



**Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Botânica
Programa de Pós-Graduação em Botânica**

**CONTRIBUIÇÃO À TAXONOMIA DO
GÊNERO *ARACHIS* - SECÇÃO *ARACHIS* À LUZ
DO ESTUDO DE ESPÉCIES E HÍBRIDOS
INTERESPECÍFICOS**

Gabriela Santos Silva

**Brasília – DF
Julho de 2008**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA

**CONTRIBUIÇÃO À TAXONOMIA DO GÊNERO *ARACHIS* - SECÇÃO
ARACHIS À LUZ DO ESTUDO DE ESPÉCIES E HÍBRIDOS
INTERESPECÍFICOS**

GABRIELA SANTOS SILVA

ORIENTADOR: Dr. JOSÉ FRANCISCO MONTENEGRO VALLS

COORIENTADORA: Dr^a. ANDRÉA DEL PILAR DE SOUZA PEÑALOZA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BOTÂNICA

BRASÍLIA/ DF
JULHO/ 2008

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA

**CONTRIBUIÇÃO À TAXONOMIA DO GÊNERO *ARACHIS* - SECÇÃO
ARACHIS À LUZ DO ESTUDO DE ESPÉCIES E HÍBRIDOS
INTERESPECÍFICOS**

GABRIELA SANTOS SILVA

**Dissertação de mestrado apresentada à
Coordenação do Programa de Pós-
graduação em Botânica, como requisito
parcial para a obtenção do título de mestre
em Botânica.**

**BRASÍLIA/ DF
JULHO/ 2008**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA**

**CONTRIBUIÇÃO À TAXONOMIA DO GÊNERO *ARACHIS* – SECÇÃO
ARACHIS À LUZ DO ESTUDO DE ESPÉCIES E HÍBRIDOS
INTERESPECÍFICOS**

GABRIELA SANTOS SILVA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA (INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS) DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM BOTÂNICA.

APROVADA POR:

**José Francisco Montenegro Valls, Dr., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
(Orientador)**

**Dalva Graciano Ribeiro, Dr^a., Universidade de Brasília- UnB
(Examinador interno)**

**Renato Ferraz de Arruda Veiga, Dr., Instituto Agrônomo de Campinas – IAC
(Examinador externo)**

BRASÍLIA – DF, 18 de JULHO de 2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Gabriela Santos

Contribuição à Taxonomia do Gênero *Arachis* - Secção *Arachis* à Luz do Estudo de Espécies e Híbridos Interespecíficos. / Gabriela Santos Silva; orientação de José Francisco Montenegro Valls – Brasília, 2008.

98 p.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/ Instituto de Ciências Biológicas, 2008.

1. *Arachis*. 2. Anatomia foliar. 3. Estudo taxonômico I. Valls, J. F. M. II. Dr.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

SILVA, G. S. **Contribuição à Taxonomia do Gênero *Arachis* – Secção *Arachis* à Luz do Estudo de Espécies e Híbridos Interespecíficos**. Brasília: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 2008, 98 p. Dissertação de Mestrado.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Gabriela Santos Silva

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO: Contribuição à Taxonomia do Gênero *Arachis* – Secção *Arachis* à Luz do Estudo de Espécies e Híbridos Interespecíficos.

GRAU: Mestre ANO: 2008

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

Gabriela Santos Silva

E-mail: gabriela.ssilva@gmail.com

Aos meus amados pais e irmã

Ao meu querido marido

Pela imensa compreensão

e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que nunca deixou de me guiar iluminando meu caminho.

À minha família pela constante companhia e dedicação. À Mamãe, Papai e Nanda, pelo eterno amor e apoio.

Ao Rafael, por ser meu melhor amigo e meu companheiro. Pela eterna credibilidade e amor.

Ao Prof. Dr. José Francisco Montenegro Valls, pelos ensinamentos que me transmitiu ao longo desta jornada.

À equipe do Laboratório de Citogenética Vegetal da Embrapa / Cenargen, pelo suporte prestado e à Dr^a. Andréa del Pilar de Souza Peñaloza, pela presteza.

A Dr^a. Dalva Graciano Ribeiro, pelos ensinamentos e pela credibilidade em mim depositada.

À equipe do Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade de Brasília, pelo suporte.

À Sileuza, pela colaboração no laboratório e pelo companheirismo.

À Alice e Giselle, pelos ótimos momentos e pela amizade.

À Vivi, pela amizade, carinho e por ser minha melhor amiga.

A todos da Embrapa / Cenargen e Universidade de Brasília, que de contribuíram para a conquista deste trabalho.

A todos meus amigos, que durante este período fizeram parte da minha vida e me ajudaram a crescer.

A Universidade de Brasília, pelo apoio institucional e pela prestesa da equipe de professores que compõem o Departamento de Botânica.

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pelo apoio institucional e pela disponibilidade dos recursos genéticos de grande importância para a realização dessa pesquisa.

A Capes, pelo apoio financeiro fundamental para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Gênero <i>Arachis</i>	3
2.1.1 Aspectos gerais	3
2.1.2 Estudos taxonômicos	5
2.2 Secção <i>Arachis</i>	6
2.2.1 Aspectos gerais	6
2.2.2 Estudos taxonômicos	7
2.3 Espécies estudadas	13
2.3.1 <i>Arachis hypogaea</i>	14
2.3.2 <i>Arachis ipaënsis</i>	15
2.3.3 <i>Arachis duranensis</i>	15
2.3.4 <i>Arachis gregoryi</i>	15
2.3.5 <i>Arachis magna</i>	16
2.3.6 <i>Arachis vallsii</i>	16
2.3.7 <i>Arachis williamsii</i>	16
	vii

2.3.8 <i>Arachis valida</i>	17
2.3.9 <i>Arachis hoehnei</i>	17
2.4 Híbridos interespecíficos	17
2.5 Anatomia	19
2.6 Estudo meiótico	21
3. OBJETIVOS	23
3.1 Objetivos específicos	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1 Espécies e híbridos analisados	24
4.2 Germinação de sementes	25
4.3 Viabilidade de grão de pólen por coloração	27
4.4 Análise molecular de prováveis híbridos entre <i>Arachis ipaënsis</i> x <i>A. magna</i>	28
4.5 Descritores organográficos	31
4.6 Anatomia	32
4.7 Histoquímica	35
4.8 Análise meiótica	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1 Germinação de sementes	39
5.2 Viabilidade de grão de pólen por coloração	40
5.3 Análise molecular de prováveis híbridos entre <i>Arachis ipaënsis</i> x <i>A. magna</i>	43
5.4 Descritores organográficos	44
5.5 Anatomia	46
5.5.1 Descrição da lâmina foliolar	47
5.5.2 Estudo comparativo	60

5.6 Histoquímica	65
5.7 Comparação anatômica entre espécies	67
5.8 Comparação anatômica entre os genitores e seus híbridos	69
5.9 Estudo meiótico	72
6. CONCLUSÕES	75
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
APÊNDICE	86
ANEXO 1	96
ANEXO 2	98

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Grupo de espécies de <i>Arachis</i> secção <i>Arachis</i> sem estruturação sistemática formal.	10
Tabela 2. Espécies envolvidas na pesquisa.	14
Tabela 3. Híbridos interespecíficos envolvidos na pesquisa.	18
Tabela 4. Identificação dos materiais utilizados no estudo anatômico foliar.	33
Tabela 5. Indivíduos analisados quanto à meiose.	37
Tabela 6. Valores médios da viabilidade dos grãos de pólen por coloração.	41
Tabela 7. Estatística descritiva de caracteres organográficos das folhas de espécies e híbridos interespecíficos de <i>Arachis</i> .	45
Tabela 8. Análise anatômica comparativa de alguns dos materiais estudados.	61
Tabela 9. Análise comparativa do estudo anatômico.	64
Tabela 10. Análise histoquímica foliar utilizada para evidenciar corpos cerosos e mucilaginosos.	66
Tabela 11. Meiose em <i>Arachis vallsii</i> (V 7635) x <i>A. williamsii</i> (Wi 1118), com demonstrativo de número de células analisadas.	73

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Área de ocorrência natural das espécies do gênero <i>Arachis</i> , com destaque para as secções taxonômicas.	4
Figura 2. Área de ocorrência das espécies silvestres da secção <i>Arachis</i> .	6
Figura 3. Idiograma esquemático de <i>Arachis hypogaea</i> .	8
Figura 4. Diagrama esquemático das espécies e híbridos estudados.	24
Figura 5. (A) e (B): Germinação de sementes em papel Germitest; (C): Manutenção das plantas jovens em telado.	26
Figura 6. Folíolos utilizados nas análises descritivas organográficas.	32
Figura 7. Estágios de crescimento do anfidiplóide entre <i>Arachis vallsii</i> x <i>A. williamsii</i> após sua germinação.	39
Figura 8. Grão de pólen corado e não corado em <i>Arachis hoehnei</i> .	42
Figura 9. Quantificação do DNA genômico (gel de agarose 1%).	43
Figura 10. Identificação das três plantas híbridas diplóides <i>Arachis ipaënsis</i> x <i>A. magna</i> em gel de poliacrilamida em que o <i>primer</i> Pseq 5G9 foi utilizado.	44
Figura 11. Região do folíolo onde foram realizados os cortes anatômicos transversais.	46
Figura 12. Célula mucilagínosa em evidência na face adaxial (<i>Arachis hypogaea</i>).	49
Figura 13. Estreitamento da hipoderme.	50
Figura 14. Provável infestação fúngica na hipoderme de <i>Arachis hoehnei</i> .	51
Figura 15. Formato dos bordos foliolares.	53
Figura 16. Nervural principal de <i>Arachis valida</i> .	55
Figura 17. Nervura principal e mesofilo em secção transversal de folíolo de <i>Arachis ipaënsis</i> , <i>A. duranensis</i> , <i>A. ipaënsis</i> x <i>A. duranensis</i> 2n = 20 e <i>A. ipaënsis</i> x <i>A. duranensis</i> 2n = 40.	56
Figura 18. Nervura principal e mesofilo em secção transversal de folíolo de <i>Arachis hypogaea</i> , <i>A. hoehnei</i> , <i>A. vallsii</i> e <i>A. gregoryi</i> .	57
Figura 19. Nervura principal e mesofilo em secção transversal de folíolo de	58

	<i>Arachis gregoryi</i> x <i>A. magna</i> 2n = 20, <i>A. vallsii</i> x <i>A. ipaënsis</i> 2n = 20, <i>A. williamsii</i> e <i>A. gregoryi</i> x <i>A. williamsii</i> 2n = 20.	
Figura 20.	Nervura principal e mesofilo em secção transversal de folíolo de <i>Arachis vallsii</i> x <i>A. williamsii</i> 2n = 20, <i>A. valida</i> , <i>A. gregoryi</i> x <i>A. valida</i> 2n = 20 e <i>A. ipaënsis</i> x <i>A. magna</i> 2n = 40.	59
Figura 21.	Nervura principal e mesofilo em secção transversal de folíolo de <i>Arachis magna</i> e <i>A. vallsii</i> x <i>A. williamsii</i> .	60
Figura 22.	Análise histoquímica foliar.	65
Figura 23.	Células em meiose do híbrido <i>Arachis vallsii</i> (V7635) x <i>A. williamsii</i> (Wi 1118).	73

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

° C	Graus Celsius
M	Molar
ml	Militros
PCR	Reação em cadeia polimerase
rpm	Rotações por minuto
W	Watt
µl	Microlitros
mm	Milímetros
g	Gramas
mg	Miligramas
µm	Micrômetros

RESUMO

Contribuição à Taxonomia do Gênero *Arachis* - Secção *Arachis* à Luz do Estudo de Espécies e Híbridos Interespecíficos

Arachis é um dos gêneros mais importantes do Brasil, quando se trata da conservação da diversidade de espécies. O estudo taxonômico do gênero, com base em dados citológicos, morfológicos e, em parte, apoiados por marcadores moleculares, pode ser beneficiado por abordagens anatômicas descritivas. *Arachis hypogaea*, o anfidiplóide *A. ipaënsis* x *A. duranensis*, sua forma diplóide e seus genitores, foram os táxons abordados no presente trabalho, além de *A. gregoryi*, *A. hoehnei*, *A. magna*, *A. valida*, *A. vallsii* e *A. williamsii*, e seus híbridos diplóides representativos de variadas combinações. Dentre os dezoito táxons estudados, a distinção dos híbridos diplóides entre *A. ipaënsis* e *A. magna*, foi realizada via marcadores microssatélites. A utilização de descritores morfológicos, a germinação de sementes, as análises anatômicas e meióticas seguiram protocolos convencionais. No estudo anatômico comparativo de *A. hypogaea* e das espécies a ela relacionadas notou-se grandes semelhanças anatômicas. As peculiaridades vistas nem sempre apareceram de forma esperada para o anfidiplóide mencionado e para sua forma híbrida diplóide. Além disso, é possível destacar *A. hoehnei* das demais espécies estudadas, uma vez que estas apresentaram diferenças pouco marcantes entre si. Este estudo também apontou semelhanças evidentes entre *A. vallsii* e *A. williamsii*, tal como um alto índice meiótico de seu híbrido diplóide. Isto corrobora o indício de que *A. vallsii*, embora não associado ao genoma de *A. hypogaea*, pertence, em realidade, à secção *Arachis*.

