

**ENRAIZAMENTO DE FOLHAS E ANÁLISE CITOLÓGICA DE HÍBRIDOS DIPLÓIDES E
ANFIDIPLÓIDES DE *Arachis***

República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva

Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Roberto Rodrigues

Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

Luis Carlos Guedes Pinto

Presidente

Silvio Crestana

Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires

Ernesto Paterniani

Helio Tollini

Marcelo Barbosa Saintive

Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa

Silvio Crestana

Diretor Presidente

José Geraldo Eugênio de França

Kepler Euclides Filho

Tatiana Deane de Abreu Sá

Diretores Executivos

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

José Manuel Cabral de Sousa Dias

Chefe-Geral

Maurício Antônio Lopes

Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Maria Isabel de Oliveira Penteadó

Chefe-Adjunto de Comunicação e Negócios

Maria do Rosário de Moraes

Chefe-Adjunto de Administração

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 106

**ENRAIZAMENTO DE FOLHAS E ANÁLISE CITOLÓGICA DE HÍBRIDOS
DIPLÓIDES E ANFIDIPLÓIDES DE *Arachis***

Alessandra Pereira Fávero

Sílvia Marina Cuco

Adeliano Cargnin

Luciano Lourenço Nass

Eduardo Leonardecz Neto

Brasília, DF

2005

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão

Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –

Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 3348-4739 Fax: (61) 3340-3666 <http://www.cenargen.embrapa.br>

e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Maria Isabel de Oliveira Penteado*

Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros: *Arthur da Silva Mariante*

Maria Alice Bianchi

Maria de Fátima Batista

Maurício Machain Franco

Regina Maria Dechechi Carneiro

Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares de Campos Carneiro

Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Maria Iara Pereira Machado*

Editoração eletrônica: *Maria da Graça S. P. Negrão*

1ª edição

1ª impressão (2005):

- E 59 Enraizamento de folhas e análise citológica de híbridos diplóides e anfidiplóides de *Arachis* / Alessandra Pereira Fávero ... [et al.]. – Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005.
28 p. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1676 – 1340; 106)

1. *Arachis* – cromossomos – enraizamento – poliploidização. I. Fávero, Alessandra Pereira II. Série.

633.368 – CDD 21.

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
INTRODUÇÃO	8
Material e Métodos	9
1. Experimento para enraizamento de híbridos e análise citológica	9
2. Experimento sobre a capacidade de enraizamento de diversas espécies do gênero <i>Arachis</i>	12
RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
1. Experimento para enraizamento de híbridos e análise citológica	15
2. Experimento sobre a capacidade de enraizamento de diversas espécies do gênero <i>Arachis</i>	17
CONCLUSÕES	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

ENRAIZAMENTO DE FOLHAS E ANÁLISE CITOLÓGICA DE HÍBRIDOS DIPLÓIDES E ANFIDIPLÓIDES DE *Arachis*

Alessandra Pereira Fávero¹

Sílvia Marina Cuco²

Adeliano Cargnin³

Luciano Lourenço Nass¹

Eduardo Leonardecz Neto⁴

RESUMO

O gênero *Arachis* possui 80 espécies descritas, a maioria brasileira. A definição do número de cromossomos e observações morfológicas têm sido muito importante em estudos sobre o gênero. Pontas de raízes obtidas a partir de plântulas são normalmente utilizadas para obtenção de células em divisão. Um método inédito e alternativo de produção de raízes em pecíolos foi desenvolvido a partir de folhas isoladas de ramos de *Arachis* tratados com colchicina. O objetivo foi o desenvolvimento de uma metodologia que permitisse a contagem do número de cromossomos para a avaliação do grau de ploidia do ramo tratado e avaliar a capacidade de enraizamento de diversas espécies silvestres de *Arachis* usando a técnica de folhas destacadas. Cento e trinta acessos e 27 híbridos interespecíficos foram avaliados. Para a obtenção de preparações com alta frequência de metáfases e cromossomos com morfologia nítida, as raízes foram tratadas com uma combinação de 8-hidroxiquinolina a 300ppm e cicloheximida a 6,25ppm durante 2 horas. As raízes foram coradas pelo método de Feulgen para a análise dos cromossomos. Trata-se de uma alternativa para a aplicação de técnicas citológicas nos casos de indisponibilidade de sementes e/ou ineficácia de estaquia.

¹ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – SAIN Parque Estação Biológica – CP 02372, CEP 70.770-900, Brasília, Brasil

² Departamento de Genética - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - ESALQ/ USP, Av. Pádua Dias, 11 CP CEP – Piracicaba –SP, Brasil.

³ Universidade Federal de Viçosa, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Fitotecnia. Avenida P.H. Rolfs, 36571-000 - Vicosa, MG - Brasil

⁴ Universidade Católica de Brasília, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, Ciências Genômicas e Biotecnologia. SGAN 916, Modulo B, Av. W5 Norte Asa Norte 70790160 - Brasília, DF - Brasil

Três avaliações foram realizadas a 15, 31 e 49 dias após o plantio. Acessos foram classificados como enraizados, não enraizados e folhas mortas. O enraizamento de folhas em espécies silvestres de *Arachis* confirma a grande variabilidade genética presente no gênero, indicando também que o número de dias interfere na porcentagem de enraizamento. A secção *Arachis* apresentou maior precocidade, possuindo as maiores taxas de enraizamento de folhas entre as secções estudadas, concentrando as maiores freqüências entre 15 e 31 dias. As secções que apresentaram maiores taxas de enraizamento tardio ou de não enraizamento foram *Erectoides*, *Extranervosae*, *Rhizomatosae* e *Procumbentes*. A secção *Caulorrhizae*, *Heteranthae* e *Trirectoides* apresentaram taxas de enraizamento intermediários, concentrando seu enraizamento aos 31 dias. A quantidade e qualidade das raízes obtidas através desta técnica foram apropriadas para o uso na caracterização citológica.

Palavras-chave: *Arachis*, cromossomos, enraizamento, poliploidização

ABSTRACT

There are 80 described species of the genus *Arachis*, and most are Brazilian. Studies of the genus have been greatly advanced by defining chromosome number and carrying out morphological observations. Root tips from plantlets are normally used to obtain cells in division. A new and alternative method to produce roots in petioles has been developed, using leaves isolated from *Arachis* branches treated with colchicine. This was in order to develop a methodology that permits the chromosome counting to establish the ploidy level for the treated branch, and to evaluate the rooting capacity of various wild *Arachis* species using the detached leaf technique. We evaluated 130 accessions and 27 interspecific hybrids. To obtain preparations with a high metaphase frequency and chromosomes with clear morphology, the roots were treated with a combination of 8-hydroxyquinoline at 300ppm and cyclohexamide at 6.25ppm for two hours. The roots were colored using the Feulgen method to analyze the chromosomes. This is an alternative for the application of cytological techniques when seeds are unavailable or when taking cuttings does not work.

Three evaluations were carried out at 15, 31 and 49 days after planting. Accessions were classified as rooted, non-rooted and dead leaves. The rooting of leaves in wild *Arachis* species confirms the great genetic variability present in the genus, also indicating that the number of days interferes in the rooting rate. The *Arachis* section showed the greatest earliness, with the highest rooting rates among the sections studied, concentrating the greatest frequencies between 15 and 31 days. The sections that showed the highest rates of late rooting or non-rooting were *Erectoides*, *Extranervosae*, *Rhizomatosae* and *Procumbentes*. The *Caulorrhizae*, *Heteranthae* and *Trierectoides* Sections presented intermediate rooting rates, concentrating around 31 days. The quantity and quality of roots obtained through this technique were appropriate for use in cytological characterization.

