

SILVOKLEIO DA COSTA SILVA

Caracterização citogenética, molecular e morfológica de
acessos do gênero *Arachis* com ênfase na seção *Heterantheae*

Recife - PE
2007

SILVOKLEIO DA COSTA SILVA

Caracterização citogenética, molecular e morfológica de acessos do gênero *Arachis* com ênfase na seção *Heteranthae*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – “Melhoramento Genético de Plantas”, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Agronomia, área de concentração em Melhoramento Genético de Plantas.

Orientador: Dr. Reginaldo de Carvalho

Co-orientadores: Dr. Péricles de Albuquerque Melo Filho

Dra. Roseane Cavalcanti dos Santos

Recife – PE
2007

Ficha catalográfica
Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Central – UFRPE

S586c Silva, Silvokleio da Costa
Caracterização citogenética, molecular e morfológica de
acessos do gênero *Arachis* com ênfase na seção *Heteranthae*
/ Silvokleio da Costa Silva. -- 2007.
98 f. : il.

Orientador : Reginaldo de Carvalho
Dissertação (Mestrado em Agronomia - Melhoramento
Genético de Plantas) – Universidade Federal Rural de Per –
nambuco. Departamento de Agronomia.
Inclui anexo e bibliografia.

CDD 631.53

1. *Arachis*
 2. *Heteranthae*
 3. Citogenética
 4. ISSR
 5. Análise fenológica
- I. Carvalho, Reginaldo de
II. Título

SILVOKLEIO DA COSTA SILVA

Caracterização citogenética, molecular e morfológica de acessos do gênero *Arachis* com ênfase na seção *Heterantheae*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – “Melhoramento Genético de Plantas”, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Agronomia, área de concentração em Melhoramento Genético de Plantas.

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: ____/____/2007.

Orientador: _____

Prof. Dr. Reginaldo de Carvalho
Departamento de Biologia/UFRPE

Examinadores: _____

Prof. Dr. Péricles de Albuquerque Melo Filho
Departamento de Agronomia/UFRPE

Prof. Dra. Luciane Vilela Resende
Departamento de Agronomia/UFRPE

Prof. Dra. Ana Maria Benko-Iseppon
Departamento de Genética/UFPE

Prof. Dra. Vilma Loreto
Unidade Acadêmica de Garanhuns - UFRPE

Recife - PE
2007

DEDICATÓRIA

Tudo o que sou e o que vier a ser
ofereço a Ti, ó Senhor Deus

Dedico a Deus, pela fé inabalável
concedida ao longo desta jornada, a
minha família, motivo maior da minha
constante luta e a meus queridos
amigos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e a oportunidade de desfrutar este momento tão especial e enriquecedor no âmbito profissional.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), pela oportunidade de realização do Curso de Mestrado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Melhoramento Genético de Plantas (PPGAMGP) da Universidade Federal Rural de Pernambuco, em especial ao Prof. Dr. Francisco José de Oliveira, coordenador, pela dedicação e paciência destinada ao corpo discente.

À Dra. Roseane Cavalcanti dos Santos pelas partilha de conhecimento, amizade, espírito materno e pelo ser humano maravilhoso que é. Muito obrigado por ter acreditado em investir.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Reginaldo de Carvalho pela amizade, compreensão, paciência e orientação que me ajudaram no crescimento pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Péricles de Albuquerque Melo Filho pelas sábias sugestões, amizade e profissionalismo.

Aos professores do Curso de Mestrado em Melhoramento Genético de Plantas, Prof. Dr. Gerson Quirino Bastos, Prof. Dr. Clodoaldo da Anunciação Filho, Prof^a. Dra. Luciane Vilela Resende, Prof. Dr. Péricles de Albuquerque Melo Filho, Prof^a. Márcia Vanusa, Prof^a. Dra. Luíza Suely Sêmen, Prof. Dr. Edson Ferreira da Silva e demais professores pelos conhecimentos, experiências transmitidas e momentos de descontração.

Aos meus colegas de turma, Marcelo Souza (amigão), Mário Ferreira de Moraes, Deivid A. Costa, Jaqueline Gadé, Lidinalva Resende, Clébia M. A. Almeida, Roberto de A. Melo, Vauban A. Carvalho, Liliane Melo Filho, Adriana Guedes, Eric Xavier e Maria Conceição Martiniano, pelas lutas, vitórias e descontrações.

À Dra. Taís de Moraes Falleiro Suassuna pelo incentivo inicial dos trabalhos com amendoim e conhecimentos generosamente possibilitados.

Aos pesquisadores da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnológicos – CENARGEN (Brasília-DF, Brasil), Dr. José Francisco Montenegro Valls e Dra. Andréa del Pilar de Souza Peñaloza pelas sementes e pelo valiosíssimo conhecimento partilhado.

Aos amigos do Laboratório de Genética, Bioquímica e Sequenciamento de DNA, em especial a Carliane Rebeca, Elizabeth A. A. Duarte, Ebenézer Bernardes (Bené), Fabiana Aparecida, Cláudio Melo, Maria Isabel Gomes e Janaína Teixeira (Janjan), pelo espírito coletivo, partilha de aprendizagem e descontração ao longo deste anos de valiosa convivência.

Ao Sr. Ivaldo Monteiro pelos momentos destinados à partilha de sua sabedoria vivida e pela amizade construída.

Ao grande amigo Aridelson Joabson Almeida de Oliveira pelas palavras de fé e estímulos proferidos em momentos oportunos.

À Elizabeth A. A. Duarte, pelo apoio, amizade, partilha das experiências vividas, pelo espírito de luta e respeito que foi construído durante anos de amizade.

A Reinaldo Farias e a Jôse Pereira pelo acolhimento inicial, amizade, sorrisos e pelo exemplo de fé a ser seguido.

À Carliane Rebeca Coelho da Silva pela compreensão, fé, partilha, luta, amizade, amor e vitórias alcançadas até hoje e por novos tempos que estão por vir.

À Sra. Eliane Monteiro e família, pela amizade, palavras de fé, sabedoria, carinho e acolhimento, além de tudo que vocês representam em minha vida.

Aos meus avós José da Costa Lima e Maria do Carmo Costa, *in memoriam*, que sempre se fizeram presentes em meu coração.

A toda minha família, em especial a Josikleio da Costa Silva, Hudsonkleio da Costa Silva e Sankleia da Costa Silva, que sem se dar conta, foram meu alicerce na construção desta obra em minha vida.

Ao Sr. Fernandes Matias da Silva, meu pai, pela vida, educação e exemplo de dignidade a ser seguido. Amo você.

À Sra. Eufrásia da Costa Silva, minha mãe, pelo amor e vida dedicados ao longo dos momentos que partilhamos juntos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela bolsa que possibilitou dar continuidade à tão almejada pós-graduação.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Muito Obrigado!

SUMÁRIO

	Página
Lista de Figuras	8
Lista de Tabelas	10
Resumo	11
Abstract	13
1. Introdução	15
CAPÍTULO I – Revisão Bibliográfica	17
2. Revisão Bibliográfica	18
2.1. Classificação Taxonômica e Botânica do Gênero <i>Arachis</i>	18
2.2. Seção <i>Heterantheae</i> Krapov. e W.C. Gregory	20
2.3. Centro de Origem e Dispersão do Gênero <i>Arachis</i> L.	22
2.4. Importância Econômica e Nutricional	23
2.5. Relevância dos Estudos Citogenéticos em Plantas Cultivadas	24
2.5.1. Citogenética no Gênero <i>Arachis</i>	28
2.6. Relevância dos Estudos Moleculares em Plantas Cultivadas	32
2.7. Uso de espécies silvestres em programas de melhoramento genético	34
3. Referências Bibliográficas	39
CAPÍTULO II - Cariologia de cinco espécies da seção <i>Heterantheae</i> pertencente ao <i>Arachis</i>	53
CAPÍTULO III - Detecção de polimorfismo entre acessos interespecíficos do gênero <i>Arachis</i> a partir de marcador ISSR	68
CAPÍTULO IV - Variabilidade em espécies do gênero <i>Arachis</i> (seção <i>Heterantheae</i>) com base em descritores fenotípicos	78
4. Considerações Gerais	86
5. Anexos	89

LISTA DE FIGURAS

	Página
CAPÍTULO I	
Figura 1. Distribuição geográfica da seção <i>Heterantheae</i> pertencente ao gênero <i>Arachis</i> , adaptado de Krapovickas e Gregory (1994)	21
Figura 2. Morfologia do cromossomo satelitado (SAT), evidenciando-se o braço menor (1) e braço maior (2), de espécies do gênero <i>Arachis</i> , segundo Fernandez e Krapovickas (1994).	29
CAPÍTULO II	
Figura 1. Cromossomos mitóticos de espécies do gênero <i>Arachis</i> (seção <i>Heterantheae</i>) a-e. Metáfases. f. Prófase. g. Núcleos interfásicos. a, b e g. <i>A. dardani</i> . c. <i>A. pusilla</i> . d. <i>A. sylvestris</i> . e. <i>A. interrupta</i> . f. <i>A. giacomettii</i> . Setas indicam cromossomos heteropicnóticos. Cabeças de seta indicam satélites cromossômicos. Barra representa 10µm.	65
Figura 2. Metáfases mitóticas de espécies do gênero <i>Arachis</i> (seção <i>Heterantheae</i>) coradas com CMA (a, e, g e i) e DAPI (b, f, h e j). c-d. sobreposição de imagem CMA/DAPI. a-b. <i>A. dardani</i> . c. <i>A. sylvestris</i> . d-f. <i>A. pusilla</i> . g-h. <i>A. interrupta</i> . i-j. <i>A. giacomettii</i> . Setas indicam cromossomos heteropicnóticos. Cabeças de seta indicam satélites cromossômicos. Barra representa 10µm.	66
Figura 3. Idiograma de espécies do gênero <i>Arachis</i> evidenciando regiões ricas em GC ou AT, reveladas, respectivamente, pelos fluorocromos CMA ⁺ e DAPI ⁺ nas espécies: a. <i>Arachis dardani</i> ; b. <i>A. sylvestris</i> ; c. <i>A. pusilla</i> ; d. <i>A. interrupta</i> ; e e. <i>A. giacomettii</i> . SM. Cromossomo submetacêntrico. HP. Cromossomo heteropicnótico negativo.	67

CAPÍTULO III

Figura 1. Padrão de amplificação de onze genótipos de *Arachis* utilizando o oligonucleotídeo UBC 813 (a) e UBC 834 (b) baseados em ISSR. M = Ladder (1Kb); 1-4. *A. dardani* (V15132, V15127, V15122 e V15128, respectivamente); 5-7. *A. pusilla* (V15150, V13189 e V13109, respectivamente); 8. *A. valida* (34AM); 9. *A. ipaensis* (KG30076); 10. *A. duranensis* (V14167); 11. *A. sternosperma* (V10229). **75**

Figura 2. Dendrograma gerado pelo programa NTSys 2.10 pelo método de clusterização UPGMA. **76**

Figura 3. Matriz de similaridade de espécies do gênero *Arachis* gerada pelo programa NTSys 2.10, derivada do coeficiente de similaridade de Jaccard (J). **77**

CAPÍTULO IV

Figura 1. Dendrograma representativo da similaridade morfológica de acessos da seção *Heterantheae* (gênero *Arachis*) obtidas através da Análise de Agrupamento pela Ligação Média entre Grupos (UPGMA), realizado no programa computacional NTSys 2.10, com base no coeficiente de Jaccard (J). **85**

LISTA DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO I	
Tabela 1. Distribuição e descrição dos tipos de satélites (SAT) ao longo das seções taxonômicas do gênero <i>Arachis</i> , adaptado de Fernandez e Krapovickas (1994) e Lavia (2001).	30
Tabela 2. Lista de espécies pertencentes ao gênero <i>Arachis</i> analisados citogeneticamente, com seus respectivos números diplóides (2n), tipo de satélite cromossômico (SAT) e referências bibliográficas.	36
CAPÍTULO II	
Tabela 1. Dados de passaporte dos acessos, com respectiva fórmula cariotípica (m-metacêntrico; sm-submetacêntrico), tipo de satélite (SAT), comprimento médio do complemento cromossômico (CMC), comprimento médio do maior par cromossômico (C1) e comprimento médio do menor par cromossômico (C2).	64
CAPÍTULO III	
Tabela 1. Dados de passaporte de acessos do gênero <i>Arachis</i> .	73
Tabela 2. Número de padrões obtidos por oligonucleotídeo utilizado.	74
CAPÍTULO IV	
Tabela 1. Dados de passaporte dos acessos do gênero <i>Arachis</i> .	83
Tabela 2. Dados médios dos descritores morfológicos avaliados nos acessos estudados pertencentes à seção <i>Heterantheae</i> .	84

RESUMO

O gênero *Arachis* tem sido alvo de diversos estudos devido à sua importância principalmente na alimentação humana e como forragem. Suas espécies silvestres apresentam alta variabilidade genética e se encontram agrupadas em nove seções taxonômicas. Destas, a seção *Heteranthae* destaca-se por ser endêmica do Brasil, ocorrendo especialmente na região Nordeste e nos Estados de Goiás e Minas Gerais. Embora não tenha uso muito difundido, muitas de suas espécies apresentam potencial para uso forrageiro. Considerando-se a plasticidade encontrada neste gênero, esforços devem ser direcionados visando potencializar o emprego das espécies nativas e sua respectiva conservação *in situ* e *ex situ*, em especial as da seção *Heteranthae* mediante sua potencialidade e representatividade regional, visto que seus representantes poderão vir a servir como alternativa para emprego como forragem e/ou de genes de interesse agrônomo. O presente trabalho teve por objetivo analisar espécies do gênero *Arachis*, enfatizando a seção *Heteranthae*, via técnicas citogenéticas e moleculares, além de análise morfológica. Com base nos dados citogenéticos, verificou-se que todos os acessos apresentaram número cromossômico diplóide $2n=20$ com morfologia metacêntrica (maioria dos cromossomos) a submetacêntrica. *Arachis dardani*, *A. pusilla* e *A. interrupta* apresentam fórmula cariotípica $18m+2sm$ e satélite tipo 2, enquanto que *A. sylvestris* e *A. giacomettii* possuem $16m+4sm$ e satélite tipo 10. Divergências em relação às regiões heterocromáticas CMA^+ foram detectadas entre as espécies. *A. pusilla* apresentou o maior número de blocos ricos em GC localizados em todos os cromossomos do complemento. De acordo com os dados obtidos, sugeriu-se que as espécies *A. dardani* e *A. interrupta* são as mais primitivas com base na assimetria moderada e tipo de satélite. Dados relacionados ao tipo de satélite de *A. interrupta* divergem da literatura. Ao menos em *A. pusilla*, a heterocromatina constitutiva parece ter sofrido modificações recentes na sua constituição que, ao contrário das demais espécies, apresentou-se formando blocos pericentroméricos CMA^+ em todo o complemento cromossômico. Os dados moleculares gerados via ISSR reuniu as espécies em três grupos, sendo os dois primeiros constituídos por espécies da seção *Heteranthae*, enquanto que o terceiro foi representado por espécies da seção *Arachis*. Tais informações estão de acordo com dados de classificação taxonômica

encontrada na literatura. As análises morfológicas, baseadas em descritores vegetativos e reprodutivos, possibilitaram agrupar a maioria dos acessos da seção *Heteranthae* conforme classificação taxonômica, exceto para a espécie *A. pusilla* que apresentou divergências fenológicas possivelmente atribuídas a fatores ambientais locais ou a variabilidade genética intrínseca deste genótipo.

Palavras-chaves: *Arachis*; Seção *Heteranthae*; Citogenética; ISSR; Análise Fenológica.

ABSTRACT

The genus *Arachis* have been mainly objective of several studies due to your importance in the feeding and as forage. Your wild species present high genetic variability and find contained in nine taxonomic sections. Of these, the *Heterantheae* section stands out for being endemic of Brazil, especially in the Northeast area and in states of Goiás and Minas Gerais. Although don't have very spread use, many of your species present potential for use as forage. Being considered the plasticity in this genus, efforts should be addressed seeking to intensify the employment of native species and your respective conservation in situ and ex situ, especially the one of the *Heterantheae* section by your potentiality and representative regional, because your players can come to serve as alternative for employment as forage and/or of genes of agronomic interest. This way, the present work had for objective to analyze species of the *Heterantheae* section of the cytogenetic and molecular, beyond morphologic analyzes. Based in cytogenetics data, was verified that all the accesses present chromosome number $2n=20$, with metacentric (in the majority of the chromosomes) the submetacentric morphology. *Arachis dardani*, *A. pusilla* and *A. interrupta* present $18m+2sm$ and satellite type 2, whereas *A. sylvestris* and *A. giacomettii* present $16m+4sm$ and satellite type 10. Divergences in relation to the heterocromatic regions CMA⁺ had been detected between the species. *A. pusilla* present the biggest number of rich blocks in GC localized in all the chromosomes of the complement. In accordance with the gotten data, the species are suggested that *A. dardani* and *A. interrupta* are most primitive with base moderate asymmetry and satellite type. Data related to the type of satellite of the *A. interrupta* are different of literature. In *A. pusilla*, the constitutive heterocromatin perishes to have suffered recent modifications in its constitution. The molecular data generated way ISSR congregated the species in three groups, being the the first ones consisting by species of the section *Heterantheae*, whereas third it was represented by species of the section *Arachis*. Such information in accordance with is given of found taxonômica classification in literature. Already the morphologic analyses, based in vegetative and reproductive describers, make possible to group the majority of the accesses of the section *Heterantheae* as taxonomic classification, except for the

species *A. pusilla* that it possibly presented phenologic divergences attributed to the ambient factors or the genetic variability intrinsic of this genotype.

Key-words: *Arachis*; Section *Heterantheae*; Cytogenetic; ISSR; Phenotypic Analyze.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Arachis* pertence à família Fabaceae, subfamília *Papilionoideae*, tribo *Aeschynomeneae* e subtribo *Stylosanthinae*. Originário da América do Sul, este gênero agrega 81 espécies, das quais 69 foram descritas por Krapovickas e Gregory (1994) as demais por Valls e Simpson (2005). Destas, 47 ocorrem exclusivamente no Brasil (Krapovickas e Gregory, 1994; Peñaloza *et al.*, 2001).

Embora o amendoim cultivado (*Arachis hypogaea* L.) seja o representante de maior importância devido à sua utilidade na alimentação e como matéria prima de produtos industrializados, outras espécies do gênero são largamente empregadas na cobertura de solos para o controle da erosão e de ervas daninhas ou como plantas forrageiras servindo de fonte de proteínas para a alimentação animal. Além disso, são utilizadas também na recuperação de solos para adubação verde, ou ainda como plantas ornamentais (Otero, 1941; Kerridge e Handy, 1994).

Estudos moleculares realizados em espécies silvestres de *Arachis* vêm revelando grande polimorfismo genético entre elas (Garcia *et al.*, 1995; Gimenes *et al.*, 2002 a, b). Todavia, o emprego da diversidade genética de *Arachis* em programas de melhoramento genético é bastante limitado para a geração de híbridos viáveis devido a incompatibilidades entre os genomas das espécies nas diversas seções. Citogeneticamente, a principal diferença observada é em relação aos números diferentes de cromossomos ($2n=2x=18$ ou 20 e $2n=4x=40$), a diferenças nos tamanhos e na morfologia dos satélites, na morfologia de alguns cromossomos, além de problemas relacionados à fertilidade de alguns acessos.

O amendoim cultivado (*A. hypogaea*) é uma espécie tetraplóide, $2n=40$, de origem desconhecida. Contudo, é possível contornar o problema da incompatibilidade de cruzamento para geração de tetraplóides comerciais pela duplicação do conjunto cromossômico de espécies diplóides ($2n=20$) com o auxílio de colchicina e posterior hibridação, produzindo assim híbridos viáveis (Fávero, 2004).

Segundo Krapovickas e Gregory (1994), as espécies do gênero *Arachis* foram agrupadas em nove seções. Dentre estas, a seção *Heteranthes* tem despertado interesse por parte de pesquisadores nacionais por possuir espécies endêmicas do Brasil, típicas da região Nordeste, e por apresentarem potencial para fins forrageiro e

possíveis fontes de genes para resistência à seca. Dados morfológicos e cariológicos foram descritos para a maioria das espécies da seção. Entretanto, uma ampla variação morfológica ocorre entre acessos infraespecíficos assim como discussões sobre o posicionamento interseccional de seus representantes.

Nas últimas décadas, a utilização de técnicas citogenéticas, convencional e de bandeamento cromossômico, em espécies vegetais cultivadas e silvestres, tem fornecido informações importantes ao melhoramento genético de alguns grupos de plantas através da localização física de marcadores cromossômicos (Raina e Mukai, 1999). Estas técnicas citogenéticas associadas às de marcadores isoenzimáticos e moleculares tem possibilitado identificar variabilidade genética entre as espécies cultivadas despertando interesse pela alta diversidade e relações filogenéticas entre os acessos silvestres dos bancos de germoplasma (Creste *et al.*, 2005).

Levando-se em consideração a plasticidade do emprego das espécies deste gênero, esforços devem ser direcionados ao estudo de sua diversidade visando potencializar o emprego das espécies nativas e sua respectiva conservação *in situ* e *ex situ*, em especial as da seção *Heterantheae* visto que, como anteriormente reportado, pela potencialidade e representatividade regional, poderá vir a servir como alternativa para emprego como forragem e/ou de genes de interesse agrônomo.

Deste modo, o presente trabalho teve por objetivo analisar espécies da seção *Heterantheae* por meio de técnicas citogenéticas e molecular, além de descritores morfológicos, visando estudar a diversidade intraseccional e fornecer informações que possam beneficiar e potencializar a utilização dos acessos em programas de melhoramento genético do gênero.

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Classificação Taxonômica e Botânica do Gênero *Arachis*

De acordo com a classificação de Cronquist (1988), o gênero *Arachis* pertence à ordem Fabales, família Fabaceae, subfamília *Papilionoideae*, tribo *Aeschynomeneae* e subtribo *Stylosanthinae*. Dentre as angiospermas, a família Fabaceae representa uma das maiores, sendo constituída por ervas, arbustos, árvores ou lianas. Segundo Souza e Lorenzi (2005) esta família agrupa cerca de 650 gêneros e aproximadamente 18.000 espécies, com distribuição cosmopolita, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais. No Brasil ocorrem cerca de 200 gêneros e 1.500 espécies.

Segundo Freitas *et al.* (2003), o primeiro a propor a classificação do amendoim foi Lineu, no ano de 1753, denominando o gênero *Arachis* (do grego “*arachos*” – que significa erva daninha) e a espécie *hypogaea* (que significa aposento subterrâneo). Em 1841, Benthon verificou a existência de algumas formas diferentes da anteriormente estudada por Lineu, descrevendo-as como espécies silvestres. Posteriormente Chevalier (1929 a, b) descreveu *A. sylvestris* e foi o primeiro a caracterizar o fruto subterrâneo de uma espécie silvestre.

Segundo Joly (1979) e Krapovickas e Gregory (1994), o gênero *Arachis* encontra-se constituído por plantas anuais, bianuais ou perenes, podendo ser eretas, decumbentes ou procumbentes, ou ainda rizomatozas ou estoloníferas. O sistema radicular é axonomorfo, com ramificações ou nós. As folhas são quadrifolioladas ou trifolioladas, com estípulas parcialmente soldadas ao pecíolo. Os folíolos podem ser desde suborbiculares a lanceolados. As flores são sésseis, com corola alaranjada ou amarela. Os frutos são subterrâneos com 1 a 5 sementes, podendo apresentar-se separadas por istmo. As sementes são lisas, com tegumento rosado pálido (em espécies silvestres) ou variando do vermelho ao preto (principalmente em espécies cultivadas).

A biologia floral das espécies de *Arachis* é típica das leguminosas, apresentando um cálice tubular longo e delgado portando a corola na base. A inflorescência é resultado de modificações dos ramos vegetativos (Umen, 1973) e é composta por flores amarelas, sésseis, isoladas (inflorescências simples) ou em

grupos de duas a cinco (inflorescências compostas) e axilares. Cada flor possui dez estames, dos quais, geralmente, nove estão unidos por um filamento, formando um tubo estaminado, permanecendo um livre. Segundo Smith (1950), do conjunto de estames da flor do amendoim, dois são estéreis e os demais são representados por quatro anteras oblongas e biloculares e as demais são menores, globosas e uniloculares.

