Caracterização citomolecular da variedade BRS Pérola branca de *Arachis hypogaea* L. (o amendoim cultivado) e de seus genitores

Reginaldo de Carvalho[1], Vanessa Emanuelle de Oliveira Maciel[1], Maria Angélica Oliveira Marinho[2], Genialdo Ramos dos Santos[1], Lidiane de Lima Feitoza[3], Roseane Cavalcanti dos Santos[4]

1 Laboratório de Citogenética Vegetal, Departamento de Biologia, Programa de Pós-graduação em Agronomia-Melhoramento Genético de Plantas - UFRPE, Recife, PE, Brasil.
2 Departamento de Agronomia, Universidade Estadual do Tocantins - UNITINS,108 Sul Alameda 11 Lote 03, Cx. Postal 173, Palmas-TO, Brasil, 77020-122.
3 Laboratório de Genética e Citogenética, Centro de Ciências da Natureza – CCN, Universidade Federal do Piauí – UFPI, Teresina, PI, Brasil.
4 Empresa Nacional de Pesquisa do Algodão, EMBRAPA, Campina Grande, PB, Brasil.
Autor para correspondência: reginaldo.carvalho@ufrpe.br

Recebido em 27 de fevereiro de 2025.
Aceito em 23 de setembro de 2026.
Publicado em 26 de novembro de 2026.

Resumo - A espécie cultivada do amendoim (*Arachis hypogaea* L.) pertence à família Fabaceae, gênero *Arachis,* composto por quase 100 espécies endêmicas da América do Sul. É uma das oleaginosas mais cultivadas no mundo, com grãos ricos em proteínas e vitaminas do complexo B, além de carboidratos, fibras, vitamina E, ácido fólico e um conjunto de minerais. A utilização de técnicas citogenéticas (bandeamento) e moleculares nas últimas décadas tem permitido o acesso a informações importantes sobre o cariótipo da espécie. Com isto, este trabalho objetivou caracterizar três variedades do amendoim cultivado (BRS Pérola Branca, BR1 e LViPE-06), sendo um híbrido e seus genitores, por meio de diversas técnicas citogenéticas visando localizar marcas cromossomo específicos e sua interação no cariótipo do híbrido. Os resultados do presente estudo revelam uma enorme semelhança cariotípica entre as variedades estudadas apresentando $2n$=40, com cromossomos pequenos, morfologia de meta a submetacêntrica e padrão de condensação proximal. As três variedades apresentaram 20 bandas DAPI$^+$ pericentroméricas e 6 bandas de heterocromatina (CMA$^+$) adjacentes. A hibridização *in situ* com sondas de DNA ribossomal evidenciou, três ou quatro pares de DNAr 45S, sempre correspondendo às bandas heterocromáticas CMA$^+$. Quatro blocos de DNAr 5S na região pericentromérica foram observados para todas as variedades. A imunocoloração com o anticorpo anti-H4K5ac foi evidenciada na eucromatina descondensada terminal dos cromossomos metafásicos e na cromatina difusa dos núcleos interfásicos. A marcação com anti-H3S10f ocorreu nos pericentrômeros dos cromossomos e ausente na intérfase. Trabalhos como este contribuem para identificar as pequenas modificações surgidas por eventos evolutivos e também a caracterização citogenética de variedades do amendoim cultivado que possuem diferenças

morfológicas, principalmente nos grãos, podendo auxiliar em programas de melhoramento do amendoim.

Palavras-chave: Bandeamento. FISH. Histonas. Híbrido. Amendoim.

Cytomolecular characterization of the BRS Pérola Branca variety of *Arachis hypogaea* L. (the cultivated peanut) and its parents

Abstract - The cultivated peanut species (*Arachis hypogaea* L.) belongs to the Fabaceae family, genus *Arachis*, which comprises nearly 100 species endemic to South America. It is one of the most widely cultivated oilseeds in the world, with seeds rich in proteins and B-complex vitamins, as well as carbohydrates, fiber, vitamin E, folic acid, and a set of minerals. The use of cytogenetic (banding) and molecular techniques in recent decades has provided access to important information about the species' karyotype. Thus, this study aimed to characterize three varieties of cultivated peanuts (BRS Pérola Branca, BR1, and LViPE-06), including a hybrid and its parental lines, using various cytogenetic techniques to locate specific chromosomal markers and their interaction in the hybrid karyotype. The results of this study reveal a significant karyotypic similarity among the studied varieties, all presenting 2n=40, with small chromosomes, meta- to submetacentric morphology, and a proximal condensation pattern. All three varieties exhibited 20 pericentromeric DAPI+ bands and six adjacent heterochromatin (CMA+) bands. In situ hybridization with ribosomal DNA probes revealed three or four pairs of 45S rDNA, always corresponding to the CMA+ heterochromatic bands. Four blocks of 5S rDNA in the pericentromeric region were observed in all varieties. Immunostaining with the anti-H4K5ac antibody was evident in the decondensed euchromatin of the terminal regions of metaphase chromosomes and in the diffuse chromatin of interphase nuclei. Labeling with anti-H3S10f occurred in the pericentromeric regions of the chromosomes and was absent in interphase. Studies like this contribute to identifying small modifications resulting from evolutionary events and the cytogenetic characterization of cultivated peanut varieties with morphological differences, especially in the seeds, which may assist in peanut breeding programs.

Keywords: Banding. FISH. Histones. Hybrid. Peanut.

Caracterización citomolecular de la variedad BRS Pérola Branca de *Arachis hypogaea* L. (el maní cultivado) y sus progenitores