Palavras chaves: amendoim, recursos genéticos, taxonomia, anatomia foliar, caracterização.

ABSTRACT

Contribution to the Taxonomy of *Arachis* - Section *Arachis* based on the study of species and interspecific hybrids

Arachis is of great importance to the conservation of species diversity in Brazil. Its taxonomic study, based on cytological, morphological data, and partly supported by molecular markers, can take benefit from descriptive anatomical approaches. *Arachis hypogaea*, the synthetic amphidiploid *A. ipaënsis* x *A. duranensis*, its diploid form, *A. ipaënsis* and *A. duranensis*, were studied in this work, in addition to *A. gregoryi*, *A. hoehnei*, *A. magna*, *A. valida*, *A. vallsii* and *A. williamsii*, and their diploid hybrids representative of various combinations. Among the eighteen materials studied, diploid hybrids between *A. ipaënsis* and *A. magna*, were distinguished using molecular markers. The use of morphological descriptors, the germination of seeds and the anatomical and cytological analyses followed conventional protocols. In the comparative anatomical study of *A. hypogaea* and its related species, a great number of anatomical similarities were found. Some of the peculiarities were not observed as expected in the synthetic amphidiploid *A. ipaënsis* x *A. duranensis* and its related diploid hybrid. Moreover, it is possible to distinguish *A. hoehnei* from the other studied species, which showed little significant differences among them. This study also pointed clear similarities between *A. vallsii* and *A. williamsii*, such as its diploid hybrid high meiotic rate. This fact emphasizes the evidence that *A. vallsii*, despite not being associated with the genomes of *A. hypogaea*, in fact, belongs to the section *Arachis*.

Key words: peanut, genetic resources, taxonomy, leaf anatomy, characterization.

1. INTRODUÇÃO

Arachis é um dos gêneros de leguminosas mais importantes para a humanidade, por abranger espécies cultivadas, como o amendoim, *Arachis hypogaea* L., de grande expressão alimentícia, econômica, e com crescentes áreas de cultivo. O significativo potencial econômico do gênero é expresso pela utilização de várias de suas espécies, além de *A. hypogaea*, para a produção de grãos (*A. villosulicarpa* Hoehne, espécie cultivada por etnias indígenas do Mato Grosso, e *A. stenosperma* Krapov. & W.C. Greg., cultivada por índios guaranis, no Litoral Atlântico) ou para a formação de pastagens, cobertura de pomares, paisagismo e controle da erosão do solo (*A. glabrata* Benth., *A. kretschmeri* Krapov. & W.C. Greg., *A. pintoii* Krapov. & W.C. Greg. e *A. repens* Handro).

Apesar de *A. hypogaea* ser rotineiramente cultivada em mais de 80 países da faixa tropical e subtropical (Singh & Singh, 1992), o gênero é exclusivamente sul-americano e mais da metade de suas espécies são endêmicas do Brasil (Valls, 2005). Este fato torna o Brasil o país com a maior responsabilidade sobre a conservação da diversidade do gênero e, conseqüentemente, sobre o avanço do conhecimento taxonômico e da variabilidade genética de suas espécies e variedades.

A taxonomia do gênero está bastante atualizada, em comparação com a situação reinante até 1993, quando apenas 22 espécies haviam sido formalmente descritas (Bentham, 1841, 1859; Hoehne, 1940; Krapovickas & Rigoni, 1951; Hermann, 1954). A monografia de Krapovickas & Gregory (1994), com 69 espécies, e a descrição de 11 espécies adicionais por Valls & Simpson (2005) promoveram um maior conhecimento e entendimento sobre as relações entre as espécies do gênero, embora ainda persistam alguns questionamentos taxonômicos intrigantes (Krapovickas & Lavia, 2000). Permanecem

dúvidas sobre o correto alinhamento de algumas espécies nas secções taxonômicas formais a que foram originalmente alocadas (Lavia *et al.*, 2008), sobre a eventual conspecificidade de espécies silvestres extremamente relevantes para o melhoramento de *A. hypogaea* e há indícios de que algumas variedades agrícolas desta última espécie, ainda cultivadas por indígenas brasileiros (Freitas & Valls, 2001; Freitas *et al.*, 2007), possam diferir de *A. hypogaea* quanto à origem, englobando distintos genitores silvestres.

O esclarecimento dessas dúvidas provavelmente exigirá ajustes na nomenclatura das espécies, subespécies e variedades, além de alterações na estrutura sistemática do gênero *Arachis* (Lavia *et al.*, 2008). Considera-se que a ampla série de abordagens comparativas já em utilização, por meio de descritores organográficos, de análises mitóticas e moleculares, pode ser enriquecida pelo estudo da anatomia foliar de alguns dos exemplares do grupo e de seus respectivos híbridos interespecíficos. Por isto, este estudo explora a disponibilidade atual de plantas vivas das diferentes espécies de *Arachis* secção taxonômica *Arachis* (Krapovickas & Gregory, 1994), assim como de seus respectivos híbridos, resultantes de projetos paralelos de caracterização de germoplasma, voltados ao pré-melhoramento de *A. hypogaea*.

É de extrema importância a análise apurada deste grupo de espécies no contexto da busca do conhecimento da biodiversidade brasileira, compromisso nacional derivado da adesão pelo Brasil à Convenção da Biodiversidade Biológica (Coradin, 2006). O presente estudo da anatomia foliar de espécies e híbridos do gênero *Arachis*, somados a dados citológicos, morfológicos e, em parte, apoiados por marcadores moleculares, deverá contribuir para um melhor entendimento sobre as relações de afinidade entre os exemplares analisados, entendimento este capaz de fornecer subsídios aos programas de pré-melhoramento e de melhoramento de *A. hypogaea*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Gênero *Arachis*

2.1.1 Aspectos gerais

Após 167 anos da descrição das primeiras cinco espécies silvestres de *Arachis*, por Bentham (1841), o gênero é hoje composto por 80 espécies (Krapovickas & Gregory, 1994; Valls & Simpson, 2005), distribuídas em nove secções taxonômicas formais (*Trirectoides* Krapov. & W.C.Greg., *Erectoides* Krapov. & W.C.Greg., *Extranervosae* Krapov. & W.C.Greg., *Triseminatae* Krapov. et W.C.Greg., *Heteranthae* Krapov. & W.C.Greg., *Caulorrhizae* Krapov. & W.C.Greg., *Procumbentes* Krapov. & W.C.Greg., *Rhizomatosae* Krapov. & W.C.Greg. e *Arachis*). A divisão do grupo em distintas secções teve como base dados morfológicos e citogenéticos aliados às informações sobre a viabilidade de grão de pólen de híbridos intraespecíficos e interespecíficos (Krapovickas & Gregory, 1994).

Arachis é um gênero exclusivo da América do Sul. Ocorre no Brasil (onde são encontradas 64 de suas espécies silvestres), Bolívia (18 espécies), Paraguai (16 espécies), Argentina (6 espécies) e Uruguai (2 espécies). O Brasil abriga espécies de todas as secções taxonômicas do grupo e 46 de suas espécies são exclusivas do país, incluindo várias espécies de interesse econômico.

O Centro de origem do gênero está localizado no Planalto Central Brasileiro (Gregory *et al.*, 1980; Hammons, 1994). A área de ocorrência natural do gênero *Arachis* vai da costa do Oceano Atlântico até o sopé da Cordilheira dos Andes e desde a Ilha de Marajó até o sul do Uruguai (Figura 1).

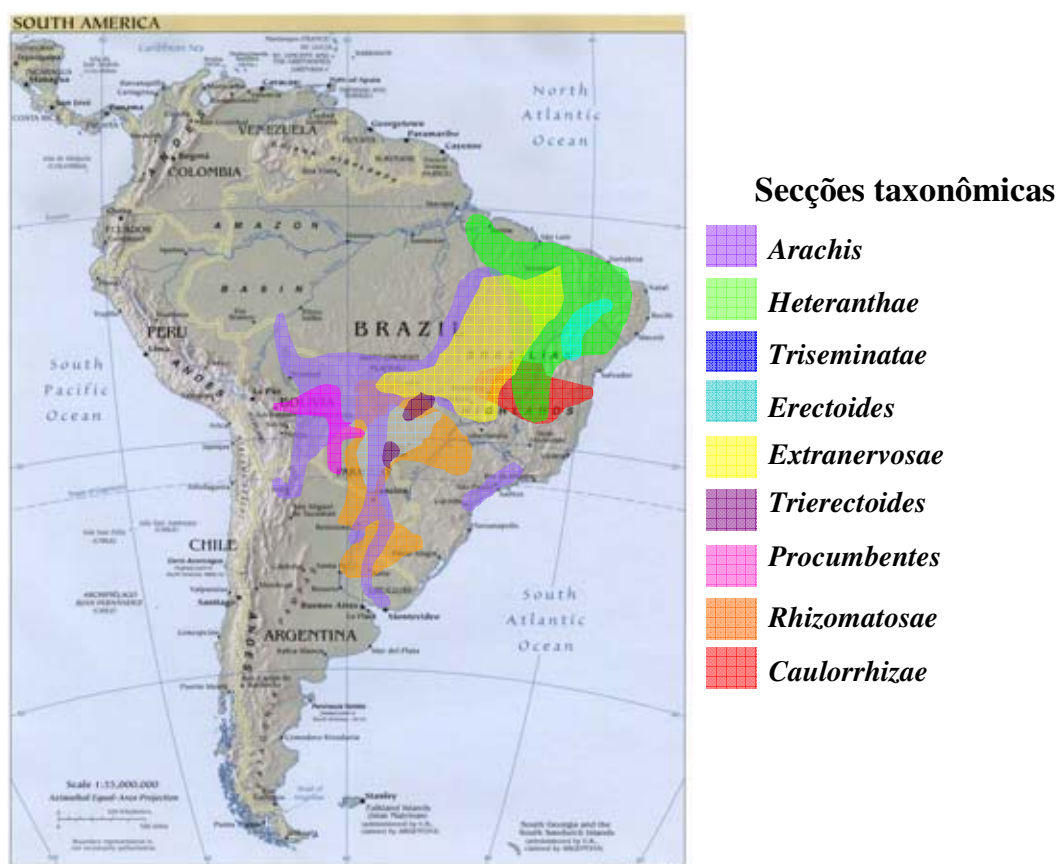


Figura 1: Área de ocorrência natural das espécies do gênero *Arachis*, com destaque para as secções taxonômicas. Adaptado de Krapovickas & Gregory (1994) e Peñaloza (2003).

Programas de pré-melhoramento do amendoim cultivado (*A. hypogaea*), com a utilização de espécies silvestres como fornecedoras de genes de resistência a algumas enfermidades da cultura, tem despertado um maior interesse por essas espécies. Segundo Allem & Valls (1987), o gênero *Arachis* encontra-se dentro dos debates sobre os variados graus de importância forrageira que os grupos de leguminosas possuem, sendo que algumas das espécies do gênero ocorrem em considerável frequência ao redor da região do Pantanal. Estes mesmos autores ainda relatam que na grande área de ocorrência das espécies de *Arachis*, estas possuem, pela densidade e grande volume de forragem, papel

fundamental de excelência em forragem de pastos, como também afirmaram Hoehne (1940) e Otero (1941).