O pistilo da flor encontra-se constituído pelo ovário, estilo e estigma. O ovário situa-se na base do tubo do cálice e possui, geralmente, de dois a quatro óvulos. O estilo é longo e filiforme, com pêlos inclinados para cima ao longo do seu comprimento. O estigma mede em torno de um centímetro, piloso e situa-se na mesma altura das anteras. Essa estrutura torna-se receptiva cerca de 24 horas antes da antese (cleistogamia), e sua receptividade persiste por quase 12 horas depois da abertura da flor (Hassan e Srivastava, 1966).

Suas flores são hermafroditas e geralmente apresentam estrutura reprodutiva envolta por uma quilha (Santos e Godoy, 1999) permitindo que a planta seja autopolinizável (autogamia), com baixa porcentagem de cruzamentos naturais (alogamia). Segundo Nigan *et al.* (1999), a taxa de polinização cruzada no amendoim resultante de hibridação natural é menor que 1%, embora Knauft *et al.* (1987) já tenham reportado valor de até 10%, decorrente de visitas de abelhas. Deste modo o fluxo gênico é considerado muito limitado e circunscrito a pequenas populações passivas de agentes polinizadores.

Uma peculiaridade que distingue os representantes deste gênero de outros da família é a presença do ginóforo (“peg” – do latim *paxillus* - ou esporão na linguagem popular), que é uma estrutura de frutificação formada após a polinização e subsequente murcha do perianto, resultante da expansão de um meristema intercalar situado abaixo do óvulo basal. Este é dotado de geotropismo positivo e comporta o embrião em sua região apical, e que dará origem à vagem no interior do solo (geocarpia) (Singh e Simpson, 1994; Santos e Godoy, 1999; Santos *et al.* 2005). As espécies silvestres de amendoim apresentam frutos catenados, isto é, frutos cujas sementes são separadas uma da outra por uma constrição muito profunda ou um istmo (Conagin, 1959).

A divisão taxonômica do gênero *Arachis* em seções foi realizada a partir da monografia de Krapovickas e Gregory (1994), onde, baseado nas relações

filogenéticas, similaridades morfológicas, compatibilidade de cruzamentos interespecíficos, viabilidade de pólen e número e morfologia cromossômica, subdividiram o gênero em nove seções (*Erectoides*, *Trirectoides*, *Extranervosae*, *Triseminatae*, *Heteranthae*, *Caulorrhizae*, *Procumbentes*, *Rhizomatosae* e *Arachis*). Segundo Valls e Simpson (2005) todas as seções juntas somam um total de 80 espécies descritas. Dentre os países do Cone Sul e Andinos, o Brasil reúne todas as seções e a maioria das espécies do gênero. Adicionalmente, cinco das seções ocorrem no Paraguai e apenas duas alcançam a Bolívia, a Argentina e o Uruguai. Do conjunto de seções apresentadas, *Arachis* é composta por 27 espécies (Valls e Simpson, 1997).

2.2. Seção *Heteranthae* Krapov. e W.C. Gregory

A seção *Heteranthae* é composta por seis espécies (*A. dardani* Krapov. e W.C. Gregory, *A. sylvestris* (A. Cheval.) A. Cheval., *A. pusilla* Benth, *A. interrupta* Valls e C. E. Simpson, *A. giacomettii* Krapov., W. C. Gregory e C. E. Simpson e *A. seridoensis* Valls, C. E. Simpson, Krapov. e R. Veiga) herbáceas, anuais ou bianuais. Suas raízes são axonomorfas com ramificações delgadas, eixo central ereto, ramificações procumbentes e folhas quadrifolioladas. As flores são dimorfas e pequenas, quando comparadas às da espécie cultivada (*A. hypogaea*), distribuídas ao longo dos ramos laterais, sendo o estandarte de cor alaranjada ou amarela. Os frutos são subterrâneos apresentando-se segmentados através de istmos (uniseminados) (Krapovickas e Gregory, 1994).

Segundo estes mesmos autores, esta seção é típica no Nordeste do Brasil, com representantes em todos os estados desta região (Figura 1). Contudo, algumas espécies da seção foram também encontradas no Norte de Minas Gerais e no Nordeste do estado de Goiás (Krapovickas e Gregory, 1994; Valls, 1996). Embora não tenha uso muito difundido, muitas de suas espécies apresentam potencial para uso forrageiro (Peñaloza, 2004).

De acordo com Coelho *et al.* (2001), diversos acessos da espécie *A. pusilla* apresentam ampla variabilidade morfológica que poderia ser explicada pelo isolamento genético-geográfico das populações.

Apesar da seção *Heteranthae* possuir um número relativamente pequeno de espécies, existe ainda algumas questões taxonômicas a serem resolvidas dentro da

seção em relação às distâncias genéticas como, por exemplo, a grande similaridade morfológica existente algumas populações de *A. giacomettii* e *A. triseminata* Krapov. e W.C. Gregory (seção *Triseminatae*), apresentando comportamento perene para maioria de seus indivíduos. É provável que o estudo do padrão de compatibilidade de cruzamento entre *A. triseminata* e *A. giacomettii*, bem como a análise do percentual de híbridos férteis possa reforçar, os dados de similaridade morfológica implicando numa possível transferência de *A. giacomettii* para a seção *Triseminatae*, ou vice-versa ou ainda a fusão das seções *Triseminatae* e *Heteranthae*. A espécie *A. triseminata* tem demonstrado isolamento genético após várias tentativas de cruzamento, sem sucesso, com espécies das outras seções (Valls, 2005).



Figura 1. Distribuição geográfica da seção *Heteranthae* pertencente ao gênero *Arachis*, adaptado de Krapovickas e Gregory (1994).

2.3. Centro de Origem e Dispersão do Gênero *Arachis* L.

Atualmente o gênero *Arachis* L. encontra-se constituído por 81 espécies com ocorrência natural na América do Sul, estendendo-se ao leste dos Andes, sul da Amazônia, norte da Planície Platina e Noroeste da Argentina. Dentre seus representantes, 64 espécies ocorrem no Brasil, sendo 48 restritas ao território brasileiro, 15 estão distribuídas na Bolívia, 14 no Paraguai, seis na Argentina e duas no Uruguai (Krapovickas e Gregory, 1994; Valls e Simpson, 2005).

O gênero *Arachis* é provavelmente originário da Serra de Amambaí, limite do Mato Grosso do Sul com o Paraguai, visto que nesta região encontram-se populações nativas de *A. guaranítica*, considerada a espécie mais primitiva do gênero. Suposições sobre a possível origem africana e asiática foram descartadas através de numerosos estudos botânicos, geográficos e arqueológicos (Gregory *et al.*, 1980; Krapovickas e Gregory, 1994). Um desses está relacionado à existência de materiais datados por volta de 3.900 a 3.750 anos (Hammons, 1994), registrados em achados arqueológicos realizados em 1875 em tumbas pré-colombianas, situadas nas proximidades de Arcon e Pachamac na região da costa do Peru. Uma análise de diversas coleções de germoplasma de amendoins silvestres e cultivados (obtidos no Noroeste e Nordeste da Argentina, Paraguai, Brasil, Bolívia, Uruguai, Peru e Equador) confirmou definitivamente a origem sul-americana para o gênero (Gregory e Gregory, 1976; Wynne e Haiward, 1989; Hammons, 1994).

Suas espécies são amplamente adaptadas a diversos sistemas ecológicos de regiões tropicais e subtropicais sendo, algumas delas, cultivadas sob sistemas de produção agrícolas diversificados na Ásia, África, e nas Américas (Holbrook e Isleib, 2001). Na América do Sul, alguns representantes do gênero ocupam uma área de 4.000 km de extensão, desde o Nordeste do Brasil até os Andes (Krapovickas e Gregory, 1994), com espécies que crescem desde o nível do mar até 1.450 m de altitude, habitando desde florestas descontínuas até vegetação aberta de gramíneas, em regiões com média pluviométrica superior a 2.000 mm por ano. Podem ocupar terrenos arenosos, argilosos ou mesmo com pedregulhos (Singh e Simpson, 1994).

As espécies de *Arachis* apresentam propagação lenta, por volta de um metro por ano devido ao tipo peculiar de frutificação. Acredita-se ainda que a dispersão

dos frutos de algumas espécies silvestres por longas distâncias tenha ocorrido por ação antrópica (indígenas), por vias zoofílicas (por exemplo, aves e/ou roedores) e/ou por meio de dispersão fluvial nas enchentes o que justificaria sua distribuição geográfica (Kockert *et al.*, 1991; Krapovickas e Gregory, 1994).

2.4. Importância Econômica e Nutricional

Embora o amendoim (*Arachis hypogaea*, seção *Arachis*) seja a espécie mais cultivada e economicamente a mais importante do gênero, outras espécies também são utilizadas como fonte de alimento em pequenas comunidades como, por exemplo, entre os indígenas (Knauff e Ozias-Akins, 1995; Stalker e Simpson, 1995).

Arachis hypogaea é a quarta oleaginosa mais cultivada no mundo, sendo superada apenas pela soja, algodão e canola (Fávero *et al.*, 2005). Seu impacto econômico se deve principalmente à sua grande diversidade de formas de consumo (Santos *et al.*, 1997), sendo suas sementes utilizadas principalmente na produção de óleo comestível, doces, pastas ou para o consumo *in natura* na forma de sementes cruas ou cozidas (Fávero, 2004).

A produção mundial em grãos supera 32 milhões de toneladas/ano sendo os principais países produtores a China, Índia, Estados Unidos, Nigéria, Indonésia, Senegal e o Brasil (Macedo, 2004). O Brasil colheu, na safra de 2004, cerca de 280 mil toneladas em vagens. A produtividade alcançou 2.421 kg/ha, sendo o Estado de São Paulo responsável por 83% da produção nacional. A região Nordeste, segundo maior pólo de consumo nacional, produziu 14,5 mil toneladas, correspondendo a 5,18% do total produzido (Conab, 2005).

Esta espécie representa uma importante fonte nutricional em nível mundial. Suas sementes apresentam alto valor calórico (580 cal/100 g), com 45-50% de óleo, além de conterem 20-25% de proteínas (riboflavina e tiamina), carboidratos, fibras, vitamina E e do complexo B, riboflavina, tiamina, ácido fólico, cálcio, fósforo, magnésio, zinco, ferro e potássio. O óleo do amendoim apresenta alta qualidade e contem ácidos graxos insaturados, tais como ácidos oléicos e linoléicos (Kokalis-Burelle *et al.*, 1997; Godoy *et al.*, 1999; Macedo, 2004).

Espécies das demais seções do gênero *Arachis*, incluindo as da seção *Heteranthae*, apresentam grande importância como plantas forrageiras servindo de fonte de proteínas para a alimentação animal ou como plantas ornamentais. A

espécie *A. pintoi* Krapov. e W.C. Gregory (seção *Caulorrhizae*), por exemplo, é largamente empregada na cobertura de solos, para controle da erosão, recuperação de solos desgastados e controle de ervas daninhas (Otero, 1941; Kerridge e Handy, 1994).

2.5. Relevância dos Estudos Citogenéticos em Plantas Cultivadas

Nas últimas décadas, o emprego de técnicas citogenéticas em espécies cultivadas, tem fornecido informações importantes ao melhoramento genético de alguns grupos de plantas através da localização física de certos marcadores nos cromossomos. A caracterização do conjunto cromossômico de uma dada espécie é essencial para a pesquisa citogenética. Comumente, a análise citogenética clássica é realizada em cromossomos metafásicos mitóticos corados com Giemsa, carmim acético ou outro corante convencional. Em uma análise de células mitóticas, aspectos como o número e comprimento dos cromossomos, razão entre braços cromossômicos, padrão de condensação e de coloração, além de características físicas adicionais, como presença e posição de constrição secundária e cromossomos satelitados, podem fornecer informações valiosas para comparar espécies ou identificar variações inter e intra-específicas (Guerra *et al.*, 1997).

Pesquisando a família Oxalidaceae, Azkue (2000) verificou alterações morfológicas e numéricas entre seus representantes. A verificação de variações nos números básicos ($x = 5, 6, 7, 8, 9$ e 11) das espécies de *Oxalis* foi muito importante para o estabelecimento de relações filogenéticas no gênero, visto que a subdivisão do mesmo em seções encontra-se baseada em dados morfológicos.

Analisando convencionalmente espécies pertencentes ao gênero *Erigeron* (Asteraceae), Nishikawa e Sato (2003) evidenciaram variações numéricas ($2n = 18$ ou 27) na espécie *E. thunbergii* subsp. *grabratus* var. *heterotricus* e consideraram-na ($2n = 27$) triplóide de base $x = 9$.

Entretanto, muitas vezes os padrões cromossômicos revelados pelas chamadas “colorações convencionais” não são suficientes para a análise detalhada de um cariótipo, especialmente se este apresentar simetria entre os cromossomos ou se os cromossomos forem pequenos em medidas micrométricas. Por outro lado, técnicas de coloração diferencial cromossômica, desenvolvidas no final do século passado, têm contribuído grandemente para estudos de identificação cromossômica,

comparação cromossômica inter e intra-específica, interpretação das alterações cromossômicas, etc (Gill *et al.*, 1991, Sumner, 2003). Dentre estas técnicas podemos destacar, para vegetais, o bandeamento C, a coloração com nitrato de prata (AgNO₃), coloração com fluorocromos base-específicos e a hibridização *in situ* (Bennett e Leitch, 1995).

Um dos grandes propósitos dos estudos citogenéticos é o reconhecimento do padrão e composição da cromatina cromossômica (eucromatina e heterocromatina) bem como de suas classes. Flemming foi o primeiro a observar ao nível citológico o comportamento de condensação da cromatina durante a interfase (Schulz-Schaeffer, 1980). Entretanto, apenas em 1928, Heitz empregou os termos eucromatina e heterocromatina (Sumner, 1990).

Muitas das técnicas diferenciais, como o bandeamento C, por exemplo, enfocam a análise da heterocromatina constitutiva. Este tipo de heterocromatina é caracterizado como sendo a parte do DNA cromossomal que permanece fortemente condensada durante a maior parte do ciclo de divisão celular, com replicação tardia na fase S, além de ser pobre em genes. Apresenta seqüências de DNA altamente repetitivo, região denominada DNA satélite, responsável pela estruturação dos cromossomos, estando ainda possivelmente relacionada a mecanismos de silenciamento gênico (De Roberts e De Robertis Jr., 1993; Zoya, 2002).

A metodologia do bandeamento C atua de forma corrosiva sobre os cromossomos promovendo várias perdas de DNA e proteínas cromossomais, principalmente em regiões eucromáticas, porém a heterocromatina é mais resistente a este tipo de remoção, gerando um padrão de blocos heterocromáticos (Vosa, 1985; Sumner, 2003).

A eficácia da técnica supracitada tem sido comprovada em muitas espécies vegetais. Em *triticales*, planta resultante do cruzamento entre trigo e centeio, o bandeamento C pode auxiliar na identificação de cromossomos provenientes de cada um dos genitores, através da observação de bandas específicas (Seal e Bennett, 1982). Em *Nicotina plumbaginifolia* (2n=20) os homólogos puderam ser pareados através do padrão de bandas intersticiais (Mouras *et al.*, 1986).

Divergências estruturais e das propriedades químicas (regiões AT e GC) da heterocromatina podem ser diferenciadas usando-se técnicas de bandeamento

cromossômico como as fluorescentes. Os fluorocromos são corantes que apresentam propriedades fluorescentes e especificidade a determinadas seqüências de bases no DNA alvo. Dentre os que possuem afinidade pelas bases adenina e timina (AT) destacam-se o 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), Hoechst 33258 e a quinacrina. Já a cromomicina A₃ (CMA), o iodeto de propídeo (IP) e a mitramicina apresentam afinidade por regiões ricas em guanina e citosina (GC). Outros como distamicina A (DA) e a actinomicina D (AMD) podem ser empregados como contra-corantes visando potencializar o contraste durante a visualização de um fluorocromo primário (Schweizer, 1976; Sumner, 1990; Kim *et al.*, 2002).

A caracterização citogenética da heterocromatina constitutiva realizada a partir de colorações empregando-se fluorocromos pode auxiliar na caracterização de espécies e variedades. Analisando seis espécies de *Citrus* através do emprego dos fluorocromos DAPI e CMA, Guerra (1993) verificou divergências quantitativas e heteromorfismo no padrão de bandas das espécies. Divergências no padrão de bandas DAPI também foram observadas na espécie *Dioclea virgata* quando comparadas a outras espécies da subfamília Papilionoidae (Souza e Benko-Iseppon, 2004).

O tratamento com fluorocromos base-específicos CMA e mitramicina, por exemplo, podem ser empregados para a detecção das regiões organizadoras de nucléolos (RON's) visto que estas regiões são normalmente flanqueadas por regiões de heterocromatina constitutiva ricas em pares de bases GC (Salvadori *et al.*, 1995). Em *Allium communtatum* (Aliaceae) a aplicação seqüencial das técnicas CMA/DAPI e nitrato de prata (AgNO₃) revelaram que as marcações com o fluorocromo CMA encontravam-se adjacentes às RON's desta espécie (Besendorfer *et al.*, 2002).

As RONS são sítios cromossomais de seqüências de DNA repetidos em tandem que codificam RNAr 45S (5.8S-18S-26S). Citologicamente, estas regiões são normalmente localizadas como constrições secundárias de cromossomos profásicos a metafásicos, sendo responsáveis pela formação dos nucléolos, na interfase anterior, e passíveis de serem detectadas pela impregnação das proteínas nucleolares aderidas nessa região com nitrato de prata (Howell e Black, 1980; Rufas *et al.*, 1982).

A técnica de nitrato de prata revela as RONS funcionalmente ativas, onde o tamanho da deposição de prata está relacionado ao grau de atividade transcricional,

evidenciando o número e a posição dos DNA ribossomais (Cermeño *et al.*, 1984; Mellink *et al.*, 1994; Zurita *et al.*, 1997). Tais informações podem ser utilizadas na diferenciação intra e interespecífica, além de servirem como padrões para auxiliar em questões de posicionamento taxonômico de uma espécie em termos de evolução do cariótipo (Klinkhardt, 1998). Entretanto, esta técnica limita-se apenas à detecção das RON's transcricionalmente ativadas na interfase anterior, a partir da reação do nitrato de prata com as proteínas argirofílicas (ácidas) associadas ao DNAr 45S (Penda's *et al.* 1993; Sanchez *et al.*, 1995; Sumner, 2003).

Contudo, em muitos genomas coexistem genes transcricionalmente ativos e inativos para a síntese de RNAr. Mais recentemente, a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) tem possibilitado mapear fisicamente as seqüências de DNA repetitivo, sejam eles ativos ou inativos, tornando-se possível, por exemplo, localizar todos os sítios de DNAr 45S, além do sítios de DNAr 5S, os quais encontram-se em regiões cromossômicas diferentes daqueles da RON (López-León *et al.*, 1999).

Melo e Guerra (2003) utilizaram sondas de DNAr 45S e 5S para investigar as relações filogenéticas e os níveis de ploidia entre espécies do gênero *Passiflora*. Os autores concluíram que, em geral, o número e a localização dos sítios de DNAr 45S foram representativos para inferir que o número diplóide $2n=12$ representa o provável genoma ancestral com número básico $x=6$ para o gênero e que as demais espécies apresentariam os números diplóides secundários $2n=18$, $2n=20$ e $2n=24$ com números básicos $x=9$, $x=10$ e $x=12$, respectivamente. A análise citogenética realizada em diversas espécies de *Citrus* empregando o bandeamento com corantes fluorescentes CMA e DAPI e hibridização *in situ* com sondas de DNAr 5S e 45S, demonstrou que a maioria das espécies estudadas são híbridos interespecíficos com pelo menos um par cromossômico heteromórfico em seus cariótipos. Por outro lado, a espécie *C. medica*, var. 'cidra Etrog' foi considerada uma das prováveis espécies ancestrais do gênero por apresentar homomorfismo cromossômico em todo seu cariótipo (Carvalho *et al.*, 2005). Os dados obtidos pelos autores auxiliaram também na discussão sobre questões filogenéticas do grupo.

Ao contrário dos exemplos supracitados, uma forte estabilidade cariotípica foi evidenciada intra e interespecificamente no gênero *Manihot*. Dos 34 acessos analisados, todos apresentaram quatro cromossomos com uma única seqüência rica em GC marcada (blocos CMA⁺) na região subterminal e seis sítios de DNAr 45S,

revelados por FISH, dos quais quatro foram encontrados na mesma posição que os blocos CMA⁺, demonstrando uma grande semelhança cariotípica entre os acessos (Carvalho e Guerra, 2002).

2.5.1. Citogenética no Gênero *Arachis*

Husted (1933,1936) foi o primeiro a realizar uma análise citogenética convencional e a determinar o número $2n=20$ para as espécies diplóides de *Arachis* e $2n=40$ (tetraplóide) para o amendoim cultivado, *A. hypogaea*. Com base nestes estudos, um conjunto de critérios foi proposto e desenvolvido para enquadrar os grupos genômicos presentes no gênero *Arachis*. Inicialmente, esse autor observou que o complemento cromossômico apresenta forte simetria, com exceção de dois pares que puderam ser perfeitamente diferenciados. O primeiro par apresentou condensação diferenciada em pró-metáfase, além de possuir metade do comprimento do par maior. Toda espécie portadora deste par cromossômico heteropicnótico foi considerada portadora do genoma “A”. Já o termo “genoma B” foi empregado para os indivíduos que não apresentavam o par de cromossomos “A”. Outra observação realizada por Husted foi que um dos pares cromossômicos apresentou constrição secundária, sendo simbolizado pela sigla “SAT” – (satelitado). Nos cromossomos satelitados, um dos braços está dividido formando um pequeno segmento proximal e outro distal (satélite) em relação ao centrômero (Figura 2). Todos os cromossomos foram classificados como metacêntricos a levemente submetacêntricos. Uma outra denominação genômica, “genoma D” foi proposta para os representantes da espécie *A. glandulifera* (seção *Arachis*) que apresentou seis pares de cromossomos subteloicêntricos (Stalker, 1991). A tabela 1 mostra a descrição dos tipos de satélites e as respectivas seções que pertencem, conforme apresentado por Fernández e Krapovickas (1994).

A presença ou a ausência dos cromossomos do tipo “A”, os diferentes tipos de cromossomo “SAT”, além da seção a qual a espécie está inserida, são parâmetros fundamentais para a caracterização citogenética das diferentes espécies (Fernández e Krapovickas, 1994).

A maioria das espécies pertencentes ao gênero *Arachis* é diplóide com $2n=2x=20$ ou com $2n=2x=18$ e somente *A. hypogaea* e *A. monticola* (seção *Arachis*),

assim como *A. glabrata*, *A. pseudovillosa* e *A. nítida* (seção *Rhizomatosae*) são tetraplóides ($2n=4x=40$) (Fernández e Krapovickas, 1994; Lavia, 1998; Peñaloza e Valls, 2005). Todas as espécies estudadas possuem um par de cromossomos “SAT”, exceto a espécie *A. valida* (seção *Arachis*) que apresenta dois pares de cromossomos “SAT” (Fernández e Krapovickas, 1994) (Tabela 2).

Tais divergências de número, morfologia cromossômica e de satélites possam ser suficientes para provocar incompatibilidades genético-fisiológicas que ocorrem em eventos pós-zigóticos, a exemplo das dificuldades encontradas para obtenção de híbridos férteis e interseccionais devido à esterilidade apresentada pela maioria dos descendentes (Stalker, 1997).