Resumen - La especie cultivada de maní (*Arachis hypogaea* L.) pertenece a la familia Fabaceae, género *Arachis*, compuesto por casi 100 especies endémicas de América del Sur. Es una de las oleaginosas más cultivadas en el mundo, con granos ricos en proteínas y vitaminas del complejo B, además de carbohidratos, fibra, vitamina E, ácido fólico y un conjunto de minerales. El uso de técnicas citogenéticas (bandeo) y moleculares en las últimas décadas ha permitido el acceso a información importante sobre el cariotipo de la especie. Así, este estudio tuvo como objetivo caracterizar tres variedades de maní cultivado (BRS Pérola Branca, BR1 y LViPE-06), incluyendo un híbrido y sus progenitores, mediante diversas técnicas citogenéticas para localizar marcas cromosómicas específicas y su interacción en el cariotipo del híbrido. Los resultados de este estudio revelan una gran similitud cariotípica entre las variedades estudiadas, presentando todas 2n=40, con

cromosomas pequeños, morfología de meta a submetacéntrica y un patrón de condensación proximal. Las tres variedades presentaron 20 bandas DAPI+ pericentroméricas y seis bandas de heterocromatina (CMA+) adyacentes. La hibridación in situ con sondas de ADN ribosómico evidenció tres o cuatro pares de ADN ribosómico 45S, siempre correspondientes a las bandas heterocromáticas CMA+. Se observaron cuatro bloques de ADN ribosómico 5S en la región pericentromérica en todas las variedades. La inmunocoloración con el anticuerpo anti-H4K5ac fue evidente en la eucromatina descondensada de las regiones terminales de los cromosomas en metafase y en la cromatina difusa de los núcleos en interfase. La marcación con anti-H3S10f se observó en las regiones pericentroméricas de los cromosomas y estuvo ausente en la interfase. Estudios como este contribuyen a identificar pequeñas modificaciones surgidas de eventos evolutivos y a la caracterización citogenética de variedades cultivadas de maní con diferencias morfológicas, especialmente en los granos, lo que puede ayudar en programas de mejoramiento del maní.

Palabras clave: Bandeo. FISH. Histonas. Híbrido. Maní.

Introdução

Estudos prévios indicam que o *Arachis hypogaea* (L.) é uma oleaginosa originária da América do Sul, tendo sido cultivada por populações indígenas antes da chegada dos europeus no século XV. Essa leguminosa cientificamente classificada como *Arachis hypogaea*, tenha se originado entre o sul da Bolívia e o norte da Argentina. E posteriormente, foi disseminada em outras regiões asiáticas de forma irreversível pelos espanhóis e portugueses. O gênero *Arachis* compreende cerca de 80 espécies descritas, distribuídas em diversos ambientes, desde regiões costeiras do Brasil e Uruguai até altitudes de 1.450 metros nos Andes, no noroeste da Argentina (Lima 2011, Macêdo 2007, Santos et al. 2021). O gênero foi dividido em nove seções taxonômicas e a seção *Arachis,* à qual pertence o amendoim cultivado, é composta por 31 espécies que apresentam os caracteres evolutivos mais recentes, tais como o fruto desenvolvido, que são de grande importância para a obtenção de novas variedades (Krapovickas e Gregory, 1994; Valls, 2005; Valls e Simpson, 2005).

O amendoim cultivado tornou-se uma cultura importante para o país devido ao seu alto teor de proteína e óleo (Silva *et al.*, 2010; Mari *et al.*, 2013) e é considerada uma espécie autógama, com uma estrutura reprodutiva, que facilita a autofecundação e uma baixa frequência de alogamia (Borém, 2013). As cultivares de amendoim de porte ereto, possuem elevada tolerância a condições de estresse hídrico (Nogueira e Santos, 2000; Santos *et al.*, 2005). A cultivar BR 1 tem sementes com película vermelha, arredondadas, tamanho médio e teor de óleo bruto nas sementes 45%. A linhagem LViPE-06 tem película bege, sementes de tamanho extragrande arredondadas e teor de óleo na faixa de 51%. A BRS Pérola Branca, é um híbrido gerado por meio de cruzamento entre a precoce BR 1 e a *top line* LViPE-06 e possui sementes grandes, arredondadas com película branca e teor de óleo 52%. A *top line* LViPE-06 e a cultivar BRS Pérola Branca são indicadas ao mercado de óleos (Santos et al, 2012).

As primeiras análises citogenéticas no gênero *Arachis* foram realizadas por Husted (1933, 1936), que determinou $2n=2x=20$ (diplóide) para espécies selvagens e $2n=4x=40$ (tetraplóide) para a espécie cultivada *Arachis hypogaea*. A espécie cultivada do amendoim, *Arachis hypogaea* L., cuja configuração citológica é (AABB; $2n = 4x = 40$), tem sua possível origem pela domesticação da

espécie tetraploide *A. monticola* (AABB) e esta, pelo cruzamento entre duas espécies silvestres da seção *Arachis*, uma de genoma "A" (com o par de cromossomos "A"), e outra de genoma "B" (sem o par de cromossomos "A") (Gregory e Gregory 1976, 1979). *Arachis monticola* e *A. hypogaea* são as únicas espécies tetraplóides da seção *Arachis* e formam híbridos férteis quando cruzados entre si. Atualmente, a hipótese mais aceita é a de que *A. duranensis* teria sido a doadora do genoma "A" (Fernandes e Krapovickas, 1994) e *A. ipaensis*, do genoma "B" (Seijo *et al.*, 2007).

A associação de diversas técnicas citogenéticas como a coloração convencional com Giemsa, bandeamento com fluorocromosos CMA/DAPI, a FISH e a imunocoloração de proteínas, proporciona uma melhor compreensão da estrutura da cromatina e seu papel na organização dos genomas. Em alguns trabalhos, os autores utilizam anticorpos contra histonas modificadas típicas da eu- e heterocromatina que mostram diferenças na composição e tipos de organização da cromatina em cromossomos de plantas (Houben *et al.*, 2003; Schübeler, 2009; Feitoza e Guerra 2011a, Marques *et al.*, 2011).

Diante do exposto e levando em consideração a importância econômica do amendoim cultivado e a escassez de estudos mais aprofundados do seu cariótipo, este trabalho objetivou entender melhor a composição e estruturação da cromatina de três variedades de amendoim cultivado utilizadas na região Nordeste do Brasil através das técnicas de coloração convencional, bandeamento duplo com os fluorocromos CMA/DAPI, Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH) e com a mais recente técnica em citogenética, a imunocoloração de proteínas histonas.

Material e métodos

A. Material vegetal

Foram utilizadas sementes de três variedades de *A. hypogaea*: BR 1, LViPE-06 e BRS Pérola Branca cedidas pela Embrapa Algodão – Campina Grande – PB. O material vegetal foi coletado e processado no Laboratório de Citogenética Vegetal da Universidade Federal Rural de Pernambuco (LCV - UFRPE).

B. Pré-tratamento

Pontas de raízes jovens foram tratadas com solução de 8-hidroxiquinoleína (8HQ) a 2 mM por 4,5 horas a 18ºC, fixadas em Carnoy (etanol: ácido acético/ 3:1v/v) e estocadas em freezer a -20ºC até a posterior utilização. Para a coloração convencional as raízes estocadas foram lavadas e hidrolisadas em HCl 5N, por 20 min. Para o bandeamento CMA/DAPI e FISH, após as lavagens, as raízes foram digeridas em solução enzimática (celulase 2%/ pectinase 20%) por 20 minutos a 37°C. Para a imunocoloração de histonas modificadas, as raízes foram fixadas por 45 min à temperatura ambiente em paraformaldeído 4% diluído em PBS e posteriormente, digeridas em solução enzimática (celulase 2%/ pectinase 20%) por 30 minutos a 37°C.

