 1993), e mostram rearranjos bastante evidentes logo após sua formação ou ao longo das gerações iniciais (Buggs *et al.*, 2011; Leal-Bertioli *et al.*, 2015; Bertioli *et al.*, 2019), como aqui demonstrado. No entanto, diferem da estabilidade genômica geralmente observada em poliploides espontâneos, como em *A. hypogaea* e *A. monticola* (Nascimento *et al.*, 2018, 2020; Bertioli *et al.*, 2019). Isso leva à inferência de que a instabilidade ocorre naturalmente em gerações iniciais, mas as gerações posteriores tendem a se estabilizar (Cifuentes *et al.*, 2010).

A instabilidade do genoma levou alguns autores a considerar a poliploidia um “beco evolutivo sem saída” (Mayrose *et al.*, 2011). No entanto, está bem estabelecido que os poliploides podem sobreviver e florescer com mecanismos de controle para garantir algum nível de estabilidade do genoma para divisão e consequente fertilidade (Soltis e Soltis 2016). Em conclusão, sugere-se para a origem de *A. hypogaea* e *A. monticola*, que após a poliploidização inicial, os indivíduos resultantes passaram por um período de instabilidade genômica, possivelmente com alta variabilidade fenotípica, variando de indivíduos incapazes de produzir sementes até aqueles com variáveis genéticas estabilizadas, como observado nas primeiras gerações de IpaDur2 (artigo submetido para publicação). Nesse cenário, apenas os indivíduos viáveis fortaleceram-se após a seleção natural, resultando no alotetraploide silvestre: *A. monticola*, ou no domesticado: *A. hypogaea*.

CAPÍTULO III

Distribuição de sequências repetitivas (RT-LTR) e mapeamento de sequências gênicas em cromossomos de diferentes genótipos de *Arachis*

1. INTRODUÇÃO

O amendoim cultivado (*Arachis hypogaea*) é uma espécie alotetraploide originada a partir da hibridação entre as espécies silvestres diploides: *A. duranensis* e *A. ipaënsis* (Fernández e Krapovikas 1994; Seijo *et al.*, 2004; Bertioli *et al.*, 2016, 2019), cujo tamanho do genoma é estimado em 2,5 Gb, composto por 74% de sequências repetitivas e 26% de sequências gênicas (Bertioli *et al.*, 2019). De fato, na maioria das plantas, o genoma é representado por uma região gênica menor, enquanto a maior parte é composta por sequências repetitivas de DNA (Schmidt e Heslop-Harrison 1998).

Essas sequências são formadas em sua maioria por elementos de transposição (ETs), que apresentam capacidade de movimentação ao longo das regiões genômicas, com grande relevância na estrutura, organização e evolução dos genomas, desempenhando diversas atividades em plantas (Schulman, 2013). Dentre os ETs, os retrotransposons do tipo LTR (RT-LTR), são amplamente estudados pois são os principais contribuidores da fração repetitiva, representando até 80% de grandes genomas (Sanmiguel e Bennetzen 1998).

Diferentes técnicas citogenéticas já foram utilizadas para a caracterização cromossômica no gênero *Arachis*. Dentre elas, o bandamento C, realizado em oito espécies do gênero, incluindo *A. hypogaea*, que revelou bandas centroméricas correspondentes as regiões heterocromáticas nas diferentes espécies (Cai *et al.*, 1987), e a localização de sítios de DNAr (Seijo *et al.*, 2004; Robledo *et al.*, 2009; Robledo e Seijo 2010; Nascimento *et al.*, 2018, 2020), que juntamente com as afinidades genômicas reveladas por GISH (Raina e Mukai 1999; Seijo *et al.*, 2007; Nascimento *et al.*, 2018, 2020), contribuíram para o esclarecimento da origem da espécie cultivada.

Entretanto, os primeiros RTs do tipo LTR só começaram a ser caracterizados no genoma do amendoim a partir de 2010, 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 (Nielen *et al.*, 2010, 2012; Moretzsohn *et al.*, 2013; Bertioli *et al.*, 2016).

A estrutura genômica organizacional do amendoim também foi demonstrada através de clones BAC de *A. duranensis* hibridizados *in situ*, mostrando que a maioria do conteúdo repetitivo era explicado pelas diversas cópias de alguns RT-LTR (Bertioli *et al.*,

2013). Esse estudo, além de corroborar a sintonia gênica entre *A. duranensis* e *A. ipaënsis*, mostrou que a remodelação genômica é principalmente devida a alterações no conteúdo repetitivo (Bertioli *et al.*, 2013, 2016, 2019).

A análise *in silico* dos elementos repetitivos nos genomas dessas espécies silvestres diploides, mais especificamente dos RT-LTRs, identificou 81 famílias em *A. duranensis* e 89 em *A. ipaënsis* (Santos 2014). Alguns desses RT-LTR foram selecionados para mapeamento cromossômico no amendoim, seus genitores diploides e no alotetraploide induzido, IpaDur1 (Nascimento *et al.*, 2018), mostrando frequência e distribuição variada, corroborando o papel do DNA repetitivo nas diferenças entre sequências dos genomas A e B.

Nos últimos anos, análises citogenéticas em diferentes espécies de plantas tem fornecido informações importantes para programas de melhoramento genético de diversos grupos de plantas através da localização física de marcadores cromossômicos (Guerra *et al.*, 1997). Além disso, a caracterização de conjuntos cromossômicos por citogenética convencional, pela análise do número e morfologia dos cromossomos e pela citogenética molecular podem fornecer informações valiosas para comparar espécies ou identificar variações inter e intraespecíficas (Guerra *et al.*, 1997).

A citogenética molecular também tem permitido mapear em cromossomos de plantas, sequências gênicas, mesmo quando em cópia-única por FISH (Danilova e Birchler 2008; Lou *et al.*, 2014; Danilova *et al.*, 2014). O processo de seleção *in silico* desses marcadores a partir das sequências completas ou parciais de genomas e transcritomas e sua utilização como sondas caracteriza a citogenômica (Lilly *et al.*, 2001). Nesse contexto, buscando estabelecer o uso da citogenômica em *Arachis*, o banco de dados de transcritomas de espécies silvestres, que contém genes cuja expressão diferencial está associada à respostas a diferentes estresses (Guimarães *et al.*, 2010, 2012, 2017; Morgante *et al.*, 2013; Clevenger *et al.*, 2017; Mota *et al.*, 2018), foi aqui explorado para a seleção de genes a serem mapeados em diferentes genótipos de *Arachis* para a identificação de cromossomos, obtenção de marcadores cromossomo-específicos e expansão do conhecimento sobre a localização desses genes, contribuindo para o entendimento da estrutura e evolução dos genomas.

Foram selecionadas sequências de DNA contendo genes com expressão diferencial após a submissão da planta a diferentes estresses. Essas sequências incluem 1) o segmento genômico contendo a sequência de *AdEXLB8*, uma Expansina-like B isolada de *A. duranensis* (Guimarães *et al.*, 2017), envolvida na plasticidade da parede

celular (McQueen-Mason *et al.*, 1992) em resposta a diferentes estresses bióticos e abióticos (Brasileiro *et al.*, 2015; Marowa *et al.*, 2016); 2) dois genes do tipo NLR (Meyers *et al.*, 1999), associados à resistência ao nematoide da galha, *M. arenaria* (Guimarães *et al.*, 2010; Clevenger *et al.*, 2017; Mota *et al.*, 2018) e 3) um gene pertencente à família das Estilbenos Sintases de *A. duranensis*, aqui designado como *GES*, envolvido na defesa de plantas contra estresses bióticos e abióticos (Langcake e Pryce 1976; Sobolev *et al.*, 1995).

Análises comparativas da distribuição e especificidade de RT-LTR, juntamente com sequências gênicas nos genomas dos alotetraploides, espontâneos e induzidos e suas respectivas espécies genitoras, além de contribuir para o desenvolvimento de mapas citogenéticos, incrementam as análises citogenéticas comparativas, incluindo o desenvolvimento de novos marcadores cromossômicos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Para determinar a distribuição citogenética de sequências repetitivas de DNA do tipo RT-LTR e sequências gênicas contendo genes responsivos a diferentes estresses, sementes de *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* var. *fastigiata* ‘IAC Tatu-ST’, *A. monticola* (V 14165), IpaDur2 (*A. ipaënsis* K 30076 x *A. duranensis* V 14167)^{4x}, *A. duranensis* (V 14167), *A. stenosperma* (V 10309) e *A. ipaënsis* (K 30076) foram utilizadas. As sementes foram obtidas da Coleção de Base (Colbase) de Germoplasma Vegetal localizada na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, Brasil e Universidade da Georgia (UGA), Georgia, EUA, todas listadas na tabela 3.

Tabela 3: Genótipos de *Arachis* utilizadas no estudo, estado, número de cromossomos, fórmula genômica, acesso, origem e obtenção de sementes.

Genótipo	Estado	2n	Fórmula Genômica	Acesso	Origem	Obtenção de sementes
<i>A. hypogaea</i> subsp. <i>fastigiata</i> var. <i>fastigiata</i>	Cultivar	40	AABB	‘IAC Tatu-ST’	Corrientes, Argentina	Colbase
<i>A. monticola</i>	Silvestre	40	AABB	V 14165	Jujuy, Argentina	Colbase
IpaDur2	Induzido	40	BBAA	(<i>A. ipaënsis</i> K30076 x <i>A. duranensis</i> V14167) ^{4x}	Bertioli <i>et al.</i> , 2019	Universidade da Georgia (UGA)
<i>A. duranensis</i>	Silvestre	20	AA	V 14167	Salta, Argentina	Colbase
<i>A. stenosperma</i>	Silvestre	20	AA	V 10309	Mato Grosso, Brasil	Colbase
<i>A. ipaënsis</i>	Silvestre	20	BB	K 30076	Gran Chaco, Bolívia	Colbase

Colbase: Coleção de Base de Germoplasma Vegetal - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF.

2.2. Obtenção de cromossomos metafásicos

Após a germinação das sementes, a região apical das raízes, com aproximadamente 5 mm de comprimento, de pelo menos 5 plantas de cada genótipo foram isoladas, pré-tratadas com solução de 8-hidroxiquinoleína 2 mM por 3 horas, a temperatura ambiente e posteriormente incubadas em solução fixadora contendo etanol 100% e ácido acético glacial (3:1; v/v) por 1 hora, a temperatura ambiente, seguida da troca por nova solução fixadora mantida por 12 horas, a 4 °C. As amostras foram armazenadas em etanol 70% a -20 °C (Fernández e Krapovickas 1994). As pontas de raízes foram incubadas em tampão citrato de sódio 10 mM, pH 7,0 por 15 minutos, a temperatura ambiente e digeridas celoliticamente em uma solução contendo enzimas proteolíticas (2 % de celulase “Onozuka” R-10 de *Trichoderma viride* - Serva 0,96 U/mg, cód. 16419 e 20 % pectinase de *Aspergillus niger* - Sigma 5,1 U/mg, cód. 2415), por 2 horas a 37 °C (Schwarzacher e Heslop-Harrison 2000). As células meristemáticas foram então isoladas em uma gota de ácido acético 45%, sobre uma lâmina histológica com auxílio de pinça e microscópio estereoscópico Zeiss (Zeiss, Oberkochen, Alemanha). As lâminas com os cromossomos foram analisadas em modo contraste de fase no microscópio Axioskop Zeiss (Zeiss, Oberkochen, Alemanha) e aquelas contendo ao menos cinco conjuntos completos de cromossomos em metáfase, livres de restos citoplasmáticos e com cromossomos bem espalhados foram selecionadas para FISH. As lâminas foram removidas após imersão das lâminas em nitrogênio líquido. As lâminas secaram a temperatura ambiente por 24 horas e foram mantidas a -20 °C.