INTRODUÇÃO

A importância dos recursos genéticos vegetais é incontestável, entretanto a baixa utilização dos acessos mantidos pelos bancos de germoplasma é uma realidade mundial. Recentemente, duas alternativas têm sido enfatizadas como promissoras para elevar o nível de utilização dos acessos disponíveis: programas de pré-melhoramento e coleções nucleares (NASS, 2001).

O gênero *Arachis* é composto por 80 espécies descritas, sendo que a maioria é brasileira (KRAPOVICKAS e GREGORY, 1994; VALLS e SIMPSON, 2005). Diversas espécies silvestres do gênero apresentam características interessantes para o melhoramento genético do amendoim (*Arachis hypogaea* L.) como níveis de resistência a pragas e doenças superiores aos encontrados em *A. hypogaea* (STALKER e MOSS, 1987; STALKER, 1989; STARR et al. 1990; SINGH et al., 1996; SIMPSON, 1997, SIMPSON e STARR, 2001), além da utilização das espécies no uso como forrageiras, ornamentais ou no controle de erosão também tem sido estudada.

A espécie cultivada *Arachis hypogaea* é considerada alotetraplóide (AABB) (SINGH et al., 1991 e KRAPOVICKAS e GREGORY, 1994), com $2n=40$. Já a maioria das espécies silvestres é diplóide com $2n=20$ (FERNÁNDES e KRAPOVICKAS, 1994). Dentro da seção *Arachis*, diversas espécies silvestres possuem o genoma "A", que pode ser caracterizado e diferenciado citologicamente das demais espécies não possuidoras do genoma A pela presença de um par de cromossomos bem menor que os demais, com coloração diferenciada e compartilhado com o amendoim, em seu genoma A (par "A") (HUSTED, 1933, 1936). Acreditou-se que existia um outro genoma no amendoim, que não apresentava o par A e que poderia ser observada uma constricção secundária e um satélite associado em um par de cromossomos. Esses cromossomos foram chamados de cromossomos "B" (HUSTED, 1936). Contudo, atualmente é sabido que todas as espécies analisadas citologicamente no gênero *Arachis* possuem um par ou eventualmente dois pares de cromossomos com satélites, chamados de cromossomos SAT (FERNÁNDEZ e KRAPOVICKAS, 1994). Logo, a presença do cromossomo SAT não é garantia da classificação exata de uma espécie como detentora do genoma "B" do amendoim. Conseqüentemente, o conceito geral de espécies com genoma "B" é mais restritivo, necessitando ser diplóide, da seção *Arachis*, possuir o mesmo genoma "B" de *A. hypogaea* e não possuir o par "A". Contudo, também não há garantia de que espécies da seção *Arachis* que não possuam o par "A", dividam o mesmo genoma "B" do amendoim.

Neste trabalho, essas espécies estão relatadas como detentoras de genoma “não-A”. Logo, são espécies que não possuem o par “A” e não necessariamente possuem o genoma “B” do amendoim cultivado.

A observação do número e morfologia de cromossomos tem sido de fundamental importância em diversos estudos de citologia baseados em mitose no gênero. Atualmente, os estudos baseados em caracterização mitótica de espécies de *Arachis* têm utilizado pontas de raiz de plântulas recém-germinadas para obtenção de células em divisão como observado em Lavia (1998) e Stalker (1991). A estaquia é um mecanismo empregado para obtenção de raízes, porém, além de ser uma técnica que, por muitas vezes, demanda um tempo relativamente grande para a obtenção de resultados e as raízes obtidas não têm a qualidade necessária para a caracterização citogenética. Muitos trabalhos têm conseguido o enraizamento de pecíolos e produção de calos via cultura *in vitro* (NAKANO et al., 1999; SHIBLI et al., 2001) ou para caracterização fitopatológica dos acessos (SUBRAHMANYAM et al., 1983) ou para estudos moleculares de desenvolvimento de raízes (BROWN e MANGAT, 1970), ambos via folhas destacadas.

O presente trabalho teve por objetivo adequar e testar um protocolo para enraizamento de pecíolos de folhas de diversas espécies de *Arachis*, com vistas a facilitar a verificação do número cromossômico em materiais poliploidizados artificialmente para programas de pré-melhoramento do amendoim.

Material e Métodos

Foram realizados dois experimentos quanto ao enraizamento: 1) Experimento para enraizamento de híbridos e análise citológica e 2. Experimento sobre a capacidade de enraizamento de diversas espécies do gênero *Arachis*.

1. Experimento para enraizamento de híbridos e análise citológica

Dez acessos de espécies silvestres de genoma “A” foram cruzados com cinco acessos de genoma “B” gerando indivíduos F₁'s estéreis, que foram tratados com colchicina para a duplicação dos cromossomos. Algumas técnicas foram levadas em consideração a fim de se obter uma avaliação preliminar do nível de ploidia das estacas de indivíduos F₁ tratadas com colchicina. Dados referentes à viabilidade de pólen e tamanho e número de estômatos por unidade de área podem ser parâmetros indicativos de níveis diferentes de ploidia entre genótipos (BARBOSA e VIEIRA, 1997; TALLURY e

COPELAND, 2002). No caso do presente trabalho, a grande maioria das estacas não possuía flores que possibilitassem uma análise de viabilidade de pólen, além do fato de que plantas tetraploidizadas tenderem a retardar o período de florescimento quando comparadas aos híbridos diplóides (SIMPSON, comunicação pessoal)⁵. A utilização da técnica de determinação de número e tamanho de estômatos não se mostrou conclusiva. Desta forma, foram realizadas análises citológicas para a contagem do número de cromossomos dos ramos tratados com colchicina, para a confirmação da poliploidização.

O experimento foi montado na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ/USP, São Paulo, Brazil, com as coordenadas latitude 22°42’33” e longitude 47°38’01”, no ano de 2001, em condições de telado, com temperatura ambiente em torno de 20 a 40°C. Folhas novas, porém totalmente expandidas, das estacas tratadas com colchicina tiveram seus pecíolos cortados e nas extremidades dos mesmos foi aplicado em pó, o hormônio enraizador ácido indol-butírico (IBA). Após a aplicação do hormônio, foram imediatamente colocadas em copos contendo substrato vegetal, identificados com o número do acesso. Os copos foram colocados em bandejas e cobertos com saco plástico transparente para a manutenção da umidade. As raízes foram coletadas entre 10 e 14 horas. Foram analisadas 17 combinações de híbridos interespecíficos, conforme apresentado na tabela 1.

Tabela 1. Tipos de cruzamentos efetuados, nomes das espécies e respectivos acessos utilizados como genitores femininos.