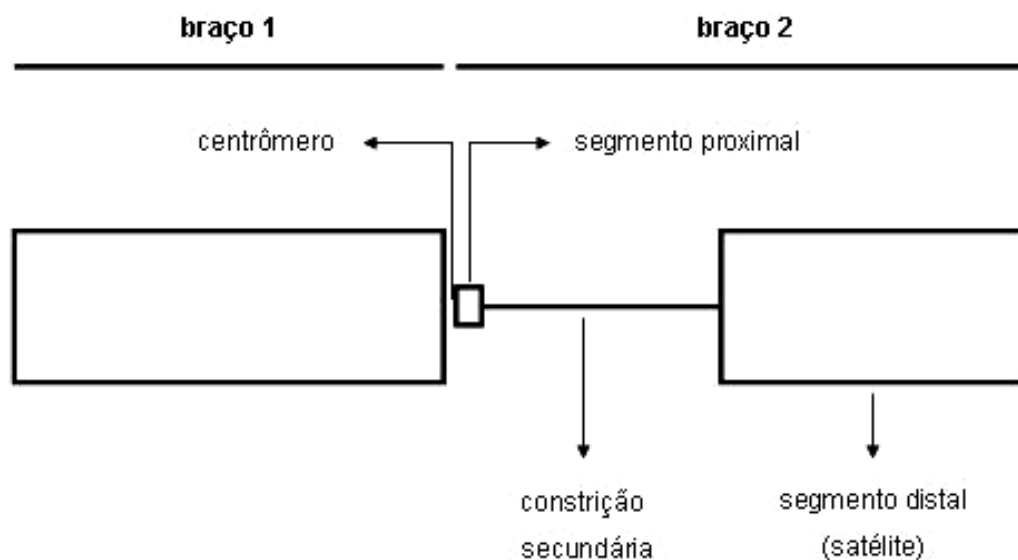

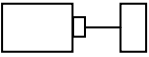
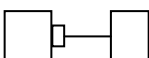
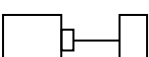
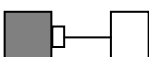
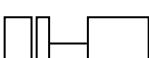
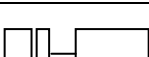

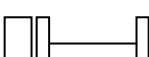
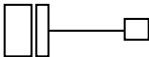



Figura 2. Morfologia do cromossomo satelitado (SAT), evidenciando-se o braço menor (1) e braço maior (2), de espécies do gênero *Arachis*, segundo Fernandez e Krapovickas (1994).

Outro aspecto de grande relevância e bastante estudado no gênero é a identificação dos prováveis ancestrais de *A. hypogaeae* (o amendoim cultivado), o tetraplóide de maior importância comercial do gênero. Essa espécie apresenta $2n=4x=40$ e genoma AABB. Provavelmente, o amendoim é um tetraplóide secundário e que se originou por processos de domesticação a partir da espécie silvestre, *A. monticola* ($2n=2x=40$) a qual possui os genomas “AA” e “BB”. Acredita-

se também, que esta última tenha surgido a partir do cruzamento entre duas espécies diplóides silvestres da seção *Arachis*, uma com o genoma “AA” e outra com o genoma “BB” (Gregory e Gregory, 1976; 1979; Krapovickas e Gregory, 1994; Singh, 1994).

Tabela 1. Distribuição e descrição dos tipos de satélites (SAT) ao longo das seções taxonômicas do gênero *Arachis*, adaptado de Fernandez e Krapovickas (1994) e Lavia (2001)

Tipo de Satélite	Cromossomo	Descrição dos tipos de satélites	Seções
1		Menor que o braço 1 e maior que o segmento proximal	<i>Extranervosae</i>
2		Menor que o braço 1 e muito maior que o segmento proximal (0,2 µm)	<i>Caulorrhizae; Heteranthae; Erectoides; Extranervosae; Trierectoides.</i>
3A		Aproximadamente igual ao tamanho do braço 1 e o segmento proximal mede 0,2 µm	<i>Erectoides; Extranervosa; Arachis; Caulorrhizae; Rhizomatosae.</i>
3B		Satélite menor que o braço 1	<i>Erectoides; Extranervosa; Arachis; Caulorrhizae; Rhizomatosae.</i>
4		Semelhante ao tipo três, contudo o braço 1 apresenta heteropichnose negativa em prometáfase e metáfase	<i>Erectoides</i>
5		Aproximadamente do tamanho do braço 1 mais o segmento proximal, sendo este último é menor.	<i>Arachis</i>
6		Maior que o braço 1, sendo este maior que o segmento proximal	<i>Arachis</i>
7		Satélite duplo, sendo estes do tamanho do braço 1 mais o segmento proximal.	<i>Arachis</i>
8		Possui metade do tamanho do braço 1. Segmento proximal menor que braço 1.	<i>Arachis</i>
9		Satélite puntiforme, igual ou menor que o segmento proximal. Braço 1 maior que o segmento proximal.	<i>Arachis, Procumbentes</i>
10		Satélite puntiforme, menor que o SAT tipo 9. Braço 1 tem tamanho semelhante ao segmento proximal.	<i>Heteranthae</i>

A estreita relação entre as espécies *A. monticola* e *A. hypogaea* tem sido evidenciada através de cruzamentos experimentais de hibridização (Krapovickas e

Rigoni, 1957; Hammons, 1970, Fávero *et al.*, 2006), bem como através da citogenética convencional, pela análise do número e morfologia cromossômica (Fernandez e Krapovickas, 1994), pela citogenética molecular, FISH e GISH (Raina e Mukai, 1999a; 1999b; Seijo *et al.*, 2004) e outros estudos moleculares (Halward *et al.*, 1991; Kochert *et al.*, 1991).

Vários outros autores empregaram técnicas citogenéticas em estudos de caracterização cromossômica no gênero *Arachis*. Dentre as técnicas de coloração diferencial utilizadas, o bandeamento C foi empregado por Cai *et al.* (1987) para avaliar oito espécies do gênero *Arachis*. Estes autores observaram bandas centroméricas nos cromossomos de *A. correntina*, *A. villosa*, *A. cardenasii*, *A. stenosperma*, *A. batizocoi*, *A. monticola*, *A. hypogaea*, e *A. rigonii*, correspondentes as regiões heterocromáticas. Segundo Raina e Mukai (1999a) tal observação não foi constatada em todos os cromossomos de *A. hypogaea*.

Parte da heterocromatina de muitas espécies de *Arachis* investigadas até o momento, é reconhecidamente rica em pares de base AT, localizada em regiões pericentroméricas. O emprego do corante fluorescente DAPI revelou uma pequena divergência no número de blocos DAPI⁺, entre dois acessos de *A. decora* (seção *Arachis*). O acesso V9955 apresentou oito pares cromossômicos com blocos marcados pelo fluorocromo, enquanto o acesso W648 apresentou marcação em todo o complemento. Já as espécies *A. praecox* e *A. palustris*, ambas da seção *Arachis*, apresentaram oito pares de cromossomos com blocos DAPI⁺ em todos os acessos investigados (Lima *et al.*, 2002).

A localização dos sítios de DNAr 45S em algumas espécies de *Arachis*, revelou a ocorrência das regiões organizadoras de nucléolos (RON's) no par satelitado. Esse resultado sugere que as espécies do gênero possuem apenas duas RON's com atividade transcripcional (Raina e Mukai, 1999). Esses mesmos autores utilizaram a técnica de hibridização genômica *in situ* (GISH) e constataram a origem alotetraplóide de *A. hypogaea* e sua estreita relação genética com *A. monticola*.

Em relação à citogenética da seção *Heterantheae*, dados referentes ao número e à morfologia cromossômica têm sido registrados na literatura (Fernandez e Krapovickas, 1994; Peñaloza e Valls, 2005).

Dentre os estudos de caracterização citogenética voltados à seção *Heterantheae* destacam-se os trabalhos de Fernandez e Krapovickas (1994) e de Peñaloza e Valls (2005), onde os autores descrevem o número cromossômico

$2n=2x=20$ para todos os acessos analisados de *A. seridoensis* e *A. interrupta*. Ambas apresentaram satélite do tipo 10 (Tabela 2). Trabalhos com técnicas diferenciais são escassos na literatura para a seção. Lima *et al.* (2002) e Peñaloza (2004) localizaram bandas CMA⁺ no par satelitado de *A. seridoensis*, acesso V10969.

2.6. Relevância dos Estudos Moleculares em Plantas Cultivadas

Estudos de biologia molecular ou genética molecular vêm se consolidando e revolucionando o campo científico. Diversos tipos de marcadores moleculares estão sendo cada vez mais utilizados em programas de melhoramento com o objetivo de aumentar a eficiência da seleção e caracterização dos germoplasmas, propiciando a maximização dos ganhos genéticos, permitindo aos melhoristas identificar e selecionar a variabilidade em nível de DNA (Abdelnoor *et al.*, 1995).

Segundo Weising *et al.* (1995), os marcadores moleculares do tipo microssatélite apresentam base mendeliana e possibilitam diferenciar dois ou mais indivíduos. Características morfológicas e agronômicas têm a desvantagem de serem influenciadas pelos fatores do ambiente e podem não representar a real similaridade ou diferença entre os indivíduos. Por outro lado, marcadores genéticos representam estritamente a variação genética, não sofrendo influência ambiental.

Atualmente há inúmeros tipos de marcadores moleculares diferenciando-se quanto a: 1) habilidade em detectar diferenças entre indivíduos, 2) custo, 3) facilidade de uso e 4) consistência e repetibilidade, o que vem incrementando a eficiência do melhoramento de plantas por meio de metodologias como a caracterização de germoplasma, seleção assistida e mapeamento genético (Ferreira e Grattapaglia, 1998). A partir de 1988, com o advento de técnicas baseadas na Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) desenvolvida por Mullis *et al.* (1986), novas possibilidades de aplicação para os marcadores moleculares surgiram nas mais diversas áreas da biologia, tanto em pesquisa básica como aplicada (Saiki *et al.*, 1988).

Em função da crescente necessidade de um maior empenho na resolução de problemas no melhoramento genético de plantas cultivadas, um maior conhecimento da organização genômica e cromossômica, além da caracterização de germoplasmas das plantas, de forma a associar marcadores genéticos às

características fenotípicas, tornaram-se importantes para o melhoramento genético vegetal, visando obter dados que forneçam informações que auxiliem na seleção de novas cultivares a serem lançadas comercialmente (Ferreira e Grattapaglia 1998).

Dentro desse contexto, a caracterização molecular vem sendo uma valiosa ferramenta empregada nas pesquisas referentes ao gênero *Arachis*. As espécies têm sido estudadas principalmente quanto às proteínas de reserva de sementes, isoenzimas, RAPD (*Random Amplified Polimorphic DNA*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) SSR (*Simple Sequence Repeats*) e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*). A análise das proteínas das sementes, por exemplo, foi esclarecedora na determinação da condição híbrida do acesso BRA-031143 de *A. pintoii* (seção *Caulorrhizae*), espécie que apresenta grande potencial agrônomo. Os indivíduos deste acesso mostraram nítida segregação quanto aos fenótipos encontrados, sempre constantes, em relação aos indivíduos dos demais acessos (Bertozzo e Valls, 2001).

Apesar da baixa capacidade discriminatória dos marcadores do tipo RAPD, a análise da diversidade genética entre espécies e acessos da seção *Extranervosae* produziu resultados extremamente coerentes com a classificação taxonômica proposta a partir de aspectos morfológicos. Semelhantemente, análises para caracterização de espécies silvestres de *Arachis* via RAPD e RFLP têm possibilitado realizar interpretações bastante consistentes em relação ao posicionamento das espécies nas diversas seções (Galgaro *et al.*, 1998). Atualmente existem esforços concentrados na busca de marcadores capazes de discriminar a variabilidade entre acessos de *A. hypogaea*, bem como na identificação de marcadores vinculados a caracteres de importância agrônoma, como a resistência a nematóides (Garcia *et al.*, 1996; Hopkins *et al.*, 1999).

O emprego de diversas técnicas moleculares possibilitou maiores esclarecimentos na definição dos prováveis progenitores do *A. monticola*, espécie essa que através de domesticação deu origem ao amendoim cultivado. Kochert *et al.* (1991), através da técnica de RFLP, sugeriram que *A. duranensis* e *A. ipaensis* (seção *Arachis*) seriam os parentes mais próximos da espécie *A. hypogaea*, descartando a hipótese de que *A. batizocoi* (seção *Arachis*) estaria relacionada com a cultivar. Esses resultados foram corroborados mais tarde por análise de marcadores RAPD, a qual sugeriu que *A. duranensis* seria a espécie doadora do

genoma "A" de *A. hypogaea*, excluindo *A. batizocoi* como doadora do genoma "B" (Hilu e Stalker, 1995).

Estudos de diversidade genética também vem sendo alvo de inúmeros trabalhos voltados ao gênero *Arachis*. Santos *et al.* (2003) detectaram divergência dentro e entre espécies em cinco seções *Erectoides*, *Trirectóides*, *Procumbentes*, *Rhizomatosae* e *Arachis*, por meio da utilização de 80 marcadores polimórficos via RAPD. Alta diversidade genética foi detectada entre diversos acessos de *A. hypogaea*, além de espécies silvestres provenientes da América do Sul, África e Ásia com o uso de marcadores microssatélites do tipo SSR, revelando mais de 60 novos marcadores para o gênero *Arachis* (Ferguson *et al.*, 2004; Moretzsohn *et al.*, 2004).

Milla *et al.* (2005) empregaram a técnica de AFLP em acessos pertencentes à seção *Arachis* para análise da diversidade genética e verificaram que *A. monticola* e *A. hypogaea* estavam entre as espécies mais relacionadas suportando ainda mais a hipótese da origem da espécie cultivada. Quanto aos estudos moleculares envolvendo a seção *Heteranthae*, Coelho *et al.* (2001) analisaram as relações filogenéticas entre espécies silvestres de todas as seções do gênero, mas com ênfase para as seções *Heteranthae* e *Triseminatae*, através de marcadores RAPD. Com base nos dados obtidos as duas seções foram arranjadas em dois grandes grupos, o primeiro formado pelos acessos de *A. sylvestris* e *A. dardani* e outro com *A. pusilla*, *A. seridoensis*, *A. interrupta* e *A. triseminatae*. Sabendo-se que esta última espécie pertence à seção *Triseminatae*, os autores sugeriram que possivelmente a seção *Heteranthae* tenha evoluído a partir da seção *Triseminatae*, considerada a mais primitiva.

Marcadores RAPD também foram utilizados para caracterizar as espécies anuais brasileiras das seções *Arachis* e *Heteranthae*. Os dados obtidos foram suficientes para agrupar as espécies em suas respectivas seções. Dentro da seção *Heteranthae* as espécies *A. sylvestris* e *A. giacomettii* apresentaram maior similaridade genética, enquanto as espécies *A. interrupta* e *A. dardani* formaram grupo à parte e afastado das demais. Um terceiro subgrupo foi formado por *A. pusilla* e *Arachis* sp., acesso 10969 (Creste *et al.*, 2005).

2.7. Uso de espécies silvestres em programas de melhoramento genético

Por volta de 1940, o valor das espécies silvestres geneticamente mais próximas do amendoim, com maior potencial de uso em seu melhoramento, passou a ser reconhecido e pesquisado, com ênfase crescente na coleta, caracterização e conservação de germoplasmas (Stalker e Simpson, 1995). Concomitantemente, algumas espécies geneticamente distantes do amendoim passaram a ser coletadas e estudadas quanto a seu potencial para produção de forragem e cobertura vegetal (Otero, 1941). Esse interesse ganhou força a partir da década de 80 por ocasião do lançamento de cultivares comerciais das espécies *A. glabrata* e *A. pintoii* (Prine *et al.*, 1986; Cook *et al.*, 1990). Esta última apresentou-se bastante promissora para a produção de forragem em sistemas agropastoris sustentáveis nos trópicos (Cook e Crosthwaite, 1994; Kerridge e Hardy, 1994; Ayarza *et al.*, 1999).

No entanto, a utilização de espécies silvestres de *Arachis* como novas opções agrícolas transcende a seu uso em pastagens, estendendo-se a cultivos de cobertura para controle de erosão e ornamentação de parques e jardins, em que se destacam *A. repens*, *A. helodes* e *A. kempff-mercadoi*. Também é notável a persistência do cultivo para a produção de grãos alimentícios, entre indígenas brasileiros, das espécies *A. villosulicarpa* e *A. stenosperma*. A primeira espécie é cultivada por três grupos indígenas no Mato Grosso e a segunda foi recentemente localizada, em condições de cultivo, em uma reserva indígena da costa atlântica do Paraná (Stalker e Simpson, 1995; Valls, 1996).

Para os programas de melhoramento genético, a diversidade genética intra-específica é essencial. É particularmente útil na caracterização individual dos acessos e cultivares e como guia na escolha de genitores em programas de cruzamento (Loarce *et al.*, 1996). Entretanto, a utilização de espécies silvestres de *Arachis* como recurso genético para o melhoramento da cultura, é ainda limitada devido, principalmente a diferenças no nível de ploidia entre as espécies diplóides ($2n=2x=20$; ou, $2n=2x=18$) e tetraplóides ($2n=4x=40$, genoma AABB) (Fernández, e Krapovickas, 1994; Lavia, 1998). Tal situação freqüentemente provoca incompatibilidades genético-fisiológicas que ocorrem no pós-cruzamento, a exemplo de dificuldades para a obtenção de híbridos interseccionais devido à esterilidade apresentada nos descendentes (Stalker, 1997).

Existe boa compatibilidade em cruzamentos intraespecíficos. Todavia, apesar de viáveis, os cruzamentos geralmente, originam híbridos estéreis. A obtenção de híbridos interseccionais é bastante difícil e há grandes diferenças de compatibilidade, ocasionando esterilidade dos híbridos. A seção *Erectoides* mostra uma posição central, uma vez que vários cruzamentos já foram documentados entre seus representantes com os de outras seis seções. Por outro lado, a seção *Triseminatae* mostra-se completamente isolada neste aspecto (Gregory e Gregory, 1979; Krapovickas e Gregory, 1994).

Tabela 2. Lista de espécies pertencentes ao gênero *Arachis* analisados citogeneticamente, com seus respectivos números diplóides (2n), tipo de satélite cromossômico (SAT) e referências bibliográficas.

	Espécie	2n	Tipo de satélite	Referências
I	Seção <i>Trierectoides</i> Krapov. e W.C. Gregory			
1	<i>A. guaranítica</i> Chodat e Hassl.	20	2	a
2	<i>A. tuberosa</i> Bong. Ex Benth.	-	-	-
II	Seção <i>Erectoides</i> Krapov. e W.C. Gregory			
3	<i>A. archeri</i> Krapov. e W.C. Gregory	20	2	a
4	<i>A. benthamii</i> Handro	20	2	a
5	<i>A. brevipetiolata</i> Krapov. e W. C. Gregory	-	-	-
6	<i>A. cryptopotamica</i> Krapov. e W. C. Gregory	-	-	-
7	<i>A. douradiana</i> Krapov. e W. C. Gregory	-	-	-
8	<i>A. gracilis</i> Krapov. e W.C. Gregory	20	2	a
9	<i>A. hatschbachii</i> Krapov. e W. C. Gregory	-	-	-
10	<i>A. hermannii</i> Krapov. e W.C. Gregory	20	2	a
11	<i>A. major</i> Krapov. e W.C. Gregory	20	2	a
12	<i>A. martii</i> Handro	-	-	-
13	<i>A. oteri</i> Krapov. e W. C. Gregory	-	-	-
14a	<i>A. paraguariensis</i> Chodat e Hassl. ssp. <i>paraguariensis</i>	20	4	a
14b	<i>A. paraguariensis</i> ssp. <i>capibarensis</i> Krapov. e W.C. Gregory	20	3	a
15	<i>A. porphyrocalyx</i> Valls e C. E. Simpson	18	8	e
16	<i>A. stenophylla</i> Krapov. e W.C. Gregory	20	4	a
17	<i>A. ssp.</i>	-	-	f
III	Seção <i>Extranervosae</i> Krapov. e W.C. Gregory			
18	<i>A. burchellii</i> Krapov. e W.C. Gregory	20	3	a
		20	3 ou 6	b
19	<i>A. lutencens</i> Krapov. et Rigoni	20	3	a
20	<i>A. macedoi</i> Krapov. e W. C. Gregory	20	3	b
21	<i>A. marginata</i> Gardner	-	-	-
22	<i>A. pietrarellii</i> Krapov. e W. C. Gregory	20	3	b
23	<i>A. aff. prostrata</i> Benth	20	2	a
24	<i>A. retusa</i> Krapov. e W. C. Gregory	20	3	b

25	<i>A. setinervosa</i> Krapov. e W. C. Gregory	-	-	-
26	<i>A. submarginata</i> Valls, Krapov. e C. E. Simpson	20	3A	e
27	<i>A. villosulicarpa</i> Hoehne	20	1 ou 2	a
		20	3	b
IV Seção Triseminatae Krapov. e W.C. Gregory				
28	<i>A. triseminata</i> Krapov. e W.C. Gregory	-	-	-
V Seção Heteranthae Krapov. e W.C. Gregory				
29	<i>A. dardani</i> Krapov. e W.C. Gregory	20	2	a
30	<i>A. giacomettii</i> Krapov., W. C. Gregory e C. E. Simpson	20	10?	b
31	<i>A. interrupta</i> Valls e C. E. Simpson	20	10	e
32	<i>A. pusilla</i> Benth.	20	2	a
33	<i>A. seridoensis</i> Valls, C. E. Simpson, Krapov. e R. Veiga	20	10	e
34	<i>A. sylvestris</i> (A. Cheval.) A. Cheval.	20	10	a; b
VI Seção Caulorrhizae Krapov. e W.C. Gregory				
35	<i>A. pintoii</i> Krapov. e W.C. Gregory	20	2 ou 3	a
36	<i>A. repens</i> Handro	-	-	-
VII Seção Procumbentes Krapov. e W.C. Gregory				
37	<i>A. appressipila</i> Krapov. e W.C. Gregory	20	9	a
38	<i>A. chiquitana</i> Krapov. , W.C. Gregory e C. E. Simpson	-	-	-
39	<i>A. hassleri</i> Krapov., Valls e C. E. Simpson	20	9	e
40	<i>A. kretschmeri</i> Krapov. e W.C. Gregory	20	9	a
41	<i>A. lignosa</i> (Chodat e Hassl.) Krapov. e W.C. Gregory	20	9	a
42	<i>A. matiensis</i> Krapov. e W.C. Gregory	20	9	a
43	<i>A. pflugeae</i> C. E. Simpson, Krapov. e Valls	20	9	e
44	<i>A. rigonii</i> Krapov. e W.C. Gregory	20	9	a
45	<i>A. subcoriaceae</i> Krapov. e W. C. Gregory	-	-	-
46	<i>A. vallsii</i> Krapov. E W. C. Gregory	20	-	b
VIII Seção Rhizomatosae Krapov. e W.C. Gregory				
47	<i>A. burkartii</i> Handro	-	-	-
48a	<i>A. glabrata</i> Benth var. <i>glabrata</i>	40	-	a; b
48b	<i>A. glabrata</i> var. <i>Hagenbeckii</i> (Harms ex Kuntze) F. J. Herm.	40	3	a
49	<i>A. nítida</i> Valls, Krapov. e C. E. Simpson	40	3A	e
50	<i>A. pseudovillosa</i> (Chodat e Hassl.) Krapov. e W.C. Gregory	40	-	a
IX Seção Arachis				
51	<i>A. batizocoi</i> Krapov. e W.C. Gregory	20	5 ou 6	a
52	<i>A. benensis</i> Krapov. e W.C. Gregory	20	9	a
53	<i>A. cardenasii</i> Krapov. e W.C. Gregory	20	3 ou 5	a
54	<i>A. correntina</i> (Burkart) Krapov. et W.C. Gregory	20	3	a
55	<i>A. cruziana</i> Krapov., W. C. Gregory e C. E. Simpson	-	-	-
56	<i>A. decora</i> Krapov., W. C. Gregory e Valls	20	-	b
		18	-	d
57	<i>A. diogoi</i> Hoehne	20	6	a

58	<i>A. duranensis</i> Krapov. e W.C. Gregory	20	3 ou 5	a
59	<i>A. glandulifera</i> Stalker	20	3	a
60	<i>A. gregoryi</i> C. E. Simpson, Krapov. e Valls	20	6	e
61	<i>A. helodes</i> Mart. ex Krapov. e Rigoni	20	5	a
62	<i>A. herzogii</i> Krapov., W. C. Gregory e C. E. Simpson	-	-	-
63	<i>A. hoehnei</i> Krapov. e W.C. Gregory	20	3	a
64a	<i>A. hypogaea</i> L. ssp. <i>fastigiata</i> Waldron var. <i>fastigiata</i>	40	3	a
64b	<i>A. hypogaea</i> ssp. <i>hypogaea</i> var. <i>hypogaea</i>	40	5	a
64c	<i>A. hypogaea</i> ssp. <i>hypogaea</i> var. <i>hirsuta</i> Kohler	40	5	a
65	<i>A. ipaensis</i> Krapov. e W.C. Gregory	20	6	a
66	<i>A. aff. kempff-mercadoi</i> Krapov. e W.C. Gregory	20	7	a
67	<i>A. krapovickasii</i> C. E. Simpson, D. E. Williams, Valls e I. G. Vargas	20	5	e
68	<i>A. kulmannii</i> Krapov. e W.C. Gregory	20	3, 5, 6 ou 7	a
69	<i>A. linearifolia</i> Valls, Krapov. e C. E. Simpson	20	-	e
70	<i>A. magma</i> Krapov. e W.C. Gregory	20	6	a
71	<i>A. microsperma</i> Krapov., W. C. Gregory e Valls	20	-	b
72	<i>A. monticola</i> Krapov. e Rigoni	40	3 ou 5	a
73	<i>A. palustris</i> Krapov., W. C. Gregory e Valls	18	3	b; c
74	<i>A. praecox</i> Krapov., W. C. Gregory e Valls	18	3	c
75	<i>A. schininii</i> Krapov., Valls e C. E. Simpson	20	-	e
76	<i>A. simpsonii</i> Krapov. e W. C. Gregory	-	-	-
77	<i>A. sternosperma</i> Krapov. e W.C. Gregory	20	3	a
		20	3 ou 5	b
78	<i>A. trinitensis</i> Krapov. e W. C. Gregory	20	-	b
79	<i>A. valida</i> Krapov. e W.C. Gregory	20	8 ou 6 e 8	a
80	<i>A. villosa</i> Benth.	20	3	a; b
81	<i>A. williamsii</i> Krapov. e W. C. Gregory	20	6	b

(a) Fernandez e Krapovickas (1994); (b) Lavia (1996); (c) Lavia 1998; (d) Peñaloza e Valls (1997); (e) Peñaloza e Valls (2005); (f) *personal communication* (Valls, 2006).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELNOOR, R. V.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Determination of genetic diversity within Brazilian soybean germplasm using random amplified polymorphic DNA techniques and comparative analysis with pedigree. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.18, n. 2, p. 265-273, 1995.