2.3. Obtenção de sondas de RT-LTR para FISH

2.3.1. Seleção de RT-LTR

Com base na distribuição *in silico* dos RT-LTR previamente identificadas em *A. duranensis* e *A. ipaënsis* (Santos 2014) foram selecionados os RT-LTR das famílias Apolo (superfamília Ty3-*Gypsy*) e Mico (superfamília Ty3-*Gypsy*). Essas famílias de RT-LTR foram escolhidas porque diferem entre si na frequência em que ocorrem nos genomas A e B de *A. duranensis* e *A. ipaënsis*. Por apresentarem sequências de DNA com alto nível de conservação entre os elementos de uma mesma família, as sequências de DNA que codificam a transcriptase reversa (TR) foram identificadas e amplificadas por

PCR para obtenção 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.

2.3.2. Amplificação por PCR da transcriptase reversa dos RT-LTR.

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

Para realizar as reações de PCR o mesmo protocolo foi utilizado para todas as TR dos RT-LTR selecionados. *Primers*: Apolo (F: GTAGAAGCTGGCAAATTCYT; R: TAAGYARYGGTGGTTGCCCCA) e Mico (F: TATTGCTATGTGGTCATGCC; R: AGGGATCTTAATGCTGATCC). No total foram utilizados 25 µL de reação de amplificação por PCR em Mastercycler (Eppendorf, USA): 2,5 µL de tampão para PCR (10%); 1 µL de MgCl₂ a 50 mM; 0,3 µL de cada primer a 10 µM; 0,3 µL de dNTPs a 10 mM, 0,15 µL de *Taq* DNA Polimerase Recombinante (Invitrogen, cód. 913878) e 1 µL de DNA molde (20 ng de DNA de plasmídeo). O ciclo utilizado em termociclador Eppendorf foi: 5 minutos a 94 °C; 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos de 49 °C a 58 °C, dependendo do par de *primers*, 30 segundos a 72 °C e 7 minutos a 72 °C. O tamanho do fragmento amplificado foi verificado por eletroforese em gel de agarose 1% corado com *SYBR Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen, cód. 2107412) 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 e Band Purification (GE Healthcare, cód. GE28-9034-70), de acordo com o protocolo do fabricante.

2.3.3. Síntese das sondas de RT-LTR

Para a obtenção de sondas de DNA marcadas a partir das sequências dos genes que codificam a TR das famílias de RT-LTR Apolo e Mico foram utilizados 1 µg de DNA purificado, marcado com digoxigenina-11-dUTP e Cy3-dUTP pelo método de *Nick Translation*, utilizando o *kit Nick Translation Mix* (Roche, cód. 11745808910). Após a marcação, as sondas foram purificadas por precipitação etanólica e misturadas em 20 µL de água MilliQ estéril, mantidas a -20 °C.

2.4. Obtenção de sondas a partir de sequências gênicas para FISH

2.4.1. Seleção de genes

Diferentes categorias de genes foram selecionadas para mapeamento citogenômico em *Arachis*. Dentre eles, o gene que codifica a Expansina-like B (*AdEXLB8*), uma *EXLB* isolada de *A. duranensis* (Brasileiro *et al.*, 2015); dois genes do tipo NLR (*NLR1* e *NLR2*) selecionados com base no transcrito de *A. stenosperma* (Mota *et al.*, 2018) e um gene pertencente à família das Estilbenos Sintases (*GES*) selecionado com base no transcrito de *A. duranensis*.

2.4.2. Síntese de sondas a partir de sequências gênicas

2.4.2.1. Segmento genômico contendo o gene *AdEXLB8*

Por ser uma sequência cópia única com tamanho pequeno (1.585 pb), conseqüentemente de difícil detecção via FISH, regiões flangeadoras livres de sequências repetitivas foram previamente estabelecidas para a sequência que codifica a Expansina-like B (*AdEXLB8*), compondo um segmento genômico com 7.559 pb, utilizado como molde para obter sonda para FISH. Essa sequência foi amplificada por PCR, utilizando os *primers* Exp_F: AGTGC GTGGCTGCTAAAAAT e Exp_R: CAAGCCGAATTCTCCATGTT. Devido ao maior comprimento do *amplicon* correspondente ao segmento genômico, a enzima *LongAmp Taq* DNA Polimerase (Invitrogen, cód. 913899) foi utilizada para amplificação dessa sequência a partir do DNA genômico isolado de *A. duranensis*.

No total foram utilizados 25 μL de reação de amplificação por PCR em Mastercycler (Eppendorf, USA). Os ciclos utilizados foram de 94 °C por 2 minutos; 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 58 °C por 30 segundos, 65 °C por 8 minutos e 65 °C por 10 minutos. O tamanho do fragmento amplificado foi verificado por eletroforese em gel de agarose 1% corado com *SYBR Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen, cód. 2107412) 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 TM PCR DNA e Band Purification (GE Healthcare, cód. GE28-9034-70), de acordo com o protocolo do fabricante.

O DNA foi então marcado com Cy3-dUTP pelo método de *Nick Translation*, utilizando o *kit* *Nick Translation Mix* (Roche, cód. 11745808910). Após a marcação, a sonda foi purificada por precipitação etanólica e misturadas em 20 μL de água MilliQ estéril, mantidas a -20 °C.

2.4.2.2. NLRs e *GES*

Diferente do gene cópia-única *AdEXLB8*, os genes *NRL1*, *NRL2* e *GES* estão organizados em *Cluster*, respectivamente e exclusivamente localizados *in silico* nas pseudomoléculas Aradu.01, Aradu.09 e Aradu.04 de *A. duranensis*, ou seja, apresentam várias cópias nessas regiões do genoma. Para a síntese das sondas a partir desses genes, suas sequências foram clonadas e amplificadas por PCR conforme descrito abaixo.

Transformação de Escherichia coli com os vetores binários dos genes NLRs e GES

Após a síntese e clonagem das sequências dos genes *NLR1*, *NLR2* e *GES* em vetores binários modelo pPZP_201BK_EGFP (Chu *et al.*, 2014) pela empresa Epoch Life Science (Texas, EUA), os mesmos foram transformados pelo método do choque térmico segundo Brasileiro e Carneiro (2015). Em tubos *Eppendorf* de 1,5 mL, o DNA plasmidial dos vetores (20 ng/ μL) foram adicionados à 50 μL de suspensão bacteriana da cepa DH10 β de *E. coli*, homogeneizados e incubados por 10 minutos a 4 °C, 1,5 minutos a 37 °C e 2 minutos a 4 °C. Posteriormente, foram adicionados 200 μL de meio LB (Luria-

Bertani) nos tubos de cada vetor, seguido por incubação a 37 °C por 25 minutos. As soluções foram inteiramente distribuídas em placas de Petri contendo meio LB sólido com estreptomicina (100mg/mL) e ampicilina (100mg/mL), para *NLR1* e *GES* e estreptomicina (100mg/mL) e canamicina (100mg/mL), para *NLR2*, posteriormente incubadas a 37 °C por 16 horas.

Seleção de cepas de E. coli transformadas

Após o crescimento das colônias bacterianas em placas de Petri contendo meio LB com agentes de seleção, colônias isoladas foram selecionadas para confirmar a transformação por PCR, realizada a partir de 1µL da suspensão de colônias isoladas diluídas em 20µL de água MilliQ, utilizadas como molde para a reação de PCR com *primers* específicos de cada gene: *NLR1* (F: TGATTATGGAGGGCGGTTAG; R: CGTGCTCTTTCCAGATCCTC), *NLR2* (F: GGCATGAGTTCCCTTCTTGA; R: CACAAGCATCACCAACATCC) e *GES* (F: TAGTAATCAGGAAGTGATTGA; R: GGAGCTCTTTCCAGATCCTC). As reações de PCR foram realizadas com a enzima *Taq* DNA Polimerase Recombinante (Invitrogen, cód. 913878) em um volume final de 25 µL. O ciclo utilizado no termociclador MasterCycler (Eppendorf, EUA) foi: 5 minutos a 94 °C; 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 56 °C, 40 segundos a 72 °C; e 5 minutos a 72 °C. O tamanho do produto de amplificação para cada colônia foi verificado por meio de eletroforese em gel de agarose 1% corado com *SYBR Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen). Após confirmação por PCR, uma colônia positiva de cada vetor foi inoculada em 3 mL de meio de cultura LB líquido contendo estreptomicina (100mg/mL) e ampicilina (100mg/mL), para *NLR1* e *GES* e estreptomicina (100mg/mL) e canamicina (100mg/mL), para *NLR2*, posteriormente incubadas a 37 °C por 16 horas. Uma alíquota de cada meio de cultura foi adicionada em glicerol 15% (v/v) e armazenada em congelador -80 °C para uso posterior. Posteriormente foi realizada extração de DNA plasmidial com o *kit illustra* plasmidPrep Midi Flow (GE Heltcare, cód. 28904267) de acordo com o protocolo do fabricante.

Amplificação por PCR e marcação das sondas

A reação de PCR foi realizada com a enzima *Taq* DNA Polimerase Recombinante (Invitrogen, cód. 913878) em um volume final de 25 µL, a partir de 1µL de DNA

plasmidial de cada gene selecionado (20 ng/ μ L), utilizado como molde para a reação com *primers* específicos para cada vetor: *NLR1* e GI (M13_F: 5'-TGTAACGACGGCCAGT-3'; M13_R: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') e *NLR2* (T7_F: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'; T3_R: 5'-GCAATTAACCCTCACTAAAGG-3'). Os ciclos utilizados foram: 94 °C por 3 minutos; 34 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 56 a 58 °C por 30 segundos, dependendo dos primers utilizados, 72 °C por 3 minutos e 72 °C por 5 minutos. O tamanho do fragmento amplificado foi verificado por eletroforese em gel de agarose 1% corado com *SYBR Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen, cód. 2107412) 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 TM PCR DNA e Band Purification (GE Healthcare, cód. GE28-9034-70), de acordo com o protocolo do fabricante.

Para a obtenção das sondas foram utilizados 1 μ g de DNA purificado marcado com digoxigenina-11-dUTP e Cy3-dUTP pelo método de *Nick Translation* com *kit* *Nick Translation* Mix (Roche cód. 11745808910). Após a marcação, as sondas foram purificadas por precipitação etanólica e misturadas em 20 μ L de água MilliQ estéril, mantidas a -20 °C.

2.5. Incorporação de nucleotídeos marcados - *Dot blot*

O teste *dot blot* foi realizado segundo Brasileiro e Carneiro (2015). Um fragmento de membrana *Hybond-N+* (Amersham, Pharmacia Biotech) foi recortado e colocado em uma placa de Petri com 55 mm de diâmetro, contendo 3 mL de tampão 1 (Tris-HCl 100 mM pH 7,5 e NaCl 15 mM) por 5 minutos. A membrana foi removida e o excesso de líquido foi absorvido entre papéis filtro. 0,5 μ L da sonda, em diferentes concentrações (1:10, 1:100 e 1:1000) foram aplicados à membrana, mantida em incubação à temperatura ambiente por 5 minutos. A membrana foi novamente imersa em 5 mL do tampão 1 por 1 minuto, posteriormente imersa em tampão 2 (BSA 5% 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 removido e 500 μ L de solução de detecção (anticorpo anti-digoxigenina conjugado com fosfatase alcalina diluído em tampão 1 1:1000; v/v) foram adicionados à membrana,

que posteriormente foi incubada a 37 °C sob leve agitação por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 5 mL de tampão 1, mantido por 10 minutos à temperatura ambiente. Após a remoção do tampão 1, 5 mL de tampão 3 (Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM; MgCl₂ 50 mM) foram adicionados à placa, mantida em incubação por mais 5 minutos. O tampão 3 foi removido e 1 mL da solução NBT/BCIP (azul nitro de tetrazólio/fosfato 5-bromo-4-cloro-3-indolil) foi adicionada à membrana, incubada por 5 minutos no escuro. A membrana foi removida da placa, lavada em água corrente e seca entre papéis filtro. A detecção dos nucleotídeos marcados foi confirmada com a observação de pontos (*dots*) na membrana *Hybond-N+*.