Genitores Femininos			Genitores Masculinos			
Espécie	Acesso	BRA	Acesso	BRA	Espécie	
<i>A. batizocoi</i>	K 9484	013315	X	GKP 10017	013404	<i>A. cardenasii</i>
			X	VNvEv 14167	036200	<i>A. duranensis</i>
			X	VSGr 6325	012505	<i>A. helodes</i>
			X	V 13250	030643	<i>A. kempff-mercadoi</i>
<i>A. magna</i>	VSPmSv 13751	033812	X	GKP 10017	013404	<i>A. cardenasii</i>
			X	Lm 3	036005	<i>A. stenosperma</i>
			X	VPoBi 9401	022608	<i>A. aff. diogoi</i>

⁵ Comunicação feita pelo pesquisador Dr. Charles E. Simpson, em 2001, diretamente a Pesquisadora Dr. Alessandra Pereira Fávero, quando ele veio ao Brasil.

Genitores Femininos			Genitores Masculinos			
Espécie	Acesso	BRA		Acesso	BRA	Espécie
<i>A. aff. magna</i>	VSGr 6389	012696	X	VNvEv 14167	036200	<i>A. duranensis</i>
			X	VGaRoSv 12488	030651	<i>A. stenosperma</i>
			X	VGoMrOv 12812	030813	<i>A. villosa</i>
			X	VSPmSv 13721	033723	<i>A. kuhlmannii</i>
			X	VpoBi 9401	022608	<i>A. aff. diogoi</i>
<i>A. hoehnei</i>	K 30006	036226	X	V SPmSv 13710	033685	<i>A. simpsonii</i>
			X	VSGr 6325	012505	<i>A. helodes</i>
			X	GKP 10017	013404	<i>A. cardenasii</i>
<i>A. ipäensis</i>	KGPScS 30076	036234	X	VNvEv 14167	036200	<i>A. duranensis</i>
			X	VGoMrOv 12812	030813	<i>A. villosa</i>

As metodologias de tratamento de raízes e confecção de preparações citológicas foram adaptadas a partir dos resultados relatados em Aguiar-Perecin e Vosa (1985) e Silvarolla e Aguiar-Perecin (1994). Para a otimização da obtenção de células metafásicas com cromossomos espalhados e apresentando morfologia nítida foram utilizadas 8-hidroxiquinolina a e cicloheximida, agentes inibidores do fuso mitótico e de síntese protéica, respectivamente. As raízes foram coletadas com 1cm aproximadamente, imediatamente tratadas com solução de 8-hidroxiquinolina a 300ppm e cicloheximida a 3,125 e 6,25ppm durante 1 hora e 30 minutos e 2 horas, respectivamente, e fixadas com 3:1 etanol/ácido acético. As raízes foram coradas pela metodologia de Feulgen, aplicando-se hidrólise em HCl 1 N por 9 minutos a 60°C e coloração com reagente de Schiff por 45 minutos, no escuro. Após a reação, procedeu-se a digestão enzimática com uma combinação de celulase a 2% e pectinase a 3%, por 10 minutos, a 37°C seguida de lavagem em tampão citrato (ácido cítrico 4mM + citrato trisódico 6mM). Para a confecção das lâminas, as regiões meristemáticas coradas foram esmagadas em uma gota de carmim acético a 1%, com leve aquecimento da lâmina para espalhamento dos cromossomos. Após seleção, as lâminas foram desmontadas em ácido acético 45% e montadas com bálsamo do Canadá. As fotomicrografias dos cromossomos foram obtidas em fotomicroscópio Zeiss, utilizando-se o filme Kodak Technical Pan (ISO 100).

2. Experimento sobre a capacidade de enraizamento de diversas espécies do gênero *Arachis*.

Para a avaliação de quais espécies e acessos tinham a capacidade de enraizar, em 2002, foram avaliados 130 acessos e 27 híbridos interespecíficos (Tabela 2) pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma de *Arachis*, BAG da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, utilizando o delineamento em blocos casualizados com quatro repetições.

Tabela 2. Nomes e número de acessos das espécies de *Arachis* e híbridos utilizados no experimento.

Espécies	Acessos
<i>A. aff. diogoi</i>	3
<i>A. aff. kretschmeri</i>	1
<i>A. aff. magna</i>	2
<i>A. aff. matiensis</i>	1
<i>A. aff. simpsonii</i>	3
<i>A. aff. stenophylla</i>	1
<i>A. appresipilla</i> Krapov. & W.C.Gregory	2
<i>A. archeri</i> Krapov. & W.C.Gregory	2
<i>A. batizocoi</i> Krapov. & W.C.Gregory	1
<i>A. brevipetiolata</i> Krapov. W.C.Gregory	1
<i>A. cardenasii</i> Krapov. & W.C. Gregory	1
<i>A. cruziana</i> Krapov., W.C.Gregory & C.E.Simpson	1
<i>A. dardani</i> Krapov. & W.C.Gregory	1
<i>A. decora</i> Krapov., W.C.Gregory & Valls	4
<i>A. diogoi</i> Hoehne	3
<i>A. duranensis</i> Krapov. & W.C.Gregory	1
<i>A. glabrata</i> Benth	1
<i>A. helodes</i> Martius ex Krapov. & Rigoni	5
<i>A. hermanii</i> Krapov. & W.C.Gregory	1
<i>A. hoehnei</i> Krapov. & W.C.Gregory	1
<i>A. hypogaea</i> L.	11
<i>A. ipaënsis</i> Krapov. & W.C.Gregory	1
<i>A. kempff-mercadoi</i> Krapov., W.C.Gregory & C.E.Simpson	1
<i>A. kretschmeri</i> Krapov. & W.C.Gregory	1

Espécies	Acessos
<i>A. kuhlmannii</i> Krapov. & W.C.Gregory	10
<i>A. lignosa</i> (Chodat & Hassl.) Krapov. & W.C.Gregory	1
<i>A. lutescens</i> Krapov. & Rigoni	1
<i>A. magna</i> Krapov., W.C.Gregory & C.E. Simpson	3
<i>A. major</i> Krapov. & W.C.Gregory	4
<i>A. microsperma</i> Krapov., W.C.Gregory & Valls	1
<i>A. monticola</i> Krapov. & Rigoni	1
<i>A. oteroi</i> Krapov. & W.C.Gregory	1
<i>A. palustris</i> Krapov., W.C.Gregory & Valls	1
<i>A. paraguariensis</i> Chodat & Hassl.	9
<i>A. pintoii</i> Krapov. & W. C. Gregory	16
<i>A. praecox</i> Krapov. & W. C. Gregory	1
<i>A. prostrata</i> Benth.	1
<i>A. pusilla</i> Benth.	2
<i>A. repens</i> Handro	5
<i>A. simpsonii</i> Krapov. & W. C. Gregory	1
<i>A. sp.</i>	11
<i>A. stenophylla</i> Krapov. & W. C. Gregory	2
<i>A. stenosperma</i> Krapov. & W. C. Gregory	3
<i>A. sylvestris</i> (A. Chev.) A. Chev.	1
<i>A. tuberosa</i> Bong. ex Benth.	3
<i>A. villosa</i> Benth.	1
<i>A. villosulicarpa</i> Hoehne	1
Subtotal	130
HÍBRIDOS	
<i>A. aff. appresipilla</i> x <i>A. sp.</i>	1
<i>A.aff. magna</i> x <i>A.aff. diogoi</i>	1
<i>A. aff. magna</i> x <i>A. duranensis</i>	1
<i>A. aff. magna</i> x <i>A. kuhlmannii</i>	1
<i>A. aff. magna</i> x <i>A. stenosperma</i>	1
<i>A.aff. magna</i> x <i>A.villosa</i>	1
<i>A. appressipila</i> x <i>A. sp.</i>	1
<i>A. batizocoi</i> x <i>A. cardenasii</i>	1
<i>A. batizocoi</i> x <i>A. duranensis</i>	1
<i>A. batizocoi</i> x <i>A. helodes</i>	1