AYARZA, M. A.; VILELA, L.; PIZARRO, E. A.; COSTA, P. H. Agropastoral systems bases on legumes: an alternative for sustainable agricultura in Brazilian Cerrados. In: THOMAS, R.; AYARZA, M. A. (Ed). **Sustainable land management for the oxisols of the Latin American savannas**. Cali: CIAT, 1999. p. 22-36.

AZKUE, D. Chromosome diversity of South America *Oxalis* (Oxalidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**. v. 132, p. 143-152, 2000.

BENNETT, M. D.; LEITCH, I. J. Nuclear DNA amounts in angiosperms. **Annals of Botany**. v. 76, p. 113-176, 1995.

BENTHAN, G. On the structure and affinities of *Arachis* and *Voandzeia*. **Transactions of the Linnaen Society of London**, v. 18, n. 2, p. 155-162, 1841.

BERTOZO, M. R.; VALLS, J. F. M. Seed storage protein electrophoresis in *Arachis pintoii* and *A. repens* (Leguminosae) for evaluating genetic diversity. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, Netherlands, v. 48, n. 2, p. 121-130, 2001.

BESENDORFER, V.; SAMARDZIJA, M.; ZOLDOS, V.; SOLIC, M. E.; PAPES, D. Chromosomal organization of ribosomal genes and NOR-associated heterochromatin, and NOR activity in some populations of *Allium commutatum* Guss. (Alliaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 139, p. 99–108, 2002.

CAI, Q.; LU, S.; CHINNAPPA, C. C. Analysis of karyotypes and Giemsa C-banding patterns in eight species of *Arachis*. **Genome**, v. 29, n. 1, p. 187-194, 1987.

CARVALHO, R.; GUERRA, M. Cytogenetics of *Manihot esculenta* Crantz (cassava) and eight related species. **Hereditas**, v. 136, n. 2, p. 159-168, 2002.

CARVALHO, R.; SOARES, W. S.; BRASILEIRO-VIDAL, A. C.; GUERRA, M. The relationships among lemons, limes and citron: a chromosomal comparison. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 109, n. 1-3, p. 276-282, 2005.

CERMEÑO, M. C.; ORELLANA, J.; SANTOS, J. L.; LACADENA, J. R. Nucleolar organizer activity in wheat, rye and derivatives analyzed by a silver-staining procedure. **Chromosoma** (Berl.), v. 98, p. 370–376. 1984.

CHEVALIER, A. Nouveaux documents sur les Arachides. **Rev. Int. Bot. Appl. Agric. Trop.** v. 9, n. 6, p. 485-496, 1929b.

CHEVALIER, A. Su rune forme ancestrale de l'Arachide cultivée. **Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.** v. 188, p. 1511, 1929a.

COELHO, P. J. A.; MORETZSOHN, M. C.; VALLS, J. F. M. Análise das relações genéticas entre espécies silvestres de *Arachis* utilizando marcadores RAPD. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Brasília-DF, n. 18, p. 1-24, 2001.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: < www.conab.gov.br > acessado em 21 de março de 2005 às 15:00hs.

CONAGIN, C. H. T. M. Desenvolvimento dos frutos nas espécies selvagens de amendoim (*Arachis* spp.). **Bragantia**, v. 18, n. 5, p. 51-70, 1959.

COOK, B. G.; CROSTHWAITE, I. C. Utilization of *Arachis* species as forage. In: SMARTT, J. (ed.). **The Groundnut Crop**. London: Chapman e Hall, 1994. cap. 15, p. 624-663.

COOK, B. G.; WILLIAMS, R. J.; WILSON, G. P. M. Register of Australian herbage plant cultivars. B. Legumes. 21. *Arachis* (a) *Arachis pintoi* Krap. et Greg. Nom. Nud. (Pinto peanut) cv. Amarillo. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 30, p. 445-446, 1990.

CRESTE, S.; TSAI, S. M.; VALLS, J. F. M.; GIMENES, M. A. e LOPES, C. R. Genetic characterization of Brazilian annual *Arachis* species from sections *Arachis* and *Heterantheae*. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 52, p. 1079-1086. 2005.

CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. 2ed. Bronx, USA, The New York Botanical Garden, 1988. 555 p.

DE ROBERTIS, E. D. P., DE ROBERTIS JR., E. M. F. **Bases da Biologia Celular e Molecular**. 2a Edição. Guanabara Koogan (ed.), Rio de Janeiro (RJ), 1993, 332 p.

FÁVERO, A. P. **Cruzabilidade entre espécies silvestres de *Arachis* visando a introgressão de resistência a doenças no amendoim cultivado**. 2004, 165 f. Tese (Doutorado em Agronomia - Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas). ESALQ, São Paulo.

FÁVERO, A. P.; GUIMARÃES, P. M. ; BERTIOLI, D. J.; LEAL-BERTIOLI, S. C. **Avaliação para resistência a mancha preta e ferrugem em híbridos entre o amendoim e as espécies silvestres de *Arachis***. Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005, 15 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 96).

FÁVERO, A. P.; SIMPSON, C. E.; VALLS, J. F. M., VELLO, N. A. Study of the Evolution of Cultivated Peanut through Crossability Studies among *Arachis ipaënsis*, *A. duranensis*, and *A. hypogaea*. **Crop Science**, v. 46, p.1546-1552, 2006.

FERGUSON, M. E.; BRAMEL P. J.; CHANDRA, S. Gene diversity among botanical varieties in peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Crop Science**, v. 44, p. 1847-1854, 2004.

FERNANDEZ, A., e. KRAPOVICKAS, A. Cromosomas y evolution en *Arachis* (Leguminosae). **Bonplandia**, v. 8, p. 187-220, 1994.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 1998. 220 p.

FREITAS, F. O.; PEÑALOZA, A. P. S.; VALLS, J. F. M. O amendoim contador de história. **Série Documentos Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Brasília-DF, v. 107, p. 1-12, 2003.

GALGARO, L.; LOPES, C. R.; GIMENES, M. A.; VALLS, J. F. M.; KOCHERT, G. Genetic variation between several species of sections *Extranervosae*, *Caulorrhizae*, *Heteranthae*, and *Triseminatae* (genus *Arachis*) estimated by DNA polymorphism. **Genome**, Ottawa, Canadá, v. 41, n. 3, p. 445-454, 1998.

GARCIA, G. M.; STALKER, H. T., SHROEDER, E.; KOCHERT, G. Identification of RAPD, SCAR, and RFLP markers tightly linked to nematode resistance genes introgressed from *Arachis cardenasii* into *Arachis hypogaea*. **Genome**, v. 39, p. 836–845, 1996.

GILL, B. S.; FRIEBE, B.; ENDO, T. R. Standard karyotype and nomenclature system for description of chromosome bands and structural aberrations in wheat (*Triticum aestivum*). **Genome**, v. 34, p. 830-839, 1991.

GODOY, I. J.; MORAES, S. A.; ZANOTTO, M. D.; SANTOS, R. C. Melhoramento de amendoim. In: BORÉM, A. (ed.) **Melhoramento de espécies cultivadas**, Viçosa: UFV, 1999, p. 51-94.

GREGORY, M. P.; GREGORY, W. C. Exotic germoplasm of *Arachis* L. interespecific hybrids. **Journal of Heredity**, v. 70, p.185-193, 1979.

GREGORY, W. C.; GREGORY, M. P. Groundnut. *Arachis hypogaea* (Leguminosae-Papilionatae). In: SIMMONDS, N. W. (ed.). **Evolution of Crop Plants**, Longman, London, UK, 1976. p. 151-154.

GREGORY, W. C.; KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, M. P. Structure, variation, evolution and classification in *Arachis*. In: SUMMERFIELD, R. J.; BUNTING, A. H. (ed.). **Advances in Legume Science**. Kew: Royal Botanic Gardens, v. 1, p. 469-481, 1980.

GUERRA, M. Cytogenetics of Rutaceae. V. High chromosomal variability in *Citrus* species revealed by CMA/DAPI staining. **Heredity**, Edinburgh, v. 71, p. 234-241, 1993.

GUERRA, M.; PEDROSA, A.; SILVA, A. E. B.; CORNELIO, M. T. M.; SANTOS, K.; SOARES, W. D. Chromosome number and secondary constriction variation in 51 accessions of a *Citrus* germplasm bank. **Revista Brasileira de Genética**, v. 20, n. 3, p. 489-496, 1997.

HALWARD, T M.; STALKER, H. T.; LARUE, E. A.; KOCHERT, G. Genetic variation detectable with molecular markers among unadapted germ-plasm resources of cultivated peanut and related species. **Genome**, v. 34, p. 1013-1020, 1991.

HAMMONS, R. O. Spangcross-a new peanut variety. **Crop Science**, v. 10, p. 459-460, 1970.

HAMMONS, R. O. The origin and history of the groundnut. In: SMARTT, J. **The Groundnut Crop**. A scientific basis for improvement. London, Chapman & Hall, 1994. cap. 2, p. 24-42.

HASSAN, M. A.; SRIVASTAVA, D. P. Floral biology and pod development of peanut studied in India. *Journal of the Ind. Botanical Soc.*, 45:92-102, 1966.

HILU, K. W.; STALKER, H. T. Genetic relationships between peanut and wild species of *Arachis* sect *Arachis* (Fabaceae): Evidence from RAPDs. **Plant Systematics and Evolution**, v. 198, n. 3-4, p. 167-178, 1995.

HOLBROOK, C. C.; ISLEIB, T. G. Geographical distribution and genetic diversity in *Arachis hypogaea*. **Peanut Science**, v. 28, p. 80-84, 2001.

HOPKINS, M. S.; CASA, A. M.; WANG, T.; MITCHELL, S. E.; DEAN, R. E.; KOCHERT, G. D.; KRESOVICH, S. Discovery and characterization of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in peanut. **Crop Science**, v. 39, n. 4, p. 1243-1247, 1999.

HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, v. 36, p. 1014-1015, 1980.

HUSTED, L. Cytological studies on the peanut, *Arachis*. I. Chromosome number and morphology. **Cytologia**, v. 5, p.109-117, 1933.

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

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. 5. ed. Companhia Editora Nacional: São Paulo-SP, 1979. p. 371-382.

KERRIDGE, P. C.; HARDY, B. **Biology and Agronomy of Forage *Arachis***. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical,1994, p. 1-18.

KIM, E. S.; PUNINA, E.O; RODIONOV, A. V. Chromosome CPD (PI/DAPI)- and CMA/DAPI-banding patterns in *Allium cepa* L. **Russian Journal of Genetics**, v. 38, n. 4, p. 392-398, 2002.

KLINKHARDT, M. B. Some aspects of karyoevolution in fishes. **Animal Research Development**, v. 47, p. 7–36, 1998.

KNAUFT, D. A.; NORDEN, A. J.; GORBET, D. W.; MARTIN, F. G. Stability of market quality factors in peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Soil and Crop Science Society of Florida Proceedings**, v. 46, p. 72-74, 1987.

KNAUFT, D. A.; OZIAS-AKINS, P. Recent methodologies for germplasm enhancement and breeding. In: PATTEE, H. E.; STALKER, H. T. (eds). **Advances in Peanut Sciences**, Am. Peanut Res. and Educ. Soc. Inc., Stillwater , 1995. p. 54-94.

KOCHERT, G.; HALWARD, T.; BRANCH, W. D.; SIMPSON, C. E. RFLP variability in peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars and wild species. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 81, p. 565-570, 1991.

KOKALIS-BURELLE, N.; PORTER, D. M.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; SMITH, D. H.; SUBRAHMANYAM, P. **Compendium of Peanut Diseases**. 2ed. Minnesota: The American Phytopathological Society, 1997. 94 p.

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

KRAPOVICKAS, A.; RIGONI, V. A. Nuevas especies de *Arachis* vinculadas al problema del origen del maní. **Darviniana**, v. 11, n. 3, p. 431-458, 1957.

LAVIA, G. I. Estudios cromosomicos en *Arachis* (Leguminosae). **Bonplandia**, Corrientes, v. 9, p. 111-120, 1996.

LAVIA, G. I. Karyotypes of *Arachis palustris* and *A. praecox* (Section *Arachis*), two species with basic chromosome number $x=9$. **Cytologia**, v. 63, p. 177-181. 1998.

LAVIA, G. I.; FERNÁNDEZ, A. (2001) Caracterización cromosómica de germoplasma de maníes silvestres pertenecientes a las secciones *Extranervosae*, *Heteranthae* y *Arachis*. **Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE)** - UNNE-CONICET. Disponível em www1.unne.edu.ar/cyt/2001/6-Biologicas/B-056.pdf acessado em Janeiro de 2006.

LIMA, J. G. A.; PEÑALOZA, A. P. S.; VALLS, J. F. M.; SANTOS, S. Caracterização citogenética de espécies brasileiras de *Arachis* (Leguminosae). In: VII ENCONTRO DO TALENTO ESTUDANTIL DA EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA, 2002, Brasília-DF. **Resumos dos trabalhos...** Brasília-DF: Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia, 2002.

LOARCE, Y.; GALLEGRO, R.; FERRER, E. A comparative analysis of the genetic relationships between rye cultivars using RFLP and RAPD markers. **Euphytica**, v. 88 n. 2, p. 107-115, 1996.

LOPEZ-LEON, M. D.; CABRERO, J.; CAMACHO, J. P. M. Unusually high amount of inactive ribosomal DNA in the grasshopper *Stauroderus scalaris*. **Chromosome Research**, v. 7, p. 83-88, 1999.

MACÊDO, M. H. G. Amendoim Disponível em conab.gov.br/download/cas/especiais/AMENDOIM-An%E1lise perspectiva... acessado em 06 de maio de 2005 as 20:00hs. 2004.

MELLINK, C. H. M.; BOSMA, A. A.; DE HAAN, N. A. Variation in size of Ag-NORs and fluorescent rDNA *in situ* hybridization signals in six breeds of domestic pig. **Hereditas**, v. 120, p. 141–149, 1994.

MELO, N. F.; GUERRA, M. Variability of the 5S and 45S rDNA sites in *Passiflora* L. species with distinct base chromosome numbers. **Annals of Botany**, v. 92, p. 309-316, 2003.

MILLA, S. R.; ISLEIB, T. G.; STALKER, H. T. Taxonomic relationships among *Arachis* sect. *Arachis* species as revealed by AFLP markers. **Genome**, v. 48, n. 1, p. 1–11, 2005.

MORETZSOHN, M. C.; HOPKINS, M. S., MITCHELL, S. E.; KRESOVICH, S.; VALLS, J. F. M.; FERREIRA, M. E. Genetic diversity of peanut (*Arachis hypogaea* L.) and its wild relatives based on the analysis of hypervariable regions of the genome. **Plant Biology**, v. 4, p. 1-10, 2004.

MOURAS, A.; WILDENSTEIN, C.; SALESSES, G. Analysis of karyotype and c-banding pattern of *Nicotiana plumbaginifolia* using 2 techniques. **Genetica**, v. 68, n. 3, p. 197-202, 1986.

MULLIS, K.; FALOONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G.; ERLICH, H. Specific Enzymatic Amplification of DNA In vitro – The Polymerase Chain – Reaction. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 51, p. 263-273, 1986.

NIGAM, S. N.; RAO, M. J. V.; GIBBONS, R. W. Artificial hybridization in groundnut. India:ICRISAT, 27p. (ICRISAT. Information Bulletin, 29). In: BORÉM, A.(ed) **Hibridação artificial de plantas**, Viçosa:UFV, p. 83-100, 1999.

NISHIKAWA, T.; SATO, K. **Chromosome numbers of *Erigeron miyabeanus* Tatew. & Kitam. (Asteraceae) and the alien taxa from Hokkaido, northern Japan**. 2003, p. 145-148, (Bulletin of the National Science Museum. Serie B. v. 29).

OTERO, J. R. Notas de uma viagem aos campos do sul do Mato Grosso. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, 1941.

PEÑALOZA, A. P. S. **Avanços da citogenética do gênero *Arachis* no Brasil**. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra), 2004.

PEÑALOZA, A. P. S.; VALLS, J. F. M. Chromosome number and satellited chromosome morphology of eleven species of *Arachis* (Leguminosae). **Bonplandia**, Corrientes, Argentina, v. 14, n. 1-4, p. 65-72, 2005.

PEÑALOZA, A. P. S.; VALLS, J. F. M. Contagem do número cromossômico em acessos de *Arachis decora* (Leguminosae). In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS, 1997, **Anais...**, Campinas: IAC, 1997, p. 39.

PENDA'S, A. M.; MORAN, P.; GARCIA-VASQUEZ, E. Multi-chromosomal location of ribosomal RNA genes and heterochromatin association in brown trout. **Chromosome Research**, v. 1, p. 63-67, 1993.

PRINE, G. M.; DUNAVIN, L. S.; MOORE, J. E. ROUSH, R. D. Registration of Florigraze rhizome peanut. **Crop Science**, v. 26, p. 1084-1085, 1986.

RAINA, S. N.; MUKAI, Y. Detection of a variable number of 18S- 5.8S-26S and 5S ribosomal DNA loci by fluorescent *in situ* hybridization in diploid and tetraploid *Arachis* species. **Genome**, v. 42, p. 52-59, 1999a.

RAINA, S. N.; MUKAI, Y. 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**, v. 214, p. 251-262, 1999b.

RUFAS, J. S.; ITURRA, P.; DE SOUZA, W.; ESPONDA, P. Simple silver staining procedure for the localization of nucleolus and nucleolar organizers under light and electron microscopy. **Arch. Biol.**, v. 93, p.267-276, 1982.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 29, p. 487-91, 1988.

SALVADORI, S.; DEIANA, A. M.; COLUCCIA, E.; FLORIDIA, G.; ROSSI, E.; ZUFFARDI, O. Colocalization of (TTAGGG)_n telomeric sequences and ribosomal genes in Atlantic eels. **Chromosome Research**, v. 3, p. 54–58, 1995.

SANCHEZ, A.; JIMÉNEZ, R.; BURGOS, M.; STITOU, S.; ZURITA, F.; DIAZ DE LA GUARDIA, R. Cytogenetic peculiarities in the Algerian hedgehog: silver stains not only NORs but also heterochromatic blocks. **Heredity**, v. 75, p. 10-16, 1995.

SANTOS, R. C.; GODOY, I. J. Hibridação em amendoim. In: BORÉM, A. (ed.) **Hibridação artificial de plantas**, Viçosa:UFV, 1999, p. 83-100.

SANTOS, R. C.; GODOY, J. I.; FÁVERO, A. P. Melhoramento do amendoim. In: SANTOS, R. C. (ed.) **O Agronegócio do Amendoim no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2005, p. 123-192.

SANTOS, R. C.; MELO FILHO, P. de A.; BRITO, S. de F. M.; MORAES, J. de S. Fenologia de genótipos de amendoim dos tipos botânicos Valência e Virgínia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 32, n. 6, p. 607-612, 1997.

SANTOS, V. S. E.; GIMENES, M. A.; VALLS, J. F. M.; LOPES, C. R. Genetic variation within and among species of five sections of the genus *Arachis* L. (Leguminosae) using RAPDs. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, Netherlands, v. 50, n. 8, p. 841-848, 2003.

SCHULZ-SCHAEFFER, J. The nucleolus organizer region. In: SYBENGA, J. (ed.) **Cytogenetics, plants, animals, human**. Springer-Verlag, New York, U.S.A. 1980, p. 36–38.

SCHWEIZER, D. Reverse fluorescent chromosome-banding with Chromomycin and DAPI. **Chromosoma**, v. 58, n. 4, p. 307-324, 1976.

SEAL, A. G.; BENNETT, M. D. Preferential C-banding of wheat or rye chromosomes. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 63, p. 227-233, 1982.

SEIJO, J. G.; LAVIA, G. I.; FERNANDEZ, A.; KRAPOVICKAS, A.; DUCASSE, D.; e MOSCONE, E. A. 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**, v. 91, n. 9, p. 1294-1303, 2004.

SINGH, A. K.; SIMPSON, C. E. Biosystematics and genetics resources. In: SMARTT, J. (ed.). **The groundnut Crop**. London: Chapman & Hall , 1994, p. 96-137.

SINGH, A.K. Groundnut, *Arachis hypogaea* (Leguminosae-Papilionoideae). In: SMARTT, J.; SIMMONDS, N.W. (eds.). **Evolution of Crop Plants**, 2 ed., London, Longman, 1994, cap. 48, p. 246-250.

SMITH, B. W. *Arachis hypogaea*. Aerial Flower and Subterranean Fruit **American Journal of Botany**, v. 37, n. 10, p. 802-815, 1950.

SOUZA, M. G. C.; BENKO-ISEPPON, A. M. Cytogenetics and banding patterns on Caesalpinioideae and Papilionoideae native from Pará, Amazonas, Brasil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, Londres, v. 144, n. 1, p. 181-191, 2004.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa. São Paulo-SP: Instituto Plantarum, 2005, 640p.

STALKER, H. T.; DHESI, J. S.; PARRY, D. C.; HAHN, J. H. Cytological and Interfertility relationships of *Arachis* Section *Arachis*. **American Journal of Botany**, v. 78, n. 2, p. 238-246, 1991.

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

STALKER, H.T. Peanut (*Arachis hypogaea* L.) **Field Crops Research**, v. 53, p.:205-217, 1997.

SUMNER, A.T. **Chromosome banding**. London: Unwin Hyman. 1990, 434 p.

SUMNER, A.T. **Chromosomes: Organization and Function**. Blackwell Publishing Limited, 2003, 304 p.

UMEN, D. P. **Biology of peanut flowering**. New Delhi: Amerind Pub., 1976. 77p.

VALLS, J. F. M. O gênero *Arachis* (Leguminosae): Importante fonte de proteínas na Pre-Historia Sul-Americana? In: REUNIAO CIENTIFICA DA SOCIEDADE DE ARQUEOLOGIA BRASILEIRA, 8, 1996, Porto Alegre, RS: Sociedade de Arqueologia Brasileira, **Anais...** 1996, v. 1, p. 265-280.

VALLS, J. F. M. Recursos genéticos de *Arachis*: Avanços no conhecimento botânico e a situação atual de conservação e uso. **Agrociência**, Montevideo, Uruguai, v. 9, n. 1-2, p. 123-132, 2005.

VALLS, J. F. M. Recursos genéticos do gênero *Arachis*. In: SANTOS, R. C. (ed.) **O agronegócio do amendoim no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2005, p. 45-69.

VALLS, J. F. M.; SIMPSON, C. E. New species of *Arachis* L. (Leguminosae) from Brazil, Paraguay and Bolivia. . **Bonplandia**, Corrientes, Argentina, v. 14, n. 1-4, p. 35-63, 2005.

VALLS, J. F. M.; SIMPSON, C. E. Novas espécies de *Arachis* (Leguminosae). In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS, 1, 1997, **Anais...** Campinas-SP : Instituto Agronômico/IAC, 1997, p. 27-28.