2.1.2 Estudos taxonômicos

A potencialidade do gênero para estudos taxonômicos com abordagem biosistemática é privilegiada, pois, das 2300 coletas citadas na monografia de Krapovickas & Gregory (1994) e no trabalho complementar de Valls & Simpson (2005), mais de 1200 das populações coletadas também estão disponíveis como acessos de germoplasma, conservados como sementes ou como plantas em coleções vivas. Até a monografia de 1994, as principais abordagens taxonômicas de *Arachis* (Hoehne, 1940; Hermann, 1954) se dedicaram quase que exclusivamente a aspectos morfológicos, concentrando-se nas estruturas acima do solo, deixando de solucionar inúmeras dúvidas quanto à sistemática do gênero.

O avanço do conhecimento do gênero nas últimas décadas, pela coleta de dados e exemplares em áreas pouco exploradas, como a zona de fronteira do Mato Grosso e Bolívia, e pelo crescente aporte de resultados citogenéticos (Fernández & Krapovickas, 1994; Peñaloza & Valls, 2005), sugere a necessidade de reajustes na circunscrição das seções e de algumas das espécies que as compõem, mesmo considerando a modernidade da publicação da monografia de Krapovickas & Gregory (1994). A própria circunscrição das variedades de *A. hypogaea* necessita aprofundamento, pois aparentemente não comporta certos tipos peculiares da espécie oriundos da bacia do rio Xingu (Freitas & Valls, 2001; Freitas *et al.*, 2007), com destaque para a forma exclusivamente brasileira descrita como espécie por Hoehne (1922), como *A. nambyquarae* Hoehne, mas

sinonimizada a *A. hypogaea* na monografia do gênero *Arachis* (Krapovickas & Gregory, 1994).

2.2 Secção *Arachis*

2.2.1 Aspectos gerais

A secção *Arachis* pertence ao gênero *Arachis*, da família *Fabaceae*, tribo *Aeschynomeneae* Benth., subtribo *Stylosanthinae* Benth. Dentre as 80 espécies conhecidas do gênero *Arachis* (Valls & Simpson, 1997), esta secção abrange 32 espécies. Portanto, é a maior e proporcionalmente a mais heterogênea secção do gênero. As demais secções contêm de 1 a 14 espécies (Valls, 2006).

A secção possui vasta distribuição geográfica (Figura 2), com algumas espécies exclusivas do Brasil e de interesse para o melhoramento genético de *A. hypogaea*.



Figura 2: Área de ocorrência das espécies silvestres da secção *Arachis*. Adaptado de Krapovickas & Gregory (1994) e Peñaloza (2003).

As principais características das espécies incluídas nesta secção são: presença de folhas tetrafolioladas, plantas eretas ou decumbentes, presença de “pegs” em ângulo de 45°, plantas anuais ou perenes, diplóides ($2n = 18, 20$ cromossomos) e tetraplóides ($2n = 40$ cromossomos) (Krapovickas & Gregory, 1994; Lavia, 1996; Peñaloza & Valls, 1997; Lavia *et al.*, 2008).

Talvez a secção *Arachis* seja artificial em sua concepção, já que o que a consolida é a proximidade de suas espécies componentes com *A. hypogaea*. Porém, isto não impede que, embora se vinculando alternativamente, a um ou outro dos genomas distintos de *A. hypogaea*, as espécies possam pertencer, em realidade a secções naturais distintas. Note-se que a inviabilidade dos híbridos interseccionais é um dos principais fatores para a separação das outras secções do gênero (Krapovickas & Gregory, 1994). Embora *A. hypogaea*, por ter alcançado o nível tetraplóide, mostre plena fertilidade, os híbridos diplóides entre espécies do genoma A e do genoma B são tão pouco viáveis como os obtidos nos cruzamentos entre espécies de qualquer outro par de secções, ou mesmo entre espécies de outras secções e as da secção *Arachis* (Valls, 2006).

2.2.2 Estudos taxonômicos

O maior impacto dos novos conhecimentos citogenéticos, até agora concentrados em análises mitóticas, recai sobre a secção *Arachis*. Tal secção inclui o amendoim cultivado, *A. hypogaea*, e tem suas espécies subdivididas em grupos com números básicos distintos ($x = 9$ e $x = 10$), dois níveis de ploidia ($2x$ e $4x$) e cariótipos bastante diferenciados, variavelmente associados aos dos “genomas A e B” (Figura 3), que deram origem a *A. hypogaea*, espécie com fórmula genômica AABB (Stalker & Moss, 1987), ou

ainda ao genoma D, proposto para *A. glandulifera* Stalker (Stalker, 1991; Lavia *et al.*, 2008).

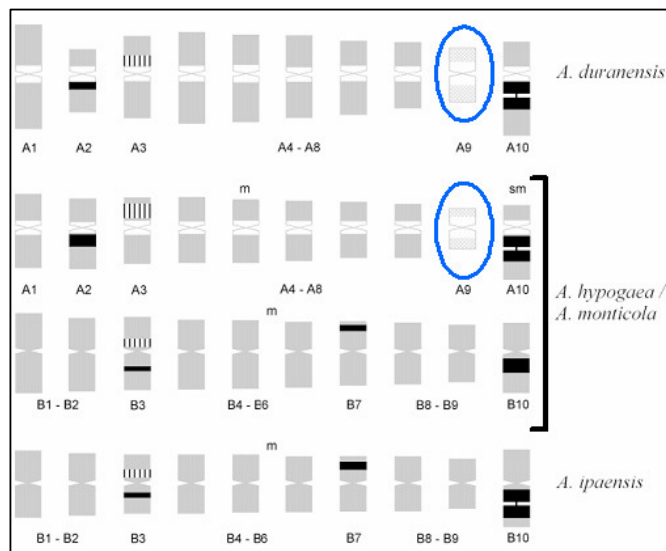


Figura 3: Idiograma esquemático de *Arachis hypogaea*. Em azul, destaque para o par de cromossomos “A”. Adaptado de Seijo *et al.*(2004).

São consideradas representativas do “genoma A” de *A. hypogaea* as espécies diplóides, anuais ou perenes, com $2n = 20$ cromossomos, portadoras de um par de cromossomos extremamente menor que os demais, e com o processo de coloração diferenciado em prómetáfase mitótica, contando com um grande bloco de heterocromatina (Lavia *et al.*, 2008) e destacado por Husted (1933, 1936) como o par cromossômico “A”.

Entre as espécies diplóides mais associadas ao “genoma B” de *A. hypogaea*, todas de ciclo anual e com $2n = 20$ cromossomos, há diversos subgrupos, de acordo com sua afinidade estimada por marcadores moleculares (Gimenes *et al.*, 2002a, 2002b; Moretzsohn *et al.*, 2004; Milla *et al.*, 2005; Bravo *et al.*, 2006). Um subgrupo reúne *A. ipaensis* Krapov. & W.C. Greg., *A. williamsii* Krapov. & W.C. Greg., *A. magna* Krapov., W.C. Greg. & C.E. Simpson, *A. gregoryi* C.E. Simpson, Krapov. & Valls e *A. valida*

Krapov. & W.C. Greg.; outro subgrupo abriga *A. batizocoi* Krapov. & W.C. Greg, *A. cruziana* Krapov., W.C. Greg. & C.E. Simpson e *A. krapovickasii* C.E. Simpson, D.E. Williams, Valls & I.G. Vargas.

Arachis glandulifera, uma espécie bastante peculiar, originalmente descrita da Bolívia e mais tarde encontrada em dois sítios no Brasil, associa-se, molecularmente a este último grupo, mas mostra seis pares de cromossomos distintos (Stalker, 1991; Fernández & Krapovickas, 1994; Pittman *et al.*, 1996). *Arachis hoehnei* Krapov. & W.C. Greg. e *A. benensis* Krapov., W.C. Greg. & C.E. Simpson, não têm suas afinidades bem compreendidas. A esta última espécie, parece associar-se, por razões morfológicas, *A. vallsii* Krapov. & W.C. Greg., espécie originalmente enquadrada na secção *Procumbentes* Krapov. & W.C. Greg. (Krapovickas & Gregory, 1994). Entretanto, há um grande acúmulo atual de evidências de que esta espécie não pertença à secção *Procumbentes* (Lavia, 1999; Krapovickas & Lavia, 2000) e sim à secção *Arachis* (Valls, 2006). Estudos com hibridizações entre *A. vallsii* e espécies pertencentes às secções *Arachis* e *Procumbentes*, poderão esclarecer melhor as relações de afinidade das espécies citadas com seus respectivos similares.

Ainda na secção *Arachis*, um grupo de três espécies anuais (*A. decora* Krapov., W.C.Greg & Valls, *A. palustris* Krapov., W.C.Greg & Valls e *A. praecox* Krapov., W.C.Greg & Valls), exclusivas do Brasil, mostra $2n = 18$ cromossomos (Lavia, 1996, 1998; Peñaloza & Valls, 1997). Por fim, a secção inclui as espécies tetraplóides *A. hypogaea* e *A. monticola* Krapov. & Rigoni (Krapovickas & Gregory, 1994). A esta última, segundo os mesmo autores, se associam *A. ipaënsis* e *A. magna*, tanto no porte, quanto no formato dos frutos.

Com base nos conhecimentos atuais, as espécies da secção *Arachis* podem ser segregadas, ainda sem a organização de uma estrutura sistemática formal, em diversos subgrupos (Tabela 1).

Tabela 1: Grupo de espécies de *Arachis* secção *Arachis* sem estruturação sistemática formal. Brasília, 2008.

Grupos	Espécies	2n	A	Informações
1	Diplóides anuais	20	+	Associadas às espécies perenes com 2n = 20 e par cromossômico "A".
2		20	-	Molecularmente associadas a <i>A. ipaënsis</i> .
3		20	-	Molecularmente associadas a <i>A. batizocoi</i> .
4		18	-	Molecularmente associadas a <i>A. vallsii</i> .
5	Diplóides perenes	20	+	Associadas às espécies anuais com o par cromossômico "A".
6	<i>A. glandulifera</i>	20	-	Molecularmente associadas a <i>A. batizocoi</i> e <i>A. cruziana</i> .
7	<i>A. hoehnei</i>	20	-	Mostra associação intermediária com espécies vinculadas aos "genomas A e B".
8	<i>A. benensis</i>	20	-	Associada morfológicamente a <i>A. vallsii</i> .
9	<i>A. vallsii</i>	20	-	Molecularmente associada às espécies anuais com 2n = 18 cromossomos.
10	Tetraplóides	40	+	Compostas de dois genomas, um deles com o par cromossômico "A".

Abreviaturas: 2n = número de cromossomos; A = par cromossômico "A".

Ao longo do avanço do conhecimento das espécies de *Arachis* e da secção típica, as espécies acima foram incluídas em diferentes esquemas sistemáticos, que, todavia, não se mostraram realistas.

Inicialmente, Gregory *et al.* (1973) enquadraram as espécies da secção *Arachis* em três séries, nunca efetivamente publicadas: **ser. *Annuae*** (que corresponde às espécies dos grupos 1, 2 e 3, indicados na tabela 2), **ser. *Perennes*** (espécies do grupo 5) e **ser. *Amphiploides*** (espécies do grupo 10). As demais espécies apresentadas na tabela acima ainda não eram conhecidas. Ao publicar a monografia do gênero, em 1994, Krapovickas & Gregory abandonaram esta subdivisão, explicando que as espécies do grupo 1 associavam-se mais claramente às perenes do grupo 5, que às anuais dos grupos 3 e 4. Os mesmos autores citaram a necessidade de se avaliar outros aspectos e caracteres, além dos já propostos, para uma melhor sistematização da estrutura das secções do gênero *Arachis*, ou seja, avaliar outros caracteres que poderiam ser úteis para um melhor ordenamento dentro da secção.

Outro esquema sistemático para a secção classifica as espécies diplóides da secção *Arachis* em espécies com “genoma A” (espécies dos grupos 1 e 5) e espécies com “genoma B” (aqui aglutinando, eventualmente, todas as espécies diplóides restantes da secção). As espécies tetraplóides contêm ambos os “genomas A e B”. Stalker (1991) segregou *A. glandulifera* como representante único do que propõe como “genoma D”.

Entretanto, é preciso considerar que a classificação por genomas é comparativa, tomando por base os “genomas A e B” de *A. hypogaea*. Neste caso, só deveriam ser consideradas de “genoma A” as espécies diplóides com cromossomos muito similares a um dos dois conjuntos de 20 cromossomos de *A. hypogaea*, e, especificamente, àquele que contém o par cromossômico “A”. A espécie mais próxima desta situação é *A. duranensis* Krapov. & W.C. Greg. (Fernández & Krapovickas, 1994; Kochert *et al.*, 1996; Seijo *et al.*, 2004), com a qual as demais espécies anuais e perenes dos grupos 1 e 5 mostram muita afinidade genética e, em geral, boa cruzabilidade (Krapovickas & Gregory, 1994; Gregory & Gregory, 1979; Ressler & Gregory, 1979).