2.6. Hibridização *in situ*

A técnica de hibridização *in situ* foi realizada como descrito em Schwarzacher e Heslop-Harrison (2000), conforme descrito no subitem 2.8 do capítulo I. As etapas e condições de hibridização foram as mesmas, independentemente do tipo de sonda utilizada. Por pertencerem a mesma classe gênica, os genes *NLR1* e *NLR2* foram hibridizados concomitantemente.

3. RESULTADOS

3.1. Distribuição citogenética de RT-LTR

As hibridizações com as sondas correspondentes às TRs dos RT-LTR pertencentes as famílias Apolo e Mico geraram sinais distribuídos nos cromossomos de todos os genótipos analisados, claramente mais abundantes e evidentes após a hibridização com Apolo, em acordo com a frequência estimada *in silico* no genoma de *A. duranensis* e *A. ipaënsis* (Santos 2014).

A sonda Apolo, hibridizada nos cromossomos de *A. duranensis* (Fig. 19A) e *A. ipaënsis* (Fig. 19B) mostrou sinais difusos e distribuídos em todos os cromossomos, entretanto mais evidentes em alguns pares. Os sítios de hibridização estavam localizados preferencialmente ao longo dos braços dos cromossomos. Nos alotetraploides, *A. hypogaea* (Fig. 19C) e IpaDur2 (Fig. 19D), os sinais de hibridização foram pontuais e evidentes, localizados nas regiões proximais dos cromossomos do subgenoma A e difusos e escassos nos cromossomos do subgenoma B.

A sonda Mico, hibridizada nos cromossomos *A. duranensis* (Fig. 20A) mostrou sinais pontuais e distribuídos em todos os cromossomos, entretanto mais evidentes em alguns pares. Os sítios de hibridização estavam localizados preferencialmente ao longo dos braços dos cromossomos. Já em *A. ipaënsis* (Fig. 20B), os sinais foram difusos, também distribuídos na maioria dos cromossomos e localizados preferencialmente ao longo dos braços. Em *A. hypogaea* (Fig. 20C), os sinais de hibridização foram pontuais e localizados nas regiões proximais da maioria dos cromossomos do subgenoma A, e difusos e escassos nos cromossomos do subgenoma B. Em IpaDur2 (Fig. 20D), os sinais de hibridização foram pontuais e localizados nas regiões proximais de apenas dois pares de cromossomos do subgenoma A, não detectados nos cromossomos do subgenoma B.

Importante ressaltar que, após as hibridizações com as sondas Apolo e Mico nos cromossomos dos dois alotetraploides analisados (*A. hypogaea* e IpaDur2), o padrão de hibridização não foi equivalente ao observado em seus genitores diploides. Notavelmente, as duas sondas mostraram sinais mais evidentes no subgenoma A, com uma redução de sinais no subgenoma B, quando comparado ao genoma B de *A. ipaënsis*.

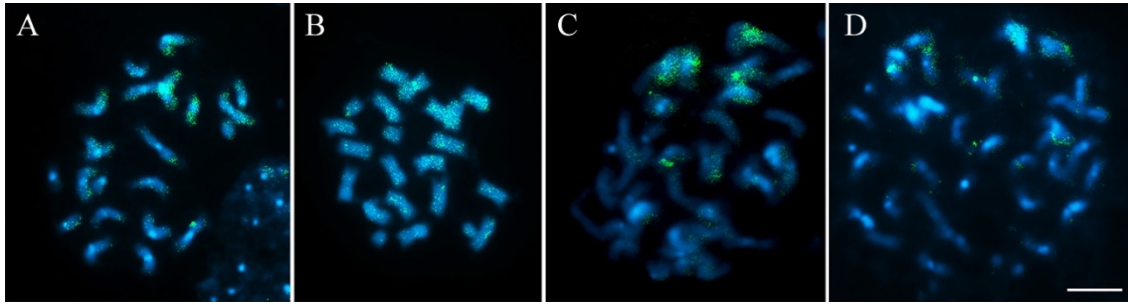


Figura 19: Cromossomos metafásicos de **A)** *A. duranensis*; **B)** *A. ipaënsis*; **C)** *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* var. *fastigiata* ‘IAC Tatu-ST’ e **D)** IpaDur2 contracolorados com DAPI (azul) após hibridização com a sonda do RT-LTR Apolo (verde) mostrando sinais difusos e pontuais, distribuídos nos cromossomos dos genomas e subgenomas A e B. Barra: 5µm.

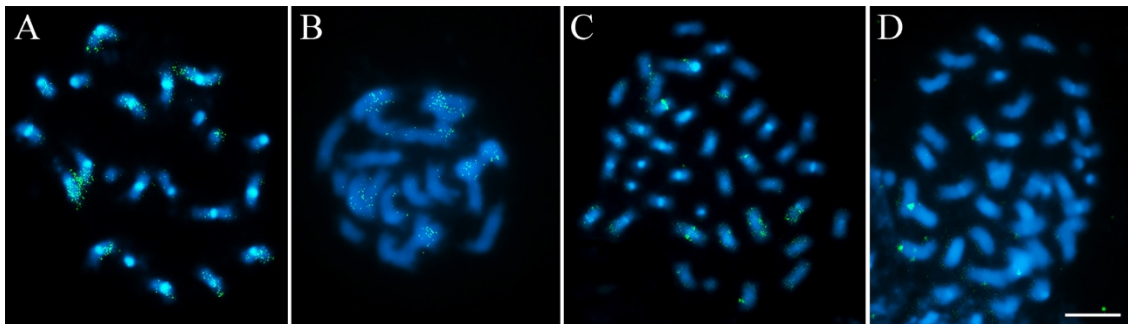


Figura 20: Cromossomos metafásicos de **A)** *A. duranensis*; **B)** *A. ipaënsis*; **C)** *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* var. *fastigiata* ‘IAC Tatu-ST’ e **D)** IpaDur2 contracolorados com DAPI (azul) após hibridização com a sonda do RT-LTR Mico (verde) mostrando sinais difusos e pontuais, distribuídos nos cromossomos dos genomas e subgenomas A e B. Barra: 5µm.

3.2. Mapeamento de sequências gênicas

3.2.1. Segmento genômico contendo o gene *AdEXLB8*

Nos cinco genótipos analisados: *A. duranensis* (Fig. 21A), *A. stenosperma* (Fig. 21B), *A. ipaënsis* (Fig. 21C), *A. hypogaea* ‘IAC Tatu-ST’ (Fig. 21D) e IpaDur2 (Fig. 21E), foi detectado um único sítio de hibridização, localizado na região distal do braço longo dos pares de cromossomos A5, para os genótipos com genoma/subgenoma A e nos pares B5 para o genoma B de *A. ipaënsis*. Nenhum sinal de hibridização foi detectado nos cromossomos B5 dos alotetraploides.

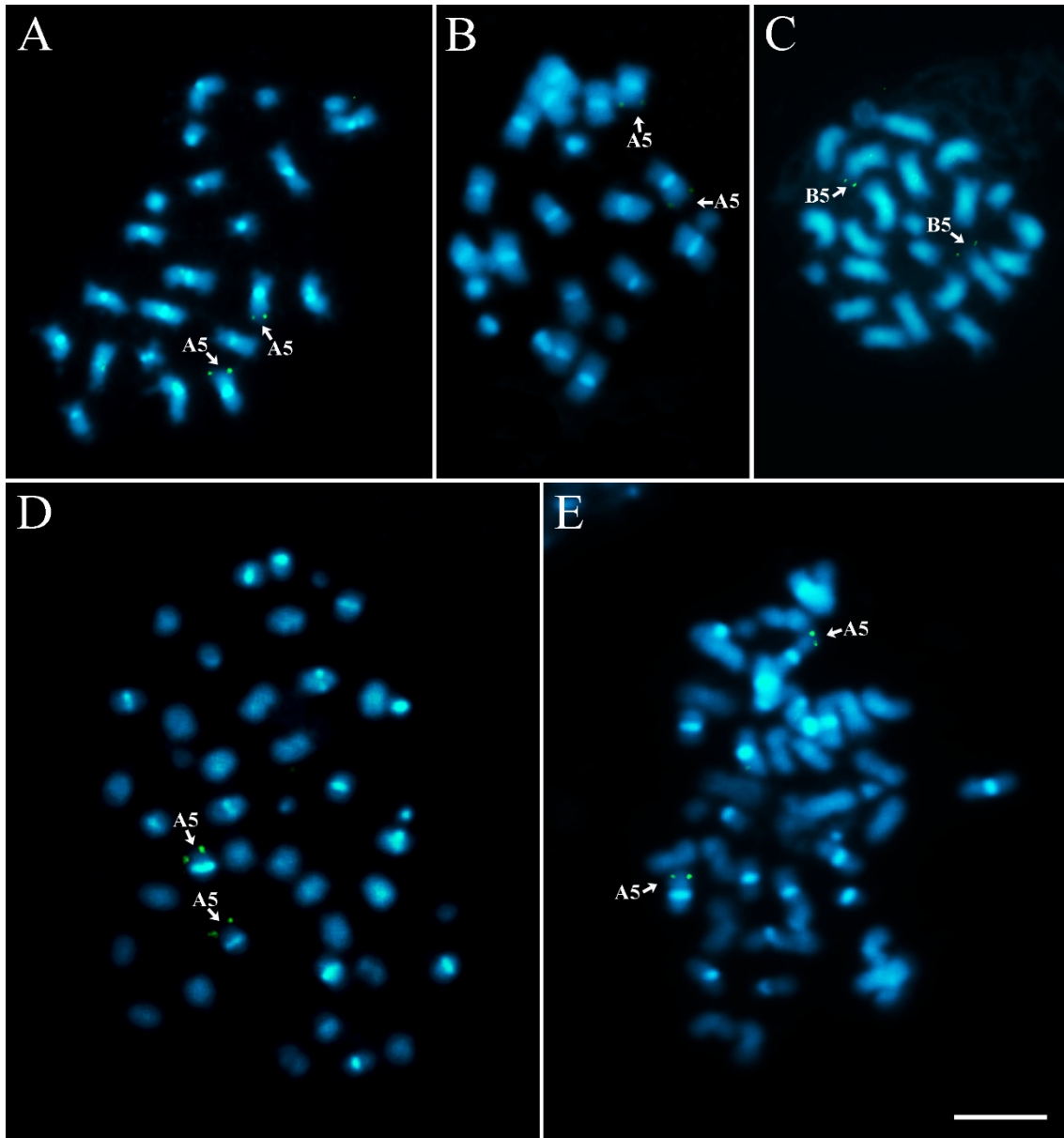


Figura 21: Cromossomos metafásicos de **A)** *A. duranensis*, **B)** *A. stenosperma*, **C)** *A. ipaënsis*, **D)** *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* var. *fastigiata* 'IAC Tatu-ST' e **E)** IpaDur2 contracolorados com DAPI (azul) após hibridização com a sonda do segmento genômico que contém a sequência gênica cópia única de *AdEXLB8* (verde) localizada nos pares de cromossomos A5, para os genótipos com genoma/subgenoma A e B5 para o genoma B de *A. ipaënsis*. A5: Aradu.A05. Barra: 5µm.

3.2.2. Genes NLRs

As hibridizações utilizando concomitantemente as sondas dos genes *NLR1* (Fig. 22A) e *NLR2* (Fig. 22B) foram realizadas nos cromossomos de *A. duranensis*, respectivamente localizados *in silico* em *Clusters* nas pseudomoléculas Aradu.A01 e Aradu.A09. Após as hibridizações foi possível detectar a presença de sinais dispersos, localizados nos braços da maioria dos cromossomos, entretanto com dois pares destacados por apresentarem sinais mais evidentes nas regiões proximais.