HÍBRIDOS	
<i>A. batizocoi</i> x <i>A. kempff-mercadoi</i>	1
<i>A. decora</i> x <i>A. pinto</i>	1
<i>A. hoehnei</i> x <i>A. cardenasii</i>	1
<i>A. hoehnei</i> x <i>A. helodes</i>	1
<i>A. hoehnei</i> x <i>A. simpsonii</i>	1
<i>A. ipaënsis</i> x <i>A. duranensis</i>	1
<i>A. ipaënsis</i> x <i>A. villosa</i>	1
<i>A. lignosa</i> x <i>A.sp.</i>	1
<i>A. magna</i> x <i>A. aff. diogoi</i>	1
<i>A. magna</i> x <i>A. cardenasii</i>	1
<i>A. magna</i> x <i>A. stenosperma</i>	1
<i>A. paraguariensis</i> x <i>A. sp.</i>	1
<i>A. pinto</i> x <i>A. pinto</i>	3
<i>A. pinto</i> x <i>A. repens</i>	2
Subtotal	27
Total	157

Folhas novas, porém totalmente expandidas foram coletadas de cada tratamento, colocadas em sacos plásticos e armazenadas em geladeira. Após completa obtenção dos tratamentos, os pecíolos foram tratados com hormônio enraizador ácido naftaleno-acético (ANA) e imediatamente colocados em células de bandejas de isopor contendo substrato vegetal. As bandejas foram envoltas com sacos plásticos transparentes para a manutenção da umidade e acondicionadas em telado, em condições de sombreamento e temperatura média de 24°C. Foram realizadas três avaliações (15, 31 e 49 dias) para verificar o potencial de enraizamento. Em cada avaliação, os acessos foram classificados da seguinte forma: enraizados, não enraizados e mortos. A análise estatística foi feita utilizando-se o SAS, por análise de regressão logística.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Experimento para enraizamento de híbridos e análise citológica

A utilização de folhas destacadas mostrou-se altamente eficiente para a obtenção de raízes em pecíolos. O enraizamento para contagem de cromossomos se deu a partir

de uma semana e até 20 dias após o isolamento da folha. Acredita-se que a temperatura ambiente entre 20 e 40°C auxiliou na obtenção de raízes. Esta técnica de enraizamento pode ser considerada inédita no gênero, e possivelmente poderá ser utilizada em outras espécies de plantas, como em soja (*Glycine max*), em que também foi verificada a possibilidade de enraizamento de pecíolos. A técnica apresentada neste artigo também pode ser adaptada para casos de espécies com indisponibilidade de sementes e/ou inviabilidade do emprego de estaquia. A quantidade e qualidade de raízes produzidas mostraram-se compatíveis com a aplicação de técnicas citológicas, que requer grande número de raízes de alta qualidade. A Figura 1 mostra um pecíolo enraizado de uma folha de um híbrido entre *Arachis batizocoi* e *Arachis cardenasii*, após o tratamento mencionado.

A utilização da combinação de 8-hidroxiquinoleína a 300ppm e cicloheximida a 6,25ppm por duas horas foi o tratamento mais eficiente, quando comparado com o protocolo usado com uma hora e meia de tratamento, e permitiu a obtenção de preparações citológicas com alta taxa de metáfases e prometáfases com a condensação adequada dos cromossomos, o que possibilitou a contagem e identificação dos mesmos nas várias combinações híbridas analisadas. O tratamento de raízes com a combinação de hidroxiquinolina e cicloheximida tem sido empregado com sucesso para análises citológicas de várias espécies de plantas, como cana-de-açúcar (SILVAROLLA e AGUIAR-PERECIN, 1994), milho (BERTÃO, 1998), *Crotalaria* sp e *Passiflora* sp (CUCO et. al., 2003). Outras substâncias já foram utilizadas com sucesso na observação de cromossomos mitóticos em espécies de *Arachis*, como o paradiclorobenzeno (STALKER et. al., 1991 e STALKER e DALMACIO, 1981), bromonaftaleno (PEÑALOZA, 1995 e FÁVERO, 1999), 8-hidroxiquinolina (FERNÁNDES e KRAPOVICKAS, 1994). Foram avaliadas várias raízes de cada planta. Na Figura 2 podem ser visualizados os cromossomos somáticos do híbrido diplóide (não poliploidizado, $2n= 20$) K 9484 (*A. batizocoi*) X V 6325 (*A. helodes*) (Figura 2a) e de um híbrido cuja duplicação do número de cromossomos foi eficiente ($4n=40$), resultante do cruzamento V 6389 (*A. aff. magna*) X V 12812 (*A. villosa*) (Figura 2b). Vale ressaltar a presença de um par heteromórfico de cromossomos, indicados por setas na figura. Em indivíduos híbridos diplóides, foi possível observar apenas a presença de um cromossomo "A", uma vez que os cruzamentos envolveram sempre uma espécie de genoma "A" com uma "não-A". Já em indivíduos

tetraplóides, duplicados com colchicina, observa-se um par de cromossomos “A”, indicando a natureza alotetraplóide do indivíduo.

Na Tabela 3, pode-se observar os tipos de híbridos em que se obtiveram plantas totalmente diplóides ou plantas quiméricas, possuindo células com 20 e 40 cromossomos. Em alguns tipos de híbridos foram observadas raízes quiméricas, com células com 20 e 40 cromossomos no mesmo meristema. Isto pode ser explicado pelo tempo insuficiente de exposição à colchicina, não sendo possível a duplicação dos cromossomos em todas as células.

Tabela 3. Tipos de cruzamentos efetuados, e acessos utilizados como genitores femininos e masculinos e resultados obtidos com análise citológica (maior ploidia encontrada).

Femininos		Masculinos	Ploidia
Acesso		Acesso	(x=10)
K 9484	X	GKP 10017	4n
	X	V 14167	4n
	X	V 6325	2n
	X	V 13250	4n
V 13751	X	GKP 10017	4n
	X	Lm 3	4n
	X	V 9401	2n
V 6389	X	V 14167	2n
	X	V 12488	4n
	X	V 12812	4n
	X	V 13721	4n
	X	Vi 9401	4n
K 30006	X	V 13710	2n
	X	V 6325	2n
	X	GKP 10017	4n
K 30076	X	V 14167	2n
	X	V 12812	4n

O gênero *Arachis* possui diversas espécies silvestres com características de baixa prolificidade, e conseqüentemente, um baixo número de indivíduos nos bancos de germoplasma. A presente técnica de enraizamento de folhas e o novo protocolo de

tratamento de raízes para posterior análise citológica contribuirão nestes casos e também auxiliará em casos de análises citológicas de plantas pertencentes a diversos outros gêneros, desde que os pecíolos de suas folhas possuam a capacidade de enraizamento.

Rios et al. (1994) conseguiram enraizamento em folhas destacadas de 16 gêneros diferentes de leguminosas, girassol (*Helianthus annuus*), colza (*Brassica campestris*) e nabo forrageiro (*Brassica napus*), usando vermiculita como substrato. Folhas de feijão comum, fava (*Vicia faba*), caupi (*Vigna unguiculata*) apresentaram os melhores enraizamentos.