Quanto às demais espécies diplóides, as anuais do grupo 3 (sem o par “A” e molecularmente associadas à *A. ipaënsis*), aproximam-se bastante do outro genoma de *A. hypogaea*. *Arachis ipaënsis* é considerada uma das espécies que deram origem a *A. hypogaea* (Kochert *et al.*, 1996; Fernández & Krapovickas, 1994; Gimenes *et al.*, 2002b; Seijo *et al.*, 2004; Fávero *et al.*, 2006) e, portanto, representaria o “genoma B”. A este grupo se incluiria, no máximo, as demais espécies do grupo 3. Considerar o restante das espécies como representativas do “genoma B” é um exagero, por tratar-se necessariamente de uma comparação com o “genoma B” de *A. hypogaea*, do qual se afastam. No entanto, ainda é preciso compreender melhor onde se enquadram essas espécies, qual seu efetivo grau de parentesco com *A. hypogaea* e se há vantagem em atribuir categorias taxonômicas formais às subdivisões da ampla secção *Arachis*.

A localização sistemática das espécies nas distintas secções do gênero *Arachis*, tem como fundamentação a similaridade de aspectos morfológicos e citogenéticos, aliados às informações sobre a viabilidade de grão de pólen de híbridos intra e interespecíficos (Krapovickas & Gregory, 1994). Estudos com cruzamentos interespecíficos realizados por Gregory & Gregory (1979), contribuíram para delimitar as secções e estabelecer as relações filogenéticas entre elas.

O sucesso obtido na hibridização de *A. vallsii* com espécies de todos os subgrupos da secção *Arachis* (Rodrigues & Valls, 2005; Valls, 2006) e, o insucesso parcial em cruzamentos preliminares com espécies da secção *Procumbentes* (Teixeira, 1999), em que está localizado originalmente, vinculado a aspectos citológicos e exomorfológicos (Lavia, 1999; Krapovickas & Lavia, 2000), além de seu ciclo vital (Valls, 2006), coloca em dúvida sua localização original dentro do gênero *Arachis*. Estes estudos indicam que a correta alocação de *A. vallsii* é na secção *Arachis* (Valls, 2006). Em publicação recente, Lavia *et al.* (2008) também propõe a transferência de *A. chiquitana* Krapov., W.C. Greg. & C.E.

Simpson da secção *Procumbentes* à secção *Arachis*, semelhantes às espécies deste grupo relacionadas ao genoma A de *A. hypogaea*, a partir de informações cromossômicas.

Graças à ampla disponibilidade de germoplasma, têm-se realizado hibridações interespecíficas e enfatizado a busca de mais informação citotaxonômica, para fundamentar novas decisões sobre afinidades entre táxons, ou mesmo a segregação de novas espécies dentre as já descritas. A realização de cruzamentos interespecíficos que evidenciam afinidades e barreiras genéticas, assim como o uso crescente de marcadores moleculares, disponibiliza um caminho para ações de pré-melhoramento de *A. hypogaea* (Valls, 2006).

Os híbridos produzidos entre espécies diplóides da secção *Arachis*, em grande parte obtidos a partir das próprias populações de origem dos exemplares tipos de cada espécie, mostram estimativas de viabilidade de pólen desde quase nula, em *A. batizocoi* x *A. cardenasii* Krapov. & W.C. Greg., até acima de 90%, em *A. magna* x *A. ipaënsis* (Simpson & Faries, 2001). A alta viabilidade de pólen nos híbridos entre *A. magna* e *A. ipaënsis* indica que essas espécies não são tão diferentes geneticamente, embora análises moleculares dos acessos envolvidos nos cruzamentos os mantenham algo distante para serem considerados de uma mesma espécie (Simpson & Faries, 2001).

2.3 Espécies estudadas

Este trabalho baseou-se no estudo das relações de afinidade entre as nove espécies do gênero *Arachis* relacionadas na Tabela 2. Desta forma fez-se necessário a análise de aspectos morfológicos destes materiais e de seus respectivos híbridos

É notável a grande importância do Brasil neste trabalho, já que em seu território encontram-se a maioria das espécies estudadas. Este fato reforça o relevante papel que o país representa junto à manutenção e conservação da biodiversidade do gênero *Arachis*.

Tabela 2: Espécies envolvidas na pesquisa. Brasília, 2008.

Espécie	Acesso	Distribuição
<i>Arachis duranensis</i> Krapov. & W.C. Greg.	V 14167	Argentina, Bolívia e Paraguai
<i>Arachis gregoryi</i> C.E. Simpson, Krapov. & Valls	V14957	Brasil
<i>Arachis hoehnei</i> Krapov. & W.C. Greg.	K 30006	Brasil
<i>Arachis hypogaea</i> var. <i>hypogaea</i> subsp. <i>hypogaea</i>	V 12548	Cultivada em 80 países
<i>Arachis ipaënsis</i> Krapov. & W.C. Greg.	K 30076	Bolívia
<i>Arachis magna</i> Krapov., W.C. Greg. & C.E. Simpson	K 30097	Bolívia e Brasil
<i>Arachis valida</i> Krapov. & W.C. Greg.	V 13514	Brasil
<i>Arachis vallsii</i> Krapov. & W.C. Greg.	V 7635	Brasil
<i>Arachis williamsii</i> Krapov. & W.C. Greg.	Wi 1118	Bolívia

Abreviaturas: ARG = Argentina; BRA = Brasil; BOL = Bolívia; PRY = Paraguai.

Coletores: K = A. Krapovickas e colaboradores; V = J. F. M. Valls e colaboradores; Wi = D. E. Williams e colaboradores.

2.3.1 *Arachis hypogaea*

É a espécie tipo do gênero conhecida comumente como amendoim e cultivada em muitos países. Foi caracterizada como uma espécie poliplóide (Husted, 1936) e possui $2n = 40$ cromossomos (Kawakami, 1930; Husted, 1931). *Arachis hypogaea* tem seis variedades, incluídas em duas subespécies (Krapovickas & Gregory, 1994). Seu centro de variação considerado mais importante, onde foram encontrados os caracteres mais primitivos da espécie, ocorre na mesma região da América do Sul onde estão localizadas

as espécies anuais e diplóides, *A. duranensis*, *A. ipaënsis* e *A. batizocoi* (Krapovickas & Gregory, 1994).

2.3.2 *Arachis ipaënsis*

É uma espécie diplóide boliviana envolvida na hipótese de origem de *A. hypogaea* (Fernández & Krapovickas, 1994; Kochert *et al.*, 1996; Gimenes *et al.*, 2002b; Seijo *et al.*, 2004; Fávero *et al.*, 2006; Lavia *et al.*, 2008). Essa espécie representa o “genoma B” do amendoim. Além disso, ocorre sob condições de seca periódica, assim como, *A. duranensis* (Krapovickas & Gregory, 1994). Segundo esses mesmos autores, é morfologicamente semelhante a *A. magna*, que também é encontrada na Bolívia.

2.3.3 *Arachis duranensis*

Espécie anual que vive em solos arenosos e profundos, e em regiões próximas a correntes de água na Argentina, Paraguai e Bolívia (Krapovickas & Gregory, 1994). Juntamente com *A. batizocoi* e *A. monticola* (única espécie silvestre tetraplóide do gênero), forma um grupo cujas espécies representam as que ocorrem nas altitudes mais elevadas dentre todas as espécies do gênero *Arachis* (Krapovickas & Gregory, 1994).

2.3.4 *Arachis gregoryi*

É uma das novas espécies do grupo descrita por Valls & Simpson (2005). É anual, diplóide, com $2n = 20$ cromossomos, e não apresenta o par de cromossomos “A” (Peñaloza & Valls, 2005). Ocorre em áreas arenosas de cerrado no estado do Mato Grosso (Valls &

Simpson, 2005). De acordo com os últimos autores, os cruzamentos que envolveram essa espécie com outras representativas do grupo *Arachis* e produziram híbridos, apontaram distintos resultados quanto à viabilidade de grão de pólen.

2.3.5 *Arachis magna*

Essa espécie vive em solos profundos e úmidos, geralmente em terra vermelha, no estado do Mato Grosso e na Bolívia. Possui 20 cromossomos e é anual (Krapovickas & Gregory, 1994). De acordo com a morfologia externa da planta, é bastante semelhante a *A. monticola* e a *A. ipaënsis*, que é menos vigorosa, mas possui padrão de crescimento similar a *A. magna* (Krapovickas & Gregory, 1994).

2.3.6 *Arachis vallsii*

Espécie brasileira e anual encontrada no estado do Mato Grosso do Sul. *Arachis vallsii* possui $2n = 20$ cromossomos (Lavia, 1996) e produz frutos e sementes sob condições de inundação, em solos encharcados (Krapovickas & Gregory, 1994). É possível que seja fonte de resistência a doenças relacionadas ao excesso de umidade.

2.3.7 *Arachis williamsii*

Localizada na Bolívia, essa espécie anual é conhecida por ser amplamente adaptada a condições de alagamento prolongado (Krapovickas & Gregory, 1994). Possui $2n = 20$ cromossomos e está incluída no grupo de espécies mais associadas ao “genoma B” de *A. hypogaea*. De acordo com sua afinidade estimada por marcadores moleculares

(Gimenes *et al.*, 2002a, 2002b; Moretzsohn *et al.*, 2004; Milla *et al.*, 2005; Bravo *et al.*, 2006) está associada a *A. ipaënsis*, *A. magna*, *A. gregoryi* e *A. valida*.

2.3.8 *Arachis valida*

Essa espécie também é encontrada no Pantanal, no estado do Mato Grosso do Sul, e possui $2n = 20$ cromossomos (Fernández & Krapovickas, 1994). É encontrada em regiões permanentemente expostas a grandes inundações (Krapovickas & Gregory, 1994).

2.3.9 *Arachis hoehnei*

É uma espécie anual e diplóide, com $2n = 20$ cromossomos (Fernández & Krapovickas, 1994), por enquanto só conhecida no estado do Mato Grosso do Sul. A ocorrência no Paraguai, citada por Krapovickas & Gregory (1994), baseou-se na inclusão de materiais de uma espécie distinta, *A. schinini* Krapov., Valls & C.E. Simpson, provavelmente segregada (Valls & Simpson, 2005).

2.4 Híbridos interespecíficos

Além das espécies em pauta, também foram estudados híbridos interespecíficos diplóides e tetraplóides relacionados a estas. Os cruzamentos realizados para a obtenção destes foram desenvolvidos com plantas originárias das mesmas populações de onde foram coletados os exemplares tipos das espécies em questão. Os híbridos produzidos entre espécies diplóides da secção *Arachis* em projetos paralelos a este estudo e a cargo de Adriana Regina Custódio (doutoranda da UFSC com atuação na Embrapa Recursos

Genéticos e Biotecnologia), Alessandra Pereira Fávero (enquanto doutoranda da USP e como pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia), Andréa Gobbi Barbosa (em trabalho de hibridação destinado à preparação de mapa genético do genoma B de *A. hypogaea*, como doutoranda da UNESP em Botucatu – SP) e Lessandra Silva Rodrigues (então doutoranda da UNESP em Botucatu – SP, atuando na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia), estão relacionados na Tabela 3.

Tabela 3: Híbridos interespecíficos envolvidos na pesquisa. Brasília, 2008.

Híbrido interespecífico	Acessos utilizados nos cruzamentos	2n	Produção
<i>A. ipaënsis</i> x <i>A. duranensis</i>	K 30076 x V 14167	20	APF
<i>A. ipaënsis</i> x <i>A. duranensis</i>	K 30076 x V 14167	40	APF
<i>A. ipaënsis</i> x <i>A. magna</i>	K 30076 x K 30097	20	AB
<i>A. gregoryi</i> x <i>A. magna</i>	V 14957 x K 30097	20	ARC
<i>A. gregoryi</i> x <i>A. williamsii</i>	V 14957 x Wi 1118	20	ARC
<i>A. gregoryi</i> x <i>A. valida</i>	V 14957 x V 13514	20	ARC
<i>A. vallsii</i> x <i>A. ipaënsis</i>	V 7635 x K 30076	20	LSR
<i>A. vallsii</i> x <i>A. williamsii</i>	V 7635 x Wi 1118	20	LSR
<i>A. vallsii</i> x <i>A. williamsii</i>	V 7635 x Wi 1118	40	APF

Abreviaturas: 2n = número de cromossomos; AB = Andréa Gobbi Barbosa; APF = Alessandra Pereira Fávero; ARC = Adriana Regina Custódio; LSR = Lessandra Silva Rodrigues.