Com base na distribuição *in silico* das sequências desses genes, nomeamos citogeneticamente esses pares de cromossomos como A1, para *NLR1* (Fig. 22A) e A6, para *NLR2* (Fig. 22B). Uma observação deve ser feita para *NLR2*, onde a correspondência numérica entre os cromossomos *in situ* e *in silico* não é possível, uma vez que o cromossomo A9 em citogenética, denominado como pequeno par A, é facilmente identificado morfologicamente e não corresponde a identificação *in silico* como Aradu.A09, e sim como Aradu.A08. Dessa forma, após as hibridizações *in situ*, determinamos que *NLR2* não está localizado em A9 e também não corresponde a Aradu.A08 (equivalente a A9) e Aradu.A09, portanto aqui determinado como A6.

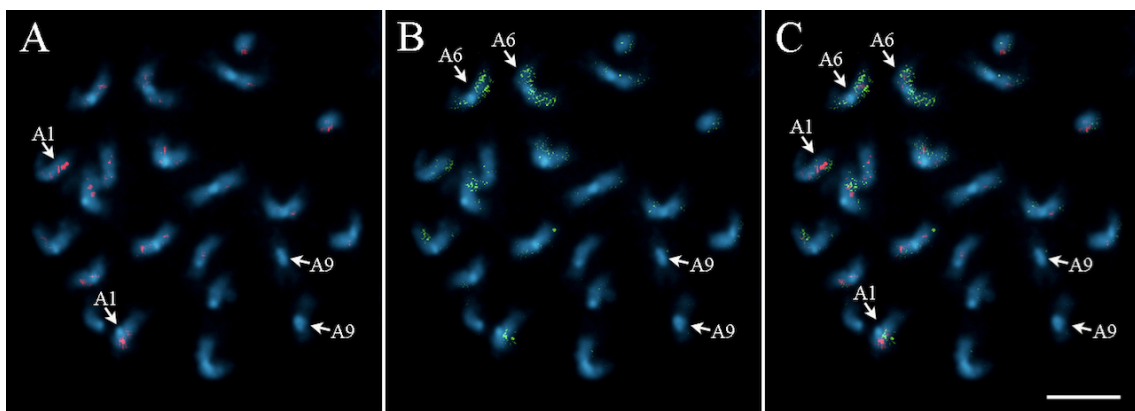


Figura 22: Cromossomos metafásicos de **A, B e C)** *A. duranensis* contracolorados com DAPI (azul) após hibridização concomitante com as sondas de *NLR1* (A- vermelho) e *NLR2* (B- verde). **C)** Sobreposição de imagens após FISH com as duas sondas NLRs e contracoloração com DAPI (azul). A1: *NLR1* (Aradu.A01); A6: *NLR2* (Aradu.A09) e A9: Aradu.A08. Barra: 5µm.

3.2.3. *GES*

As hibridizações com a sonda do gene pertencente à família das Estilbenos Sintases (*GES*) foram realizadas nos cromossomos de *A. duranensis*, localizado *in silico* em um *Cluster* na pseudomolécula Aradu.A04. Após as hibridizações foi possível detectar um único sítio localizado na região proximal do braço curto de A4 (Figs. 23A e B), assim designado citogeneticamente com base na distribuição *in silico* das sequências desse gene.

Estes resultados incrementam o cariótipo de *Arachis*, principalmente para as espécies com genoma A, através do estabelecimento de dois novos marcadores cromossomo-específicos a partir de sequências gênicas (*AdEXLB8*: cromossomo 5 e *GES*: cromossomo 4), resumidos esquematicamente na figura 24, que também mostra a distribuição das bandas positivas CMA₃/DAPI (Nascimento *et al.*, 2018, 2020) e os sítios de DNAr 5S e 45S (Seijo *et al.*, 2004; Nascimento *et al.*, 2018) nos cromossomos de *A. duranensis* (V 14167).

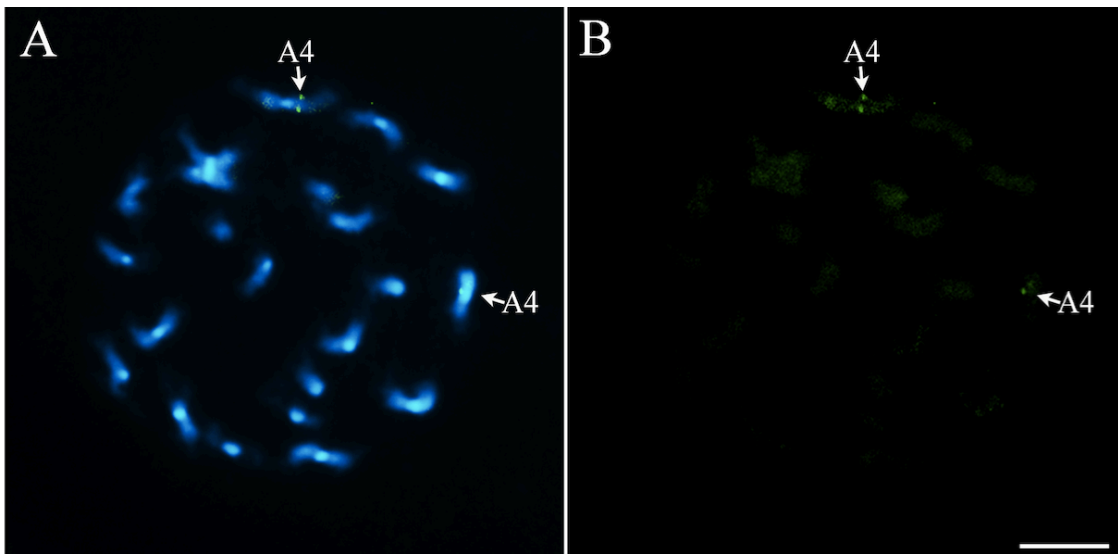


Figura 23: Cromossomos metafásicos de A/B) *A. duranensis* contracolorados com DAPI (azul), após hibridização com a sonda do gene pertencente à família das Estilbenos Sintases (*GES*) (verde) mostrando um único sítio de hibridização localizado em A4: Aradu.A04. Barra: 5µm.

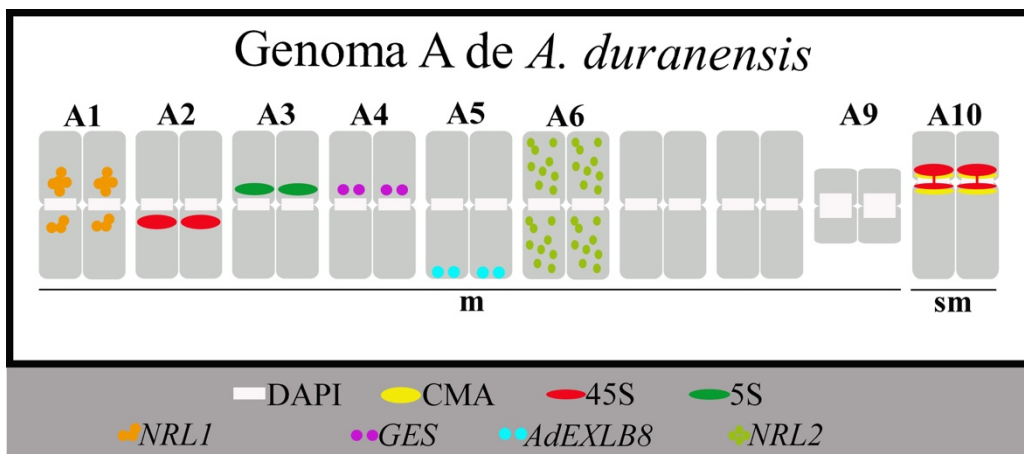


Figura 24: Diagrama esquemático do cariótipo de *A. duranensis* (V 14167) mostrando bandas DAPI⁺ (retângulos brancos), bandas CMA₃⁺ (elipses amarelas), a distribuição dos sítios de DNAr 5S (elipses verdes) e DNAr 45S (elipses vermelhas) e a localização do segmento genômico contendo *AdEXLB8* e das sequências gênicas de *NLR1*, *NLR2* e *GES*. m: cromossomos metacêntricos. sm: cromossomos submetacêntricos.

4. DISCUSSÃO

Elementos de transposição são frações de DNA repetitivo, geralmente localizadas em regiões heterocromáticas, sendo os principais responsáveis pelas variações nos tamanhos dos genomas (Sanmiguel e Bennetzen 1998), que apresentam intensa atividade após a alotetraploidização, podendo provocar desde o aumento do número de cópias, até mesmo uma redução do número de suas sequências (Nielen *et al.*, 2012; Bertoli *et al.*, 2016).

As análises *in situ* dos RT-LTR Apolo e Mico, confirmaram a frequência previamente determinada *in silico* nos genomas de *A. duranensis* e *A. ipaënsis*, onde Apolo é a família mais abundante nesses genomas, com frequência similar entre eles (2,3% no genoma A e 2,06% no genoma B) e Mico, menos frequente que Apolo, porém com frequência também similar nos dois genomas: A (0,77%) e B (0,72%).

A distribuição citogenética de Apolo e Mico nos cromossomos de *A. hypogaea* e IpaDur2 sugerem um caráter não aditivo da distribuição desses RT-LTR observada em *A. duranensis* e *A. ipaënsis*. Notavelmente, ambos alotetraploides mostraram sinais mais evidentes no subgenoma A, com redução de sinais visíveis no subgenoma B. Sugerindo a redução desses RT-LTR no subgenoma B após a alotetraploidização. Diferenças na distribuição de sequências repetitivas são frequentemente reportadas entre os cromossomos dos subgenomas A e B de *Arachis*, possivelmente resultantes da atividade diferencial de transposição desencadeada após a alotetraploidização, espontânea ou induzida, corroborando que os retrotransposons, principalmente os do tipo LTR, possuem um papel importante na remodelação dos genomas de *Arachis* (Nielen *et al.*, 2012; Moretzsohn *et al.*, 2013; Bertoli *et al.*, 2016, 2019; Nascimento *et al.*, 2018).

A citogenética molecular, a partir do mapeamento de sequências gênicas tem sido uma ferramenta capaz de responder diferentes questões relacionadas à estrutura e evolução dos genomas (Danilova *et al.*, 2014; Jiang 2019). O mapeamento de sequências gênicas com expressão diferencial associada à repostas a diferentes estresses em cromossomos de *Arachis*, além de estabelecer o uso da citogenômica gênero e ampliar conhecimento sobre a localização dessas sequências nos genomas, forneceu marcadores cromossomo-específicos e permitiu a anotação mais assertiva das pseudomoléculas através da correspondência *in silico* e *in situ*.

Os resultados obtidos a partir das hibridizações de diferentes sequências gênicas corroboram de forma mais refinada e específica suas localizações previamente determinadas *in silico*, em particular para a Expansina-like B (*AdEXLB8*), determinada para o genoma A de *A. duranensis*, genoma B de *A. ipaënsis* e subgenoma A de *A. hypogaea*. A ausência de hibridização nos cromossomos B5 dos alotetraploides sugere que, após a alotetraploidização possa ter ocorrido uma possível reorganização estrutural na região desse segmento, dificultando sua detecção após a FISH, já que a sequência de *AdEXLB8* é encontrada nas análises *in silico* do subgenoma B.

Além disso, genes silenciados de um ou de ambos os genitores em alotetraploides são frequentes (Soltis e Soltis 2016; Loyd e Bomblies 2016). Alterações no genoma alopoliploide podem ocorrer pela redução do número de cópias dos 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).