C. Análise convencional

As raízes foram maceradas em ácido acético 45% e posteriormente coradas com Giemsa a 3%, durante 10 min., para definição do cariótipo e caracterização cromossômica seguindo a metodologia de Guerra (1983) com pequenas modificações.

D. Coloração CMA/DAPI

Para a identificação das regiões ricas em AT e GC, após a confecção das lâminas, estas foram envelhecidas por 3 dias e posteriormente coradas com 8µL de CMA3 (cromomicina A - 0,5 mg/ml)

por 60 min. Em seguida foram contracoradas com 8µL de DAPI (2µg/ml) por 30 minutos e montadas com 10µL de meio de montagem (Guerra e Souza, 2002).

E. Hibridização Fluorescente in situ (FISH)

Para a detecção de sítios de DNAr 45S e 5S seguiu-se o protocolo de Pedrosa-Harand *et al.* (2002). As lâminas selecionadas foram pré-tratadas com RNase e pepsina, fixadas em formaldeído e desidratadas em série alcoólica. A mistura de hibridização contendo 50% de formamida, 10% de sulfato de dextran, 2 x SSC e 2-5 ng/µl de sonda marcada foi desnaturada previamente por 10 min a 75° C. As lâminas foram desnaturadas por 5 min a 75° C. A hibridização foi realizada em câmara úmida a 37° C por um dia e posteriormente as lâminas foram analisadas.

F. Imunocoloração

Para a imunocoloração, seguiu-se o protocolo de Manzanero *et al.*, (2000). Após a confecção das lâminas, foram adicionados 15 µl de anticorpo primário anti-H4K5ac ou anti-H3S10f diluídos 1:300 (rabbit polyclonal IgG – Upstate Biotechnology, USA). Posteriormente, o anticorpo primário foi detectado usando 15 µl do anticorpo secundário goat anti-rabbit IgG conjugado com FITC (Sigma), diluído 1:60. As preparações foram montadas em DAPI (2 µg/mL):Vectashield e analisadas imediatamente.

G. Fotodocumentação

Os resultados foram fotografados em microscópio de epifluorescência Leica DM2500 equipado com câmera digital Leica DFC345Fx. As medições cromossômicas foram realizadas no software MicroMeasure3. As imagens foram processadas no Adobe Photoshop CS5 (Adobe Systems Incorporated) com alteração de brilho e contraste, apenas.

Resultados e discussão

As três variedades de *A. hypogaea* estudadas (BR1, LViPE-06 e BRS Pérola Branca) apresentaram genoma tetraplóide com 2*n*=4x=40 cromossomos. No geral, as características citológicas foram bastante similares (Fig. 1), com cromossomos apresentando morfologia variando de metacêntricos a submetacêntricos e fórmula cariotípica (19m+1sm), confirmando resultados de Husted (1933, 1936). O tamanho foi considerado de pequeno a médio, com valores variando entre 1,20 a 2,93µm para LViPE-06, 1,45 a 3,14µm para BR1 e 1,39 a 3,03µm para o híbrido "BRS Pérola Branca" (Figs. 2b-c, 3b-c e 4b). Semelhanças de tamanho cromossômico juntamente com a morfologia e o tipo de núcleos também têm sido encontradas em outras variedades de *A. hypogaea* (Seijo *et al.*, 2004; 2009) e outras espécies como *A. gregoryi, A. linearifolia e A. schininii*, pertencentes à secção *Arachis* (Peñaloza e Valls, 2005). Nos três cariótipos foi evidenciado também um par de cromossomos mais fracamente corado, conhecido como "par A", que ocorre no genoma de muitas espécies de *Arachis*, incluindo aquela doadora do genoma A para a formação de *A. hypogaea* (Fernández e Krapovickas, 1994) (Figs. 2b, 3b, 4c). Os núcleos interfásicos foram do tipo semi-reticulado com base na classificação de Guerra (1985), com presença de cromocentros bem distintos da cromatina difusa do restante do núcleo, sendo esta última praticamente não corada, ou apenas fracamente, pela coloração Giemsa e CMA/DAPI (Figs. 2a, 3a e 4a). Adicionalmente, as variedades de *Arachis hypogaea* apresentaram satélites do tipo 5, corroborando os dados de Inéz e Fernández (2004). A seção *Arachis* é bem caracterizada pela presença de satélites do tipo 3A, 3B, 5, 6, 7, 8 e 9 (Silva *et al.*, 2010) e a principal característica desse tipo de satélite encontrado no amendoim é sua

ampla distensão, especialmente em prometáfase, além da formação de satélites relativamente grandes.

Na coloração com os fluorocromos CMA e DAPI, foram observadas bandas DAPI$^+$ na região pericentromérica de 10 pares de cromossomos, sendo seis delas adjacentes aos blocos de CMA$^+$ em 3 pares cromossômicos (Figs. 2d, 3d e 4c). A presença de bandas heterocromáticas DAPI$^+$ apenas na metade do complemento cromossômico de *A. hypogaea* sugere uma separação espacial de genomas distintos (genoma A e B) e demonstra claramente sua origem híbrida, corroborando dados prévios (Lavia e Seijo, 2005; Seijo *et al.*, 2004; Robledo e Seijo, 2009). Além do mais, a presença de apenas um cromossômico heteropcnótico (diferencialmente corado), conhecido como "par A", também reforça a ideia da formação híbrida com origem nos genomas do tipo A (*A. duranensis*) e B (*A. ipaensis*). Bandas heterocromáticas DAPI$^+$ centroméricas, mas em todos os cromossomos, também estão presentes noutras espécies diploides que apresentam genoma A, como é o caso de *A. correntina, A. duranensis* e *A.villosa* (Seijo *et al.*, 2004) e em *Arachis glandulifera, A. hoehnei* e *A. gregoryi* (Robledo e Seijo, 2008; Custódio *et al.*, 2013), além de outras nove espécies de *Arachis* que apresentam genoma A (Robledo e Seijo, 2009). Está presente também na espécie *Arachis pusilla* da secção Heterantheae (Silva *et al.*, 2010) e em todas as variedades de *A. hypogaea* relatadas (Seijo *et al.*, 2004; 2007; Robledo e Seijo 2008; 2009). Dessa forma, bandas DAPI$^+$ centroméricas tem sido um bom marcador citológico no gênero *Arachis*, uma vez que uma boa parte das suas espécies geralmente tem todos, ou quase todos, os cromossomos do complemento com bandas pericentroméricas (espécie com genoma A) ou sem bandas (espécie do genoma B) (Raina e Mukai, 1999; Seijo *et al.*, 2004). Entretanto, uma exceção é *A. batizocoi*, que apresenta um único par sem bandas heterocromáticas (Seijo *et al.*, 2004).