Coletores: K = A. Krapovickas e colaboradores; V = J. F. M. Valls e colaboradores; Wi = D. E. Williams e colaboradores.

No gênero *Arachis* a cruzabilidade entre espécies está diretamente relacionada às relações de afinidade entre suas espécies (Krapovickas & Gregory, 1994). Este fato pode ser mais uma vez reforçado pela divisão taxonômica do grupo, que também tem como base dados de cruzamentos inter e intraespecíficos.

A obtenção de anfidiplóides por Alessandra Pereira Fávero (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia) foi realizada por duplicação cromossômica de híbridos representativos dos “genomas A x B” de *A. hypogaea* com colchicina (Fávero *et al.*, 2006). Um desses anfidiplóides resultou da duplicação do híbrido diplóide entre *A. duranensis* (relacionada ao “genoma A” de *A. hypogaea*) x *A. ipaënsis* (relacionada ao “genoma B” de *A. hypogaea*), o que repete a história evolutiva da espécie cultivada *A. hypogaea* (o amendoim). O outro híbrido tetraplóide utilizado neste trabalho, também obtido por Alessandra Pereira Fávero, resultou da duplicação cromossômica do híbrido diplóide entre *A. vallsii* x *A. williamsii*, cujos genitores não apresentam o par cromossômico “A” (Lavia, 1996).

O processo de obtenção de híbridos experimentais é de fundamental importância para detectar afinidades e, nos estudos já citados, foi utilizado para estabelecer ou confirmar as secções taxonômicas.

2.5 Anatomia

Os conhecimentos sobre anatomia vegetal são de relevante importância quando se trata de reprodução vegetativa de plantas, em que a identificação de caracteres estruturais é fundamental no processo de propagação que depende da regeneração de tecidos (Silva *et al.*, 2005). Além disso, estudos sobre anatomia descritiva e anatomia quantitativa são recentemente utilizados na literatura como aporte e subsídio de soluções para questionamentos taxonômicos que envolvam espécies de um mesmo grupo com semelhanças na organografia (Rio *et al.*, 2005). Caracteres úteis para distinções taxonômicas foram utilizados por Oliveira *et al.* (2008) para separar as nove espécies do

gênero *Raddia* em diferentes subgrupos. Neste mesmo trabalho foram encontrados caracteres exclusivos pertencentes a duas espécies do gênero.

Mussury *et al.* (2007) trabalharam com caracteres anatômicos foliares de algumas espécies da família *Amaranthaceae* com o objetivo de facilitar a identificação taxonômica dos indivíduos do gênero *Gomphrena*. Silva & Alquini (2003) distinguiram duas espécies do gênero *Axonopus* por apresentarem características anatômicas exclusivas, como a presença de células buliformes e tricomas. Em *Poaceae*, estudos comparativos de anatomia da lâmina foliar resultaram na distinção entre duas espécies que apresentam grande similaridade quanto à morfologia externa (Alvarez *et al.*, 2005). Duas espécies do gênero *Plantago* L. que careciam de estudos anatômicos de folha foram analisadas por Rocha *et al.* (2002), que revelaram similaridade entre essas espécies e os outros indivíduos do mesmo grupo.

Em *Arachis*, observações sobre a anatomia foliar de *A. hypogaea* caracterizaram a presença de uma estrutura mesofítica com alguns poucos caracteres xerofíticos (Reed, 1924). A diferenciação do mesofilo foliar em parênquima paliçádico e parênquima lacunoso foi relatada por Yarbrough em 1957, para *A. hypogaea*. Estudos histológicos foliares de dois genótipos do amendoim (*A. hypogaea*) resultaram na observação de características distintivas que separam os materiais analisados (Veiga *et al.*, 1994). Caracteres relacionados à morfologia de estômatos também indicaram diferenças entre genótipos de *A. hypogaea* em um trabalho em que a variabilidade de estômatos ocorrentes em folíolos do amendoim foi avaliada (Veiga *et al.*, 1992a).

Estudos histoquímicos com dois diferentes genótipos do amendoim (*A. hypogaea*) demonstraram que é possível distingüí-los a partir de suas composições histoquímicas (Veiga *et al.*, 1992b). Tais autores também afirmam que contaminações fúngicas foliares provavelmente estão relacionadas a fatores histoquímicos.

2.6 Estudo meiótico

Embora dependente da disponibilidade de plantas vivas, a análise meiótica vem sendo continuamente empregada, por mais de meio século, para a solução de questões referentes à estabilidade reprodutiva de espécies, ao potencial de pareamento cromossômico regular de seus híbridos, à similaridade de comportamento de híbridos de espécies mais ou menos similares, associadas em mesmas secções ou gêneros, e mesmo para a alocação de taxons em níveis supra-genéricos, como tribos e subfamílias.

Baker & Baker (1967) abordaram as relações de espécies de *Filipendula* e *Spiraea* (Rosaceae) e seus possíveis híbridos, propondo a alocação de gêneros com números básicos distintos a diferentes subfamílias. Therman (1956) abordou as relações genéricas na tribo *Polygonatae* de *Liliaceae*, enfatizando os distintos números básicos e a frequência de quiasmas. Menzel & Martin (1974) analisaram a proximidade de oito espécies da secção *Furcaria* de *Hibiscus* (Malvaceae), enfatizando distinções pela análise da meiose de seus híbridos. Do estudo meiótico de *Acanthophyllum* (Caryophyllaceae) por Ghaffari (2004), resultou a recomendação da transferência de *A. caespitosum* Boiss. a uma nova secção. A análise meiótica de taxons brasileiros da secção *Axonopus*, série *Axonopus*, do gênero *Axonopus* (Poaceae) permitiu a nítida distinção de espécies silvestres meioticamente estáveis, em relação aos híbridos naturais esporadicamente formados entre elas, em áreas de simpatria, em distintos níveis de ploidia (Hickenbick *et al.*, 1975).

Nas leguminosas, Conterato & Schifino-Wittmann (2006) confirmaram a regularidade da meiose de espécies silvestres brasileiras de *Lupinus* pelo índice meiótico, estimativas de viabilidade de grão de pólen e configurações cromossômicas. Newell & Hymowitz (1983) analisaram espécies diplóides de *Glycine* e seus híbridos, chamando a atenção para o fato de algumas plantas híbridas não atingirem a floração, o que impede a

análise de sua meiose. Grant *et al.* (1984) deram seqüência à análise de espécies e híbridos de *Glycine* e segregaram as espécies parentais em grupos de similaridade. Somaroo & Grant (1972) analisaram comparativamente as configurações meióticas de sete espécies diplóides de *Lotus* e 16 combinações híbridas, com base na morfologia dos bivalentes. Estes autores enfatizam que a simples constatação de pareamento pode ser enganadora, já que ainda pode esconder alterações cromossômicas estruturais. Além disso, mostraram que, em seus híbridos, a fertilidade de pólen não foi associada às irregularidades meióticas observadas, podendo resultar de controle genotípico.

Em *Arachis*, Ressler & Gregory (1979) analisaram a meiose de três espécies diplóides da secção *Arachis* portadoras do par “A” e seus híbridos, demonstrando a grande afinidade, pela alta frequência de pareamento completo (formação de 10 bivalentes por célula). Lavia *et al.* (2001) estudaram a meiose de representantes das secções *Procumbentes* e *Arachis*, ambas em foco na presente revisão da posição taxonômica de *A. vallsii*. As espécies da secção *Arachis* foram divididas em dois grupos, pela presença ou ausência do par cromossômico “A”, tão evidente em meiose, quanto em análises mitóticas anteriores (Fernández & Krapovickas, 1994). Rodrigues *et al.* (2004) publicaram as primeiras informações meióticas de outras quatro espécies da secção *Arachis*, evidenciando alguma irregularidade em *A. benensis*. Os autores também chamam a atenção para a boa distinção do par cromossômico “A” em meiose, o que favorece a análise de alotetraplóides.

3. OBJETIVOS

Contribuir para um melhor conhecimento taxonômico da estrutura sistemática do gênero *Arachis*, a partir do estudo anatômico comparativo entre algumas espécies e híbridos obtidos, nos níveis citológicos diplóide e tetraplóide, da secção *Arachis*.

3.1 Objetivos específicos

A – Identificar caracteres semelhantes e distintivos entre as espécies estudadas e seus respectivos híbridos;

B – Contribuir para o esclarecimento das relações de afinidade de *A. ipaënsis*, espécie boliviana associada à origem de *A. hypogaea*, e *A. magna*, da Bolívia e do Brasil;

C – Estimar a viabilidade polínica de algumas espécies e híbridos interespecíficos de *Arachis* da secção *Arachis*;

D – Discriminar as possíveis plantas maternas dos híbridos diplóides de *A. ipaënsis* x *A. magna*;

E – Avaliar alguns caracteres organográficos de indivíduos híbridos e seus progenitores;

F – Estudar e comparar a anatomia foliar de espécies e híbridos de *Arachis* da secção *Arachis*;

G – Avaliar a meiose para alguns indivíduos do gênero *Arachis*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Espécies e híbridos analisados

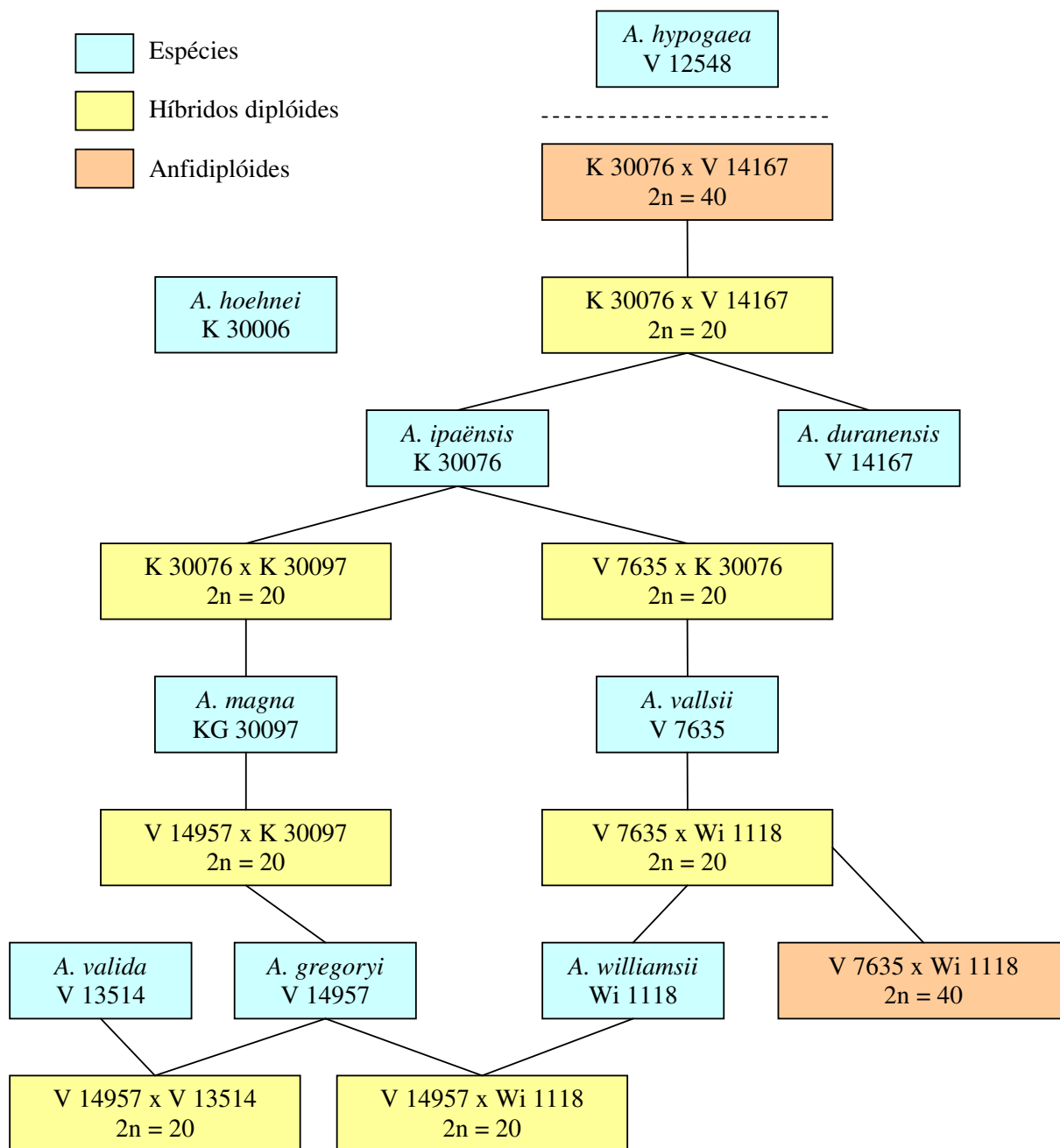


Figura 4: Diagrama esquemático das espécies e híbridos estudados.