De fato, o subgenoma B, herdado de *A. ipaënsis*, mostra-se mais vulnerável a alterações após a alotetraploidização do que o subgenoma A. Alterações no subgenoma B foram anteriormente detectadas em IpaDur1, revelando diferenças em alguns aspectos da organização e composição do genoma, como a recombinação entre os subgenomas A e B demonstrada via GISH nos cromossomos B10 e a perda de sítios de DNAr 45S em B3 e B7 (Nascimento *et al.*, 2018). Diferenças nos padrões de distribuição de bandas heterocromáticas CMA₃⁺, mais especificamente não detectadas nos cromossomos B3, B7 e B10 também foram observadas em alguns acessos indígenas de *A. hypogaea* e *A. monticola*, reforçando a instabilidade do subgenoma B (Nascimento *et al.*, 2020). Além disso, a genotipagem via SNPs (Bertioli *et al.*, 2019) revelou deleções e recombinações, como tetrassomia e troca de blocos de DNA ao longo dos segmentos cromossômicos, entre os subgenomas alotetraploides em um viés do subgenoma A em direção ao subgenoma B, reforçando a ideia de que, a alotetraploidização, de fato pode influenciar a reorganização e instabilidade dos cromossomos B.

Nas plantas, a principal classe de genes de resistência são os NLR, subdivididos em duas classes: *Toll Interleucin Receptor 1* (TIR-NB-LRR) e *Coiled-coil* (CC-NB-LRR) (Meyers *et al.*, 1999), ambas localizadas em *clusters* multigênicos, com domínios (TIR e NB-ARC) comuns a todos os genes do tipo (Dang *et al.*, 2013). As análises do transcrito de *A. stenosperma*, relacionado à resistência ao nematoide da galha, *M. arenaria*, revelou genes relacionados à imunidade da planta com perfis de expressão

contrastantes. Estes incluem os genes *NLR1* e *NLR2*, ambos agrupados em *Clusters*, respectivamente localizados *in silico* nos cromossomos Aradu.01 e Aradu.09 de *A. duranensis* (Mota *et al.*, 2018). As hibridizações com as sondas desses genes mostraram sinais dispersos na maioria dos cromossomos, o que corresponde a detecção dos domínios comuns a todos os genes do tipo NLR (domínios TIR e NB-ARC). Entretanto, um par de cromossomos hibridizados com *NLR1* e outro hibridizado com *NLR2* apresentaram sinais de hibridização mais evidentes, refletindo a complementariedade total das sondas com esses cromossomos, o que possibilitou a identificação dos *clusters* desses genes respectivamente nos cromossomos A1 e A6.

As espécies do gênero *Arachis* estão entre as poucas espécies de plantas que sintetizam naturalmente o resveratrol, uma fitoalexina sintetizada a partir da atividade das Estilbenos Sintases, que também protege as plantas contra estresses bióticos e abióticos (Langcake e Pryce 1976; Sobolev *et al.*, 1995), além de apresentar propriedades antioxidantes e ser agente terapêutico na prevenção e tratamento de muitas doenças humanas (Harikumar e Aggarwal 2008; Meng *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2016). Explorar o transcrito dessas espécies para obtenção de sondas para FISH, nos permitiu estabelecer um marcador cromossomo específico a partir da sequência de um gene pertencente à família dessas Estilbenos Sintases (*GES*) agrupado em um *Cluster* localizado *in silico* e *in situ* nos cromossomos 4 de *A. duranensis*.

Pela primeira vez foram estabelecidos marcadores cromossomo-específicos a partir da sequência de DNA de dois genes diferencialmente expressos, associados à repostas a diferentes estresses (*AdEXLB8* e *GES*) em *Arachis*. O estabelecimento dessa ferramenta incrementa o cariótipo para as espécies do gênero, principalmente para as espécies com genoma A, contribuindo para o entendimento da estrutura e evolução desses genomas.

REFERÊNCIAS

- Adams, K. L., & Wendel, J. F. (2005). Polyploidy and genome evolution in plants. *Current opinion in plant biology*, 8(2), 135-141.
- Aliyeva-Schnorr, L., Stein, N., & Houben, A. (2016). Collinearity of homoeologous group 3 chromosomes in the genus *Hordeum* and *Secale cereale* as revealed by 3H-derived FISH analysis. *Chromosome research*, 24(2), 231-242.
- Bailey, J. (2002). Peanut Disease Management. North Carolina Peanut Production Guide. Chapter 6: 19.
- Bento, M., Tomas, D., Viegas, W., & Silva, M. (2015). Unravelling genome dynamics in *Arabidopsis* synthetic auto and allopolyploid species. *Biologia plantarum*, 59(4), 661-670.
- Bertioli, D. J., Leal-Bertioli, S. C. M., Lion, M. B., Santos, V. L., Pappas, G., Cannon, S. B., & Guimaraes, P. M. (2003). A large scale analysis of resistance gene homologues in *Arachis*. *Molecular Genetics and Genomics*, 270(1), 34-45.
- Bertioli, D. J., Moretzsohn, M. C., Madsen, L. H., Sandal, N., Leal-Bertioli, S. C., Guimarães, P. M., ... & Sato, S. (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(1), 1-11.
- Bertioli, D. J., Vidigal, B., Nielen, S., Ratnaparkhe, M. B., Lee, T. H., Leal-Bertioli, S. C., ... & Paterson, A. H. (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(3), 545-559.
- Bertioli, D. J., Cannon, S. B., Froenicke, L., Huang, G., Farmer, A. D., Cannon, E. K., ... & Ren, L. (2016). The genome sequences of *Arachis duranensis* and *Arachis ipaensis*, the diploid ancestors of cultivated peanut. *Nature genetics*, 48(4), 438-446.
- Bertioli, D. J., Jenkins, J., Clevenger, J., Dudchenko, O., Gao, D., Seijo, G., ... & Samoluk, S. S. (2019). The genome sequence of segmental allotetraploid peanut *Arachis hypogaea*. *Nature genetics*, 51(5), 877-884.
- Bertioli, D. J., Abernathy, B., Seijo, G., Clevenger, J., & Cannon, S. B. (2020). Evaluating two different models of peanut's origin. *Nature Genetics*, 1-3.
- Bonavia, D. (1982). Precerámico peruano, Los Gavilanes, oasis en la historia del hombre. *Corporación Financiera de Desarrollo S.A. COFIDE e Instituto Arqueológico Alemán*.
- Brasileiro, A. C., Morgante, C. V., Araujo, A. C., Leal-Bertioli, S. C., Silva, A. K., Martins, A. C., ... & Saraiva, M. A. (2015). Transcriptome profiling of wild *Arachis* from water-limited environments uncovers drought tolerance candidate genes. *Plant molecular biology reporter*, 33(6), 1876-1892.

- Brasileiro, A. C. M., & Carneiro, V. T. C. (2015). Manual de transformação genética de plantas, 2ª Edição revisada e ampliada. Cap. 11 Preparação de sondas. *Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, Brasília*.
- Buggs, R. J., Zhang, L., Miles, N., Tate, J. A., Gao, L., Wei, W., ... & Soltis, D. E. (2011). Transcriptomic shock generates evolutionary novelty in a newly formed, natural allopolyploid plant. *Current Biology*, *21*(7), 551-556.
- Cabral, J. S., Felix, L. P., & Guerra, M. (2006). Heterochromatin diversity and its colocalization with 5S and 45S rDNA sites in chromosomes of four *Maxillaria* species (Orchidaceae). *Genetics and Molecular Biology*, *29*(4), 659-664.
- Cai, Q., Lu, S., & Chinnappa, C. C. (1987). Analysis of karyotypes and Giemsa C-banding patterns in eight species of *Arachis*. *Genome*, *29*(1), 187-194.
- Carvalho, R., Soares Filho, W. S., Brasileiro-Vidal, A. C., & Guerra, M. (2005). The relationships among lemons, limes and citron: a chromosomal comparison. *Cytogenetic and Genome Research*, *109*(1-3), 276-282.
- Cerbah, M., Coulaud, J., & Siljak-Yakovlev, S. (1998). rDNA organization and evolutionary relationships in the genus *Hypochaeris* (Asteraceae). *Journal of Heredity*, *89*(4), 312-318.
- Chen, X., Li, H., Pandey, M. K., Yang, Q., Wang, X., Garg, V., ... & Upadhyaya, H. (2016). Draft genome of the peanut A-genome progenitor (*Arachis duranensis*) provides insights into geocarpy, oil biosynthesis, and allergens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(24), 6785-6790.
- Chester, M., Riley, R. K., Soltis, P. S., & Soltis, D. E. (2015). Patterns of chromosomal variation in natural populations of the neoallotetraploid *Tragopogon mirus* (Asteraceae). *Heredity*, *114*(3), 309-317.
- Chirinos, F. (2011). Breeding for Early Maturity in Peanuts (*Arachis hypogaea* L.) using Traditional Methods and Marker Assisted Selection (MAS).
- Chu, Y., Guimarães, L. A., Wu, C. L., Timper, P., Holbrook, C. C., & Ozias-Akins, P. (2014). A technique to study *Meloidogyne arenaria* resistance in *Agrobacterium rhizogenes*-transformed peanut. *Plant Disease*, *98*(10), 1292-1299.
- Cifuentes, M., Grandont, L., Moore, G., Chèvre, A. M., & Jenczewski, E. (2010). Genetic regulation of meiosis in polyploid species: new insights into an old question. *New Phytologist*, *186*(1), 29-36.
- Clevenger, J., Chu, Y., Guimaraes, L. A., Maia, T., Bertioli, D., Leal-Bertioli, S., ... & Ozias-Akins, P. (2017). Gene expression profiling describes the genetic regulation of *Meloidogyne arenaria* resistance in *Arachis hypogaea* and reveals a candidate gene for resistance. *Scientific reports*, *7*(1), 1-14.
- Comai, L. (2005). The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature reviews genetics*, *6*(11), 836-846.

Conab - Companhia Nacional de Abastecimento. 2020. Acompanhamento da safra de grãos brasileiros. Safra 2019/20. Acessado em 25 de junho de 2020, disponível em: <file:///C:/Users/Embrapa01/Downloads/GraosZjunhoZcompleto.pdf>

Custódio, A. R., Seijo, G., & Valls, J. F. M. (2013). Characterization of Brazilian accessions of wild *Arachis* species of section *Arachis* (Fabaceae) using heterochromatin detection and fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Genetics and molecular biology*, 36(3), 364-370.

Dang, J. L., Horvath, D. M., & Staskawicz, B. J. (2013). Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science*, 341(6147), 746-751.

Danilova, T. V., & Birchler, J. A. (2008). Integrated cytogenetic map of mitotic metaphase chromosome 9 of maize: resolution, sensitivity, and banding paint development. *Chromosoma*, 117(4), 345-356.

Danilova, T. V., Friebe, B., & Gill, B. S. (2012). Single-copy gene fluorescence *in situ* hybridization and genome analysis: Acc-2 loci mark evolutionary chromosomal rearrangements in wheat. *Chromosoma*, 121(6), 597-611.

Danilova, T. V., Friebe, B., & Gill, B. S. (2014). Development of a wheat single gene FISH map for analyzing homoeologous relationship and chromosomal rearrangements within the *Triticeae*. *Theoretical and applied genetics*, 127(3), 715-730.

Danilova, T. V., Akhunova, A. R., Akhunov, E. D., Friebe, B., & Gill, B. S. (2017). Major structural genomic alterations can be associated with hybrid speciation in *Aegilops markgrafii* (Triticeae). *The Plant Journal*, 92(2), 317-330.

Deiana, A. M., Cau, A., Salvadori, S., Coluccia, E., Cannas, R., Milia, A., & Tagliavini, J. (2000). Major and 5S ribosomal sequences of the largemouth bass *Micropterus salmoides* (Perciformes, Centrarchidae) are localized in GC-rich regions of the genome. *Chromosome Research*, 8(3), 213-218.

Dhillon, S. S., Rake, A. V., & Miksche, J. P. (1980). Reassociation kinetics and cytophotometric characterization of peanut (*Arachis hypogaea* L.) DNA. *Plant Physiology*, 65(6), 1121-1127.

Eilam, T., Anikster, Y., Millet, E., Manisterski, J., & Feldman, M. (2008). Nuclear DNA amount and genome downsizing in natural and synthetic allopolyploids of the genera *Aegilops* and *Triticum*. *Genome*, 51(8), 616-627.