Na Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH), as três variedades apresentaram seis sítios de DNAr 45S (Fig. 2f, 3f e 4e) e dois pares de DNAr 5S (Fig. 2e, 3e e 4d), sendo um par de 5S no genoma A (que apresenta o "par A" e bandas DAPI$^+$ centroméricas) e outro par no genoma B, ambos os sítios localizados na região mais proximal. Na secção *Arachis*, o número de DNAr 45S variou de dois em *A. gregory* para oito sítios em *A. glandulifera*, enquanto o número de DNAr 5S foi mais conservado e variou de dois na maioria das espécies analisadas para quatro em *A. hoehnei* (Custódio *et al.*, 2013). Além do mais, um trabalho anterior mostrou valores diferentes do observado no presente trabalho para os dois loci em uma variedade de *A. hypogaea*, sendo cinco sítios de DNAr 45S e apenas dois sítios de DNAr 5S, (Seijo *et al.*, 2004). Detecção de genes de RNAr por hibridização *in situ* fluorescente (FISH) mostra ser uma ferramenta útil em estudos de organização do genoma da planta, homeologias cromossômicas, citotaxonomia e evolução (Jiang e Gill, 1994; Nakamura *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2012; Fonsêca *et al.*, 2014). No estudo dos cromossomos de *Arachis* como um todo, a técnica de FISH tem demonstrado que o número de loci de DNAr ribossomal é variável, como observado por Raina e Mukai (1999), Robledo e Seijo (2008) e no presente trabalho, que similar às marcas DAPI$^+$ centroméricas, também pode ser um bom marcador para reconstrução e entendimento dos processos evolutivos do grupo *Arachis*.

No cariótipo de *A. hypogaea*, uma das características citológicas mais curiosas e que chama à atenção é a presença de um par cromossômico menor (vindo do genoma A), que apesar de conter uma banda heterocromática proximal, mostra um baixo nível de condensação da cromatina (Figs. 2d, 3e, 4d). Com o intuito de caracterizar a cromatina desse par, nós utilizamos o anticorpo contra a histona H4 acetilada na lisina 5 (anti-H4K5ac), uma marca universal da eucromatina descompactada e por isso associada à expressão e atividade gênica (Shahbazian e Grunstein, 2007),

fornecendo dessa forma um panorama da estrutura e compactação da cromatina e permitindo um comparativo com os demais cromossomos do complemento. Os resultados mostraram que o anticorpo anti-H4K5ac marcou fortemente nas regiões terminais descondensadas de todos os cromossomos das três variedades (Fig. 2j-l, 3j-l e 4o-q), não marcando a cromatina proximal de condensação precoce e nem as bandas heterocromáticas CMA^+ e $DAPI^+$ próximas ao centrômero, que constituem uma pequena fração dessa cromatina proximal. Uma exceção foi o "par A", que foi diferencialmente marcado com H4K5ac e apresentou hiperacetilação ao longo de todo o comprimento cromossômico. Nos núcleos interfásicos, apenas a cromatina difusa, que corresponde às regiões terminais completamente descondensadas, foi marcada (Figs. 2n e 4n).

O padrão de marcação da H4K5ac observado no híbrido e nos progenitores de *A. hypogaea* foi similar ao observado em outras plantas com cromossomos e genomas pequenos como *Silene* (Vyskot *et al.*, 1999), *Costus* e *Eleutherine bulbosa* (Feitoza e Guerra, 2011), *Phaseolus vulgaris* (Fonsêca *et al.*, 2014). Nessas espécies, a hiperacetilação ocorreu exclusivamente nas regiões cromossômicas distais de replicação muito inicial e que correspondem à típica eucromatina descondensada, que em plantas com cromossomos e genomas pequenos, é aparentemente bem delimitada das outras frações da cromatina. Aparentemente, a hiperacetilação diferencial nesses três tipos de cromatina (eucromatina descondensada terminal, eucromatina condensada proximal e heterocromatina), sugere que a hiperacetilação esteja sempre associada a regiões potencialmente transcriptíveis (Hansey *et al.*, 2010; Ratnakumar *et al.*, 2011; Miller e Grant, 2013). Em Arabidopsis (Probst, 2004), Silene (Vyskot *et al.*, 1999) e tomate (Wang *et al.*, 2006), os segmentos cromossômicos menos condensados e hiperacetilados representem regiões ricas em sequências gênicas transcripcionalmente competentes. Além do mais, no tomate, cujo genoma é bastante estudado, as regiões terminais de replicação precoce que corresponde à eucromatina terminal são mais ricas em genes e hiperacetilada (Wang *et al.*, 2006; dados de um dos autores). No genoma das três variedades de *A. hypogaea*, além das regiões terminais fortemente marcadas, foi observada uma acetilação intensa e diferencial no par A. Uma vez que a H4K5ac é uma marca universal e exclusiva de regiões descompactadas e de replicação precoce, sendo por isso associada às regiões transcripcionalmente ativas, nós sugerimos que o genomas das espécies aqui analisadas apresentam intensa atividade transcripcional nas regiões cromossômicas terminais dos cromossomos vindos dos genomas A e B, e especialmente no par A, vindo do genoma A.

Na utilização do anticorpo anti-H3S10f, uma marca associada à condensação cromossômica na mitose de plantas, a marcação se deu fortemente na região pericentromérica de todos os cromossomos das variedades analisadas em mitose (Figs. 2g-i, 3g-i, 4f-k). No geral, a marcação iniciou na prófase e intensificou-se na metáfase. Tanto na anáfase, quanto na telófase e nos núcleos interfásicos o brilho reduziu drasticamente e estes não foram marcados (Fig. 4h). A forte associação temporal entre o surgimento de H3S10f e a condensação cromossômica tem levado à suposição de que a fosforilação da histona H3 teria um papel importante na condensação cromossômica (Wei *et al.*, 1998), embora hajam também evidências em contrário (Manzanero *et al.*, 2002). No presente trabalho, apesar do "par A" das três variedades apresentarem condensação tardia quando comparado ao tempo de condensação dos demais cromossomos do complemento, não foram observadas diferenças no tempo de início de fosforilação entre os cromossomos A e B, tão pouco entre o "par A" e os demais cromossomos. Similarmente, em *E. bulbosa*, as extensas regiões precocemente condensadas do par I não foram nem precocemente fosforiladas nem mais extensamente fosforiladas que os braços curtos e de condensação tardia dos cromossomos pequenos.