2. Experimento sobre a capacidade de enraizamento de diversas espécies do gênero *Arachis*

Quanto ao enraizamento dos pecíolos de folhas observado nas espécies silvestres de *Arachis* avaliadas e híbridos, pôde-se confirmar a grande variabilidade genética presente no gênero. Diferenças altamente significativas foram observadas entre os genótipos quanto ao enraizamento das folhas (Tabela 4). Foram perceptíveis as diferenças ($P < 0,01$) durante o período no qual a avaliação foi realizada, indicando que o número de dias interfere na porcentagem de enraizamento.

Tabela 4: Valores de Qui-Quadrado e P-valor dados pela análise de regressão logística.

FV	GL	Qui-Quadrado	P > Qui-Quadrado
Blocos	3	21,3420	< 0,0001
Genótipos	156	230,6462	< 0,0001
Dias	2	245,3772	< 0,0001

Na tabela 5, observa-se que foram formados 13 grupos significativamente diferentes quanto ao tempo e sucesso no enraizamento. Os acessos V 9923 (*A. (Sect. Arachis) sp.*) e Wi 1302-2 (*A. cruziana*) enraizaram no período de 15 dias em quatro e três repetições, respectivamente, sendo considerados os mais precoces dentre os materiais avaliados. Já o acesso V 13774 (*A. aff. diogo*) morreu em todas as repetições, indicando que essa metodologia pode não ser adequada para o enraizamento desse acesso nos períodos estudados.

Na primeira avaliação (15 dias), 26 acessos (16,25%) enraizaram em pelo menos uma repetição. Na segunda (31 dias) e terceira (49 dias) avaliações, 103 (64,40%) e 126 (78,75%) acessos apresentaram desenvolvimento de raiz, respectivamente.

Após a terceira avaliação, 34 acessos (21,25%) não desenvolveram raiz. Nesse grupo estão incluídos os que não enraizaram e os que morreram. Tais acessos serão oportunamente reavaliados utilizando-se metodologia alternativa.

Tabela 5. Número dos acessos, espécies, secção e folhas enraizadas (%) em 15, 31 e 49 dias após início do experimento, considerando 100% como quatro folhas enraizadas.

Acessos	Espécie	Secção	% folhas enraiz. (n= 4 rep)		
			15d	31d	49d
V 9923	<i>A. sp.</i>	<i>Arachis</i>	100	100	100
Wi 1302-2	<i>A. cruziana</i>	<i>Arachis</i>	75	100	100
K 9484 x GKP 10017	<i>A. batizocoi x A. cardenasii</i>	<i>Arachis</i>	50	100	100
KG 30006 X V 13710	<i>A. hoehnei x A. simpsonii</i>	<i>Arachis</i>	50	100	100
V 14682	<i>A. praecox</i>	<i>Arachis</i>	50	100	100
V 9955	<i>A. decora</i>	<i>Arachis</i>	50	100	100
K 9484 X V14167	<i>A. batizocoi x A. duranensis</i>	<i>Arachis</i>	50	75	100
V 13736	<i>A. sp.</i>	<i>Arachis</i>	25	100	100
V 14703	<i>A. kuhlmannii</i>	<i>Arachis</i>	25	100	100
W 648	<i>A. decora</i>	<i>Arachis</i>	25	100	100
V 13211-1	<i>A. pintoii</i>	<i>Caulorrhizae</i>	25	100	100
W 34	<i>A. pintoii</i>	<i>Caulorrhizae</i>	25	100	100
V 6330	<i>A. diogoi</i>	<i>Arachis</i>	0	100	100
K 9484 x V 13250	<i>A. batizocoi x A. kempff-mercadoi</i>	<i>Arachis</i>	0	100	100
KG 30006 x V 6325	<i>A. hoehnei x A. helodes</i>	<i>Arachis</i>	0	100	100
KG 30076 x V 12812	<i>A. ipaënsis x A. villosa</i>	<i>Arachis</i>	0	100	100
Mdi 1538	<i>A. hypogaea</i>	<i>Arachis</i>	0	100	100
V 12549	<i>A. hypogaea</i>	<i>Arachis</i>	0	100	100
V 13250	<i>A. kempff-mercadoi</i>	<i>Arachis</i>	0	100	100
Of 121	<i>A. hypogaea</i>	<i>Arachis</i>	0	100	100
V 6389 x V 12488	<i>A. aff. magna x A. stenosperma</i>	<i>Arachis</i>	0	100	100
Sv 3809	<i>A. paraguariensis</i>	<i>Erectoides</i>	0	100	100
V 14636	<i>A. tuberosa</i>	<i>Triectoides</i>	0	100	100
V 14724	<i>A. magna</i>	<i>Arachis</i>	25	75	100
V 13023	<i>A. palustris</i>	<i>Arachis</i>	25	75	75
V 14715	<i>A. kuhlmannii</i>	<i>Arachis</i>	25	75	75
V 13330	<i>A. pintoii</i>	<i>Caulorrhizae</i>	25	75	75
V 13751 x GKP 10017	<i>A. magna x A. cardenasii</i>	<i>Arachis</i>	25	50	100

Acessos	Espécie	Secção	% folhas enraiz. (n= 4 rep)		
			15d	31d	49d
VM 13414	<i>A. pintoi</i>	<i>Caulorrhizae</i>	0	75	100
V 6389 x V14167	<i>A. aff. magna x A. duranensis</i>	<i>Arachis</i>	25	50	75
V 13383	<i>A. dardani</i>	<i>Heteranthae</i>	25	50	75
GKP 10017	<i>A. cardenasii</i>	<i>Arachis</i>	0	75	75
KG 30006 x GKP 10017	<i>A. hoehnei x A. cardenasii</i>	<i>Arachis</i>	0	75	75
Pa s/no	<i>A. helodes</i>	<i>Arachis</i>	0	75	75
V 14691	<i>A. kuhlmannii</i>	<i>Arachis</i>	0	75	75
V 14714	<i>A. kuhlmannii</i>	<i>Arachis</i>	0	75	75
Vp 5000	<i>A. diogoi</i>	<i>Arachis</i>	0	75	75
QE 24	<i>A. pintoi</i>	<i>Caulorrhizae</i>	0	75	75
V 13643	<i>A. pintoi</i>	<i>Caulorrhizae</i>	0	75	75
V 6389 x V 12812	<i>A.aff. magna x A.villosa</i>	<i>Arachis</i>	0	50	100
V 12548	<i>A. hypogaea</i>	<i>Arachis</i>	0	50	100
V 13751 x Lm 3	<i>A magna x A. stenosperma</i>	<i>Arachis</i>	0	50	100
V 13779	<i>A. kuhlmannii</i>	<i>Arachis</i>	0	50	100
V 13570 x V 13589	<i>A. lignosa x A.sp.</i>	<i>Procumbentes</i>	0	50	100
Of 99	<i>A. villosulicarpa</i>	<i>Arachis</i>	0	25	100
V 7677 x V 13589	<i>A. paraguariensis x A. sp.</i>	<i>Erectoides</i>	0	25	100
VSW 9917	<i>A. kretschmeri</i>	<i>Procumbentes</i>	0	25	100
Of 109	<i>A. hypogaea</i>	<i>Arachis</i>	0	50	75
V 13710	<i>A. aff. simpsonii</i>	<i>Arachis</i>	0	50	75
V 6389 x V 9401	<i>A.aff. magna x A.aff. diogoi</i>	<i>Arachis</i>	0	50	75
V 6389 x V13721	<i>A. aff. magna x A. kuhlmannii</i>	<i>Arachis</i>	0	50	75
V 6404	<i>A. kuhlmannii</i>	<i>Arachis</i>	0	50	75
V 14692	<i>A. kuhlmannii</i>	<i>Arachis</i>	0	50	75
V 12767x 1579	<i>A. pintoi x A. repens</i>	<i>Caulorrhizae</i>	0	50	75
V 6731-wf	<i>A. pintoi</i>	<i>Caulorrhizae</i>	0	50	75
W 215	<i>A. repens</i>	<i>Caulorrhizae</i>	0	50	75
K 9484	<i>A. batizocoi</i>	<i>Arachis</i>	25	50	50
Mdi 1560	<i>A. hypogaea</i>	<i>Arachis</i>	25	50	50
Cv. TATU	<i>A. hypogaea</i>	<i>Arachis</i>	25	25	75
V 10229	<i>A. stenosperma</i>	<i>Arachis</i>	0	0	100
V 10470	<i>A. helodes</i>	<i>Arachis</i>	0	50	50
V 14710	<i>A. aff. simpsonii</i>	<i>Arachis</i>	0	50	50
V 13745	<i>A. aff. simpsonii</i>	<i>Arachis</i>	0	50	50
V 14042	<i>A. microsperma</i>	<i>Arachis</i>	0	50	50
V 14167	<i>A. duranensis</i>	<i>Arachis</i>	0	50	50