FAOSTAT - Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2020. Acessado em 25 de junho de 2020, disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>

Fávero, A. P., Simpson, C. E., Valls, J. F., & Vello, N. A. (2006). Study of the evolution of cultivated peanut through crossability studies among *Arachis ipaensis*, *A. duranensis*, and *A. hypogaea*. *Crop Science*, 46(4), 1546-1552.

- Fávero, A. P., Moraes, S. A. D., Garcia, A. A. F., Valls, J. F. M., & Vello, N. A. (2009). Characterization of rust, early and late leaf spot resistance in wild and cultivated peanut germplasm. *Scientia Agricola*, 66(1), 110-117.
- Fávero, A. P., Santos, R. F. D., Simpson, C. E., Valls, J. F. M., & Vello, N. A. (2015). Successful crosses between fungal-resistant wild species of *Arachis* (section *Arachis*) and *Arachis hypogaea*. *Genetics and Molecular Biology*, 38(3), 353-365.
- Feldman, M., & Levy, A. A. (2012). Genome evolution due to allopolyploidization in wheat. *Genetics*, 192(3), 763-774.
- Fernández, A. & Krapovickas, A. (1994). Cromossomas y evolución en *Arachis* (Leguminosae). *Bonplandia* (8), 187-220.
- Ferreira, M. E. & Grattapaglia, D. (1998). Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3. ed. *Brasília: Embrapa-cenargen*.
- Feschotte, C., Jiang, N., & Wessler, S. R. (2002). Plant transposable elements: where genetics meets genomics. *Nature Reviews Genetics* (3), 329-341.
- Flavell, R. B., Bennet, M. D. & Smith, J. B. (1974). Genome size and proposition of repeated nucleotide sequence DNA in plants. *Biochemical Genetics* (12), 257-269.
- Foncéka, D., Hodo-Abalo, T., Rivallan, R., Faye, I., Sall, M. N., Ndoye, O., ... & Rami, J. F. (2009). Genetic mapping of wild introgressions into cultivated peanut: a way toward enlarging the genetic basis of a recent allotetraploid. *BMC Plant Biology*, 9(1), 1-13.
- Freitas, F. O. & Valls, J. F. M. (2001). Nota sobre a ocorrência de um tipo distinto de amendoim no Parque Indígena do Xingu e arredores e suas implicações etnobotânicas. In: SIRGEALC. *Anais do Simpósio de Recursos Genéticos para a América Latina e o Caribe, IAPAR, Londrina*.
- Freitas, F. O., Penãloza, A. P. S. & Valls, J. F. M. (2003a). O amendoim contador de história. *Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*. Infoteca 107, 12.
- Freitas, S. M., Margarido, M. A. & Negri, N. A. (2003b). Modelo de previsão para área plantada com amendoim das águas no estado de São Paulo. *Informações Econômicas*, São Paulo 33(2), 21-27.
- Freitas, F. O., Moretzsohn, M. C., & Valls, J. F. M. (2007). Genetic variability of Brazilian Indian landraces of *Arachis hypogaea* L. *Genetics Molecular Research* 6(3), 675-684.
- Galasso, I., Pignone, D., Frediani, M., Maggiani, M., & Cremonini, R. (1996). Chromatin characterization by banding techniques, in situ hybridization, and nuclear DNA content in *Cicer* L. (Leguminosae). *Genome*, 39(2), 258-265.
- Gao, D., Araujo, A. C., Nascimento, E. F., Chavarro, M. C., Xia, H., Jackson, S. A., ... & Leal-Bertioli, S. C. (2021). ValSten: a new wild species derived allotetraploid for

increasing genetic diversity of the peanut crop (*Arachis hypogaea* L.). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 1-15.

Gimenes, M. A., Lopes, C. R. & Valls, J. F. M. (2002). Genetic relationships among *Arachis* species based on AFLP. *Genetics and Molecular Biology* 5, 349-353.

Grabiele, M., Chalup, L., Robledo, G., & Seijo, G. (2012). Genetic and geographic origin of domesticated peanut as evidenced by 5S rDNA and chloroplast DNA sequences. *Plant Systematics and evolution*, 298(6), 1151-1165.

Gregory, W. C. & Gregory, M. P. (1976). Groundnut. *Arachis hypogaea* (Leguminosae-Papilionatae). In: Simmonds NW. (ed.). *Evolution of Crop Plants*, Longman, London, 151-154.

Gregory, M. P. & Gregory, W. C. (1979). Exotic germplasm of *Arachis* L. interspecific hybrids. *Journal of Heredity* 70, 185-193.

Guerra, M., Pedrosa, A., & Silva, A. E. (1997). Chromosome number and secondary constriction variation in 51 accessions of a *Citrus* germplasm bank. *Revista Brasileira de Genética* 20(3), 489-496.

Guerra, M. (2000). Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Genetics and molecular biology* 23, 1029-1041.

Guimarães, P. M., Brasileiro, A. C. M., Proite, K., de Araújo, A. C. G., Leal-Bertioli, S. C. M., Pic-Taylor, A., ... & Bertioli, D. J. (2010). A study of gene expression in the nematode resistant wild peanut relative, *Arachis stenosperma*, in response to challenge with *Meloidogyne arenaria*. *Tropical Plant Biology*, 3(4), 183-192.

Guimarães, P. M., Brasileiro, A. C., Morgante, C. V., Martins, A. C., Pappas, G., Silva, O. B., ... & Bertioli, D. J. (2012). Global transcriptome analysis of two wild relatives of peanut under drought and fungi infection. *BMC genomics*, 13(1), 387.

Guimaraes, P. M., Guimaraes, L. A., Morgante, C. V., Silva Jr, O. B., Araujo, A. C. G., Martins, A. C., ... & Bertioli, D. J. (2015). Root transcriptome analysis of wild peanut reveals candidate genes for nematode resistance. *PloS one*, 10(10), e0140937.

Guimaraes, L. A., Mota, A. P. Z., Araujo, A. C. G., de Alencar Figueiredo, L. F., Pereira, B. M., de Passos Saraiva, M. A., ... & Brasileiro, A. C. M. (2017). Genome-wide analysis of expansin superfamily in wild *Arachis* discloses a stress-responsive expansin-like B gene. *Plant molecular biology*, 94(1-2), 79-96.

Grosso, N. R., Zygadlo, J. A., & Lamarque, A. L. (1997). Proximate, fatty acid and sterol compositions of aboriginal peanut (*Arachis hypogaea* L) seeds from Bolivia. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 73(3), 349-356.

Hammons, R. O. (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.

- Harikumar, K. B., & Aggarwal, B. B. (2008). Resveratrol: a multitargeted agent for age-associated chronic diseases. *Cell cycle*, 7(8), 1020-1035.
- Heslop-Harrison, J. S. (2000). Comparative genome organization in plants: from sequence and markers to chromatin and chromosomes. *The Plant Cell*, 12(5), 617-635.
- Herselman, L. (2003). Genetic variation among Southern African cultivated peanut (*A. hypogaea* L.) genotypes as revealed by AFLP analysis. *Euphytica* 133, 319-327.
- Hilu, K. W. (1993). Polyploidy and the evolution of domesticated plants. *American Journal of Botany* 80, 1494-1499.
- Husted, L. (1936). Cytological Studies an the Peanut, *Arachis*. II. *Cytologia*, 7(3), 396-423.
- Ibrahim, H. M., Hosseini, P., Alkharouf, N. W., Hussein, E. H., Abd El Kader, Y., Aly, M. A., & Matthews, B. F. (2011). Analysis of gene expression in soybean (*Glycine max*) roots in response to the root knot nematode *Meloidogyne incognita* using microarrays and KEGG pathways. *BMC genomics*, 12(1), 220.
- Janda, J., Šafář, J., Kubaláková, M., Bartoš, J., Kovářová, P., Suchánková, P., ... & Chalhoub, B. (2006). Advanced resources for plant genomics: a BAC library specific for the short arm of wheat chromosome 1B. *The Plant Journal*, 47(6), 977-986.
- Janila, P., Variath, M. T., Pandey, M. K., Desmae, H., Motagi, B. N., Okori, P., ... & Varshney, R. K. (2016). Genomic tools in groundnut breeding program: status and perspectives. *Frontiers in plant science*, 7, 289.
- Jiang, J. (2019). Fluorescence in situ hybridization in plants: recent developments and future applications. *Chromosome Research*, 27(3), 153-165.
- Juenger, T. E. (2013). Natural variation and genetic constraints on drought tolerance. *Current opinion in plant biology*, 16(3), 274-281.
- Kashkush, K., Feldman, M., & Levy, A. A. (2003). Transcriptional activation of retrotransposons alters the expression of adjacent genes in wheat. *Nature genetics*, 33(1), 102-106.
- Kende, H., Bradford, K., Brummell, D., Cho, H. T., Cosgrove, D., Fleming, A., ... & Voesenek, L. (2004). Nomenclature for members of the expansin superfamily of genes and proteins. *Plant molecular biology*, 55(3), 311-314.
- Kenton, A. (1991). Heterochromatin accumulation, disposition and diversity in *Gibasis karwinskyana* (Commelinaceae). *Chromosoma*, 100(7), 467-478.
- Kerridge, P. C., & Hardy, B. (Eds.). (1994). *Biology and agronomy of forage Arachis* (No. 240). CIAT, 1-18.

- Kidwell, M. G., & Lisch, D. (1997). Transposable elements as sources of variation in animals and plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(15), 7704-7711.
- Knauft, D. A., Moore, K. M., & Gorbet, D. W. (1993). Further studies on the inheritance of fatty acid composition in peanut. *Peanut Science*, 20(2), 74-76.
- Kochert, G., Halward, T., Branch, W. D., & Simpson, C. E. (1991). RFLP variability in peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars and wild species. *Theoretical and Applied genetics*, 81(5), 565-570.
- Kochert, G., Stalker, H. T., Gimenes, M., Galgaro, L., Lopes, C. R., & Moore, K. (1996). RFLP and cytogenetic evidence on the origin and evolution of allotetraploid domesticated peanut, *Arachis hypogaea* (Leguminosae). *American Journal of Botany*, 83(10), 1282-1291.
- König, C., Ebert, I., & Greilhuber, J. (1987). A DNA cytophotometric and chromosome banding study in *Hedera helix* (Araliaceae), with reference to differential DNA replication associated with juvenile–adult phase change. *Genome*, 29(3), 498-503.
- Kourelis, J., & Van Der Hoorn, R. A. (2018). Defended to the nines: 25 years of resistance gene cloning identifies nine mechanisms for R protein function. *The Plant Cell*, 30(2), 285-299.
- Krapovickas, A. & Gregory, W. C. (1994). Taxonomía del género *Arachis* (Leguminosae). *Bonplandia* 8, 1-186.
- Krapovickas, A. (1995). El origen y dispersión de las variedades del maní. *Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria* 49, 18-26.
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., ... & Funke, R. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 412(6846), 565-566.
- Langcake, P., & Pryce, R. J. (1976). The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiological Plant Pathology*, 9(1), 77-86.
- Lavia, G. I. (1998). Karyotypes of *Arachis palustris* and *A. praecox* (section *Arachis*), two species with basic chromosome number $x=9$. *Cytologia*, 63(2), 177-181.
- Lavia, G. I. (1999). Caracterización cromosómica del germoplasma de maní. *Doctoral Thesis. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba*.
- Leal-Bertioli, S. C., Santos, S. P., Dantas, K. M., Inglis, P. W., Nielen, S., Araujo, A. C., ... & Carrasquilla-García, N. (2015). *Arachis batizocoi*: a study of its relationship to cultivated peanut (*A. hypogaea*) and its potential for introgression of wild genes into the peanut crop using induced allotetraploids. *Annals of botany*, 115(2), 237-249.