Isso reforçou a hipótese de que fosforilação de H3S10 pode não ter uma relação causal com a condensação mitótica (Feitoza e Guerra, 2011).

Figura 1: Idiograma mostrando número e posição das bandas. I- Bandas CMA^+ (amarelo) e $DAPI^+$ (azul claro) nas variedades BR 1, LViPE-06 e BRS Pérola Branca. II- DNAr 45S (vermelho) e DNAr 5S (verde escuro) em LViPE-06 e BRS Pérola Branca. III- DNAr 45S (vermelho) e DNAr 5S (verde escuro) em BR 1. IV- Padrão anti-H3S10f (azul escuro) e anti-H4K5ac (verde claro) nas três variedades.

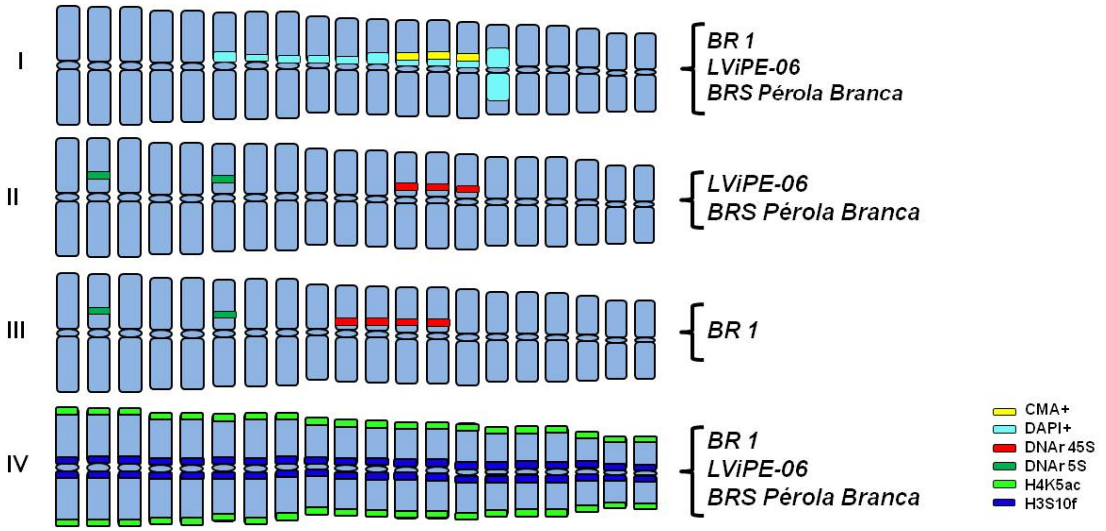


Figura 2: Células mitóticas de *Arachis hypogaea* L., var. BR 1. A- Núcleo interfásico do tipo semi-reticulado; B- Padrão de condensação em prometáfase revelado por Giemsa. C- Padrão de condensação profásico revelado por Giemsa. D- Coloração com CMA/DAPI revelando as bandas ricas em AT; Inserto evidencia banda DAPI. E– FISH mostrando bandas de DNAr 5S. F- FISH mostrando bandas de DNAr 45S. G, H, I- Imunocoloração com anti-H3S10f mostrando suas marcações na região pericentromérica. J, K, L- Imunocoloração com o anticorpo H4K5ac evidenciando suas marcações terminais. M-N- Núcleo interfásico em imunocoloração revelando cromocentros em vermelho. Inserto em I mostrando marcação pericentromérica de anti-H3S10f. Barras = 10 µm.