Acessos	Espécie	Secção	% folhas enraiz. (n= 4 rep)		
			15d	31d	49d
V 13167x 1578	<i>A. pintoi</i> x <i>A. repens</i>	<i>Caulorrhizae</i>	0	50	50
V 13338 x V 12787	<i>A. pintoi</i> x <i>A. pintoi</i>	<i>Caulorrhizae</i>	0	50	50
V 5786	<i>A. repens</i>	<i>Caulorrhizae</i>	0	50	50
V 7632	<i>A. major</i>	<i>Erectoides</i>	0	50	50
V 7614	<i>A. archeri</i>	<i>Erectoides</i>	0	50	50
V 6001	<i>A. sylvestris</i>	<i>Heteranthae</i>	0	50	50
GK 10002 x V 13589	<i>A. appressipila</i> x <i>A. sp.</i>	<i>Procumbentes</i>	0	50	50
KG 30097	<i>A. magna</i>	<i>Arachis</i>	0	25	75
Of 116	<i>A. hypogaea</i>	<i>Arachis</i>	0	25	75
SV 4533	<i>A. decora</i>	<i>Arachis</i>	0	25	75
KG 30076 x V14167	<i>A. ipaënsis</i> x <i>A. duranensis</i>	<i>Arachis</i>	0	25	50
V 13775	<i>A. aff. diogoi</i>	<i>Arachis</i>	0	25	50
V 13728	<i>A. simpsonii</i>	<i>Arachis</i>	0	25	50
		<i>Arachis x</i>			
V 13460 x V13167	<i>A. decora</i> x <i>A. pintoi</i>	<i>Caulorrhizae</i>	0	25	50
GK 12787	<i>A. pintoi</i>	<i>Caulorrhizae</i>	0	25	50
Np	<i>A. pintoi</i>	<i>Caulorrhizae</i>	0	25	50
V 13888	<i>A. pintoi</i>	<i>Caulorrhizae</i>	0	25	50
W 902	<i>A. pintoi</i>	<i>Caulorrhizae</i>	0	25	50
Sv 3781	<i>A. aff. stenophylla</i>	<i>Erectoides</i>	0	25	50
V 14025	<i>A. paraguariensis</i>	<i>Erectoides</i>	0	25	50
V 8910	<i>A. aff. matiensis</i>	<i>Procumbentes</i>	0	25	50
V 9077 x V 13589	<i>A. aff. appresipilla</i> x <i>A. sp.</i>	<i>Procumbentes</i>	0	25	50
Ni1291	<i>A. sp.</i>	<i>Arachis</i>	25	25	25
V 13985	<i>A. hoehnei</i>	<i>Arachis</i>	25	25	25
V 10833	<i>A. pusilla</i>	<i>Heteranthae</i>	25	25	25
K 9484 x V 6325	<i>A. batizocoi</i> x <i>A. helodes</i>	<i>Arachis</i>	0	0	75
Of 106	<i>A. hypogaea</i>	<i>Arachis</i>	0	0	75
Of 126	<i>A. hypogaea</i>	<i>Arachis</i>	0	0	75
V 5868	<i>A. repens</i>	<i>Caulorrhizae</i>	0	0	75
V 10390	<i>A. stenosperma</i>	<i>Arachis</i>	0	25	25
KG 10602	<i>A. diogoi</i>	<i>Arachis</i>	0	25	25
KG 30076	<i>A. ipaënsis</i>	<i>Arachis</i>	0	25	25
V 13751	<i>A. magna</i>	<i>Arachis</i>	0	25	25
V 13751 x V 9401	<i>A. magna</i> x <i>A.aff. diogoi</i>	<i>Arachis</i>	0	25	25
V 14705	<i>A. kuhlmannii</i>	<i>Arachis</i>	0	25	25
NC 1577	<i>A. repens</i>	<i>Caulorrhizae</i>	0	25	25

Acessos	Espécie	Secção	% folhas enraiz. (n= 4 rep)		
			15d	31d	49d
W 47 x W 34	<i>A. pintoi</i> x <i>A. pintoi</i>	<i>Caulorrhizae</i>	0	25	25
V 7677	<i>A. paraguariensis</i>	<i>Erectoides</i>	0	25	25
V 10969	<i>A. sp</i>	<i>Heteranthae</i>	0	25	25
V 13570	<i>A. lignosa</i>	<i>Procumbentes</i>	0	25	25
V 13589	<i>A. sp.</i>	<i>Procumbentes</i>	0	25	25
V 14765	<i>A. aff.magna</i>	<i>Arachis</i>	0	0	50
W 346	<i>A. pintoi</i>	<i>Caulorrhizae</i>	0	0	50
V 14024	<i>A. paraguariensis</i>	<i>Erectoides</i>	0	0	50
V 14026	<i>A. stenophylla</i>	<i>Erectoides</i>	0	0	50
Sv. 3775	<i>A. sp.</i>	<i>Procumbentes</i>	0	0	50
Cv TATUÍ	<i>A. hypogaea</i>	<i>Arachis</i>	0	0	25
V 14773	<i>A. stenosperma</i>	<i>Arachis</i>	0	0	25
V 6325	<i>A. helodes</i>	<i>Arachis</i>	0	0	25
V 13167 x V 6791-wf	<i>A. pintoi</i> x <i>A. pintoi</i>	<i>Caulorrhizae</i>	0	0	25
W 217	<i>A. repens</i>	<i>Caulorrhizae</i>	0	0	25
V 14045	<i>A. paraguariensis</i>	<i>Erectoides</i>	0	0	25
V 14625	<i>A. paraguariensis</i>	<i>Erectoides</i>	0	0	25
V 7303	<i>A. sp</i>	<i>Erectoides</i>	0	0	25
V 7560	<i>A. hermanii</i>	<i>Erectoides</i>	0	0	25
Bw 4167	<i>A. prostrata</i>	<i>Extranervosae</i>	0	0	25
GK10002	<i>A. appressipila</i>	<i>Procumbentes</i>	0	0	25
V 13605	<i>A. glabrata</i>	<i>Rhizomatosae</i>	0	0	25
V 13774	<i>A. aff. diogoi</i>	<i>Arachis</i>	0	0	0
KG 30034	<i>A. kuhlmannii</i>	<i>Arachis</i>	0	0	0
EKZb 1	<i>A. kuhlmannii</i>	<i>Arachis</i>	0	0	0
V 13477	<i>A. decora</i>	<i>Arachis</i>	0	0	0
V 14165	<i>A. monticola</i>	<i>Arachis</i>	0	0	0
V 14316	<i>A. villosa</i>	<i>Arachis</i>	0	0	0
V 14673	<i>A. helodes</i>	<i>Arachis</i>	0	0	0
V 14743	<i>A. aff. magna</i>	<i>Arachis</i>	0	0	0
V 9401	<i>A. aff. diogoi</i>	<i>Arachis</i>	0	0	0
V 12083	<i>A. helodes</i>	<i>Arachis</i>	0	0	0
V 6740	<i>A. pintoi</i>	<i>Caulorrhizae</i>	0	0	0
W 153	<i>A. pintoi</i>	<i>Caulorrhizae</i>	0	0	0
W 220	<i>A. pintoi</i>	<i>Caulorrhizae</i>	0	0	0
Sv 3807	<i>A. paraguariensis</i>	<i>Erectoides</i>	0	0	0
V 8530	<i>A. major</i>	<i>Erectoides</i>	0	0	0