- Leal-Bertioli, S. C., Moretzsohn, M. C., Roberts, P. A., Ballén-Taborda, C., Borba, T. C., Valdisser, P. A., ... & Bertioli, D. J. (2016). Genetic mapping of resistance to *Meloidogyne arenaria* in *Arachis stenosperma*: a new source of nematode resistance for peanut. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 6(2), 377-390.
- Leal-Bertioli, S. C., Godoy, I. J., Santos, J. F., Doyle, J. J., Guimarães, P. M., Abernathy, B. L., ... & Bertioli, D. J. (2018). Segmental allopolyploidy in action: increasing diversity through polyploid hybridization and homoeologous recombination. *American journal of botany*, 105(6), 1053-1066.
- Lilly, J. W., Havey, M. J., Jackson, S. A., & Jiang, J. (2001). Cytogenomic analyses reveal the structural plasticity of the chloroplast genome in higher plants. *The Plant Cell*, 13(2), 245-254.
- Liu, B., & Wendel, J. F. (2002). Non-Mendelian phenomena in allopolyploid genome evolution. *Current Genomics*, 3(6), 489-505.
- Liu, B., & Wendel, J. F. (2003). Epigenetic phenomena and the evolution of plant allopolyploids. *Molecular phylogenetics and evolution*, 29(3), 365-379.
- Lloyd, A., & Bomblies, K. (2016). Meiosis in autopolyploid and allopolyploid *Arabidopsis*. *Current opinion in plant biology*, 30, 116-122.
- Lou, Q., Zhang, Y., He, Y., Li, J., Jia, L., Cheng, C., ... & Chen, J. (2014). Single-copy gene based chromosome painting in cucumber and its application for chromosome rearrangement analysis in *C. ucumis*. *The Plant Journal*, 78(1), 169-179.
- Lu, J., & Pickersgill, B. (1993). Isozyme variation and species relationships in peanut and its wild relatives (*Arachis* L.—Leguminosae). *Theoretical and Applied Genetics*, 85(5), 550-560.
- Marchant, D., Soltis, D. E., & Soltis, P. S. (2016). Patterns of abiotic niche shifts in allopolyploids relative to their progenitors. *New Phytologist*, 212(3), 708-718.
- Marcon, A. B., Barros, I. C., & Guerra, M. (2003). A karyotype comparison between two closely related species of *Acrostichum*. *American Fern Journal*, 93(3), 116-125.
- Marcon, A. B., Barros, I. C. L., & Guerra, M. (2005). Variation in chromosome numbers, CMA bands and 45S rDNA sites in species of *Selaginella* (Pteridophyta). *Annals of Botany*, 95(2), 271-276.
- Marowa, P., Ding, A., & Kong, Y. (2016). Expansins: roles in plant growth and potential applications in crop improvement. *Plant cell reports*, 35(5), 949-965.
- Mayrose, I., Zhan, S. H., Rothfels, C. J., Magnuson-Ford, K., Barker, M. S., Rieseberg, L. H., & Otto, S. P. (2011). Recently formed polyploid plants diversify at lower rates. *Science*, 333(6047), 1257-1257.
- McClintock, B. (1950). The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 36(6), 344-355.

- McClintock, B. (1983). The significance of responses of the genome to challenge. *Science* 226, 792-801.
- McQueen-Mason, S., Durachko, D. M., & Cosgrove, D. J. (1992). Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *The Plant Cell*, 4(11), 1425-1433.
- Meng, C., Liu, J. L., & Du, A. L. (2014). Cardioprotective effect of resveratrol on atherogenic diet-fed rats. *International journal of clinical and experimental pathology*, 7(11), 7899.
- Meyers, B. C., Dickerman, A. W., Michelmore, R. W., Sivaramakrishnan, S., Sobral, B. W., & Young, N. D. (1999). Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *The Plant Journal*, 20(3), 317-332.
- Meyers, B. C., Tingey, S. V., & Morgante, M. (2001). Abundance, distribution, and transcriptional activity of repetitive elements in the maize genome. *Genome Research*, 11(10), 1660-1676.
- Milla, S. R., Isleib, T. G., & Stalker, H. T. (2005). Taxonomic relationships among *Arachis* sect. *Arachis* species as revealed by AFLP markers. *Genome*, 48(1), 1-11.
- Morawetz, W. (1986). Remarks on karyological differentiation patterns in tropical woody plants. *Plant Systematics and Evolution*, 152(1-2), 49-100.
- Moretzsohn, M. C., Hopkins, M. S., Mitchell, S. E., Kresovich, S., Valls, J. F. M., & Ferreira, M. E. (2004). Genetic diversity of peanut (*Arachis hypogaea* L.) and its wild relatives based on the analysis of hypervariable regions of the genome. *BMC Plant Biology*, 4(1), 11.
- Moretzsohn, M. C., Barbosa, A. V., Alves-Freitas, D. M., Teixeira, C., Leal-Bertioli, S. C., Guimarães, P. M., ... & Gimenes M. A. (2009). A linkage map for the B-genome of *Arachis* (Fabaceae) and its synteny to the A-genome. *BMC Plant Biology*, 9(1), 1-10.
- Moretzsohn, M. C., Gouvea, E. G., Inglis, P. W., Leal-Bertioli, S. C., Valls, J. F., & Bertioli, D. J. (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(1), 113-126.
- Morgante, C. V., Brasileiro, A. C., Roberts, P. A., Guimaraes, L. A., Araujo, A. C., Fonseca, L. N., ... & Guimaraes, P. M. (2013). A survey of genes involved in *Arachis stenosperma* resistance to *Meloidogyne arenaria* race 1. *Functional Plant Biology*, 40(12), 1298-1309.
- Mota, A. P. Z., Vidigal, B., Danchin, E. G., Togawa, R. C., Leal-Bertioli, S. C., Bertioli, D. J., ... & Guimaraes, P. M. (2018). Comparative root transcriptome of wild *Arachis* reveals NBS-LRR genes related to nematode resistance. *BMC plant biology*, 18(1), 159.

- Nascimento, E. F. D. M., dos Santos, B. V., Marques, L. O., Guimarães, P. M., Brasileiro, A. C., Leal-Bertioli, S. C., ... & Araujo, A. C. (2018). The genome structure of *Arachis hypogaea* (Linnaeus, 1753) and an induced *Arachis* allotetraploid revealed by molecular cytogenetics. *Comparative cytogenetics*, 12(1), 111.
- Nascimento, E. F. D. M. B. D., Leal-Bertioli, S. C. D. M., Bertioli, D. J., Chavarro, C., Freitas, F. O., Moretzsohn, M. D. C., ... & Araujo, A. C. G. D. (2020). Brazilian Kayabi Indian accessions of peanut, *Arachis hypogaea* (Fabales, Fabaceae): origin, diversity and evolution. *Genetics and molecular biology*, 43(4).
- Neves, N., Delgado, M., Silva, M., Caperta, A., Morais-Cecilio, L., & Viegas, W. (2005). Ribosomal DNA heterochromatin in plants. *Cytogenetic and genome research*, 109(1-3), 104-111.
- Nielen, S., Campos-Fonseca, F., Leal-Bertioli, S., Guimarães, P., Seijo, G., Town, C., ... & 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(2), 227-246.
- Nielen, S., Vidigal, B. S., Leal-Bertioli, S. C., Ratnaparkhe, M., Paterson, A. H., Garsmeur, O., ... & Bertioli, D. J. (2012). 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(1), 21-38.
- Novaes, W. (1985). Xingu - uma flecha no coração. *Editora Brasiliense S.A.*
- Orgel, L. E., & Crick, F. H. (1980). Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature*, 284(5757), 604-607.
- Otero, J. R. (1941). Notas de uma viagem aos campos do sul do Mato Grosso. *Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura.*
- Pedrosa, A., Sandal, N., Stougaard, J., Schweizer, D., & Bachmair, A. (2002). Chromosomal map of the model legume *Lotus japonicus*. *Genetics*, 161(4), 1661-1672.
- Peñaloza, A. P. S., & Valls, J. F. M. (1997). Contagem do número cromossômico em acessos de *Arachis decora* (Leguminosae) In: Simpósio Latino-Americano de Recursos Genéticos Vegetais 1. *Programa e Resumos. Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, Brazil*, 39.
- Peñaloza, A. P. S. (2000). Citogenética das espécies silvestres do gênero *Arachis* (Leguminosae). In *518 Congresso Nacional de Botânica. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/Sociedade Botânica do Brasil, Brasília* (pp. 45-49).
- Peñaloza, A. D. P. D. S., & Valls, J. F. M. (2005). Chromosome number and satellited chromosome morphology of eleven species of *Arachis* (Leguminosae). *Bonplandia*, 14(1-2), 65-72.
- Pickersgill, B., & Heiser Jr, C. B. (1977). Origins and distribution of plants domesticated in the New World tropics. *Origins of agriculture* 803-835.

- Proite, K., Leal-Bertioli, S. C., Bertioli, D. J., Moretzsohn, M. C., da Silva, F. R., Martins, N. F., & Guimarães, P. M. (2007). ESTs from a wild *Arachis* species for gene discovery and marker development. *BMC plant biology*, 7(1), 1-10.
- Proite, K., Carneiro, R., Falcão, R., Gomes, A., Leal-Bertioli, S., Guimaraes, P., & Bertioli, D. (2008). Post-infection development and histopathology of *Meloidogyne arenaria* race 1 on *Arachis* spp. *Plant Pathology*, 57(5), 974-980.
- Raina, S. N., & Mukai, Y. (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(1-4), 251-262.
- Raina, S. N., Rani, V., Kojima, T., Ogihara, Y., Singh, K. P., & Devarumath, R. M. (2001). RAPD and ISSR fingerprints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification, and phylogenetic relationships in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and wild species. *Genome*, 44(5), 763-772.
- Ramsey, J., & Schemske, D. W. (1998). Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual review of ecology and systematics*, 29(1), 467-501.
- Ratnaparkhe, M. B., Wang, X., Li, J., Compton, R. O., Rainville, L. K., Lemke, C., ... & Paterson, A. H. (2011). Comparative analysis of peanut NBS-LRR gene clusters suggests evolutionary innovation among duplicated domains and erosion of gene microsynteny. *New Phytologist*, 192(1), 164-178.
- Robledo, G., & 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(3), 717-724.
- Robledo, G., Lavia, G. I., & 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(7), 1295-1307.
- Robledo, G., & 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(6), 1033-1046.
- Röser, M. (1994). Pathways of karyological differentiation in palms (Arecaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 189(1-2), 83-122.
- Salvadori, S., Deiana, A., Elisabetta, C., Florida, G., Rossi, E., & Zuffardi, O. (1995). Colocalization of (TTAGGG)_n telomeric sequences and ribosomal genes in Atlantic eels. *Chromosome Research*, 3(1), 54-58.
- Sanders, T. H. (2002). Groundnut (peanut) oil. In: Vegetable Oils in Food Technology Composition, Properties, and Uses. Gunstone, F. D. (Ed.), Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK 231-243.