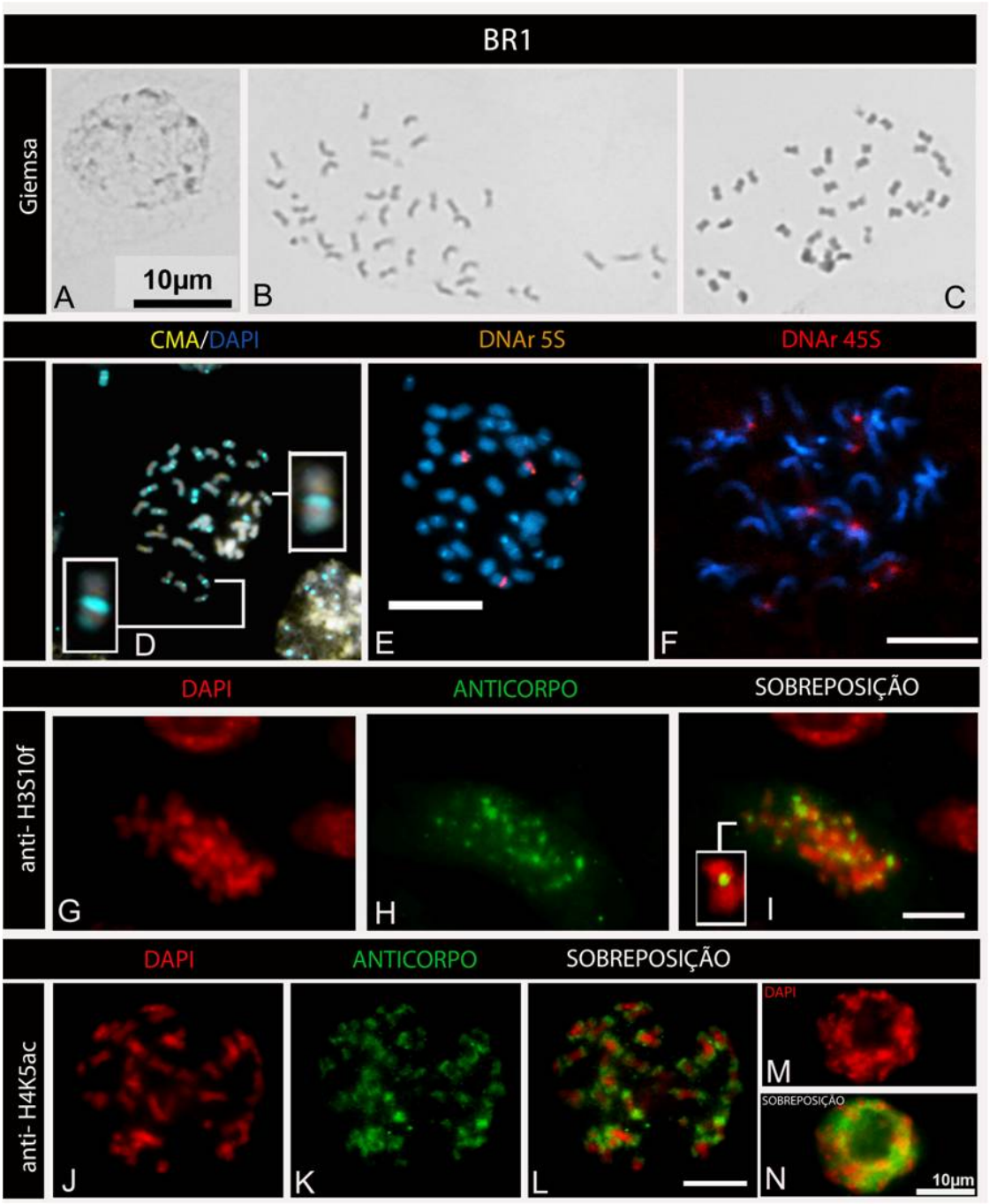


Figura 3: Células mitóticas de *Arachis hypogaea* L., var. LviPE-06. A- Núcleo interfásico do tipo semi-reticulado; B-C- Padrão de condensação em prometáfase e metáfase, em sequência, revelado por Giemsa. D- Coloração com CMA/DAPI revelando as bandas ricas em AT. E– FISH mostrando bandas de DNAr 5S. F- FISH mostrando bandas de DNAr 45S. G, H, I- Imunocoloração com anti-H3S10f mostrando suas marcações na região pericentromérica. J, K, L- Imunocoloração com o anticorpo H4K5ac evidenciando suas marcações terminais. Barras = 10 µm.

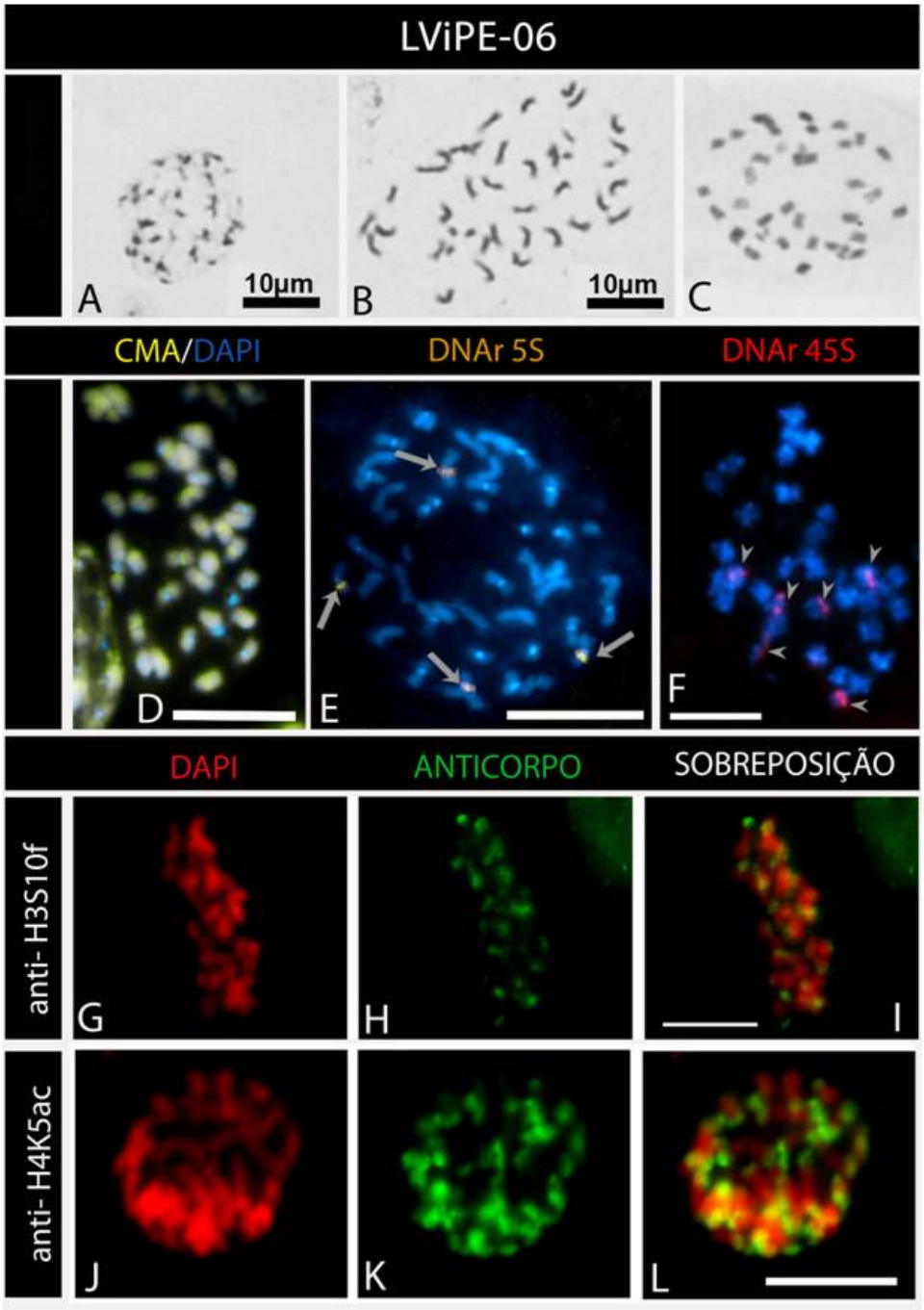
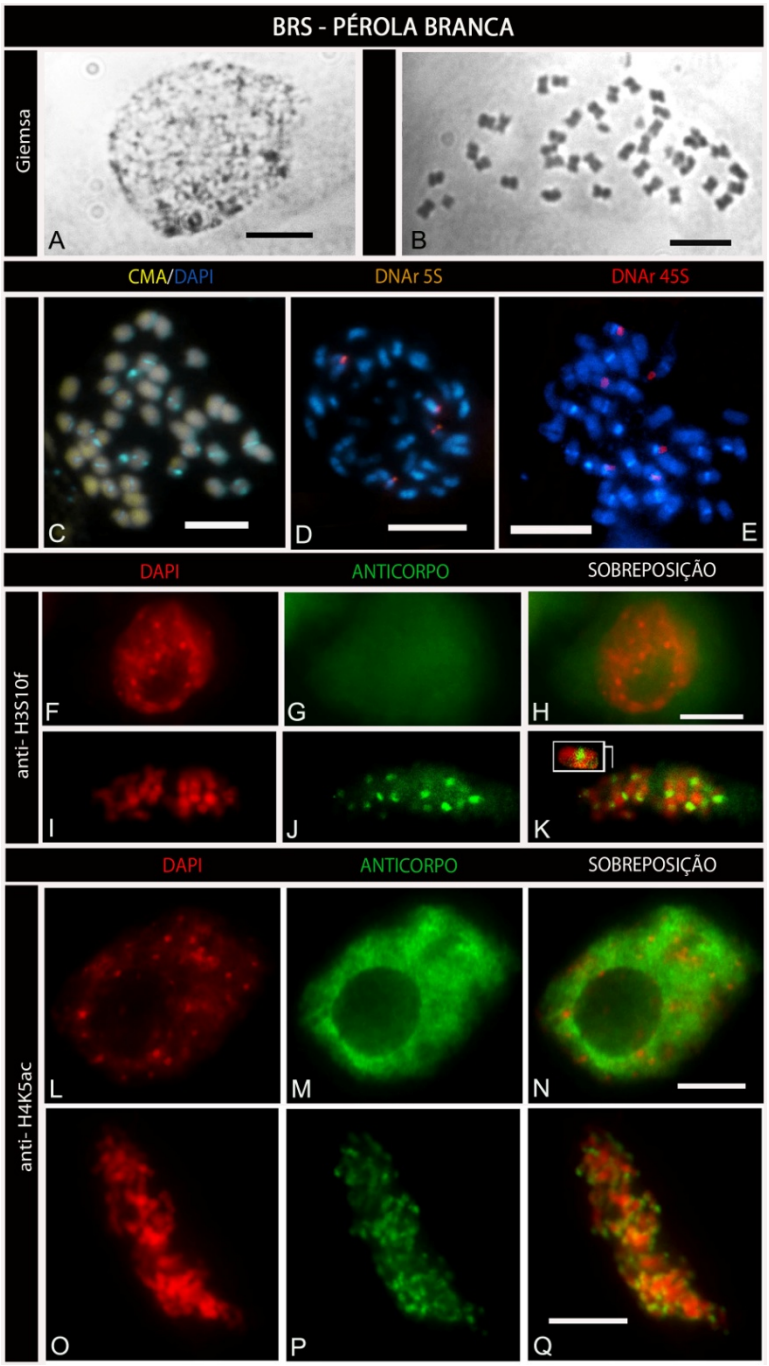