VALLS, J. F. M.; SIMPSON, C. E. Taxonomy, natural distribution, and attributes of *Arachis*. In: KERRIDGE, P. C.; HARDY, B. **Biology and Agronomy of Forage *Arachis***. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, p. 1-18, 1994.

VOSA, C. G. Chromosome banding in plants. In: SHARMA, A. K.; SHARMA, A. (eds.). **Chromosome and Cell Genetics**, Gordon and Breach Science Publishers, London, 1985, p. 79-104.

WEISING, K.; ATKINSON, R. G.; GARDNER, R. C. Genomic fingerprinting by microsatellite-primed PCR: a critical evaluation. **PCR Methods Applications**, v. 4, p. 249-255, 1995.

WYNNE, J. C.; HALWARD, T. Cytogenetics and genetics of *Arachis*. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 8, n. 3, p. 189-220, 1989.

ZOYA, V. A. Heterochromatin in Animals and Plants. Similarities and Differences. **Plant Physiology**, v. 129, p. 40-49, 2002.

ZURITA, F.; SÁNCHEZ, A.; BURGOS, M.; JIMÉNEZ, R.; DE LA GUARDIA, R. D. Interchromosomal, intercelular and interindividual variability of NORs studied with silver staining and *in situ* hybridisation. **Heredity**, v. 78, p. 229–234, 1997.

CAPÍTULO II

CARIOLOGIA DE CINCO ESPÉCIES DA SEÇÃO *HETERANTHAE* PERTENCENTE AO GÊNERO *ARACHIS*

Manuscrito a ser enviado à revista:
Genetics and Molecular Biology (ISSN 14154757)

Cariologia de cinco espécies da seção *Heteranthae* pertencente ao gênero *Arachis*

Silvokleio da Costa Silva¹, Maria Isabel Gomes Martins², Roseane Cavalcanti dos Santos³, Andréa del Pilar de Souza Peñaloza⁴, Péricles de Albuquerque de Melo Filho⁵, Reginaldo de Carvalho²

¹Mestrado em Melhoramento Genético de Plantas, Depto. de Agronomia, UFRPE, Recife, PE, Brasil.

²Laboratório de Genética-Bioquímica e Sequenciamento de DNA, Depto. de Biologia/Genética, UFRPE, Recife, PE, Brasil.

³Centro Nacional de Pesquisa do Algodão, EMBRAPA, Campina Grande, PB, Brasil.

⁴Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia, EMBRAPA, Brasília, DF, Brasil.

⁵Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife, PE, Brasil.

Resumo

Dentre as espécies do gênero *Arachis*, as da seção *Heteranthae* são endêmicas do Brasil, especialmente na região Nordeste e nos Estados de Goiás e Minas Gerais. O presente trabalho teve por objetivo realizar um estudo cariomorfológico em 10 acessos pertencentes a cinco espécies de *Heteranthae* por meio da coloração convencional e do uso de fluorocromos base-específicos CMA₃ e DAPI. Todos os acessos apresentaram número cromossômico diplóide $2n=20$ com morfologia metacêntrica (maioria dos cromossomos) a submetacêntrica. *Arachis dardani*, *A. pusilla* e *A. interrupta* apresentam fórmula cariotípica $18m+2sm$ e satélite tipo 2, enquanto que *A. sylvestris* e *A. giacomettii* possuem $16m+4sm$ e satélite tipo 10. Divergências numéricas com relação às regiões heterocromáticas CMA⁺ foram detectadas entre as espécies, porém todas localizadas nas regiões pericentroméricas. A espécie *A. pusilla* apresentou o maior número de blocos ricos em GC localizados em todos os cromossomos do complemento. De acordo com os dados obtidos, sugeriu-se que as espécies *A. dardani* e *A. interrupta* são as mais primitivas com base na assimetria moderada e tipo de satélite. Dados relacionados ao tipo de satélite de *A. interrupta* divergem da literatura. Ao menos em *A. pusilla*, a heterocromatina constitutiva parece ter sofrido modificações recentes na sua constituição que, ao contrário das demais espécies, apresentou blocos pericentroméricos CMA⁺ em todo o complemento cromossômico.

Palavras-chaves: Arachis; Heteranthae; CMA/DAPI;

Introdução

O gênero *Arachis* L. (família Fabaceae) possui 80 espécies registradas até o momento. Essas espécies são originárias da América do Sul e distribuem-se desde o Leste dos Andes, Sul da Amazônia, Norte da Planície Platina até o Noroeste da Argentina. Dentre seus representantes, 64 espécies ocorrem no Brasil, sendo 47 restritas ao território brasileiro, 15 distribuídas na Bolívia, 14 no Paraguai, seis na Argentina e duas no Uruguai. O gênero encontra-se dividido em nove seções *Trirectoides*, *Erectoides*, *Extranervosae*, *Triseminatae*, *Heteranthae*, *Caulorrhizae*, *Procumbentes*, *Rhizomatosae* e *Arachis* (Krapovickas e Gregory, 1994; Valls e Simpson, 2005). O amendoim cultivado (*A. hypogaea* L., seção *Arachis*) é o representante de maior importância econômica sendo a quarta oleaginosa mais cultivada no mundo, superada apenas pela soja, algodão e canola. Suas sementes podem ser consumidas cruas, cozidas ou na forma de doces ou pastas (Santos et al., 1997; Fávero, 2004).

Os primeiros estudos citogenéticos no gênero *Arachis* foram feitos por Husted (1933, 1936). A maioria dos representantes deste gênero é diplóide com $2n=2x=20$, com exceção da *A. decora*, *A. porphyralyx*, *A. palustris* e *A. praecox* que possuem $2n=2x=18$ (Peñaloza e Valls, 1997; Peñaloza et. al., 2001; Lavia, 1998). Por outro lado, as espécies *A. hypogaea*, *A. monticula*, *A. glabrata*, *A. pseudovillosa* e *A. nitida* são tetraplóides com $2n=4x=40$ (Krapovickas e Rigoni, 1951; Gregory et. al., 1973; Fernandez e Krapovickas, 1994; Peñaloza et. al., 2001). Dentre as espécies que constituem o gênero *Arachis*, as da seção *Heteranthae* são endêmicas do Brasil, sendo encontradas tipicamente na região Nordeste e nos Estados de Goiás e Minas Gerais. Seus representantes são anuais, de ciclo reprodutivo curto e com potencial, principalmente para uso forrageiro. Segundo Valls (2005), o interesse pelos recursos genéticos de *Arachis* fundamenta-se no impacto econômico e ecológico, passíveis de exploração, via variabilidade genética, com a finalidade de subsidiar programas de melhoramento genético das espécies cultivadas, pela transferência de características fenotípicas desejáveis encontradas em espécies silvestres como, por

exemplo, a tolerância à seca, característica essa que parece estar presente nas espécies da seção *Heterantheae*.

A caracterização genética de germoplasma de *Arachis* tem proporcionado um melhor entendimento da potencialidade dos recursos genéticos em espécies cultivados ou silvestres, visando a introgressão de genes de interesse agrônomo e sua possível utilização em programas de melhoramento genético para a obtenção de novas cultivares de amendoim. Portanto, o presente trabalho teve por objetivo analisar cariotipicamente, 10 acessos da seção *Heterantheae*, por meio da técnica convencional e bandeamento cromossômico CMA/DAPI, visando detectar variabilidade cromossômica intraseccional e fornecer informações que possam ser utilizadas em programas de melhoramento genético do gênero.

Materiais e Métodos

Os acessos utilizados (Tabela 1) foram provenientes do Banco Ativo de Germoplasma de Amendoim (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Brasil). As sementes foram tratadas com ethrel (1%) e germinadas em papel filtro. Após a germinação as plântulas foram transferidas para copos descartáveis com substrato autoclavado. As pontas de raízes foram coletadas e pré-tratadas com 8-hidroxiqiloneína (8HQ) a 2mM por 16h a 15 °C, fixadas em etanol : ácido acético (3:1, v/v) por 24h e estocadas em freezer a -20 °C para subsequente preparação de lâminas.

Para a análise convencional as raízes foram hidrolisadas em HCl 5N, após dissecadas em uma gota de ácido acético 45%, com remoção da lamínula na presença de nitrogênio líquido, sendo as lâminas coradas com Giemsa 2% e montadas com Entellan (Guerra, 1983). Para a técnica de bandeamento cromossômico fluorescente seguiu-se a metodologia de Schweizer (1976) com modificações: as raízes foram inicialmente digeridas em solução enzimática (2% celulase / 20% pectinase) a 37°C por 1h, dissecadas em uma gota de ácido acético 45% e a lamínula também foi removida na presença de nitrogênio líquido. Depois de envelhecidas por três dias, as lâminas foram coradas com cromomicina A₃ (CMA) a 0,5 mg/ml por 30 min e com 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) a 2 µg/ml por 30 min, sendo montadas em glicerol/Mcllvaine (1:1, v/v). As melhores células foram fotografadas em microscópio Leica DMLB, usando o sistema de fotomicroscopia

Leica wild MPS 48, utilizando luz UV, e filtros específicos com comprimento de onda de 360-390 nm para DAPI e de 430-470 nm para CMA para o bandeamento com fluorocromos e luz halógena para fotografias convencionais. Para ambas as técnicas utilizou-se filme Fuji Asa 100. O programa computacional Image Tool 3.0 foi empregado nas medições cromossômicas. A construção do idiograma foi baseada na análise de 10 metáfases e/ou pro-metáfases dos acessos. Os cromossomos foram classificados baseados na nomenclatura proposta por Guerra (1986) e Morawetz e Samuel (1988). Os tipos de satélites descritos seguiram a classificação de Fernandez e Krapovickas (1994).

Resultados e Discussão

Todos os acessos analisados apresentaram número diplóide $2n=2x=20$ (Tabela 2). Os núcleos interfásicos foram do tipo arreticulado (Figura 1g), apresentando-se uniformes entre os acessos. O padrão de condensação cromossômica, observado em prometáfases, foi do tipo proximal, ou seja, primeiros pontos de condensação nas regiões centroméricas e os finais das cromátides condensando-se mais tardiamente. Tais dados corroboram com os apresentados por Fernandez e Krapovickas (1994). Todas as espécies analisadas apresentaram apenas um par de satélites localizados após o segmento distal no braço curto.

Os satélites variaram apenas em relação ao tamanho e conseqüentemente aos tipos. Fernandez e Krapovickas (1994) classificaram os cromossomos satelitados em 10 diferentes tipos, foram levados em consideração o seu tamanho relativo e a posição em relação ao centrômero. Os satélites do tipo 1 a 7 são considerados macrossatélites, enquanto que os do tipo 9 e 10 são considerados microssatélites e o do tipo 8 intermediário. Segundo Fernandez e Krapovickas (1994), Peñaloza (2000) e Lavia e Fernandez (2001; 2002), a espécie *A. sylvestris* apresenta satélite do tipo 10, dados estes confirmado neste estudo. Peñaloza e Valls (2005) reportaram que *A. seridoensis* e *A. interrupta* possuem este mesmo tipo de satélite, entretanto os dados encontrados no presente estudo permitiram concluir que *A. interrupta* apresentou satélite tipo 2. Para o genótipo de *A. giacomettii* foi observado do satélite tipo 10, confirmando uma suposição descrita no trabalho de Lavia (1996) a qual relatou que os satélites seriam provavelmente, do tipo 9 ou 10. Já os acessos de *A. dardani*, como reportado por Fernandez e Krapovickas (1994), e *A. pusilla* possuem um par satelitado do tipo 2.

Fernandez e Krapovickas (1994) sugeriram um caminho evolutivo para as espécies deste gênero onde eventos de translocações ou inversões estariam relacionados à diversidade dos tipos de satélites cromossômicos, sendo os do tipo 2 e 3 os mais primitivos, visto que os mesmos se fazem presentes na maioria das espécies e seções do gênero. Ainda com base no contexto evolutivo Peñaloza (2000) sugere que a simetria dos cariótipos dá uma idéia de evolução, sendo que as espécies com cariótipos mais simétricos são consideradas mais primitivas.

Arachis dardani, *A. pusilla* e *A. interrupta* apresentaram fórmula cariotípica $18m+2sm$, com comprimento médio do complemento cromossômico igual a 1,71 μm , 1,68 μm e 1,42 μm , respectivamente (Tabela 2) e satélite do tipo 2 (Figura 1a-b e 1e). As espécies *A. sylvestris* e *A. giacomettii* possuem fórmula cariotípica $16m+4sm$, comprimento médio do complemento cromossômico igual a 1,79 μm e 2,00 μm , respectivamente (Tabela 2) apresentando um par satelitado do tipo 10 (Figura 1d e 2i). Ambos os cariótipos são moderadamente assimétricos. O comprimento médio do maior e menor par cromossômico encontra-se na tabela 2, sendo o maior conjunto representado por *A. giacometti* e o menor por *A. interrupta*.

Quanto ao tamanho longitudinal cromossômico, Lavia e Fernandez (2002) analisaram seis seções do gênero *Arachis* da qual a seção *Heteranthae* apresentou um dos menores tamanhos cromossômicos e conteúdo de DNA nuclear. De acordo com Krapovickas e Gregory (1994) os maiores conteúdos de DNA são observados nas espécies mais primitivas. No entanto, Stebbins (1956) considera que não há correlação entre o grau de evolução e o conteúdo de DNA. Este autor preferiu aceitar que em um dado grupo de plantas superiores exista correlação entre o conteúdo de DNA e a adaptação ecológica.

Ainda explorando a análise da coloração convencional, não foi possível visualizar a constrição secundária dos cromossomos estudados. No entanto através da morfologia cromossômica e o tipo de satélite é possível associá-las. Todavia, a coloração com nitrato de prata ($AgNO_3$) seria satisfatória para evidenciá-las, como realizado por Berg e Greilhuber (1992) em espécies de *Cestrum*, e associá-las as RON's. Seijo e Fernandez (2003) utilizaram a localização da constrição secundária como um dos fatores para a diversificação cariotípica de espécies do gênero *Lathyrus*.

Com respeito à composição base-específica dos segmentos heterocromáticos, todos os acessos analisados apresentaram bandas CMA⁺/DAPI⁻

no par 4, flanqueando a região organizadora nucleolar (RON) (Figura 3), entretanto as espécies *A. dardani*, *A. pusilla* e *A. interrupta* (Figura 3a,c-d, respectivamente) destacaram-se por possuírem a marcação da banda CMA⁺ mais forte no satélite. Os acessos de *A. dardani* apresentaram uma banda CMA⁺/DAPI⁻ centrométrica no par 3 (Figura 2a-b e 3a), enquanto que em *A. giacomettii* tal banda encontrou-se presente no par 5 (Figura 2i-j e 3e). Os dados com fluorocromos base-específicos nas células analisadas dos acessos de *A. pusilla* revelaram bandas centroméricas CMA⁺ (Figura 2d-e) em todos os cromossomos e bandas DAPI⁺ adjacentes em cinco pares cromossômicos (Figura 2f e 3c). Além do mais foi evidenciado um par heteropicnótico negativo nesta espécie (Figura 2d e 3c).

Os satélites cromossômicos e as RON's destacam-se fracamente com o CMA enquanto que não são evidenciadas na presença do DAPI. Tal observação foi realizada nos acessos de *A. sylvestris* e *A. giacomettii* (Figura 2c e 2l, respectivamente).

Schweizer (1976) e Sumner (1990) afirmam que os fluorocromos podem evidenciar diferencialmente a constituição dos nucleotídeos presentes no segmento de DNA, propiciando uma análise da constituição das regiões observadas, que podem ser ricas em AT, GC, ambas ou neutras. Variações no padrão de marcação com fluorocromo CMA têm sido amplamente descritas na literatura, incluindo-se espécies proximalmente relacionadas (Guerra, 2000).

O padrão de distribuição de regiões heterocromáticas ricas em GC foi utilizado para a distinção de oito tipos de cromossomos em espécies de *Citrus* (Carvalho et al., 2005). Guerra et al. (2000) utilizou tal padrão de bandeamento para descrever espécies de *Rutaceae*, afirmando que variações quantitativas e qualitativas na heterocromatina podem ser comuns em diferentes populações e espécies. De acordo Berg e Greilhuber (1993) tais variações, possivelmente, estão associadas à perda ou amplificação de seqüências de DNA repetitivo. Isto sugere a ocorrência de alterações na organização dos segmentos de DNA repetitivo e que estas modificações na composição cariotípica poderiam ser observadas através desta coloração.

Deste modo, baseados nos dados encontrados no presente estudo sugeriu-se que espécies possivelmente estão sob processos de evolução, visto que as divergências detectadas na constituição da heterocromatina constitutiva dos acessos

analisados sugerirem que possam estar ocorrendo alterações nos segmentos de DNA repetitivo.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Dr. José Francisco Montenegro Valls, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pelo material vegetal concedido para a realização deste estudo.

Referências

BERG C, GREILHUBER J (1992) Cold-sensitive chromosome regions and their relation to constitutive heterochromatin in *Cestrum-Parqui* (Solanaceae). *Genome* 35 (6): 921-930.

BERG C, GREILHUBER J (1993) Cold-sensitive chromosome regions and heterochromatin in *Cestrum-Aurantiacum* (Solanaceae). *Plant Systematics and Evolution* 185 (3-4): 259-273.

CARVALHO R, SOARES-FILHO WS, BRASILEIRO-VIDAL AC, GUERRA M (2005) The relationships among lemons, limes and citron: a chromosomal comparison *Cytogenet. Genome Res* 109:276-282.

FÁVERO AP (2004) Cruzabilidade entre espécies silvestres de *Arachis* visando a introgressão de resistência a doenças no amendoim cultivado. 2004, 165 p. Tese de Doutorado em Agronomia. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas. ESALQ-SP.

FERNADEZ A, KRAPOVICKAS A (1994) Cromosomas y evolution en *Arachis* (Leguminosae). *Bompladia* 8(1-4):187-220.

GREGORY WC, GREGORY MP, KRAPOVICKAS A, SMITH BW, YARBROUGH JA (1973) Structures and genetic resources of peanuts, en C.T. Wilson (ed.). *Peanuts – culture ad uses. Am, Peanut Res. And Educ. Assoc., Stillwater* 3:47-134.

GUERRA M (1983) O uso Giemsa na citogenética vegetal - comparação entre a coloração simples e o bandeamento. *Ciência e Cultura*, São Paulo-Brasil, 35:190-193.

GUERRA M (1986) Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et al. *Rev. Bras Genet* 9:741-743.

GUERRA M (2000) Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Genet. Mol. Biol.* 23:1029-1041.

GUERRA M, SANTOS KGB, SILVA AEB, EHRENDORFER F (2000) Heterochromatin banding patterns in *Rutaceae-Aurantioidae* – A case of parallel chromosomal evolution. *American Journal of Botany*. 87(5): 735-747.

HUSTED L (1933) Cytological studies on the peanut, *Arachis*. I. Chromosome number and morphology. *Cytologia* 5:109-117.

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

KRAPOVICKAS A, GREGORY WC (1994) Taxonomia del género *Arachis* (Leguminosae). *Bomplandia* 8:1-186.

KRAPOVICKAS A, RIGONI VA (1951) Estudios citológicos en el género *Arachis*. *Ver. Invest. Agric.* 5(3): 289-293.

LAVIA GI (1996) Estudios cromosómicos en *Arachis* (Leguminosae). *Bonplandia* 9 (1-2): 111-120.

LAVIA GI (1998) Karyotypes of *Arachis palustris* and *A. praecox* (Section *Arachis*), two species with basic chromosome number = 9. *Cytologia* 63:177-181.

LAVIA GI, FERNANDEZ A, SEIJO G (2001) Avances en la caracterización citogenética de especies de *Arachis*. *Anais do III SIRGEALG - Simpósio de Recursos Genéticos para a América Latina e Caribe*; Londrina-PR, Brasil, 63-67.

LAVIA GI, FERNÁNDEZ A (2001) Caracterización cromosómica de germoplasma de maníes silvestres pertenecientes a las secciones *Extranervosae*, *Heteranthae* y *Arachis*. Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE) - UNNE-CONICET.

LAVIA GI, FERNÁNDEZ A (2002) Contenido de ADN nuclear en especies silvestres y cultivadas del género *Arachis*. Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE) - Facultad de Cs. Agrarias – UNNE.

MORAWETZ W, SAMUEL MRA (1988) Karyological patterns in the *Hamamelidae*. In: CRANE, P.; BLACKMORE, S. Evolution, systematics and fossil history of the *Hamamelidae*. Oxford: Clarendon Press. 40:129-154.

PEÑALOZA APS (2000) Citogenética das espécies silvestres do gênero *Arachis* (Leguminosae). 51º Congresso Nacional de Botânica. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/Sociedade Botânica do Brasil, 45-49.

PEÑALOZA APS, VALLS JFM (1997) Contagem do número cromossômico em acessos de *Arachis decora* (Leguminosae). In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS, Campinas: IAC, Anais, 39.

PEÑALOZA APS, VALLS JFM, GUERRA M (2001) Caracterização citogenética de espécies brasileiras de *Arachis*. - Anais do III SIRGEALG - Simpósio de Recursos Genéticos para a América Latina e Caribe; Londrina-PR, Brasil.

PEÑALOZA APS, VALLS JFM (2005). Chromosome number and satellited chromosome morphology of eleven species of *Arachis* (Leguminosae). **Bonplandia**, Corrientes, Argentina, 14(1-4):65-72.

SANTOS R C, MELO FILHO PA, BRITO SFM, MORAES JS (1997) Fenologia de genótipos de amendoim dos tipos botânicos Valência e Virgínia. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 32(6):607-612.

SCHWEIZER D (1976). Reverse fluorescent chromosome-banding with Chromomycin A and DAPI. *Chromosoma* 58(4):307-324.

SEIJO JP, FERNANDEZ A (2003) Karyotype analysis and chromosome evolution in South American species of *Lathyrus* (Leguminosae). *American Journal of Botany*. 90(70):380-387.

STALKER HT (1991) A New Species in Section *Arachis* of Peanuts with a D Genome. *American Journal of Botany*, v. 78, n. 5, p. 630-637.

STEBBINS GL (1956) Artificial polyploidy as a tool in plant breeding. *Brookhaven Symp. Biol.* 9:37-52.

SUMNER AT (1990) Chromosome banding. London: Unwin Hyman. 434 p.

VALLS JFM (2005). Recursos genéticos do gênero *Arachis*. In: O agronegócio do amendoim no Brasil. Editor técnico: Roseane Cavalcanti dos Santos. Campina Grande: Embrapa Algodão. 45-69.

VALLS JFM, SIMPSON CE (2005) New species of *Arachis* (Leguminosae) from Brasil, Paraguay and Bolivia. *Bonplandia*,14(1-2):35-63.

Tabela 1. Dados de passaporte dos acessos, com respectiva fórmula cariotípica (m-metacêntrico; sm-submetacêntrico), tipo de satélite (SAT), comprimento médio do complemento cromossômico (CMC), comprimento médio do maior par cromossômico (C1) e comprimento médio do menor par cromossômico (C2).

Espécie	Coletores	Acesso	BRA	Município	UF	Latitude S	Longitude W	Cariótipo	Sat	CMC (μ m)	C1 (μ m)	C2 (μ m)
<i>A. dardani</i>	VSSu	V15122	040495	Patos	PB	07 00 24.7	037 17 49.1	18m+2sm	2	1,73+/-0,17	2,34	1,37
	VSSu	V15127	025585	Pombal	PB	06 42 56.9	037 49 10.7	18m+2sm	2	1,55+/-0,28	2,10	1,06
	VSSu	V15128	040517	Pombal	PB	06 44 28.4	037 56 40.3	18m+2sm	2	1,73+/-0,37	2,63	1,35
	VSSu	V15132	025615	Acari	RN	06 21 06.3	036 36 50.2	18m+2sm	2	1,83+/-0,35	2,55	1,32
<i>A. giacomettii</i>	VApNu	V15155	040568	Montalvânia	MG	14 21 17.1	044 23 36.3	18m+2sm	2	1,42+/-0,21	1,88	1,10
<i>A. interrupta</i>	VFAPzSv	V13082	030121	Monte Azul	MG	14 55 15.3	043 29 53.8	16m+4sm	10	1,79+/-0,49	2,35	1,42
<i>A. pusilla</i>	VFAPzSv	V13109	030317	Januária	MG	15 32 33.1	044 24 22.3	18m+2sm	2	1,60+/-0,25	2,08	1,16
	VPzW	V13189	030571	São Francisco	MG	15 57 53.4	044 54 01.9	18m+2sm	2	1,70+/-0,27	2,27	1,18
	VApNu	V15150	014796	Jequitai	MG	17 12 55.1	044 28 02.9	18m+2sm	2	1,74+/-0,33	2,47	1,48
<i>A. sylvestris</i>	VNu	V15161	040576	Porto Nacional	TO	10 42 29.0	048 25 07.1	16m+4sm	10	2,00+/-0,25	2,50	1,62

Coletores: Fa=L.Faraco de Freitas; Nu=A.C.G.S.Nunes; Pz=E.A.Pizarro; S=C.E.Simpson; Su=T.M.F. Suassuna; Sv=G.P.Silva; V=J.F.M.Valls; Ap=A.P.S.Peñaloza; W=W.L.Werneck.