Os experimentos realizados utilizaram germoplasma de espécies e de híbridos do gênero *Arachis*, selecionados entre os já disponíveis no Banco Ativo de Germoplasma de *Arachis* spp. (BAG *Arachis*), da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Embrapa/Cenargen), em Brasília, onde foram mantidos como plantas vivas em telados.

Para o presente trabalho foram utilizadas todas as espécies e híbridos interespecíficos indicados no esquema ilustrado na Figura 4.

4.2 Germinação de sementes

Para a obtenção de plantas de prováveis híbridos resultantes do cruzamento entre *A. ipaënsis* K 30076 e *A. magna* K 30097 fez-se necessário a germinação de sementes. Estas sementes resultaram da geração F1 de plantas híbridas e foram cedidas pelo pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Dr. Marcos Aparecido Gimenes. Primeiramente, foram colocadas para germinar dez sementes referentes a este cruzamento, e posteriormente foram germinadas mais dez. Destas, dezenove plantas são mantidas vivas em condições de telado.

Oito sementes de *A. hoehnei* K 30006 também foram colocadas para germinar já que este acesso não foi encontrado disponível no telado de *Arachis* na Embrapa Cenargen. Além destas, para a espécie *A. ipaënsis* K 30076 foram colocadas para germinar treze sementes.

Para o anfidiplóide obtido através de duplicação do híbrido diplóide entre *A. vallsii* x *A. williamsii*, foram colocadas para germinar duas de suas sementes. As sementes deste anfidiplóide foram cedidas pela pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Dr^a. Alessandra Pereira Fávero. Para essas sementes foi acrescentado de duas a cinco gotas de solução de Ethrel no papel Germitest.

Para a germinação destas sementes adotou-se o seguinte protocolo:

I – Seleção das sementes mantidas e conservadas em Câmara Fria à 10° C, como segmentos de frutos isolados;

II – Em seguida, estas foram retiradas do segmento de fruto e lavadas em água destilada;

III – As sementes foram colocadas para germinar em papel Germitest embebido de água destilada. Quando necessário retirou-se o tegumento das sementes;

IV – O conjunto de sementes em papel Germitest foi mantido em Câmara de Germinação com temperatura controlada a 28 °C e com fotoperíodo de 12 horas.

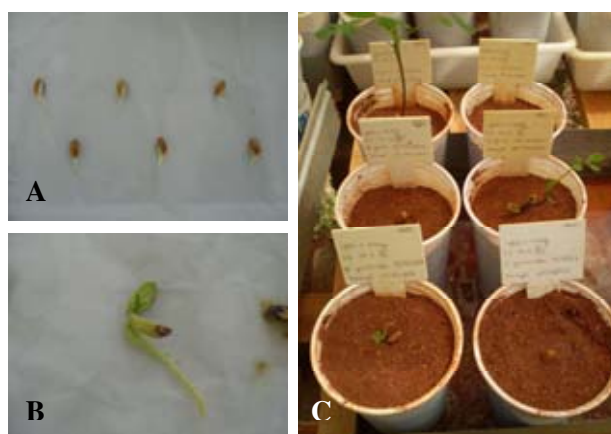


Figura 5: (A) e (B): Germinação de sementes em papel Germitest; (C): Manutenção das plantas jovens em telado.

As condições ideais adotadas para a germinação de sementes seguiram protocolos localmente utilizados para *A. hypogaea* (Peñaloza & Valls, 2005).

Quando as sementes germinadas, incluindo o hipocótilo e raiz primária, atingiram um comprimento superior a 3 cm, aproximadamente e podendo variar, promoveu-se o transplante dessas para copos plásticos com solo e areia (1:1). As plântulas jovens foram

mantidas em copos plásticos com solo e areia na mesma proporção em estufa adaptada no telado de *Arachis*, na Embrapa Cenargen. Com o desenvolvimento e conseqüente crescimento das plantas jovens realizaram-se os transplantes destas para vasos de cimento (floreiras) e de plástico com o mesmo tipo de substrato, onde são mantidas até o momento.

4.3 Viabilidade de grão de pólen por coloração

A coloração de grão do pólen foi realizada para se estimar a viabilidade destes grãos, o que sugere se uma planta pode ou não ser considerada fértil. As plantas envolvidas nesta etapa da pesquisa abrangem aquelas que tiveram suas sementes germinadas, além de, uma planta de *A. hypogaea* V 12548 e uma de *A. duranensis* V 14167. Nesta etapa foram analisados grãos de pólen de 40 plantas.

Para a coloração de grão de pólen adotou-se o seguinte procedimento:

I – A coleta das flores foi realizada em copos plásticos com uma lâmina de água destilada (para evitar ressecamento) entre 8h30 e 9h30 da manhã;

II – As flores foram abertas e suas anteras foram maceradas sob uma lâmina com carmim acético glicerinado (1:1). Esta etapa foi realizada no Laboratório de Citogenética Vegetal da Embrapa Cenargen;

III – As lâminas produzidas foram mantidas à temperatura ambiente sobre a bancada por, no mínimo, uma hora;

IV – Por fim, analisou-se a coloração dos grãos de pólen sob microscópio óptico e com o auxílio de um contador de laboratório. A contagem foi realizada por amostragem ao acaso das lâminas e os grãos de pólen foram avaliados em duas categorias: corados e não corados.

A coleta das flores foi feita durante os meses de fevereiro e maio de 2008, e de forma aleatória. Para cada planta analisada nesta etapa da pesquisa foram consideradas sete flores coletadas no menor período de tempo possível de acordo com o florescimento das plantas. Dentre estas, foram descartados o menor valor e o maior valor encontrados nas estimativas de viabilidade de grão de pólen por coloração.

4.4 Análise molecular de prováveis híbridos entre *A. ipaënsis* x *A. magna*

Para garantir a utilização de plantas híbridas neste trabalho fez-se necessária uma identificação molecular dos prováveis híbridos obtidos através do cruzamento entre *A. ipaënsis* e *A. magna*, já que não se tinha certeza se aquelas sementes colocadas para germinar eram originárias de autofecundação maternas ou eram resultado do cruzamento artificial realizado entre essas duas espécies diplóides. Para se discriminar, as possíveis plantas maternas dos híbridos em questão, foram utilizados procedimentos de extração de DNA genômico de folha e a identificação dos híbridos foi realizada por marcadores microssatélites. Esta etapa da pesquisa, em que se fez necessário um estudo utilizando marcadores moleculares, foi realizada no Laboratório de Caracterização Genética Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Nesta fase foram avaliadas as dezenove plantas identificadas como sendo prováveis híbridos resultantes do cruzamento entre *A. ipaënsis* x *A. magna* geração F1. Destas, foram coletadas folhas jovens e frescas utilizadas na extração de DNA genômico que seguiu o seguinte protocolo, adaptado de Ferreira & Grattapaglia (1995):

I – A coleta das folhas frescas foi realizada no período matutino próximo às 10h. Nesta etapa, aproximadamente 200 mg de cada amostra foi alocada em tubos de

microcentrífuga de 2 ml devidamente identificados, que foram armazenados em nitrogênio (N₂) líquido;

II – As amostras de cada tubo com N₂ líquido foram maceradas;

III – Foram adicionados às amostras 700 µl do Tampão 2x CTAB e 2 µl de 2-mercaptoetanol por ml do Tampão. Nesta etapa o material foi mantido incubado em banho-maria a 60° C durante 60 minutos;

IV – Foi adicionado 700 µl de clorofórmio – álcool isoamílico (24:1) e misturou-se até a formação de uma emulsão;

V – O material foi centrifugado a 14.000 rpm por cinco minutos. Depois, a fase aquosa obtida foi transferida para dois novos tubos de microcentrífuga de 1,5 ml (cerca de 300 µl de cada amostra foi transferido para cada um dos tubos);

VI – Foi adicionado 900 µl do tampão de precipitação CTAB e agitaram-se lentamente os tubos. Esta etapa foi seguida de centrifugação a 13.200 rpm por 1,5 minuto.

VII – Descartou-se cuidadosamente o sobrenadante e o pellet com o DNA permaneceu aderido ao fundo dos tubos;

VIII – O DNA dos dois tubos de cada amostra foi ressuspendido com 600 µl de NaCl. As amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por cinco minutos e o sobrenadante transferido para um novo tubo;

IX – Precipitou-se o DNA com 1 ml de etanol absoluto e centrifugou-se a 13.200 rpm por 2 minutos. Logo depois, o sobrenadante foi descartado cuidadosamente;

X – O pellet restante foi lavado por duas vezes com 500 µl de etanol 70% e centrifugou-se as amostras a 13.200 rpm por 1,5 minuto;

XI – Foi feita uma rápida centrifugação (*spin*) e o pellet foi colocado para secar a temperatura ambiente por no mínimo 12 horas;

XII – Por fim, ressuspendeu-se o DNA com 50 µl de TE e RNase (1 mg/ml). Esse material foi incubado à 37° C por aproximadamente 60 minutos.

A quantificação de DNA genômico foi estimada pelo uso de géis de agarose a 1% com corrida a 90 W por 40 minutos. Nesta etapa foram utilizados dois marcadores moleculares de massa correspondentes à λ 50 ng/µl e λ 100 ng/µl. Ao final deste procedimento o DNA das amostras foi diluído para uma nova concentração de 2,5 ng/µl. Os géis de agarose foram documentados sob luz ultravioleta.

A reação de amplificação de DNA (reação de polimerase em cadeia – PCR) teve um volume final de 13 µl por poço no gel. Os reagentes foram misturados separadamente do DNA. Cada reação continha 153 µl de água estéril; 117 µl de Tp10x; 13,5 µl de MgCl₂; 117 µl de dNTP; 117 µl de BSA (*bovine serum albumine*) e 22,5 µl de Taq DNA Polimerase. Ao final foram adicionados 4 µl de *primer* e 3 µl de DNA.

Os *primers* utilizados neste trabalho foram cedidos pelo pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Dr. Márcio de Carvalho Moretzsohn. São eles: TC3B5, TC1D2, PM24, TC5C5, RN27 A10, TC1A2, Pseq 5G9 e TC7H11.

Utilizou-se gel de poliacrilamida para a distinção entre indivíduos por polimorfismo entre marcadores microssatélites. Os protocolos de preparo deste gel e da coloração com nitrato de prata foram adaptados de Bassam *et al.* (1991) e Creste *et al.* (2001).

A utilização das placas onde o gel de poliacrilamida correu envolveu o preparo do Bind e do Repel. Limpou-se por duas vezes a placa de vidro com 995 µl de etanol, 10 µl de ácido acético e 6 µl de bind silane. Esperou-se secar por aproximadamente cinco minutos e, então, a placa foi lavada com etanol. Foi preparado o Repel para a placa de acrílico, onde foi aplicado 1 ml de Rain X e esperou-se secar por cinco minutos. Esta placa foi lavada com água destilada.

As placas foram montadas e niveladas para a eletroforese. Para a produção do gel de poliacrilamida misturou-se 100 ml de acrilamida (5%) a 666 µl de APS (10%). Esta solução foi vertida com auxílio de uma seringa nas placas. Esperaram-se aproximadamente duas horas para a completa polimerização do gel.

Foram feitas pré-corridas para os géis por no mínimo 45 minutos a 90 W. Às amostras que foram quantificadas acrescentou-se 3 µl de solução tampão formamida e em seguida esse material foi desnaturado no termociclador de placa à 95° C por cinco minutos. Na seqüência, as amostras foram mantidas no gelo até a aplicação no gel. A eletroforese ocorreu a 90 W e para o primeiro gel durou 50 minutos; para o segundo gel durou 1h15.