Figura 4: Células mitóticas de *Arachis hypogaea* L., var. BRS Pérola Branca (BRS-Branco). A- Núcleo interfásico do tipo semi-reticulado; B- Padrão de condensação em metáfase revelado por Giemsa. C- Coloração com CMA/DAPI revelando as bandas ricas em AT. D– FISH mostrando bandas de DNAr 5S. E- FISH evidenciando bandas de DNAr 45S. F, G, H- Imunocoloração com anti-H3S10f em núcleo interfásico mostrando que não existe marcação nessa fase. I, J, K- Imunocoloração com anti-H3S10f em metáfase revelando a marcação na região pericentromérica; Inserto evidenciando a marcação. L, M, N- Imunocoloração com o anticorpo H4K5ac em núcleo interfásico, mostrando marcação. O, P, Q- Imunocoloração com o anticorpo H4K5ac em metáfase, evidenciando suas marcações terminais. Barras = 10 µm.



Conclusão

Os dados observados no presente trabalho sugerem que algumas características citológicas, pelo menos aquelas perceptíveis pelas técnicas aqui empregadas como o número de sítios de DNAr, heterocromatina e padrão de histonas, foram bastante uniformes nas três variedades estudadas. Já os dados obtidos com a FISH indicaram uma forte discrepância quando comparado com acessos de outros estudos em *A. hypogaea*, demonstrando a aparente perda da homogeneidade, reconhecida no gênero *Arachis*.

O padrão de bandas de heterocromatina CMA^+ e $DAPI^+$ foi mais estável e homogêneo quando comparados com os trabalhos prévios. As marcas epigenéticas anti-H4K5ac e anti-H3S10f, observadas de maneira inédita nesse estudo, possuem os mesmos padrões observados antes em outras espécies de plantas. Uma vez que o padrão de marcação da H4K5ac possui estreita relação com regiões descompactadas e provavelmente mais ricas em genes, acredita-se que o uso dessa marca de histona associada com outros marcadores citológicos possa auxiliar em estudos futuros de mapeamento de genes importantes nas variedades de amendoim, ou outras plantas, de interesse econômico.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) pela estrutura física e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Conflito de Interesses: Os autores declaram não ter conflitos de interesse.

Referências

Borém A, Miranda GV. 2013. Melhoramento de plantas. 6ª edição. Viçosa: Editora UFV, 523pp.

Custódio AR, Seijo G, Valls FM. 2013. Characterization of Brazilian accessions of wild Arachis species of section *Arachis* (Fabaceae) using heterochromatin detection and fluorescence in *situ* hybridization (FISH). Genetics and Molecular Biology, 36(3) 364-370.

Feitoza L, Guerra M. 2011. Different types of plant chromatin associated with modified histones H3 and H4 and methylated DNA. Genetica. doi: 10.1007/s10709-011-9550-8.

Fernándes A, Krapovickas A. 1994. Cromosomas y evolución em *Arachis* (Leguminosae). Bonplandia, 8:187-220.

Fonsêca A, Richard MMS, Geffroy V, Pedrosa-Harand A. 2014. Epigenetic Analyses and the Distribution of Repetitive DNA and Resistance Genes Reveal the Complexity of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae) Heterocromatin. Cytogenet Genome Res. p. 1-11. doi: 10.1159/000360572.

Gregory WC, Gregory MP. 1976. Groundnut. In: Simmonds, N. W.(Ed.). London, Logman Group. Evolution of crop plants. 151-154.

Gregory WC, Gregory MP. 1979. Exotic germ plasm os *Arachis* L. interespecific hybrids. Journal of Heredity, 70:185-193.