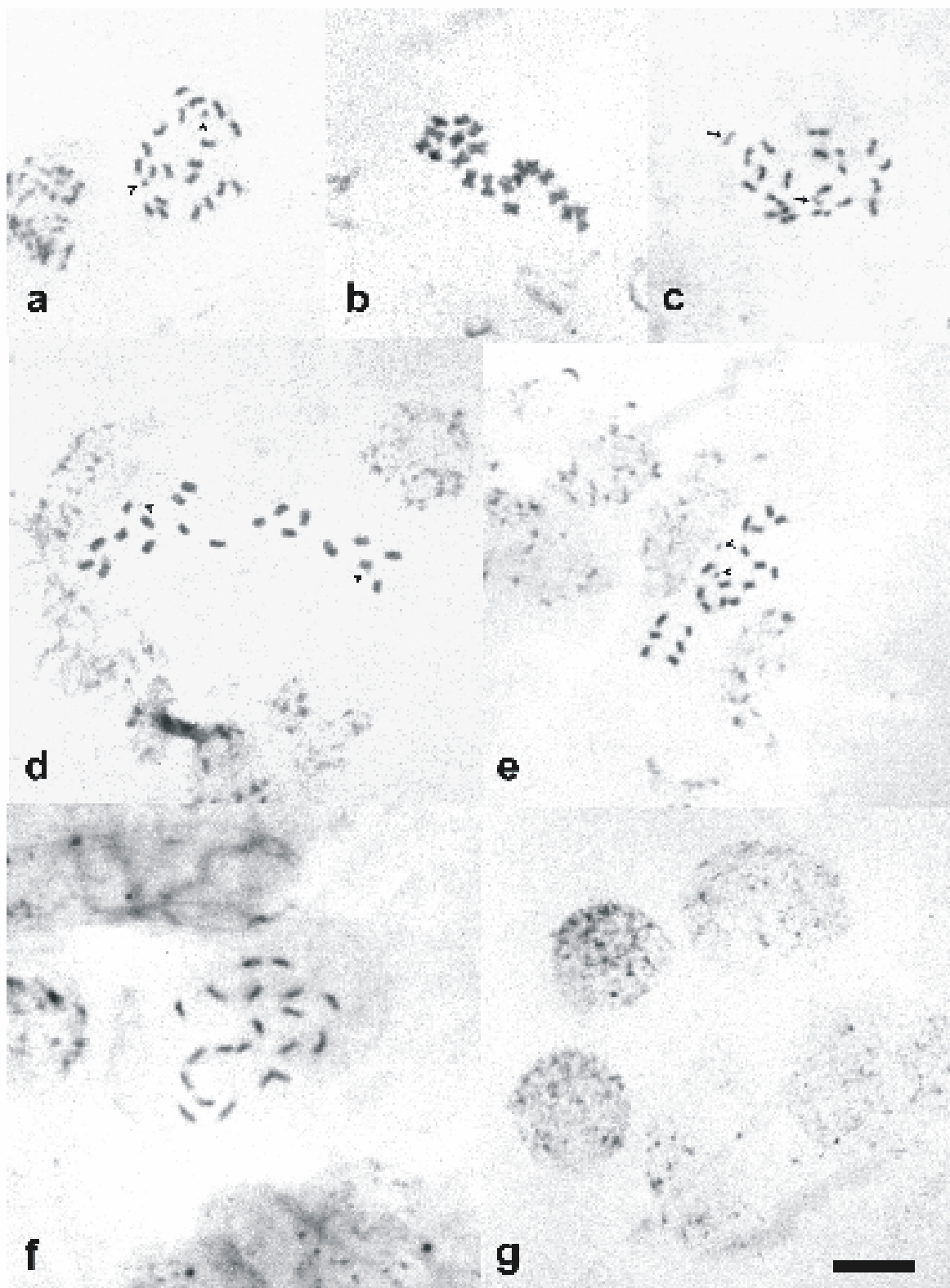


Figura 1. Cromossomos mitóticos de espécies do gênero *Arachis* (seção *Heteranthae*) **a-e**. Metáfases. **f**. Prófase. **g**. Núcleos interfásicos. **a, b** e **g**. *A. dardani*. **c**. *A. pusilla*. **d**. *A. sylvestris*. **e**. *A. interrupta*. **f**. *A. giacomettii*. Setas indicam cromossomos heteropicnóticos. Cabeças de seta indicam satélites cromossômicos. Barra representa 10 μ m.

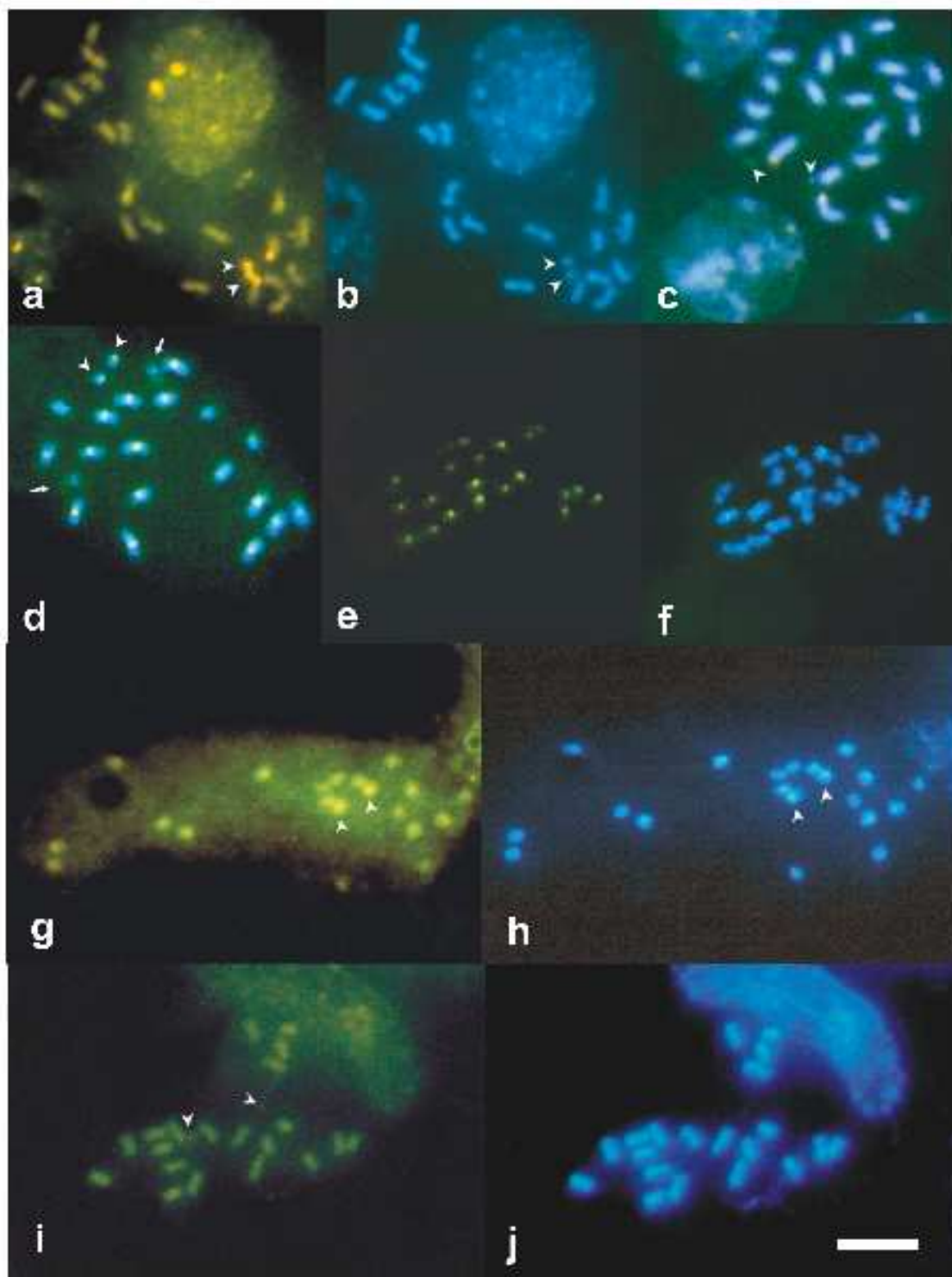


Figura 2. Metáfases mitóticas de espécies do gênero *Arachis* (seção *Heteranthae*) corados com CMA (a, e, g e i) e DAPI (b, f, h e j). c-d. Sobreposição de imagem CMA/DAPI. a-b. *A. dardani*. c. *A. sylvestris*. d-f. *A. pusilla*. g-h. *A. interrupta*. i-j. *A. giacomettii*. Setas indicam cromossomos heteropnóticos. Cabeças de seta indicam satélites cromossômicos. Barra representa 10 μ m.

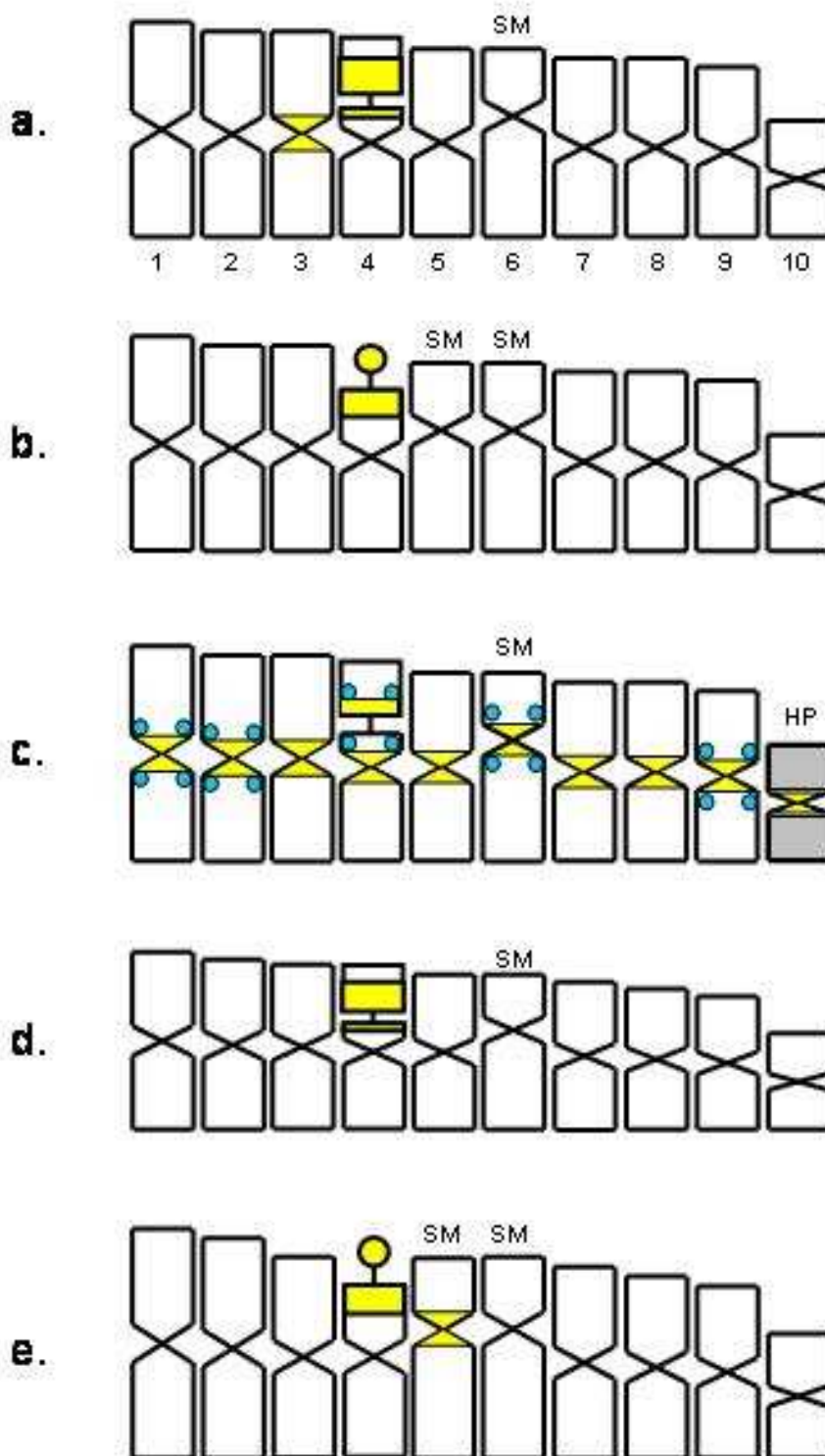


Figura 3. Idiograma de espécies do gênero *Arachis* evidenciando regiões ricas em GC ou AT, reveladas, respectivamente, pelos fluorocromos CMA⁺ (■) e DAPI⁺ (●) nas espécies: **a.** *Arachis dardani*; **b.** *A. sylvestris*; **c.** *A. pusilla*; **d.** *A. interrupta*; e **e.** *A. giacomettii*. **SM.** Cromossomo submetacêntrico. **HP.** Cromossomo heteropicnótico negativo.

CAPÍTULO III

DETECÇÃO DE POLIMORFISMO ENTRE ACESSOS INTERESPECÍFICOS DO GÊNERO *ARACHIS* A PARTIR DE MARCADOR ISSR

Manuscrito a ser enviado à revista:

***Revista de Biologia e Ciências da Terra* ISSN 1519-5228**

(Campina Grande-PB, Brasil)

**Detecção de polimorfismo entre acessos interespecíficos do gênero *Arachis* a
partir de marcador ISSR**

Detection of polymorphism among interespecific accesses of the Arachis genus from marker ISSR

Silvokleio da Costa Silva¹, Fabiana Aparecida Cavalcante Silva¹, Roseane Cavalcanti dos Santos², Reginaldo de Carvalho³, Péricles de Albuquerque Melo Filho⁴.

¹ Mestrando em Agronomia 'Melhoramento Genético de Plantas' - UFRPE, Recife- PE.

² Pesquisadora da Embrapa Algodão, Campina Grande-PB.

³ Professor do Departamento de Biologia/Genética da UFRPE, Recife- PE.

⁴ Professor do Departamento de Agronomia da UFRPE, Recife- PE.

Resumo

The high plasticity of the species of the *Arachis* genus has been white of diverse research in the morphologic, cytogenetic and molecular scope. Such fact if must the high genetic variability among species that finds grouped nine taxonomic sections. The present work had for objective to analyze 11 pertaining accesses to the sections *Heteranthae* and *Arachis*, of the *Arachis* genus, using molecular marker ISSR. Four primers had been used and generated 57 standards of polymorphic bands. The marker revealed efficient in the discrimination of the species and the two sections, beyond variations between accesses of one same species. The genetic relations corroborate with data of literature and the taxonomic classification proposal for the genus.

Palavras-chaves: *Heteranthae*; *Arachis*; ISSR.

Introdução

O gênero *Arachis* encontra-se constituído por 81 espécies, das quais 69 foram descritas por Krapovickas e Gregory (1994), 11 por Valls e Simpson (2005) e uma ainda não descrita. As espécies ocorrem naturalmente na América do Sul, estendendo-se ao leste dos Andes, sul da Amazônia, norte da Planície Platina e Noroeste da Argentina. Baseado nas similaridades morfológicas, compatibilidade de cruzamento, viabilidade de pólen em híbridos e morfologia cromossômica, o gênero encontra-se subdividido em nove seções (*Erectoides*, *Triectoides*, *Extranervosae*, *Triseminatae*, *Heteranthae*, *Caulorrhizae*, *Procumbentes*, *Rhizomatosae* e *Arachis*) (Krapovickas e Gregory, 1994; Peñaloza e Valls, 2005).

Muitas das espécies deste gênero apresentam valor econômico incluindo

Arachis hypogaea (*Arachis*), *A. pintoi* (*Caulorrhizae*) e *A. glabrata* (*Rhizomatosae*). Destas, as duas primeiras têm sido utilizadas para fins de melhoramento genético. Outras espécies, com alto potencial agrônomo para fins forrageiro, são também encontradas em outras seções deste gênero (Conagin, 1962) como, por exemplo, as da *Heteranthae* (Peñaloza, 2004).

Segundo Krapovickas e Gregory (1994) a seção *Heteranthae* é tipicamente nordestina, com representantes em todos os Estados desta região. Há registros de que exemplares podem ser encontrados no Norte de Minas Gerais e no Nordeste do Estado de Goiás (Krapovickas e Gregory, 1994). Embora não tenha uso muito difundido, muitas das espécies desta seção apresentam potencial para uso forrageiro (Peñaloza, 2004).

De acordo com Coelho *et al.* (2001), há registro de ampla variação morfológica entre acessos da espécie *A. pusilla* (seção *Heterantheae*). Entre acessos de outra seção, Valls (2005) registrou a perenidade de vários indivíduos de *A. giacometti*, outra espécie da seção *Heterantheae*, e grande similaridade morfológica com *A. triseminata* (seção *Triseminatae*).

Muitos estudos têm sido conduzidos no gênero *Arachis*, empregando-se marcadores moleculares e bioquímicos, sendo verificado a presença de elevado polimorfismo entre suas espécies. (Garcia *et al.*, 1996; He e Prakash, 1997; Galgaro *et al.*, 1998; Gimenes *et al.*, 2002 a, b; Creste *et al.*, 2005).

Afim de se propiciar a escolha de indivíduos promissores em trabalhos de melhoramento via seleção ou hibridação, torna-se imprescindível o conhecimento da variabilidade genética entre acessos dessa seção de modo.

Deste modo, o presente estudo analisou 11 acessos pertencentes às seções *Heterantheae* e *Arachis*, do gênero *Arachis*, utilizando marcador molecular do tipo ISSR.

Material e Métodos

Germoplasma e extração de DNA

Onze acessos pertencentes às seções *Heterantheae* e *Arachis*, obtidos do Banco de Germoplasma de *Arachis*, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnológicos, Cenargen, Brasília-DF, foram utilizados para este estudo. Uma síntese dos dados de passaporte dos acessos encontra-se na Tabela 1.

O DNA foi isolado a partir de folíolos jovens, pelo método de Dellaporta *et al.* (1983) - modificado por Romano *et al.* (1998) e aliquoteado para 10 ng/ μ L em água ultrapura estéril, para posterior utilização nas reações em cadeia de polimerase - PCR.

Os oligonucleotídeos de ISSR utilizados foram produzidos pela University of British Columbia-Vancouver (Tabela 2).

Reações de PCR para ISSR

As reações de PCR foram conduzidas em termociclador PCR Sprint Thermal Cycler, utilizando-se 0,2 μ M de cada oligonucleotídeo (Tabela 2), 0,25 mM de cada dNTP, 0,10 μ g de DNA de cada acesso, 1 U de Taq DNA polimerase, 1X do tampão da enzima, 1,5 mM de MgCl₂, perfazendo um volume final de 15 μ L. As condições de PCR utilizadas foram: 5 minutos de desnaturação inicial a 95 °C, seguindo-se de 30 ciclos de desnaturação (94 °C/30 seg), anelamento (46 °C/45 seg) e extensão (72 °C/2 min) e um ciclo final de extensão (72 °C/7 min). Quatro oligonucleotídeos da série UBC foram utilizados (Tabela 2). Os produtos obtidos foram visualizados em gel de agarose (1,2 %), corados em Syber Gold 5X (Invitrogen) e em seguida fotografados no fotodocumentador Vilber Loumart sobre luz UV.

Análise dos dados

Os produtos amplificados foram tabulados como 1 (presença de banda) e 0 (ausência de banda) e submetidas ao programa NTSys 2.10 (Rohlf, 2000). Foi utilizado o método de clusterização UPGMA (*Unweighted Pair-group Method with Arithmetic Averages*) (Sneath e Sokal, 1973) e o índice J (Jaccard) para inferência da similaridade genética.

Resultados e Discussão

Os oligonucleotídeos ISSR amplificaram 57 fragmentos de DNA (Tabela 2). Tal amplificação possibilitou separar os acessos das seções *Heterantheae* e da *Arachis* a partir do padrão de similaridade. Os perfis obtidos para cada oligonucleotídeo encontram-se na Figura 1, onde foram conseguidos 20 15, 15 e 7 padrões com os respectivos oligonucleotídios UBC 813, UBC 834, UBC 884 e UBC 888.

O dendrograma gerado pelo programa NTSys apresentou três grupos distintos (Figura 2), onde no primeiro encontram-se os acessos referentes à espécie *A. dardani*, no segundo os acessos de *A. pusilla* e o terceiro grupo foi constituído por todas as outras espécies da seção *Arachis* (*A. valida*, *A. ipaensis*, *A. duranensis* e *A. stenosperma*).

No primeiro grupo observa-se que os acessos de *A. dardani* V15128, V15122 e V15127 estão mais proximamente relacionados quando comparados ao V15132. Provavelmente, a disposição destes acessos no dendrograma esteja relacionado à distribuição geográfica das populações em estudo, visto que os três primeiros foram coletados no sertão paraibano e o último no sertão do Rio Grande do Norte.

Já no segundo grupo, observou-se que os acessos V13189, V13109 e V15150 de *A. pusilla* têm grande proximidade, sendo que os dois primeiros estão mais inter-relacionados, o que possivelmente poderia ser justificado por pertencerem a mesorregião do norte de Minas Gerais, microrregião de Januária e o último acesso pertence microrregião de Pirapora. Esses dados corroboram com os de Coelho *et al.* (2001), onde através de análise genética, via RAPD, observaram a ocorrência de ampla variabilidade entre acessos da espécie *A. pusilla*, correlacionando-a a divergências morfológicas encontradas entre os acessos pesquisados.

A conformação obtida nos dois primeiros grupos confirma a classificação taxonômica das espécies *A. dardani* e *A. pusilla*, ambas pertencentes à seção *Heteranthae* (Krapovickas e Gregory, 1994). Além disso, Raina *et al.* (2001), através do marcador molecular RAPD e ISSR, e Creste *et al.* (2005), via RAPD, estabeleceram relações filogenéticas entre estas espécies e outras das seções do gênero.

O terceiro grupo reuniu apenas os acessos pertencentes à seção *Arachis*, estando *A. valida*, *A. ipaensis* e *A. duranensis* mais próximos entre si. Contudo, *A. stenosperma*, apesar de ter ficado mais afastada, esteve mais intimamente relacionada com *A.*

duranensis. Tal fato poderia estar relacionado ao tipo de genoma, como reportado por Krapovickas e Gregory (1994) e Creste *et al.* (2005), visto que *A. duranensis* e *A. stenosperma* apresentam o genoma do tipo “A”, enquanto que *A. valida* e *A. ipaensis* apresentam o tipo “B”.

Conclusões

1. Marcador molecular ISSR é eficiente para analisar a variabilidade genética inter e intraseccional dos representantes de *Arachis*, auxiliando na caracterização de bancos de germoplama do gênero.
2. Mesmo que alguns acessos tenham sido coletados em um mesmo local, verificou-se pelas análises de ISSR que houve agrupamento independente, situação que nem sempre se torna possível de ser realizada via caracteres morfológicos.

Referências Bibliográficas

- COELHO, P. J. A.; MORETZSOHN, M. C. ; VALLS, J. F. M. *Análise das relações genéticas entre espécies silvestres de Arachis utilizando marcadores RAPD*. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, n. 18, 2001, p. 1-24.
- CONAGIN, C. H. T. M. Espécies selvagens de *Arachis*. *Observações sobre os exemplares da coleção da seção de citologia*. Bragantia. Campinas, v. 21, 1962, p. 341-374.
- CRESTE, S.; TSAI, S. M.; VALLS, J. F. M.; GIMENES, M. A. e LOPES, C. R. *Genetic characterization of Brazilian annual Arachis species from sections Arachis and Heteranthae*. Genetic Resources and Crop Evolution. v. 52, 2005, p. 1079-1086.

- DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. A plant DNA mini-preparation Version II, *Plant. Mol. Biol. Repr.*, v. 1, 1983, p. 19-21.
- GALGARO, L.; LOPES, C. R.; GIMENES, M.; VALLS, J. F. M.; KOCHERT, G. *Genetic variation between several species of sections Extranervosae, Caulorrhizae, Heteranthae, and Triseminatae (genus Arachis) estimated by DNA polymorphism.* *Genome* v. 41, n. 3, 1998, p. 445-454.
- GARCIA, G. M.; STALKER, H. T.; SHROEDER, E.; KOCHERT, G. *Identification of RAPD, SCAR, and RFLP markers tightly linked to nematode resistance genes introgressed from Arachis cardenasii into Arachis hypogaea.* *Genome* v. 39, n. 5, 1996, p. 836-845.
- GIMENES, M.A., LOPES, C.R. & VALLS, J.F.M.. *Genetic relationships among Arachis species based on AFLP.* *Genetics and Molecular Biology.* v. 25, n. 3, 2002a, p. 349-353.
- GIMENES, M. A.; LOPES, C. R.; GALGARO, M. L.; VALLS, J. F. M.; e KOCHERT, G. *RFLP analysis of genetic variation in species of section Arachis, genus Arachis (Leguminosae).* *Euphytica.* v. 123, 2002b, p. 421-429.
- HE, G.H.; PRAKASH, C. S. *Identification of polymorphic DNA markers in cultivated peanut (Arachis hypogaea L.).* *Euphytica,* v. 97, n. 2, 1997, p.143-149.
- KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, W. C. *Taxonomia del género Arachis (Leguminosae).* *Bonplandia,* v. 8, 1994, p. 1-186.
- PEÑALOZA, A. P. S. *Avanços da citogenética do gênero Arachis no Brasil.* (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra), 2004.
- RAINA, S. N.; RANI, V.; KOJIMA, T.; OGIHARA, Y.; SINGH, K. P.; DEVARUMATH, R. M. *RAPD and ISSR fingerprints useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varieties identification, and phylogenetic relationships in peanut (Arachis hypogaea) cultivars and wild species.* *Genome,* v. 44, 2001, p.763-772.
- ROHLF, F. J. *NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1.* New York: Exeter Software, 2000.
- ROMANO, E. Extração de DNA de tecidos vegetais. IN: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V. T. C. *Manual de transformação genética de plantas.* Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen. 1998, 309p.
- SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. *Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification.* San Francisco: W. H. Freeman. 1973, p. 573.
- VALLS, J. F. M. *Recursos genéticos de Arachis: Avanços no conhecimento botânico e a situação atual de conservação e uso.* *Agrociência,* v. 9, n. 1-2, 2005, p. 123-132.
- VALLS, J. F. M.; SIMPSON, C. E. *New species of Arachis L. (Leguminosae) from Brazil, Paraguay and Bolivia.* *Bonplandia,* v. 14, n. 1-4, 2005, p. 35-63.

Tabela 1. Dados de passaporte de acessos do gênero *Arachis*

Espécie	Coletores	Acesso	Cód.acesso BRA-	Município	UF
<i>A. dardani</i>	VSSu	15122	040495	Patos	PB
	VSSu	15127	025585	Pombal	PB
	VSSu	15128	040517	Pombal	PB
	VSSu	15132	025615	Acari	RN
<i>A. pusilla</i>	VFapZsv	13109	030317	Januária	MG
	VPzW	13189	030571	São Francisco	MG
	VApNu	15150	014796	Jequitáí	MG
<i>A. valida</i>	VPoBi	34 AM	022675	Corumbá	MS
<i>A. ipaensis</i>	-	KG30076	036234	-	Bolívia
<i>A. duranensis</i>	-	V14167	-	-	Argentina
<i>A. stenosperma</i>	VMiSv	V10229	023001	Cananéia	SP

Coletores:

Ap=A.P.S.Peñaloza; Bi=L. Bianchetti; Fa=L.Faraco de Freitas; Mi=S.T.S. Miotto; Nu=A.C.G.S.Nunes; Po= A. Pott; Pz=E.A.Pizarro; S=C.E.Simpson; Su=T.M.F. Suassuna; Sv=G.P.Silva; V=J.F.M. Valls; W=W.L.Werneck

Tabela 2. Número de padrões obtidos por oligonucleotídeo utilizado.

<i>Oligonucleotídeos</i>	Seqüência (3'-5')	Padrões gerados
UBC 813	CTC TCT CTC TCT CTC TT	20
UBC 834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT	15
UBC 884	HBH AGA GAG AGA GAG AG	15
UBC 888	BDB CAC ACA CAC ACA CA	7
Total	-	57

Legenda: Bases Degeneradas. Y= (C ou T); H= (A,C ou T); B= (C,G ou T) e D=(A,G ouT).

Figura 1. Padrão de amplificação de onze genótipos de *Arachis* utilizando o oligonucleotídeo UBC 813 (a), UBC 834 (b), baseados em ISSR. **M** = Ladder (1Kb); **1-4**. *A. dardani* (V15132, V15127, V15122 e V15128, respectivamente); **5-7**. *A. pusilla* (V15150, V13189 e V13109, respectivamente); **8**. *A. valida* (34AM); **9**. *A. ipaensis* (KG30076); **10**. *A. duranensis* (V14167); **11**. *A. sternosperma* (V10229).

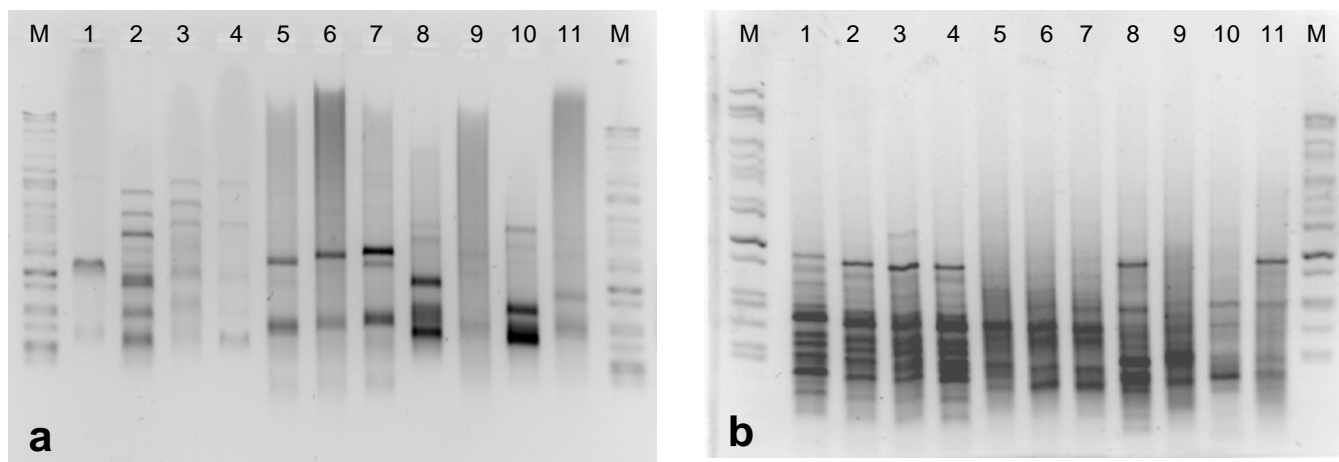


Figura 2. Dendrograma gerado pelo programa NTSys 2.10 pelo método de clusterização UPGMA.

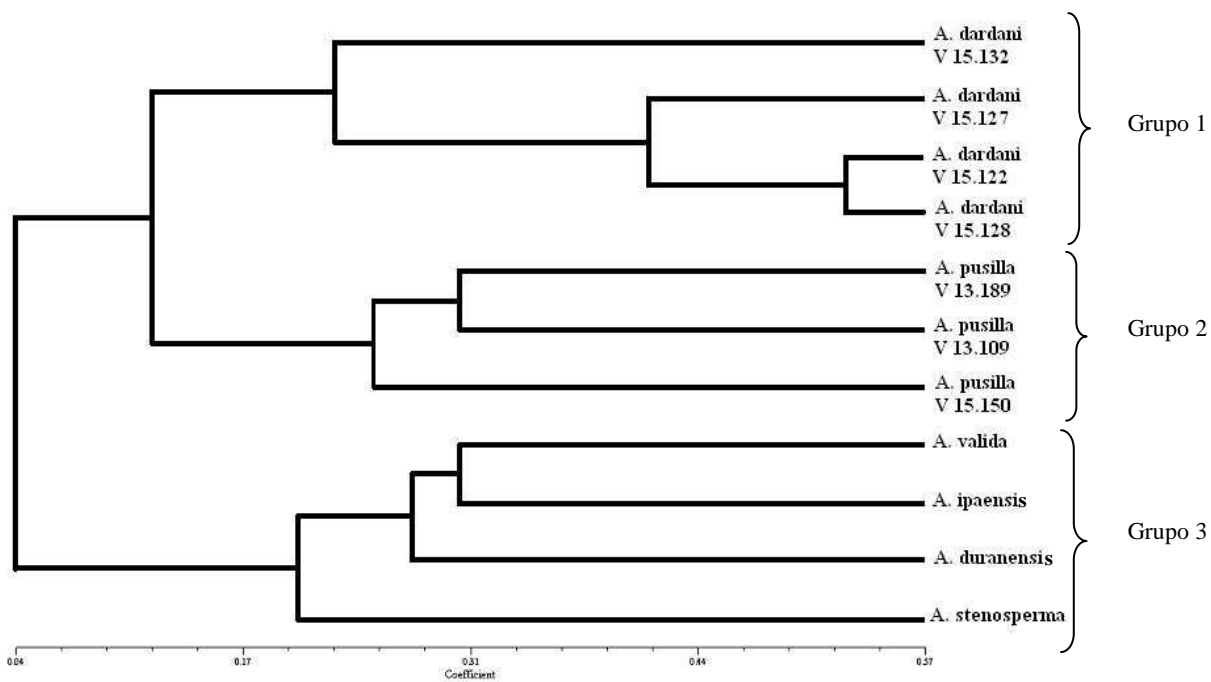


Figura 3. Matriz de similaridade de espécies do gênero *Arachis* gerada pelo programa NTSys 2.10, derivada do coeficiente de similaridade de Jaccard (J).

Espécie	Acesso	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.
<i>A. dardani</i>	1.V15132	1,00										
	2.V15127	0,23	1,00									
	3.V15122	0,15	0,39	1,00								
	4.V15128	0,29	0,42	0,57	1,00							
<i>A. pusilla</i>	5.V15150	0,11	0,03	0,04	0,04	1,00						
	6.V13189	0,19	0,21	0,17	0,16	0,21	1,00					
	7.V13109	0,16	0,11	0,09	0,09	0,30	0,28	1,00				
<i>A. valida</i>	8. 34 AM	0,16	0,05	0,07	0,10	0,05	0,08	0,10	1,00			
<i>A. ipaensis</i>	9. KG30076	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25	1,00		
<i>A. duranensis</i>	10. V14167	0,08	0,00	0,03	0,07	0,05	0,04	0,00	0,30	0,20	1,00	
<i>A. sternosperma</i>	11. V10229	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00	0,29	0,16	0,25	1,00

CAPÍTULO IV

VARIABILIDADE ENTRE ESPÉCIES DA SEÇÃO *HETERANTHAE* (GÊNERO *ARACHIS*) COM BASE EM DESCRITORES FENOTÍPICOS

Manuscrito a ser enviado à revista:

***Revista de Biologia e Ciências da Terra* ISSN 1519-5228**

(Campina Grande-PB, Brasil)

Variabilidade entre espécies da seção *Heteranthae* (gênero *Arachis*) com base em descritores fenotípicos

Variability among species of the Heteranthae section (Arachis genus) on the basis phenotypical descriptors

Silvokleio da Costa Silva¹, Reginaldo de Carvalho², Péricles de Albuquerque de Melo Filho¹; Roseane Cavalcanti dos Santos³

¹ Mestrando em Agronomia 'Melhoramento Genético de Plantas' - UFRPE, Recife- PE.

² Professor do Departamento de Biologia/Genética da UFRPE, Recife- PE.

³ Professor do Departamento de Agronomia da UFRPE, Recife- PE.

⁴ Pesquisadora da Embrapa Algodão, Campina Grande-PB.

ABSTRARCT

Species of *Heteranthae* section from *Arachis* genus are annual diploids ($2n=2x=20$), with geographic distribution from the Brazilian Northeast, Goiás and Minas Gerais and show potential for forage. Some morphological traits are peculiar among species of this section, however, data found out in literature have shown interesting divergences that could be used in selection processes in *Arachis* breeding. In this study was analyzed the variability among species of *Heteranthae* sections based on known phenotypical descriptors. Data were registered at blooming and at harvest of the accesses, which took place on 100 days after sowing. Seventeen vegetative and reproductive traits were registered and transformed in binary variables for further obtention of dendrogram and similarity matrix by UPGMA cluster method. Three were performed among the accesses, they were: group I: *A. dardani* and *A. pusilla* (V13109); group II: *A. sylvestris*, *A. giacomettii* and *A. pusilla* (V13189 and V15150) and group III: performed just with *A. interrupta*. The higher similarity was verified between V15122 e V15128 de *Arachis dardani*, with proximity greater than 88%.

Palavras-chaves: *Arachis*; *Heteranthae*; phenotypical descriptors.

INTRODUÇÃO

O reconhecimento do valor das espécies silvestres de *Arachis* teve início a partir de meados do século XX mediante o crescimento das coletas, caracterização e conservação de germoplasmas. O gênero *Arachis* possui 81 espécies das quais 69 foram descritas por Krapovickas e Gregory (1994), 11 por Valls e Simpson (2005) e uma ainda não descrita, sendo todas originárias da América do Sul. O sistema de classificação proposto por Krapovickas e Gregory (1994) agrupa os representantes do gênero em nove seções, baseado em dados morfológicos e de compatibilidade de cruzamento, associados a

dados cromossômicos e de distribuição geográfica.

As espécies silvestres de *Arachis* são autógamas, analogamente a espécie cultivada (*A. hypogaea* L.). Os representantes da seção *Heteranthae* são diplóides ($2n=2x=20$) anuais, localizados tipicamente na região Nordeste do Brasil, podendo também ser localizados nos estados de Goiás e Minas Gerais. Apesar da plasticidade de emprego do gênero, esta seção merece atenção pelo seu potencial para uso forrageiro.

A variabilidade genética de uma população é um parâmetro que pode ser facilmente mensurado pela distância genética entre espécies (Cowen e Frey, 1987).

Segundo Oliveira e Valls (2003), o conhecimento de caracteres fenológicos, reprodutivos e de compatibilidade de cruzamento intra e interespecífico pode ser utilizado na caracterização de espécies silvestres e cultivadas.

Uma melhor compreensão da variabilidade genética, abrangendo o germoplasma de *Arachis* só pode ser alcançada com uma caracterização adequada (Valls et al., 1995). Variações morfológicas e moleculares foram observadas na seção *Caulorrhizae* (Bertozzo e Valls, 2001; Gimenes et al., 2000; Valente et al., 2001) e isto vem sustentando a investigação em nível de variabilidade genética disponível nesta seção.

Algumas espécies da seção *Heteranthae* apresentam divergências exomorfológicas, provavelmente ocasionadas pelos mecanismos adaptativos ao longo do processo evolutivo. Muitos estudos moleculares realizados comprovam a existência de polimorfismo entre as espécies silvestres do gênero (Crestes et al., 2005), incluindo as desta seção.

Diante de tais afirmações o presente estudo teve por objetivo analisar a fenologia de acessos da seção *Heteranthae* visando identificar polimorfismo a partir de descritores pré-estabelecidos.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal – Dez acessos da seção *Heteranthae* disponibilizados pelo Banco Ativo de Germoplasma de Espécies Silvestres de *Arachis*, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnológicos (CENARGEN, Brasília-DF) foram avaliados. Os dados de passaporte encontram-se na Tabela 1. O experimento foi conduzido em campo experimental localizado no Departamento de Biologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, entre julho e novembro de 2006. Cada acesso foi plantado em vasos (50 cm de diâmetro) contendo solo previamente adubado e corrigido de acordo com as necessidades de *A. hypogaea* (Santos et al., 2006). Cada vaso conteve duas plantas, perfazendo um total de cinco vasos totalmente casualizados por repetição. Os dados de temperatura média,

umidade relativa do ar e precipitação pluvial durante o ciclo dos acessos foram de 33 C, 68% e 320 mm, respectivamente.

Descritores morfológicos - Os descritores analisados foram baseados no trabalho de Krapovickas e Gregory (1994), com algumas inclusões, quer sejam: floração na haste principal (FHP), altura da haste principal (AHP), formato do folíolo (FF), produção de sementes por planta (PTS), número de sementes por planta (NTS), número de ramos laterais (NRL), cor da haste principal (CHP), início de floração (IF), número de vagens por planta (NVG), número de sementes por vagem (NSV), número de istmo na vagem (NIV), peso de 50 vagens (P50V), produção de vagens por planta (PVG), peso de 50 sementes (P50S), presença de veias no estandarte (VE), cor do estandarte (CE), comprimento médio dos ramos laterais (MRL).

Análise dos dados – Após tabulação dos dados, procedeu-se a uniformização e posterior transformação dos mesmos em variáveis binárias de acordo com metodologia descrita em Johnson e Wichern (1992). A seguir, construiu-se o dendrograma e a matriz de similaridade com auxílio do programa NTSYSpc 2.10 (Rohlf, 2000) pelo método de clusterização UPGMA para inferência da similaridade genética, baseado no coeficiente de Jaccard (J).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os descritores morfológicos e a média dos agrônômicos encontram-se na Tabela 2. Observa-se que há variabilidade inter e intra acessos e que os descritores quantitativos são mais responsivos pela diferenciação. As relações filogenéticas entre os acessos podem ser verificadas no dendrograma gerado a partir dos dados da referida Tabela, no qual ficaram discriminados três grupos distintos (Figura 1). O primeiro foi constituído pelos acessos de *A. dardani* e um acesso de *A. pusilla* (V13109); o segundo por *A. sylvestris*, *A. giacomettii* (subgrupos I) e *A. pusilla* (acessos V13189 e V15150 - subgrupo II), e o terceiro formado pelo acesso de *A. interrupta*.

Analisando-se o grupo I, observou-se a existência de alta similaridade entre os acessos de *A. dardani*, chegando a 88,9% comparando os acessos V15122 e V15128. Os dados obedecem à classificação taxonômica proposta por Krapovickas e Gregory (1994). O grau de similaridade pode ser reforçado ainda pela proximidade geográfica das populações estudadas. Já o acesso V13109 (*A. pusilla*), apresentou-se mais intimamente relacionada com *A. dardani* (V15122), com similaridade morfológica 54,5%, quando comparado aos demais acessos de *A. pusilla*.

De acordo com Coelho et al. (2001) há ocorrência de uma ampla variação morfológica entre acessos da espécie *A. pusilla*.

Analogamente aos dados encontrados por Creste et al. (2005), as espécies *A. sylvestris* e *A. giacomettii* (subgrupo I – grupo II) constituem um subgrupo dentro da seção. Estes autores verificaram, via RAPD, que estas espécies apresentaram aproximadamente 40,0% de similaridade genética, enquanto que os dados apresentados neste estudo revelaram 50,0% de similaridade morfológica.

Ainda no grupo II (Figura 1), subgrupo II, verificou-se que os acessos V13189 e V15150 de *A. pusilla* apresentaram 50,0% de similaridade genética. Ambos pertencem a mesorregião do norte de Minas, sendo que o primeiro pertence à microrregião de Januária e a última à microrregião de Pirapora. Apesar do acesso V13109 pertencer a esta espécie, provavelmente sua divergência fenológica pode ter sido altamente influenciada por fatores ambientais do local ao qual o experimento foi realizado ou por características peculiares do mesmo.

A espécie *A. interrupta* (grupo III – Figura I) apresentou-se mais distante quando comparado às demais. Tal variabilidade poderia ser explicada pelo isolamento genético-geográfico dos representantes. Dados citogenéticos, como os de Martins et al. 2006, e/ou moleculares, assim como a ampliação do número de acessos poderiam fornecer uma melhor conclusão.

CONCLUSÕES

1. A maior similaridade genética foi detectada entre os acessos de *Arachis dardani*, V15122 e V15128, sendo esta superior a 82%.

2. Apesar de pertencerem à espécie *A. pusilla*, as distâncias fenotípicas encontradas entre os acessos são, possivelmente, resultantes da variabilidade natural explicada por fatores ambientais locais ou diferenças intrínsecas destes acessos.

REFERÊNCIAS

BERTOZO, M. R.; VALLS, J. F. M. Seed storage protein electrophoresis in *Arachis pintoii* and *A. repens* (Leguminosae) for evaluating genetic diversity. *Genetic Resources and Crop Evolution*, Dordrecht, Netherlands, v. 48, n. 2, p. 121-130, 2001.

COELHO, P. J. A.; MORETZSOHN, M. C.; VALLS, J. F. M. Análise das relações genéticas entre espécies silvestres de *Arachis* utilizando marcadores RAPD. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*, Brasília, DF., n. 18, 2001. p. 1-24.

COWEN, N. M.; FREY, K. F. Relationship between three measures of genetic distance and breeding behavior in oats (*Avena sativa* L.). *Genome*, v. 29, 1987. p. 97-106.

CRESTE, S.; TSAI, S. M.; VALLS, J. F. M.; GIMENES, M. A. e LOPES, C. R. Genetic characterization of Brazilian annual *Arachis* species from sections *Arachis* and *Heteranthae*. *Genetic Resources and Crop Evolution*. v. 52, 2005. p. 1079-1086.

GIMENES, M. A. ; LOPES, C. R. ; GALGARO, M. L. ; VALLS, J. F. M. ; KOCHERT, G. . Genetic variation and phylogenetic relationships based on RAPD analysis in section *Caulorrhizae*, genus *Arachis* (Leguminosae). *Euphytica*, Dordrecht, Netherlands, v. 16, n. 3, 2000. p. 187-195.

JOHNSON, R. A.; WICHERN, D. W. Applied multivariate statistical analysis. 3 ed. New Jersey: Prentice Hall, 1992. 642p.

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

MARTINS, M. I. G.; SILVA, S. C.; SANTOS, R. C.; CARVALHO, R. Caracterização citogenética de sete acessos do gênero *Arachis* através de técnicas convencionais e de bandeamento cromossômico In: XVII Encontro de Genética no Nordeste, Recife-PE, 2006.

OLIVEIRA, M. A. P.; VALLS, J. F. M. . Morphological characterization and reproductive aspects in genetic variability studies of forage peanut. . *Scientia Agricola*, Piracicaba, SP, v. 60, n. 2, 2003. p. 299-304.

ROHLF, F. J.. TSPc: Numerical Taxonomy System, ver. 2.1. Exeter Publishing, Ltd, Setauket, New York, USA. 2000.

SANTOS, R. C.; REGO, G. M.; SANTOS, C.A.; PEIXOTO, A.S.; MELO FILHO, P. A.; MORAES, T.M.G.; SUASSUNA, T.F. Recomendações Técnicas para o Cultivo do Amendoim. Campina Grande: Embrapa, Circular tecnica, n. 102, 2006.

SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. *Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification*. San Francisco: W. H. Freeman., 1973. p. 573.

VALENTE, S. E. S.; COELHO, P. J. A. ; GIMENES, M. A. ; VALLS, J. F. M. ; LOPES, C. R. . Analysis of isoenzymatic variation in accessions of *Arachis pintoi* derived from its original germplasm collection. In: INTERNATIONAL PLANT AND ANIMAL GENOME CONFERENCE, 9, 2001, San Diego, Estados Unidos. Poster abstracts [of the] INTERNATIONAL PLANT AND ANIMAL GENOME CONFERENCE, 9. San Diego, ESTADOS UNIDOS : *International Plant and Animal Genome Conference*, 2001.

VALLS, J. F. M. ; SIMPSON, C. E. . New species of *Arachis* L. (Leguminosae) from Brazil, Paraguay and Bolivia. *Bonplandia*, Corrientes, ARGENTINA, v. 14, n. 1-4, 2005. p. 35-63.

VALLS, J. F. M.; SIMPSON, C. E.; RAO, V. R. Collecting wild species of *Arachis*. In: Guarino, L.; Rao, V.R.; Reid, R.. (Org.). *Collecting Plant Genetic Diversity. Technical Guidelines*. 1 ed. Wallingford, Inglaterra: CAB International, 1995. p. 677-684.