A coloração do gel de poliacrilamida foi realizada com a exposição deste às seguintes soluções: (1.a) fixador por dez minutos em agitador; (1.b) lavagem em água destilada por um minuto; (2.a) oxidação por três minutos em agitador; (2.b) lavagem em água destilada por um minuto; (3.a) coloração em solução de nitrato de prata por 20 minutos; (3.b) lavagem em água destilada por 30 segundos por duas vezes consecutivas; (4) revelador por aproximadamente três minutos; (5.a) solução STOP por cinco minutos; (5.b) lavagem em água destilada por um minuto. As placas foram colocadas para secar ao ar livre antes de se obter as imagens digitalizadas do gel com auxílio de scanner e do programa EPSON Scan II32.

4.5 Descritores organográficos

Foram avaliados alguns caracteres organográficos de acordo com o uso de descritores comumente empregados para espécies de *Arachis* (Veiga *et al.*, 1986; IBPGR, 1990; Monçato, 1995; Fávero, 2004; Custódio, 2005). Os dados morfológicos foram

obtidos dos indivíduos híbridos e seus progenitores já abordados nesta pesquisa. As medições foram realizadas com auxílio de paquímetro digital.

As características morfológicas foram observadas no ramo principal e em um dos ramos cotiledonares de todas as plantas em estudo. Para cada espécie e híbrido, o número de plantas empregadas para fazer as medições variou entre uma e três. Utilizou-se uma das últimas folhas expandidas de cada ramo para as medições. Os caracteres observados incluíram: comprimento e largura de folíolos distais e proximais esquerdo, e comprimento e espessura de pecíolo.

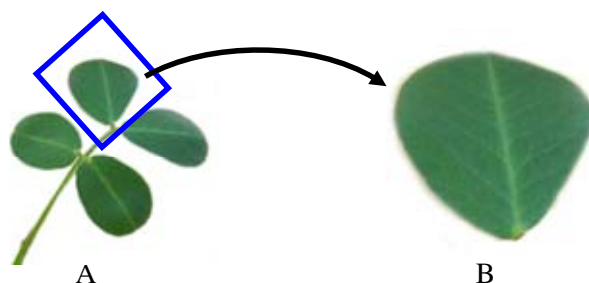


Figura 6: Folíolos utilizados nas análises descritivas organográficas. (A) Folha inteira; (B) Folíolo utilizado nas medições.

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística e foram calculados: a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação.

4.6 Anatomia

As análises anatômicas foram realizadas no Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade de Brasília, seguindo os protocolos convencionais. Os materiais utilizados nesta etapa do trabalho receberam numerações de acordo com a Tabela 4.

Para a coleta das folhas utilizou-se o seguinte padrão: folhas totalmente expandidas entre o segundo e terceiro entre nó, e aproximadamente do mesmo tamanho. Tiveram preferência nos cortes anatômicos transversais as regiões medianas do folíolo superior esquerdo das folhas, e aqueles que não apresentavam nenhum tipo de injúria (Figura 6).

As amostras de folha foram coletadas e fixadas em solução de FAA 70 (90 ml de etanol 70%; 5 ml de ácido acético glacial; 5 ml de formaldeído). Estas amostras foram mantidas nessa solução por aproximadamente 24 horas e armazenadas em solução de etanol 70% à temperatura ambiente.

Tabela 4: Identificação dos materiais utilizados no estudo anatômico foliar. Brasília, 2008.

Nº	Indivíduos	Acessos	2n
1	<i>Arachis ipaënsis</i>	K 30076	20
2	<i>Arachis duranensis</i>	V 14167	20
3	<i>Arachis ipaënsis</i> x <i>Arachis duranensis</i>	K 30076 x V 14167	20
4	<i>Arachis ipaënsis</i> x <i>Arachis duranensis</i>	K 30076 x V 14167	40
5	<i>Arachis hypogaea</i>	V 12548	40
6	<i>Arachis hoehnei</i>	K 30006	20
7	<i>Arachis vallsii</i>	V 7635	20
8	<i>Arachis gregoryi</i>	V 14957	20
9	<i>Arachis gregoryi</i> x <i>Arachis magna</i>	V 14957 x K 30097	20
10	<i>Arachis vallsii</i> x <i>Arachis ipaënsis</i>	V 7635 x K 30076	20
11	<i>Arachis williamsii</i>	Wi 1118	20
12	<i>Arachis gregoryi</i> x <i>Arachis williamsii</i>	V 14957 x Wi 1118	20
13	<i>Arachis vallsii</i> x <i>Arachis williamsii</i>	V 7635 x Wi 1118	20
14	<i>Arachis valida</i>	V 13514	20
15	<i>Arachis gregoryi</i> x <i>Arachis valida</i>	V 14957 x V 13514	20
16	<i>Arachis ipaënsis</i> x <i>Arachis magna</i>	K 30076 x K 30097	20
17	<i>Arachis magna</i>	K 30097	20
18	<i>Arachis vallsii</i> x <i>Arachis williamsii</i>	V 7635 x Wi 1118	40

Abreviaturas: N^o = número; 2n = número de cromossomos.

Coletores: K = A. Krapovickas e colaboradores; V = J. F. M. Valls e colaboradores;
Wi = D. E. Williams e colaboradores.

Os cortes transversais das lâminas foliolares realizados à mão livre, foram feitos com o auxílio do micrótomo de mesa e lâminas de alto desempenho específicas. Utilizou-se isopor como suporte para as amostras na realização dos cortes. Para a observação ao microscópio destes cortes foi necessária a utilização da técnica de clareamento, em que os cortes mais finos foram: (1) imersos em solução de hipoclorito de sódio 10 ou 20%, por aproximadamente 15 minutos ou até o material ficar transparente; (2) colocados em solução de hipoclorito 50% por 5 – 10 minutos; (3) lavados em água destilada de 3 – 5 vezes, por 2 – 3 minutos a cada lavagem; (4) colocados em etanol 50% por aproximadamente 1 minuto; e, por fim, (5) corados com solução alcoólica de azul de alcian e safranina (4:1) por cerca de 20 segundos, acompanhando a tonalidade da amostra. Após esse procedimento, o material foi lavado em álcool comercial e os cortes foram imersos em solução de etanol 100% e acetato de butila nas seguintes proporções: 1:3, 1:1 e 1:3. Ao final, os cortes foram imersos em acetato de butila puro e as lâminas foram montadas em verniz vitral incolor (Paiva *et al.* 2006) ou resina.

Para os cortes transversais das lâminas foliolares realizados no micrótomo rotativo foi realizada a inclusão em parafina conforme o procedimento (Figueiredo & Graciano-Ribeiro, 2000): (1) desidratação elítica gradual e remoção gradual da água e dos fixadores, com preenchimento dos espaços com etanol, (2) infiltração e embebedimento do tecido em parafina, (3) microtomia e distensão dos cortes, (4) remoção da parafina e coloração, e (5) montagem em meio permanente com resina ou verniz vitral incolor (Paiva *et al.* 2006). A espessura dos cortes transversais realizados em micrótomo rotativo variaram de 0,6 µm a 12 µm.

A inclusão do material vegetal em historresina foi realizada de acordo com o seguinte procedimento: (1) desidratação etílica gradual (etanol 70%, 95% e 100% por duas horas em cada etapa), (2) pré-infiltração em etanol absoluto e resina líquida (1:1) por duas

horas no vácuo, (3) infiltração com solução Meio A (meio A' – 100 ml de resina líquida para 0,9 g de pó ativador, ou meio A'' – 50 ml de resina líquida para 0,5 g de pó ativador) entre 5 a 24 horas no vácuo, (4) polimerização em solução Meio B (meio B' – 25 ml de meio A' para 1 ml de endurecedor / Hardener, ou meio B'' – 15 ml de meio A'' para 1 ml de endurecedor / Hardener) e (5) emblocamento do material em molde de silicone. A placa de molde foi mantida em estufa de 40° C e 70° C até o endurecimento do material. A coloração das lâminas obtidas por essa técnica foi realizada de duas formas: (1) coloração aquosa dupla com safranina 1% e azul de alcian 1%, ou (2) coloração policromática com azul de toluidina 1%. A montagem das lâminas em meio permanente foi feita com verniz vitral (Paiva *et al.* 2006).

Após a obtenção das lâminas, os melhores cortes transversais foram selecionados, fotografados e se capturou imagens das estruturas anatômicas com auxílio do fotomicroscópio Axioskop Zeiss e do programa Motic Images Plus 2.0.

4.7 Histoquímica

Estudos histoquímicos foram realizados com amostras de cortes transversais de folhas frescas, dos mesmos materiais utilizados na descrição anatômica, feitos à mão livre em micrótomo de mesa com o auxílio de lâminas de alto desempenho para micrótomo. Foram obtidas amostras de todas as espécies e híbridos envolvidos na pesquisa. Estes estudos foram realizados no Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade de Brasília. O material foi submetido aos seguintes reagentes histoquímicos específicos:

- (1) Sudan IV – para evidenciar cutina, suberina e ceras (Jensen, 1962; Gerlach, 1984);
- (2) Vermelho de rutênio – para evidenciar mucilagem (Langeron, 1949);

(3) Vermelho congo – também utilizado para detecção de mucilagem (Johansen, 1940; Dop & Gautié, 1928);

(4) Ácido tânico / Cloreto de ferro III – para confirmar a presença de mucilagem (Pizzolato & Lillie, 1973);

(5) Azul de metileno 1% com bórax – para confirmar a presença de corpos silicosos.

Para os testes realizados com Sudan IV foi adotado o seguinte protocolo: (1) coloração dos cortes transversais com Sudan IV em vidro relógio por 20 minutos; (2) lavagem das amostras em etanol 90%; (3) montagem das lâminas e (4) retirada do etanol com papel filtro e introdução de glicerina 50%. O vermelho de rutênio foi utilizado a uma concentração de 0,001 g para 10 ml de água destilada por 10 a 15 minutos para cada amostra. Neste procedimento não se utilizou lavagem dos cortes em etanol. O vermelho congo, a uma concentração de 1%, e o azul de metileno foram empregados por cinco minutos. As lâminas destes dois últimos testes foram mantidas em glicerina 50%. O protocolo utilizado com o reagente histoquímico (4) foi: (a) imersão dos cortes em ácido tânico 50% em etanol durante 10 e 20 minutos; (b) lavagem em água destilada; (c) imersão das amostras em cloreto férrico 3% e 10%; e (d) lavagem rápida em água destilada antes da montagem das lâminas. As lâminas utilizadas em todos os testes histoquímicos continham quatro cortes transversais de folíolo para cada indivíduo estudado.

4.8 Análise meiótica

Os estudos meióticos foram realizados no Laboratório de Citogenética da Embrapa Cenargen, incluíram a participação de indivíduos híbridos (Tabela 5) e seguiram os protocolos convencionais. Os botões florais foram coletados em variados horários ao longo do dia, sendo que as coletas se concentraram entre os horários de 7h e 10h da manhã, e

fixados em solução Carnoy (etanol absoluto: ácido acético glacial, 3:1, v/v). As amostras foram mantidas nesta solução por no mínimo 2h15 e, além disso, todo o material coletado sofreu uma limpeza, onde foram retiradas as estípulas que recobrem os jovens botões florais. Após esse procedimento, as amostras foram armazenadas, em vidros pequenos devidamente identificados, com solução de etanol 70% à 4° C.

Tabela 5: Indivíduos analisados quanto à meiose. Brasília, 2008.

Híbrido diplóide	Acessos
<i>A. ipaënsis</i> x <i>A. duranensis</i>	K 30076 x V 14167
<i>A. ipaënsis</i> x <i>A. magna</i>	K 30076 x K 30097
<i>A. ipaënsis</i> x <i>A. villosa</i>	K 30076 x V 12812
<i>A. gregoryi</i> x <i>A. linearifolia</i>	V 6389 x V 9401
<i>A. gregoryi</i> x <i>A. stenosperma</i>	V 6389 x V 12488
<i>A. gregoryi</i> x <i>A. villosa</i>	V 6389 x V12812
<i>A. vallsii</i> x <i>A. williamsii</i>	V 7635 x Wi 1118

Coletores: K = A. Krapovickas e colaboradores; V = J. F. M. Valls e colaboradores; Wi = D. E. Williams e colaboradores.