- Sanmiguel, P., & Bennetzen, J. L. (1998). Evidence that a recent increase in maize genome size was caused by the massive amplification of intergene retrotransposons. *Annals of Botany*, 82, 37-44.
- Santos, R. C., Freire, R. M. M., & de Lima, L. M. (2013). O agronegócio do amendoim no Brasil. rev. e ampl. *Brasília, DF: Embrapa*.
- Santos, B. V. D. (2014). Estudo dos genomas A e B de *Arachis*. Tese de doutorado. Pós-Graduação em Biologia Molecular. Universidade de Brasília.
- Sato, S., & Yoshioka, T. (1984). Heterogeneity of heterochromatic segments in *Nothoscordum fragrans* chromosomes. *Caryologia*, 37(3), 197-205.
- Saze, H., & Kakutani, T. (2011). Differentiation of epigenetic modifications between transposons and genes. *Current opinion in plant biology*, 14(1), 81-87.
- Schmidt, T., & Heslop-Harrison, J. S. (1998). Genomes, genes and junk: the large-scale organization of plant chromosomes. *Trends in Plant Science*, 3(5), 195-199.
- Schulman, A. H. (2013). Retrotransposon replication in plants. *Current opinion in virology*, 3(6), 604-614.
- Schwarzacher, T., & Schweizer, D. (1982). Karyotype analysis and heterochromatin differentiation with Giemsa C-banding and fluorescent counterstaining in *Cephalanthera* (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 141(2), 91-113.
- Schwarzacher, T. & Heslop-Harrison, J. S. (2000). Practical *in situ* Hybridization. Oxford, UK: Bios.
- Schweizer, D. (1976). Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma*, 58(4), 307-324.
- Schweizer, D. (1981). Counterstain-enhanced chromosome banding. *Human genetics*, 57(1), 1-14.
- Schweizer, D., & Ambros, P. F. (1994). Chromosome banding. In *Chromosome analysis protocols* (pp. 97-112). Humana Press.
- Seijo, J. G., Lavia, G. I., Fernández, A., Krapovickas, A., Ducasse, D., & Moscone, E. A. (2004). Physical mapping of the 5S and 18S–25S rRNA genes by FISH as evidence that *Arachis duranensis* and *A. ipaensis* are the wild diploid progenitors of *A. hypogaea* (Leguminosae). *American Journal of Botany*, 91(9), 1294-1303.
- Seijo, G., Lavia, G. I., Fernández, A., Krapovickas, A., Ducasse, D. A., Bertioli, D. J., & Moscone, E. A. (2007). Genomic relationships between the cultivated peanut (*Arachis hypogaea*, Leguminosae) and its close relatives revealed by double GISH. *American Journal of Botany*, 94(12), 1963-1971.

- Seijo, J. G., Kovalsky, E. I., Chalup, L. M. I., Samoluk, S. S., Fávero, A., & Robledo, G. A. (2018). Karyotype Stability and Genome-Specific Nucleolar Dominance in Peanut, Its Wild 4× Ancestor, and a Synthetic AABB Polyploid. *Crop Science*, 58(4), 1671-1683.
- Shaked, H., Kashkush, K., Ozkan, H., Feldman, M., & Levy, A. A. (2001). Sequence elimination and cytosine methylation are rapid and reproducible responses of the genome to wide hybridization and allopolyploidy in wheat. *The Plant Cell*, 13(8), 1749-1759.
- Shirasawa, K. E. N. T. A., Bertoli, D. J., Varshney, R. K., Moretzsohn, M. C., Leal-Bertoli, S. C., Thudi, M. A. H. E. N. D. A. R., ... & Qin, H. O. N. G. D. E. (2013). Integrated consensus map of cultivated peanut and wild relatives reveals structures of the A and B genomes of *Arachis* and divergence of the legume genomes. *DNA research*, 20(2), 173-184.
- Silva, G. M. (2009). *Peanut diversity management by the Kaiabi (Tupi Guarani) indigenous people, Brazilian Amazon* (Doctoral dissertation, University of Florida).
- Silva, S. C., Martins, M. I. G., Santos, R. C., Peñaloza, A. P. S., Melo Filho, P. A., Benko-Iseppon, A. M., Valls J. F. M. V., & Carvalho, R. (2010). Karyological features and banding patterns in *Arachis* species belonging to the *Heterantheae* section. *Plant systematics and evolution*, 285(3-4), 201-207.
- Silvestri, M. C., Ortiz, A. M., & Lavia, G. I. (2015). rDNA loci and heterochromatin positions support a distinct genome type for 'x= 9 species' of section *Arachis* (*Arachis*, Leguminosae). *Plant systematics and evolution*, 301(2), 555-562.
- Simpson, C. E., Nelson, S. C., Starr, J. L., Woodard, K. E., & Smith, O. D. (1993). Registration of TxAG-6 and TxAG-7 peanut germplasm lines. *Crop Science*, 33(6), 1418-1418.
- Simpson, C. E., Krapovickas, A., & Valls, J. F. M. (2001). History of *Arachis* including evidence of *A. hypogaea* L. progenitors. *Peanut Science*, 28(2), 78-80.
- Singh, A. K., & Moss, J. P. (1982). Utilization of wild relatives in genetic improvement of *Arachis hypogaea* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 61(4), 305-314.
- Singh, A. K. (1986). Utilization of wild relatives in the genetic improvement of *Arachis hypogaea* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 72(4), 433-439.
- Singh, A. K., & Simpson, C. E. (1994). Biosystematics and genetic resources. In *The Groundnut Crop* (pp. 96-137). Springer, Dordrecht.
- Smartt, J., Gregory, W. C., & Gregory, M. P. (1978). The genomes of *Arachis hypogaea*. 1. Cytogenetic studies of putative genome donors. *Euphytica*, 27(3), 665-675.
- Smartt, J., & Stalker, H. T. (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* 21-49.

- Smith, B. W. (1950). *Arachis hypogaea*. Aerial flower and subterranean fruit. *American Journal of Botany*, 802-815.
- Sobolev, V. S., Cole, R. J., Dorner, J. W., & Yagen, B. (1995). Isolation, purification, and liquid chromatographic determination of stilbene phytoalexins in peanuts. *Journal of AOAC International*, 78(5), 1177-1182.
- Soltis, P. S., Liu, X., Marchant, D. B., Visger, C. J., & Soltis, D. E. (2014). Polyploidy and novelty: Gottlieb's legacy. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1648), 20130351.
- Soltis, P. S., Marchant, D. B., Van de Peer, Y., & Soltis, D. E. (2015). Polyploidy and genome evolution in plants. *Current opinion in genetics & development*, 35, 119-125.
- Soltis, P. S., & Soltis, D. E. (2016). Ancient WGD events as drivers of key innovations in angiosperms. *Current opinion in plant biology*, 30, 159-165.
- Song, K., Tang, K., & Osborn, T. C. (1993). Development of synthetic Brassica amphidiploids by reciprocal hybridization and comparison to natural amphidiploids. *Theoretical and Applied Genetics*, 86(7), 811-821.
- Song, H., Wang, P., Li, C., Han, S., Zhao, C., Xia, H., ... & Wang, X. (2017). Comparative analysis of NBS-LRR genes and their response to *Aspergillus flavus* in *Arachis*. *PLoS one*, 12(2), e0171181.
- Stalker, H. T. (1991). A new species in section *Arachis* of peanuts with ad genome. *American Journal of Botany*, 78(5), 630-637.
- Stalker, H. T. (1995). Germplasm resources in *Arachis*. *Advanced in Peanut Science*, 14-53.
- Stalker, H. T., Tallury, S. P., Ozias-Akins, P., Bertoli, D., & Bertoli, S. L. (2013). The value of diploid peanut relatives for breeding and genomics. *Peanut Science*, 40(2), 70-88.
- Stalker, H. T. (2017). Utilizing wild species for peanut improvement. *Crop Science*, 57(3), 1102-1120.
- Stebbins, G. L. (1971). Chromosomal evolution in higher plants. *Chromosomal evolution in higher plants*.
- Suassuna, T. M. F., Matos, R. G. & Freitas F. O. (2016). Diálogos de saberes: relatos da Embrapa 8, 145-157.
- Subramanian, V., Gurtu, S., Rao, R. N., & Nigam, S. N. (2000). Identification of DNA polymorphism in cultivated groundnut using random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. *Genome*, 43(4), 656-660.
- Temsch, E. M., & Greilhuber, J. (2000). Genome size variation in *Arachis hypogaea* and *A. monticola* re-evaluated. *Genome*, 43(3), 449-451.

Temsch, E. M., & Greilhuber, J. (2001). Genome size in *Arachis duranensis*: a critical study. *Genome*, 44(5), 826-830.

USDA-FAS – United States Department of Agriculture Foreign Agricultural Service. 2020. World Agricultural Production. Tabelas 11 a 15. Acessado em 25 de junho de 2020, disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>

Valls, J. F. M. (2000). Diversidade genética no gênero *Arachis* e a origem do amendoim. In: BANDEL, G.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R.; OLIVEIRA, G.C.X. (eds.) ENCONTRO SOBRE TEMAS DE GENÉTICA E MELHORAMENTO, 17, 2000, Piracicaba. Anais ... Piracicaba: ESALQ/Depto. de Genética, 2000. p.19-33. (CDD 631.522/581.15).

Valls, J. F., & Simpson, C. E. (2005). New species of *Arachis* (Leguminosae) from Brazil, Paraguay and Bolivia. *Bonplandia*, 35-63.

Valls, J. F., da Costa, L. C., & Custodio, A. R. (2013). A novel trifoliolate species of *Arachis* (Fabaceae) and further comments on the taxonomic section *Trierectoides*. *Bonplandia*, 91-97.

Valls, J. F., & Simpson, C. E. (2017). A new species of *Arachis* (Fabaceae) from Mato Grosso, Brazil, related to *Arachis matiensis*. *Bonplandia*, 26(2), 143-150.

Van de Peer, Y., Mizrachi, E., & Marchal, K. (2017). The evolutionary significance of polyploidy. *Nature Reviews Genetics*, 18(7), 411.

Varshney, R. K., Bertioli, D. J., Moretzsohn, M. D. C., Vadez, V., Krishnamurthy, L., Aruna, R., ... & He, G. (2009). The first SSR-based genetic linkage map for cultivated groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 118(4), 729-739.

Wang, H., Penmetsa, R. V., Yuan, M., Gong, L., Zhao, Y., Guo, B., ... & Bertioli, D. J. (2012). Development and characterization of BAC-end sequence derived SSRs, and their incorporation into a new higher density genetic map for cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). *BMC plant biology*, 12(1), 1-11.

Wanzenböck, E. M., 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(5), 1007-1016.

Wendel, J., & Doyle, J. J. (2005). Polyploidy and evolution in plants. *Plant diversity and evolution: genotypic and phenotypic variation in higher plants*, 97.

Wendel, J. F. (2015). The wondrous cycles of polyploidy in plants. *American journal of botany*, 102(11), 1753-1756.

Wicker, T., Sabot, F., Hua-Van, A., Bennetzen, J. L., Capy, P., Chalhoub, B., ... & Paux, E. (2007). A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nature Reviews Genetics*, 8(12), 973-982.

Wynne, J. C., Haiward, T., & Knauft, D. A. (1989). Cytogenetics and genetics of *Arachis*. *Critical reviews in plant sciences*, 8(3), 189-220.

Xiong, Z., Gaeta, R. T., & Pires, J. C. (2011). Homoeologous shuffling and chromosome compensation maintain genome balance in resynthesized allopolyploid *Brassica napus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(19), 7908-7913.

Yin, D., Ji, C., Song, Q., Zhang, W., Zhang, X., Zhao, K., ... & Chen, Z. J. (2020). Comparison of *Arachis monticola* with diploid and cultivated tetraploid genomes reveals asymmetric subgenome evolution and improvement of peanut. *Advanced Science*, 7(4), 1901672.

Yuksel, B., Estill, J. C., Schulze, S. R., & Paterson, A. H. (2005). Organization and evolution of resistance gene analogs in peanut. *Molecular Genetics and Genomics*, 274(3), 248-263.

Zhang, P., Li, W., Fellers, J., Friebe, B., & Gill, B. S. (2004). BAC-FISH in wheat identifies chromosome landmarks consisting of different types of transposable elements. *Chromosoma*, 112(6), 288-299.

Zhang, L., Yang, X., Tian, L., Chen, L., & 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*, 211(4), 1424-1439.

Zheng, Y. X., Li, C. J., Liu, Y., Yan, C. X., Zhang, T. T., Zhuang, W. J., & Shan, S. H. (2012). Cloning and characterization of a NBS-LRR resistance gene from peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Journal of Agricultural Science*, 4(12), 243.

Zoldos, V., Papes, D., Cerbah, M., Panaud, O., Besendorfer, V., & Siljak-Yakovlev, S. (1999). Molecular-cytogenetic studies of ribosomal genes and heterochromatin reveal conserved genome organization among 11 *Quercus* species. *Theoretical and Applied Genetics*, 99(6), 969-977.