Acessos	Espécie	Secção	% folhas enraiz. (n= 4 rep)		
			15d	31d	49d
V 13494	<i>A. archeri</i>	<i>Erectoides</i>	0	0	0
V 13556	<i>A. paraguariensis</i>	<i>Erectoides</i>	0	0	0
V 13997	<i>A. major</i>	<i>Erectoides</i>	0	0	0
V 14016	<i>A. paraguariensis</i>	<i>Erectoides</i>	0	0	0
V 14021	<i>A. stenophylla</i>	<i>Erectoides</i>	0	0	0
V 14518	<i>A. oteroi</i>	<i>Erectoides</i>	0	0	0
V 14538	<i>A. major</i>	<i>Erectoides</i>	0	0	0
V 14664	<i>A. brevipetiolata</i>	<i>Erectoides</i>	0	0	0
V 14683	<i>A. lutescens</i>	<i>Extranervosae</i>	0	0	0
V 6676	<i>A. pusilla</i>	<i>Heteranthae</i>	0	0	0
Sv 3818	<i>A. sp</i>	<i>Procumbentes</i>	0	0	0
V 14555	<i>A. aff. kretschmeri</i>	<i>Procumbentes</i>	0	0	0
V 9060	<i>A. appresipilla</i>	<i>Procumbentes</i>	0	0	0
Sv 3782	<i>A. sp</i>	<i>Rhizomatosae</i>	0	0	0
V 13940	<i>A. tuberosa</i>	<i>Triectoides</i>	0	0	0
V 14632	<i>A. tuberosa</i>	<i>Triectoides</i>	0	0	0
Ag	<i>A. pintoii</i>	<i>Caulorrhizae</i>	0	0	0
V 14044	<i>A. sp.</i>	<i>Procumbentes</i>	0	0	0
V 14050	<i>A. sp.</i>	<i>Procumbentes</i>	0	0	0

Foram avaliadas espécies de todas as secções do gênero, exceto uma, Secção *Trisseminatae*. Na Tabela 6, é possível observar o número de acessos por secção utilizado no experimento e a porcentagem total de folhas enraizadas por acesso e por secção. A secção *Arachis* mostrou-se com a maior porcentagem de acessos com todas as folhas enraizadas (100%).

Na desta tabela, são apresentadas também as secções e seus respectivos dados em porcentagem do número de acessos que iniciou o enraizamento de folhas aos 15, 31, 49 dias ou que não enraizou (incluindo indivíduos mortos). Foi possível observar comportamento diferencial entre as secções quanto ao enraizamento das folhas. A secção *Arachis* apresentou maior precocidade, possuindo as maiores taxas de enraizamento de folhas entre as secções estudadas, concentrando as maiores freqüências entre 15 e 31 dias. As secções que apresentaram maiores taxas de enraizamento tardio ou de não enraizamento foram *Erectoides*, *Extranervosae*, *Rhizomatosae* e *Procumbentes*. A secção *Caulorrhizae*, *Heteranthae* e *Triectoides*

apresentaram taxas de enraizamento intermediários, concentrando seu enraizamento aos 31 dias. Em média, o início do enraizamento dos pecíolos para a maioria das secções foi de 31 dias. Pode-se observar que a maioria das folhas não enraizou ou morreu, porém, em média, 35,7% das folhas enraizaram, indicando que a técnica é muito eficiente em algumas secções, como nas secções *Arachis*, *Caulorrhizae* e *Extranervosae*.

Tabela 6. Número de acessos por secção utilizado no experimento, porcentagem total de folhas enraizadas por acesso e porcentagens parciais de folhas enraizadas aos 15, 31 e 49 dias para as diferentes secções do gênero *Arachis*.

Section	No.	Rooted leaves (%)								
		0%	25%	50%	75%	100%	15d	31d	49d	
<i>Arachis</i>	79	10	10	11	22	26	9.3	47.8	63.9	
<i>Caulorrhizae</i>	27	4	4	9	7	3	3.7	33.3	50.9	
<i>Erectoides</i>	24	10	6	6	0	2	0.0	13.5	27.1	
<i>Extranervosae</i>	3	1	1	0	0	1	0.0	8.3	41.7	
<i>Heteranthae</i>	5	1	2	1	1	0	10.0	30.0	35.0	
<i>Procumbentes</i>	14	5	3	4	0	2	0.0	16.7	33.9	
<i>Rhizomatosae</i>	2	1	1	0	0	0	0.0	0.0	12.5	
<i>Trierectoides</i>	3	2	0	0	0	1	0.0	33.3	33.3	
Means							2.9	21.8	37.3	

Esta técnica de enraizamento poderá ser utilizada em outras espécies de plantas em que for detectado o enraizamento de pecíolos, como foi observado em feijão (*Phaseolus vulgaris*) (BROWN e MANGAT, 1970) ou soja (BLOMGREN et al., 1988), em que observou-se também cromossomos em mitose a partir de pontas de raiz desenvolvidas em pecíolos de folhas destacadas. Esta técnica também pode ser utilizada em casos de indisponibilidade de sementes e/ou inviabilidade do emprego de estaquia.

A quantidade e qualidade de raízes produzidas mostraram-se compatíveis com a aplicação de técnicas citológicas, que requerem grande número de raízes de alta qualidade. Outros aspectos que merecem destaque são o tempo necessário para a obtenção de raízes e a facilidade de manuseio destas.