Guerra M. 1983. O uso do corante Giemsa na citologia vegetal. Comparação entre a coloração simples e o bandeamento. Cienc. Cultura. 19-193.

Guerra M. 1985. Estrutura e diversificação dos núcleos interfásicos em plantas. In: I Colóquio de Citogenética e Evolução de Plantas, 1.1985. Anais... Ribeirão Preto: SBG, 137-153.

Guerra M, Souza MJ. 2002. Como Observar Cromossomos: um guia de técnica em citogenética vegetal, animal e humana. São Paulo, Funpec, 131p.

Husted L. 1933. Cytological studies of the peanut *Arachis*, I. Chromosome number and morphology, Cytologia. 5:109-117.

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

Houben A, Demido VD, Gernand D, Meister A, Leach CR, Schubert I. 2003. Methylation of histone H3 in euchromatin of plant chromosomes depends on basic nuclear DNA content. The Plant Journal, v. 33, p. 967-973. doi: 10.1046/j.1365-313X.2003.01681

Inéz LG, Fernández A. 2004. Karyotypic studies in Arachis hypogaea L. varieties. 57(4):353-359p.

Jiang J, Gill BS. 1994. New 18S-26S ribosomal RNA gene loci: Chromosomal landmarks for the evolution of polyploidy wheats. Chromosoma. 103:179-185.

Krapovickas A, Gregory WC. 1994. Taxonomia del género *Arachis* (Leguminosae). Bonplandia. 8:1-186.

Lima, T. M. D. 2011. Cultivo do amendoim submetido a diferentes níveis de adubação e condições edafoclimáticas no sudoeste de Goiás.

Macêdo, M, H, G. 2007. Amendoim: proposta de preço Mínimo - safra 2006/2007.

Manzanero S, Arana P, Puertas MJ, Houben A. 2000. The chromosomal distribution of phosphorylated histone H3 differs between plants and animals at meiosis. Chromosoma. 109: 308–317.

Mari AG, Santos RF, Secco D, Cabral AC, Júnior AM, Frigo EP. 2013. Amendoim (*Arachys hypogaea*) – uma cultura energética. Cascavel, 6(3):122-134.

Marques A, Fuchs JMAL, Heckmann S, Guerra M, Houben A. 2011. Characterization of Eu- and heterochromatin of citrus with a focus on the condensation behavior of 45S rDNA chromatin. Cytogenetic and Genome Research, n.134, p. 72-82. doi: 10.1159/000323971.

Nakamura R, Kitamura S, Inoue M, Ohmido N, Fukui K. 2001. Karyotype analysis of *Nicotiana kawakamii* Y. Ohashi using DAPI banding and rDNA FISH. Theor Appl Genet. 102:810-814.

Nogueira RJMC, Santos RC. 2000. Alterações fisiológicas no amendoim submetido ao estresse hídrico. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental 4:41–45.

Pedrosa-Harand A, Sandal N, Stougaard J, Schweizer D, Bachmair A. 2002. Chromosomal Map of the Model Legume *Lotus japonicus.* Genetics. 161: 1661–1672.

Peñaloza APS, Valls JFM. 2005. Chromossome number and satellited chromossome morphology of eleven species of *Arachis* (Leguminosae). Bonplandia. Corrientes, Argentina. 14(1-4):65-72.

Probst AV, Fagard M, Proux F, Mourrain P, Boutet S, Earley K, Lawrence RJ, Pikaard CS, Murfett J, Furner I, Vaucheret H, Scheid OM. 2004. Arabidopsis Histone Deacetylase *HDA6* Is Required for Maintenance of Transcriptional Gene Silencing and Determines Nuclear Organization of rDNA Repeats. The Plant Cell. 16(4):1021-1034.

Raina SN, Mukai Y. 1999. 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. 42:52-59.

Ratnakumar P, Vadez V. 2011. Groundnut (Arachis hypogaea) genotypes tolerant to intermittent drought maintain a high harvest index and have small leaf canopy under stress. Functional Plant Biology. 38:1016–1023.

Robledo G, Seijo G. 2008. Characterization of the *Arachis* (Leguminosae) D genome using fluorescence in situ hybridization (FISH) chromosome markers and total genome DNA hybridization. Genetics and Molecular Biology. 31(3): 717-724.

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

Santos RC, Godoy IJ, Favero AP. 2005. Melhoramento do amendoim. In: SANTOS, R.C. (Ed.). O agronegócio do amendoim no Brasil. Campina Grande: Embrapa Algodão; Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica. p.123-190.

Santos RC, Freire RMM, Lima LM, Zagonel GF, Costa BJ. 2012. Produtividade de grãos e óleo de genótipos de amendoim para o mercado oleoquímico. Revista Ciência Agronômica. 43(1):72-77.

Santos AAC, Oliveira AJ, Oliveira TC, Cruz AKN, Almici MS. 2021. DOI: http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i2.12719

Seijo JG, Lavia GI, Fernandez A, Krapovickas A, Ducasse D, Moscone EA. 2004. Physical Mapping of the 5s and 18s-25s rRNA genes by FISH as evidence that *Arachis duranensis* and *A. ipaensis* are the wild diploid progenitors of *A. hypogaea* (Leguminosae). American Journal of Botany. 91(9): 1294-1303.

Seijo G, Lavia GI, Fernández A, Krapovickas A, Ducasse DA, Bertioli DJ, Moscone EA. 2007. Genomic relationships between the cultivated peanut (*Arachis hypogaea*, Leguminosae) and its close relatives revealed by double GISH. American Journal of Botany. 94(12): 1963–1971.

Shahbazian MD, Grunstein M. 2007. Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. Annu Rev Biochem. 76:75-100.

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

Valls JFM. 2005. Recursos genéticos de *Arachis*: avanços no conhecimento botânico e a situação atual de conservação e uso. Agrociência. 9(2):123-132.

Vyskot B, Siroky J, Hladilova R, Belyaev ND, Turner BM. 1999. Euchromatic domains in plant chromosomes as revealed by H4 histone acetylation and early DNA replication. Genome. 42:343–350.

Wang J, Song L, Grover D, Azrak S, Batzer MA, Liang P. 2006. dbRIP: A highly integrated database of retrotransposon insertion polymorphisms in humans. Hum Mutat. 27: 323–329.

Wei Y, Mizzen CA, Cook RG, Gorovsky MA, Allis CD. 1998. Phosphorylation of histone H3 at serine 10 is correlated with chromosome condensation during mitosis and meiosis in *Tetrahymena*. Proceedings of the National Academy of Sciences. USA. 95: 7480-7484.