Tabela 1. Dados de passaporte dos acessos do gênero *Arachis*

Espécie	Coletores	Acesso	Cód. acesso BRA	Município	UF	Latitude S	Longitude W
<i>A. dardani</i>	VSSu	15122	040495	Patos	PB	07 00 24.7	037 17 49.1
	VSSu	15127	025585	Pombal	PB	06 42 56.9	037 49 10.7
	VSSu	15128	040517	Pombal	PB	06 44 28.4	037 56 40.3
	VSSu	15132	025615	Acari	RN	06 21 06.3	036 36 50.2
<i>A. giacomettii</i>	VApNu	15155	040568	Montalvânia	MG	14 21 17.1	044 23 36.3
<i>A. interrupta</i>	VFapZsv	13082	030121	Monte Azul	MG	14 55 15.3	043 29 53.8
	VFapZsv	13109	030317	Januária	MG	15 32 33.1	044 24 22.3
<i>A. pusilla</i>	VPzW	13189	030571	São Francisco	MG	15 57 53.4	044 54 01.9
	VApNu	15150	014796	Jequitáí	MG	17 12 55.1	044 28 02.9
<i>A. sylvestris</i>	VNu	15161	040576	Porto Nacional	TO	10 42 29.0	048 25 07.1

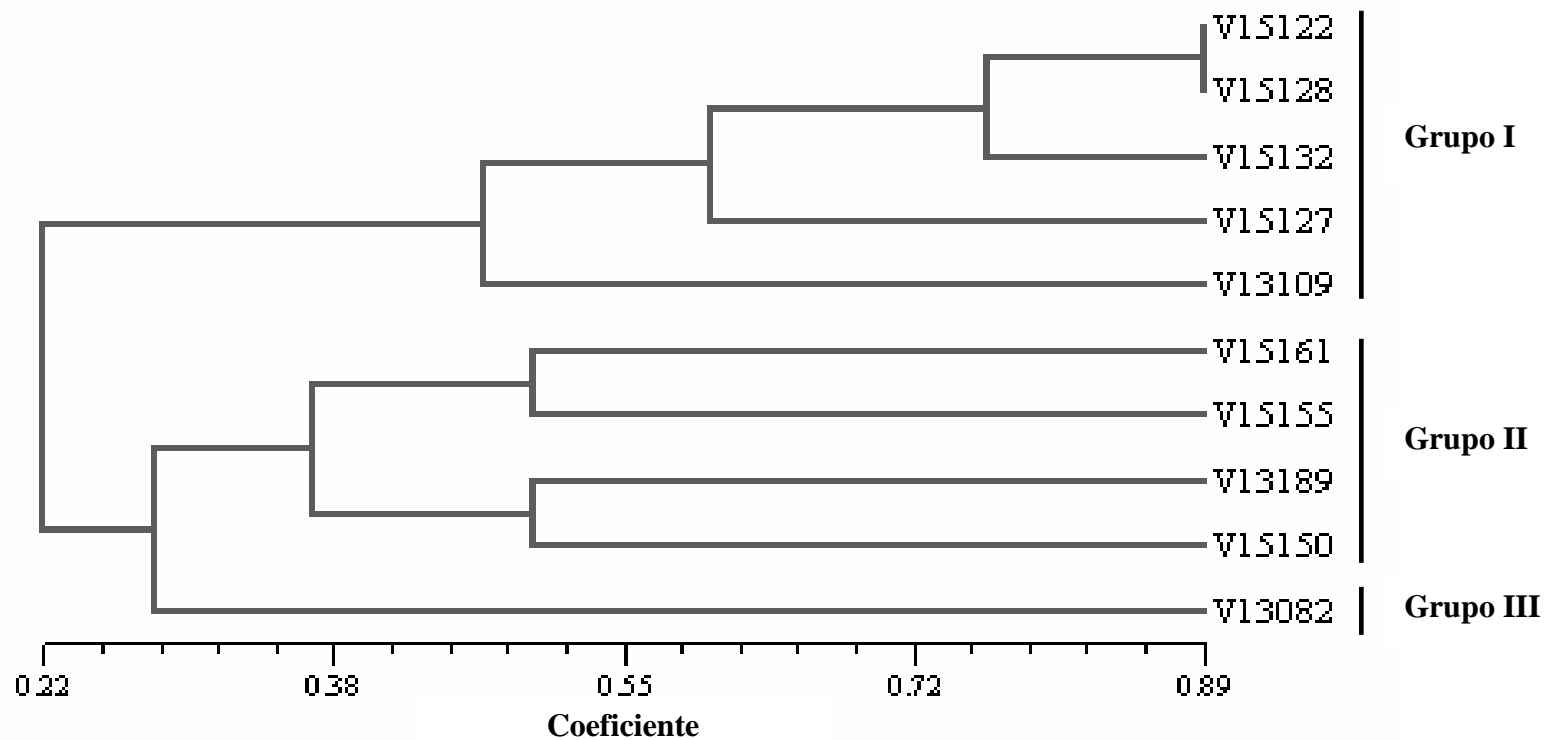
Coletores: Ap=A.P.S.Peñaloza; Fa=L.Faraco de Freitas; Nu=A.C.G.S.Nunes; Pz=E.A.Pizarro; S=C.E.Simpson; Su=T.M.F. Suassuna; Sv=G.P.Silva; V=J.F.M.Valls; W=W.L.Werneck

Tabela 2. Dados médios dos descritores morfológicos avaliados nos acessos estudados pertencentes a seção *Heterantheae*.

Espécie	Acesso	FHP (cm)	AHP (cm)	FF	PTS (g)	NTS	NRL	CHP	IF (dias)	NVG	NSV	NIV	P50V (g)	PVG (g)	P50S (g)	CVE	CE	MRL (cm)
<i>A. dardani</i>	V15122	0	20.75	0	4.49	39.40	6.2	0	28.2	36.80	0	0	12.50	8.92	6.49	1	0	143.80
	V15127	0	21.8	0	3.71	51.00	5.5	0	33.3	48.30	0	0	7.39	7.21	5.06	1	0	158.25
	V15128	0	24.1	0	4.39	45.50	5.8	0	26.8	40.25	0	0	11.14	9.12	5.75	1	0	154.30
	V15132	1	50.8	0	4.43	60.30	5.0	0	24.2	46.75	0	0	10.77	8.07	5.71	1	0	146.80
<i>A. sylvestris</i>	V15161	1	28.4	1	1.44	19.67	2.8	0	35.4	16.67	0	0	12.21	2.86	6.03	0	1	49.56
<i>A. pusilla</i>	V13109	0	6.1	1	6.57	55.75	6.0	0	29.4	48.75	0	0	8.40	9.39	6.48	0	0	48.35
	V13189	1	98.0	1	5.03	38.50	3.8	1	24.6	32.00	0	0	11.16	7.30	9.25	0	0	93.80
	V15150	1	95.7	1	2.82	25.00	4.0	1	26.4	23.00	0	0	9.86	4.54	7.39	0	0	127.42
<i>A. interrupta</i>	V13082	1	24.2	0	1.10	16.00	6.5	1	41.2	13.60	0	0	5.06	1.86	4.46	0	1	79.60
<i>A. giacomettii</i>	V15155	1	52.0	1	2.13	20.00	3.0	1	28.0	11.00	1	1	16.27	3.58	6.32	0	1	45.00

Descritores: FF (0 – presença; 1 – ausência); FF – (0 – obovado; 1- lanceolado); CHP (0 – esverdeado; 1 – arroxado); NSV (0 – até duas; 1 – até três); NIV (0 – até um; 1 – até dois); CVE (0 - (0 – ausentes ou da cor do estandarte; 1- vinho); CE (0 – amarelo claro; 1- amarelo ovo).

Figura 1. Dendrograma representativo da similaridade morfológica de acessos da seção *Heterantheae* (gênero *Arachis*) obtidas através da Análise de Agrupamento pela Ligação Média entre Grupos (UPGMA), realizado no programa computacional NTSys 2.10, com base no coeficiente de Jaccard (J).



4. CONSIDERAÇÕES GERAIS

4. CONSIDERAÇÕES GERAIS

O gênero *Arachis* tem sido alvo de diversos estudos que visam conhecer a variabilidade genética e a potencialidade de utilização das espécies que o constitui. Atualmente ferramentas moleculares e citogenéticas, somados as de classificação taxonômica, têm auxiliado na elucidação de problemas de incompatibilidade reprodutiva, filogenia e evolução.

As espécies pertencentes à seção *Heteranthae* (gênero *Arachis*) têm despertado o interesse de pesquisadores nacionais por possuir espécies endêmicas do Brasil, típicas da região Nordeste, e por apresentarem potencial para fins forrageiro e possíveis fontes de genes para resistência à seca.

Apesar da seção *Heteranthae* possuir um número relativamente pequeno de espécies existe ainda algumas questões taxonômicas a serem resolvidas dentro da seção em relação às distâncias genéticas e posicionamento interseccional.

No presente trabalho foram estudadas espécies pertencentes à seção *Heteranthae* (gênero *Arachis*) via técnicas citogenéticas (coloração convencional e de fluorescência - CMA/DAPI), bem como empregando-se marcador ISSR e descritores fenotípicos, com o intuito de conhecer a variabilidade morfogenética desta seção.

Mediante estudos citogenéticos, confrontados com dados da literatura, conclui-se que *A. dardani* e *A. interrupta* foram às espécies que apresentaram características cariotípicas mais primitivas entre os avaliados. Segundo análise da constituição da heterocromatina constitutiva, sugeriu-se que estes genótipos encontram-se sob processo de alteração dos segmentos de DNA repetitivo. Pode-se, ainda, constatar que os blocos de heterocromatina constitutiva, evidenciados pelos fluorocromos CMA e DAPI, apresentaram estabilidade intraespecífica, servindo como excelentes marcadores para distinguir as espécies envolvidas nesse estudo.

Analisando os genótipos *A. dardani* e *A. pusilla* constatou-se a existência de correlações entre os dados citogenéticos referentes aos blocos CMA⁺, correspondente à heterocromatina constitutiva rica em guanina e citosina (GC), com os dados gerados via amplificação. Dentre os oligonucleotídeos empregados, o UBC 834 (AGA GAG AGA GAG AGA GYT) produziu um número de padrões superior quando comparados aos demais, sendo a grande maioria monomórfica. Tais padrões possivelmente estão relacionados à constituição deste oligonucleotídeo. Os

dados gerados via técnicas de coloração convencional com Giemsa, CMA/DAPI e ISSR possibilitaram agrupar os acessos conforme a classificação taxonômica.

Levando-se em consideração da especificidade de oligonucleotídeos, provavelmente aos blocos heterocromáticos, e/ou provavelmente o próprio genoma, apresentam maior riqueza em guanina. Tal suposição se deve ao fato de que, empregando-se os oligonucleotídeos UBC 834 e 884 observou-se um maior número de bandas quando comparados aos oligonucleotídeos UBC 813 e 888 que apresentaram maior constituição de citosina.

Futuros trabalhos envolvendo o estudo de espécies desconhecidas poderiam ser direcionados a partir de dados citogenéticos para o desenho de oligonucleotídeos quando se intencionar estudar molecularmente espécies desconhecidas.

O marcador ISSR ainda apresentou-se satisfatório para avaliar a variabilidade genética inter e intraseccional. A exemplo da seção *Heteranthae*, mesmo que alguns acessos tenham sido coletados em uma mesma localidade verificou-se que houve agrupamento independente dos mesmos, situação que nem sempre se torna possível de ser realizada via caracteres morfológicos.

Baseado na potencialidade de utilização como forrageira sugere-se que a espécie *A. dardani* poderia servir como alternativa para referida finalidade visto que a mesma apresentou maior produção de massa vegetativa quando comparado aos demais representantes estudados nesta seção.

5. ANEXOS

INTRUÇÕES PARA AUTORES

GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

ISSN 1415-4757 (versão impressa)

São Paulo, Brasil

GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

SCOPE AND POLICY

Genetics and Molecular Biology (formerly named Revista Brasileira de Genética/Brazilian Journal of Genetics - ISSN 0100-8455) is published quarterly by the Sociedade Brasileira de Genética (Brazilian Society of Genetics).

The Journal considers contributions that present the results of original research in genetics, evolution and related scientific disciplines. Although Genetics and Molecular Biology is an official publication of the Brazilian Society of Genetics, contributors are not required to be members of the Society.

It is a fundamental condition that submitted manuscripts have not been and will not be published elsewhere. With the acceptance of a manuscript for publication, the publishers acquire full and exclusive copyright for all languages and countries.

Manuscripts considered in conformity with the scope of the journal as judged by the Editor in conjunction with the Editorial Board are reviewed by the Associate Editors and two or more external reviewers. Acceptance by the Editor is based on the quality of the work as substantial contribution to the field and on the overall presentation of the manuscript.

SUBMISSION OF PAPERS

1. Manuscripts should be submitted to:

Angela M. Vianna-Morgante , Editor-in-Chief
Genetics and Molecular Biology
Rua Capitão Adelmio Norberto da Silva, 736
14025-670 Ribeirão Preto, SP - Brasil

2. A submission package sent to the Editorial Office must contain:

- a)** A cover letter signed by all authors stating that they have approved the submission of the manuscript and that the findings have not been published or are not under consideration for publication elsewhere.
- b)** A hard copy of the manuscript, including original figures.
- c)** A copy of any unpublished or in-press companion articles referred to in the submission.
- d)** An electronic copy of the text, tables and figures. Formats for text are Word or RTF, in Windows platform. Images in TIFF or JPEG formats should be sent in separate files (For Figures, see detailed instructions in 3.1.h). Mailed disks must be labeled with the first author's last name, platform and software (see detailed ins

3. Categories of Contribution

3.1. Research Articles

Manuscripts must be written in English in double-spaced, 12-point type throughout, including the References Cited section, appendices, tables and legends; printed on one side only of A4 paper with 2.5 cm margins; marked with consecutive page numbers, beginning with the cover page.

The following elements must start on a new page and be ordered as they are listed below:

- a) The title page** must contain: a concise and informative title; the authors' names (first name at full length); the authors' institutional affiliation, including department, institution, city, state or province and country; different affiliations indicated with superscript numbers; a short running title of about 35 characters, including spaces; up to five key words; the corresponding author's name, postal address, phone and fax numbers and email address. The corresponding author is the person responsible

for checking the page proofs, arranging for the payment of color illustrations and author's alteration charges.

b) The Abstract must be a single paragraph that does not exceed 200 words and summarizes the main results and conclusions of the study. It should not contain references.

c) The text must be as succinct as possible. Text citations: articles should be referred to by authors' surnames and date of publication; citations with two authors must include both names; in citations with three or more authors, name the first author and use et al. List two or more references in the same citation in chronological order, separated by semi-colons. When two or more works in a citation were published in the same year, list them alphabetically by the first author surname. For two or more works by the same author(s) in a citation, list them chronologically, with the years separated by commas. (Example: Freire-Maia et al., 1966a, 1966b, 2000). Only articles that are published or in press should be cited. In the case of personal communications or unpublished results, all contributors must be listed by initials and last name (et al. should not be used). Numbers: In the text, numbers nine or less must be written out except as part of a date, a fraction or decimal, a percentage, or a unit of measurement. Use Arabic numerals for numbers larger than nine. Avoid starting a sentence with a number. Binomial Names: Latin names of genera, species and intraspecific taxa in the text must be printed in italics; names of orders and families should appear in the Title and also when first mentioned in the text. URLs for programs, data or other sources should be listed in the Internet Resources Section, immediately after the References Section, not in the text. URLs for citations of publications in electronic journals should appear in the reference section.

The text includes the following elements:

Introduction – Description of the background that led to the study.

Material (or Subjects) and Methods – Details relevant to the conduct of the study. Statistical methods should be explained at the end of this section.

Results – Undue repetition in text and tables should be avoided. Comment on significance of results is appropriate but broader discussion should be part of the Discussion section.

Discussion – The findings of the study should be placed in context of relevant published data. Ideas presented in other publications should not be discussed solely to make an exhaustive presentation.

Some manuscripts may require different formats appropriate to their content.

d) The Acknowledgments must be a single paragraph that immediately follows the discussion and includes references to grant support.

e) The References Section: Section: references must be ordered alphabetically by the first author surname; references with the same first author should be ordered as follows: first, as single author in chronological order; next, with only one more co-author in alphabetical order by the second author; and finally followed by references with more than two co-authors, in chronological order, independent of the second author surnames. Use standard abbreviations for journal titles.

Only articles that are published or in press should be included in this section. Works submitted to a publication but not yet accepted, personal communications and unpublished data must be cited within the text. “Personal communication” refers to individuals other than the authors of the manuscript being submitted; “unpublished data” refers to data produced by at least one of the authors of the manuscript being submitted.

Sample journal article citation:

Breuer ME and Pavan C (1955) Behaviour of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angela* at different stages of larval development. *Chromosoma* 7:371-386.

Yonenaga-Yassuda Y, Rodrigues MT and Pellegrino KCM (2005) Chromosomal banding patterns in the eyelid-less microteiid lizard radiation: The $X_1X_1X_2X_2:X_1X_2Y$

sex chromosome system in *Calyptommatius* and the karyotypes of *Psilophtalmus* and *Tretioscincus* (Squamata, Gymnophthalmidae). *Genet Mol Biol* 28:700-709.

Sample book citation:

Dobzhansky T (1951) *Genetics and Origin of Species*. 3rd edition. Columbia University Press, New York, 364 pp.

Sample chapter-in-book citation:

Crawford DC and Howard-Peebles PN (2005) Fragile X: From cytogenetics to molecular genetics. In Gersen SL and Keagle MB (eds) *The Principles of Clinical Cytogenetics*. 2nd edition. Humana Press, New Jersey, pp 495-513.

Sample Electronic Article citation:

Simin K, Wu H, Lu L, Pinkel D, Albertson D, Cardiff RD and Van Dyke T (2004) pRb inactivation in mammary cells reveals common mechanisms for tumor initiation and progression in divergent epithelia. *Plos Biol* 2:194-205. <http://www.plosbiology.org> .

f) Internet Resources Section

this section should contain a list of URLs referring to data presented in the text, software programs and other Internet resources used during data processing. When databases are cited, date of consultation must be stated.

Sample Internet Resource citation :

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM> (September 4, 2005)

LEM Software, http://dir.niehs.nih.gov/dirbb/weinbergfiles/hybrid_design.htm

g) Tables each table must start on a new page. A concise title should be provided above the table. Tables must be numbered consecutively in Arabic numerals. Each column must have a title in the box head. Footnotes typed directly below the table should be indicated in lowercase superscript numbers.

h) Figures must be numbered consecutively in Arabic numerals. Legends should be typed on a separate sheet. A set of original illustrations of the highest quality must be provided in glossy paper. If you have created figures electronically submit them also as hard copies. Scanned figures should not be submitted. Images should be in TIFF or JPEG format and provided in separate files. Figures in Word format cannot be published. Journal quality reproduction will require grayscale and color at resolution yielding 300 dpi. Authors should submit bitmapped line art at resolution yielding 600-1200 dpi. These resolutions refer to the output size of the file; if it is anticipated that images will be enlarged or reduced, the resolutions should be adjusted accordingly. Identify each illustration by affixing on the back a label containing: the number of the figure, the name of the first author and an arrow indicating top of illustration. Illustrations supplied on disks must follow instructions in item 2 (Submission package). Color illustration can be accepted, but authors are asked to defray the cost. For costs of color figures, check with the Editorial Office.

i) Nomenclature should adhere to current international standards.

j) Sequences may appear in text or in figure. DNA, RNA and protein sequences equal to or greater than 50 units must be entered into public databases. The accession number must be provided and released to the general public together with publication of the article. Long sequences requiring more than two pages to reproduce will not be published unless the Editorial decision is that the publication is necessary. Complete mtDNA sequence will not be published.

k) Data access: reference should be made to availability of detailed data and materials used for reported studies.

l) Ethical issues: Reports of experiments on live vertebrates must include a brief statement that the institutional review board approved the work. For experiments involving human subjects, authors must also include a statement that informed consent was obtained from all subjects. If photos or any other identifiable data are included, a copy of the signed consent must accompany the manuscript.

3.2 Short Communications Present brief observations that do not warrant full-length articles. They should not be considered preliminary communications. They should be

15 or fewer typed pages in double spaced 12-point type, including literature cited. They should include an Abstract no longer than five percent of the paper's length and no further subdivision with introduction, material and methods, results and discussion in a single section. Up to two tables and two figures may be submitted. The title page and reference section format is that of full-length article.

3.3 Letters to the Editor Relate or respond to recent published items in the journal. Discussions of political, social and ethical issues of interest to geneticists are also welcome in this form.

3.4 Review Articles are welcome.

3.5 Book Reviews: Publishers are invited to submit books on Genetics, Evolution and related disciplines, for review in the journal. Aspiring reviewers may propose writing a review.

3.6 History, Story and Memories Accounts on historical aspects of Genetics relating to Brazil.

4. Proofs: Page proofs will be sent to the corresponding author. Changes made to page proofs, apart from printer's errors, will be charged to the authors. Notes added in proof require Editorial approval.

5. Reprints Reprints are free of charge and provided as a pdf-file.

INTRUÇÕES PARA AUTORES

REVISTA DE BIOLOGIA E CIÊNCIAS DA TERRA

ISSN 1519-5228

Campina Grande-PB, Brasil

REVISTA DE BIOLOGIA E CIÊNCIAS DA TERRA

1. Somente serão aceitos para publicação trabalhos inéditos escritos em Português, Espanhol ou Inglês, em observância à Lei de Direito Autoral (nº 9.610) de 19 de fevereiro de 1998.
2. A Revisão em Língua Portuguesa, Espanhola ou Inglesa são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es).
3. A partir do **v.6 n.1**, o número máximo de autores permitido por artigo é de 4 (quatro) e um mesmo autor poderá ter apenas um trabalho como autor principal por número da revista.
4. Os originais devem ser enviados em arquivo anexo para o endereço eletrônico **revbiocieter@yahoo.com.br**
5. NOVAS Especificações:
 - Programa a ser utilizado: Microsoft Word for Windows;
 - Fonte Times New Roman 14 para o título, Times New Roman 12 para o corpo do texto e Times New Roman 10 para o nome dos autores, tabelas e figuras;
 - O Título em português e em Inglês e o nome dos autores devem estar centralizados;
 - Espaçamento simples entre linhas;
 - Margens (todas): 2,0cm
 - O texto deve estar formatado em duas colunas, com espaço de 0,5 cm entre elas e largura de 8,25 cm em ambas
 - Os trabalhos NÃO devem apresentar notas de rodapé. As observações serão inseridas no final de cada trabalho, bem como os Agradecimentos que poderão ser incluídos no final.
 - As figuras devem ser "escaneadas" no formato ".gif" ou ".JPEG" e inseridas no texto com as respectivas indicações e informações.
 - Os resumos deverão ser escritos em Inglês apresentados em um só parágrafo com máximo de 20 linhas ou 900 caracteres. As Palavras-chave deverão vir no máximo em 08.
 - A extensão dos trabalhos deverá apresentar no máximo, 20 páginas.
 - Incluir abaixo do título o(s) nome(s) do(s) autor(s) e formação acadêmica no fim conforme artigos já publicados.

FAVOR VERIFICAR NA REVISTA EXEMPLO DOS TRABALHOS MAIS RECENTES PUBLICADOS.

6. Normas básicas para referências bibliográficas:

Livros:

SOBRENOME(S), Nome(s). *Título em itálico*: subtítulo normal. Edição. Local: Editora, ano. nº páginas

Capítulos:

SOBRENOME(S), Nome(s). Título do Capítulo. In: SOBRENOME(S), Nome(s)(ed) ou (org). *Título em itálico*. Local: Editora, ano. nº páginas

Artigos:

SOBRENOME(S), Nome(s). Título do Artigo. *Título do Periódico em itálico*, volume, número, mês/ano, páginas consultadas,

Teses, dissertações, monografias:

SOBRENOME, Nome. *Título em itálico*. Local, ano, nº de páginas. (Tese, dissertação ou monografia) - Instituição.

7. Prazos e datas para recebimento dos trabalhos

- Serão estipulados a cada semestre

8. Trabalhos científicos de alunos de Graduação também serão aceitos desde que sejam devidamente orientados por um Professor.

9. *Os autores são responsáveis pelas idéias contidas nos trabalhos, bem como pela responsabilidade técnica e a veracidade das informações, dados, etc, apresentados. A comissão editorial não se responsabiliza pelo conteúdo dos textos publicados.*