CONCLUSÕES

Como se pôde observar, a metodologia utilizada permitiu o reconhecimento inequívoco dos híbridos poliploidizados ou não, bem como a contagem e clara

visualização da morfologia dos cromossomos. A utilização de folhas destacadas mostrou-se altamente eficiente para a obtenção de raízes em diversas espécies do gênero, com taxa de enraizamento de 78,75% ao final de 49 dias. O período de enraizamento variou principalmente em função da espécie, demonstrando um fator genético preponderante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR-PERECIN, M. L. R. de; VOSA, C. C-banding in maize. II. Identification of somatic chromosomes. **Heredity**, London, v. 54, n. 1, p. 37-42, 1985.

BARBOSA, L. V.; VIEIRA, M. L. C. Meiotic behavior of passion fruit somatic hybrids, *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener plus *P. amethystina* Mikan. **Euphytica**, Dordrecht, Netherlands, v. 98, n. 1-2, p. 121-127, 1997.

BERTÃO, M. R. **Caracterização Citogenética de Linhagens de Milho (*Zea mays* L.) através de bandamento cromossômico e hibridação molecular *in situ***. 1998. Tese (Doutorado) - Escola Superior Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP.

BLOMGREN, S. M.; AMBERGER, L. A.; HEER, H. E.; PALMER, R. C. A petiole-rooting technique for soybean chromosome observation. **Soybean Genetics Newsletter**, n. 15, p. 153-154, 1988.

BROWN, E. G.; MANGAT, B. S. Studies on free nucleotide pool and RNA components of detached leaves of *Phaseolus vulgaris* during root development. **Phytochemistry**, New York, v. 9, p.1859-1868, 1970.

CUCO, S. M.; MONDIN, M.; VIEIRA, M. L. C.; AGUIARPERECIN, M. L. R. Técnicas para a obtenção de preparações citológicas com alta frequência de metáfases mitóticas em plantas: *Passiflora* (Passifloraceae) e *Crotalaria* (Leguminosae). **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 17, n. 3, p. 363-370, 2003.

FÁVERO, A. F. **Caracterização morfológica, citogenética e molecular de acessos de germoplasma da espécie *Arachis kuhlmannii* Krapov. & W. C. Gregory (Secção *Arachis*)**. 1999. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", UNESP/Botucatu.

FERNÁNDES, A.; KRAPOVICKAS, A. Cromosomas y evolución en *Arachis* (Leguminosae). **Bonplandia**, v. 8, n. 1-4, p. 187-220, 1994.

HUSTED, L. Cytological studies of the peanut *Arachis*. 1 Chromosome number and morphology. **Cytologia**, n. 5, p. 109-117, 1933.

HUSTED, L. Cytological studies of the peanut *Arachis*. 2. Chromosome number, morphology and behavior, and their application to the problem of the origin of the cultivated forms. **Cytologia**, n. 7, p. 396-423, 1936.

- KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, W. C. Taxonomia del género *Arachis* (Leguminosae). **Bonplandia** v. 8, n. 1-4, p. 1-186, 1994.
- 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.
- NAKANO, M.; NIIMI, Y.; KOBAYASHI, D.; WATANABE, A. Adventitious shoot regeneration and micropropagation of hybrid tuberous begonia (*Begonia x tuberhybrida* Voss). **Scientia Horticulturae**, v. 79, p. 245-251, 1999.
- NASS, L. L. Utilização de recursos genéticos vegetais no melhoramento. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento** – plantas. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p.29-55.
- PEÑALOZA, A. P. S. **Caracterização dos componentes biológicos da produção de sementes de *Arachis pintoi* (Leguminosae)**. 1995. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de Brasília.
- RIOS, G. P.; ANTONIO, F. G.; RODRIGUES, F. A. Enraizamento de folhas em vermiculita para estudos de doenças foliares. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 19, p. 268, 1994.
- SHIBLI, R. A.; SHATNAWI, M.; ABU-EIN; AL-JUBOORY, K. H. Somatic embryogenesis and plant recovery from callus of 'Nabali' Olive (*Olea europea* L.) **Scientia Horticulturae**, v. 88, p. 243-256, 2001.
- SILVAROLLA, M. B.; AGUIAR-PERECIN, M. L. R. de. Evaluation of chromosome number stability in two sugarcane varieties. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 17, n. 2, p. 237-242, 1994.
- SIMPSON, C. E. Introgression of Root-nematode resistance into *Arachis*. In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS, 1., 1997, Campinas. **Programas e Resumos...** Campinas: IAC/Embrapa-Cenargen, 1997.
- SIMPSON, C. E.; STARR, J. L. Registration of 'Coan' peanut. **Crop Science**, n. 41, p. 918, 2001.
- SINGH, A. K.; STALKER, H. T.; MOSS, J. P. Cytogenetics and Use of Alien Genetic Variation in Groundnut Improvement. **Chromosome Engineering in Plants: Genetics, Breeding, Evolution, Part B**, p. 65-77, 1991.
- SINGH, A. K.; SUBRAHMANYAM, P.; GURTU, S. Variation in a wild groundnut species, *Arachis duranensis* Krapov. & W. C. Gregory. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 43, p. 135-142, 1996.
- STALKER, H. T.; DALMACIO, R. D. Chromosome of *Arachis* species, section *Arachis*. **The Journal of Heredity**, v. 72, p. 403-408, 1981.
- STALKER, H. T.; MOSS, J. P. Speciation, cytogenetics and utilization of *Arachis* species. **Advances in agronomy**, San Diego, v. 41, p. 1-40, 1987.
- STALKER, H. T. Utilizing Wild Species for Crop Improvement. In: STALKER, H. T.; CHAPMAN, C. (Eds.). **Scientific Management of Germplasm: Characterization, Evaluation and Enhancement**. International Board for Plant Genetic Resources, Rome. 190p. 1989. (IBPGR Training Courses: Lecture Series, 2).

- STALKER, H. T.; DHESI, J. S.; PARRY, D. C. An analysis of the B genome species *Arachis batizocoi* (Fabaceae). **Plant Systematics Evolution**, v. 174, p. 159-169, 1991.
- STALKER, H. T. A new species in section *Arachis* of peanuts with a D genome. **American Journal of Botany**, v. 78, p. 630-637, 1991.
- STARR, J. L.; SCHUSTER, G. L.; SIMPSON, C. E. Characterization of the Resistance to *Meloidogyne arenaria* in an Interspecific *Arachis* spp. Hybrid. **Peanut Science**, v. 17, p. 106-108, 1990.
- SUBRAHMANYAM, P.; MOSS, J. P. Resistance to peanut rust in wild *Arachis* species. **Plant Disease**, v. 67, p. 209-212, 1983.
- TALLURY, S. P.; COPELAND, S. C. Nondestructive determination of ploidy levels in peanut interspecific hybrids. **Proceedings of the American Peanut Research and Education Society**, v. 34, p. 117, 2002.
- VALLS, J. F.M.; SIMPSON, C. E. New species of *Arachis* (Leguminosae) from Brasil, Paraguay and Bolivia. **Bonplandia**, v. 14, n. 1-2, p. 35-63, 2005.



a) Folha enraizada do híbrido originado do cruzamento entre *Arachis batizocoi* (K 9484) e *Arachis cardenasii* (GKP 10017).



Figura 2. a) Cromossomos somáticos do híbrido diplóide (não poliploidizado, $2n=20$) K9484 (*A. batizoco*) X V6325 (*A. helodes*), b) Híbrido cuja duplicação do número de cromossomos foi eficiente ($4n=40$), resultante do cruzamento V6389 (*A. aff. magna*) X V12812 (*A. villosa*).