Para as análises meióticas em microscópio óptico Zeiss, os botões foram abertos individualmente e suas anteras, maceradas e coradas uma a uma com carmim acético 2% ouorceína acética 1% (Lavia *et al.*, 2001). Para cada lâmina foi utilizada apenas uma antera do material coletado afim de que se tenham bons preparados com o mínimo possível de resto celular de parede das anteras.

Essas análises se concentraram no pareamento dos cromossomos em diacinese e em metáfase I e na segregação desses em anáfase e em telófase I. As lâminas que apresentarem resultados representativos e com boas divisões meióticas foram fotografadas e preservadas como permanentes.

A interpretação dos resultados das análises meióticas levou em conta as configurações cromossômicas evidenciadas ao final da prófase e ao longo da diacinese (análise do pareamento cromossômico) e durante a telófase e a anáfase (segregação cromossômica). Além disso, o índice meiótico, ou seja, a percentagem de tétrades normais – que reflete a estabilidade meiótica de um organismo (Schifino-Wittmann, 2004) –, as associações meióticas e a estimativa da viabilidade dos grãos de pólen (contagem de grão de pólen corado) de alguns dos indivíduos em estudo, também foram dados analisados.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Germinação de sementes

No processo de aquisição de plantas vivas para este estudo, através da utilização do germoplasma de *Arachis*, obteve-se 19 plantas identificadas como prováveis híbridos diplóides de *A. ipaënsis* x *A. magna*. Além dessas, todas as oito sementes de *A. hoehnei* colocadas para germinar originaram plântulas.

Para a espécie *A. ipaënsis*, apenas cinco plantas originárias de suas treze sementes se mantêm vivas. E por fim, nenhuma das duas sementes do anfidiplóide entre *A. vallsii* x *A. williamsii* sobreviveram. Estas, apesar de sobreviverem com um crescimento estagnado, com as plúmulas e cotilédones abertos em evidência, por mais de 30 dias sob condições de telado, não desenvolveram raízes adventícias e morreram (Figura 7).



Figura 7: Estágios de crescimento do anfidiplóide entre *Arachis vallsii* x *A. williamsii* após sua germinação.

5.2 Viabilidade de grão de pólen por coloração

A estimativa da viabilidade de grão de pólen por coloração com carmim acético glicerinado indicou para a maioria dos indivíduos estudados estimativas que apontam uma alta viabilidade polínica. É importante lembrar que nesta avaliação foram utilizadas sete flores de cada material analisado. Esta técnica é considerada uma forma indireta de se identificar a viabilidade de grãos de pólen já que a avaliação pela coloração e formato dos grãos de pólen é relativa. Durante este procedimento foram avaliadas aproximadamente 300 flores entre os meses de fevereiro e maio de 2008, sendo o mês de março (quando foram coletadas e analisadas 127 flores) o de maior intensidade de floração. Os valores médios encontrados para cada um dos exemplares analisados podem ser vistos na Tabela 6.

Para os indivíduos cujos dados não aparecem na Tabela 5, obtiveram-se informações insuficientes para se estimar a viabilidade polínica. É notável que para todos os casos analisados obtiveram-se estimativas da viabilidade polínica acima de 80%. A alta taxa de viabilidade de grão de pólen, além de indicar uma provável terminalização meiótica regular, pode, também, apontar alguma proximidade entre as espécies genitoras. Estudos recentes correlacionam a alta taxa de viabilidade polínica com a ocorrência de meiose regular para algumas espécies do gênero *Arachis* (Oliveira & Valls, 2003). A alta viabilidade de grão de pólen de híbridos entre *A. ipaënsis* e *A. magna* já havia sido notificada por outros autores (Simpson & Faries, 2001) e no presente trabalho manteve-se acima de 85% nos híbridos diplóides identificados por marcadores moleculares como sendo resultantes de hibridação artificial (assunto também abordado no tópico 5.3 do presente trabalho).

Tabela 6: Valores médios da viabilidade dos grãos de pólen por coloração. Brasília, 2008.

Indivíduos analisados		Viabilidade de grão de pólen (%)	Desvio Padrão (%)
<i>A. hypogaea</i>		84,80	17,17
<i>A. duranensis</i>		93,86	3,15
<i>A. ipaënsis</i> x <i>A. duranensis</i> 2n = 40		90,43	6,45
<i>A. ipaënsis</i> x <i>A. magna</i> 2n = 20	Planta 01 A	99,51	0,36
	Planta 02 A	99,60	0,43
	Planta 03 A	98,71	0,99
	Planta 04 A	98,46	1,01
	Planta 05 A	-	-
	Planta 01 B	90,66	4,88
	Planta 02 B	89,94	2,32
	Planta 03 B	-	-
	Planta 04 B	-	-
	Planta 05 B	-	-
	Planta 06 B	-	-
	Planta 07 B	-	-
	Planta 08 B	-	-
	Planta 09 B	-	-
	Planta 10 B ¹	85,06	6,34
	Planta 11 B	99,17	0,31
	Planta 12 B	92,80	2,01
	Planta 13 B	98,80	0,43
	Planta 14 B	99,06	0,34
Planta 15 B ¹	98,40	1,14	
Planta 16 B	92,69	3,66	
Planta 17 B	-	-	
Planta 18 B	99,31	0,43	
Planta 19 B ¹	98,83	0,51	
<i>A. hoehnei</i>	Planta 01	98,86	1,00
	Planta 02	99,00	0,62
	Planta 03	99,46	0,46
	Planta 04	99,40	0,75
	Planta 05	99,34	0,32
	Planta 06	98,63	1,13
	Planta 07	99,34	0,63
	Planta 08	99,29	0,45
<i>A. ipaënsis</i>	Planta 01	-	-
	Planta 02	80,26	7,46
	Planta 03	98,51	1,66
	Planta 04	96,71	1,71
	Planta 05	93,49	10,89

¹: Híbridos identificados por marcadores moleculares como resultantes de hibridação artificial.

A menor taxa de viabilidade polínica foi obtida em uma das plantas analisadas de *A. ipaënsis*. Entretanto, nem por isso foi considerada uma viabilidade baixa já que esta manteve-se acima de 80%.

Segundo Fávero *et al.* (2006), a viabilidade polínica do anfidiplóide *A. ipaënsis* x *A. duranensis* ($2n = 40$ cromossomos) se aproxima dos 98%. Os mesmos autores ainda afirmam que esse híbrido aponta para semelhanças evolutivas entre espécies silvestres e o amendoim cultivado, *A. hypogaea*. Neste estudo, estimou-se uma taxa de viabilidade de grão de pólen acima de 90%, o que corrobora estudos anteriores.

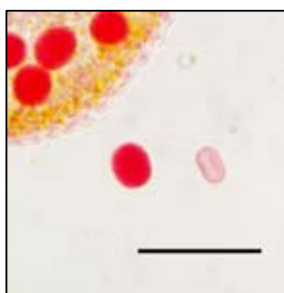


Figura 8: Grão de pólen corado e não corado em *Arachis hoehnei*. Barra = 1mm.

Arachis hypogaea apresentou o maior desvio padrão, o que indica que para essa espécie obteve-se uma maior dispersão dos valores referentes às taxas de viabilidade polínica. Em contrapartida, as plantas de *A. hoehnei* apresentaram desvio padrão abaixo de 1%, que aponta uma amostra bastante homogênea quanto aos valores obtidos para a avaliação da viabilidade de grão de pólen. Além dessas, algumas plantas do híbrido diplóide *A. ipaënsis* x *A. magna* também se comportaram da mesma forma.

5.3 Análise molecular de prováveis híbridos entre *A. ipaënsis* x *A. magna*

A identificação dos híbridos diplóides *A. ipaënsis* x *A. magna* com a utilização de microssatélites foi eficiente para se distinguir seguramente três plantas híbridas que correspondem àquelas identificadas como 10B, 15B e 19B (Tabela 6). A planta 10B foi identificada como sendo um híbrido diplóide de *A. ipaënsis* x *A. magna* em 5 *primers* (dentre eles: RN27 A10, TC1A2 e Pseq 5G9), a planta 15B, em 4 *primers* (dentre eles: RN27 A10 e TC1A2) e a planta 19B, em 3 *primers* (RN27 A10, TC1A2 e Pseq 5G9). Estes resultados garantem a origem artificial destes híbridos e descartam qualquer possibilidade destes serem oriundos de autofecundação da planta mãe.

O gel de agarose utilizado na quantificação do DNA genômico pode ser visualizado na Figura 9.

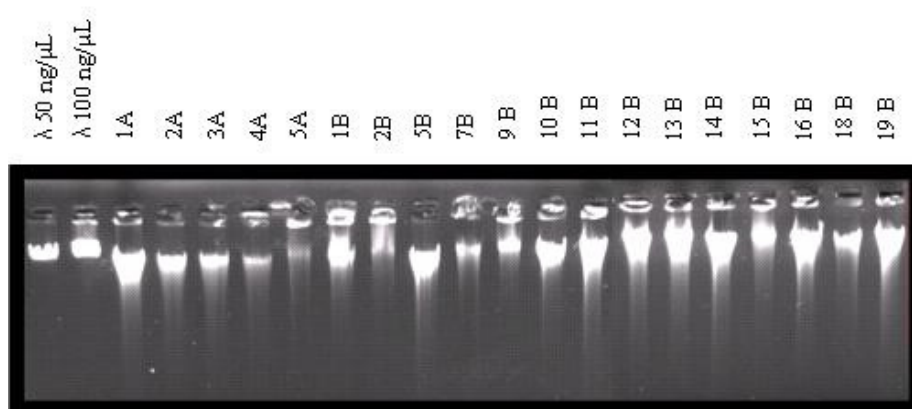


Figura 9: Quantificação do DNA genômico (gel de agarose 1%). (A) e (B): prováveis híbridos diplóides *Arachis ipaënsis* x *A. magna* obtidos por germinação de sementes.

Nem todos os indivíduos avaliados puderam ser identificados quanto à sua origem híbrida diplóide ou maternal, através da utilização de marcadores microssatélites. Alguns *primers* mostraram-se inespecíficos para a identificação via bandas polimórficas. Ainda

restam dúvidas quanto à origem das plantas 1A, 5A, 1B, 2B, 5B, 12B, 14B, 16B e 18B, que foram identificadas em apenas dois *primers*. Para um resultado seguro sobre a distinção dessas plantas quanto a sua origem faz-se necessário a utilização de outros *primers*.

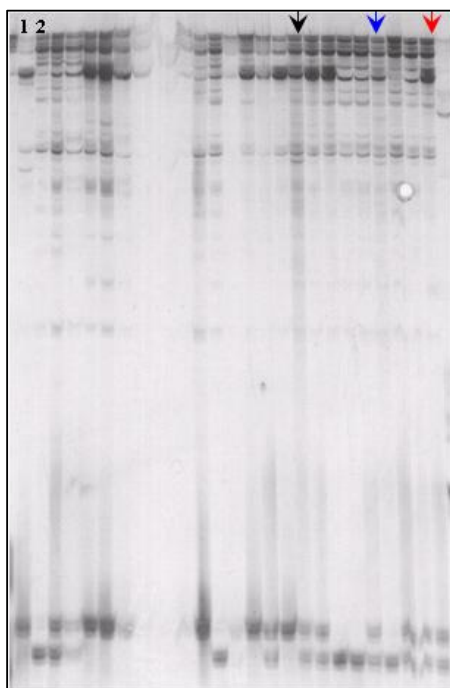


Figura 10: Identificação das três plantas híbridas diplóides *Arachis ipaënsis* x *A. magna* em gel de poliacrilamida em que o *primer* Pseq 5G9 foi utilizado. **1.** *A. ipaënsis* (K 30076); **2.** *A. magna* (K 30097); Seta preta: planta 10B; Seta azul: planta 15B; Seta vermelha: planta 19B.

5.4 Descritores organográficos

Quanto à organografia das plantas neste estudo, observou-se a taxa de variabilidade dos descritores analisados. Para isso, os dados das medições foram tabulados e obtiveram-se as estatísticas relacionadas na Tabela 7.

A escolha dos caracteres morfológicos utilizados neste trabalho teve como base outros estudos descritivos (Monçato, 2000; Fávero, 2004; Custodio, 2005), que além de avaliar a variabilidade das características analisadas dentre os acessos e espécies de *Arachis*, também se concentraram em avaliar alguns outros elementos estatísticos, tal como matrizes de correlação.

Tabela 7: Estatística descritiva de caracteres organográficos das folhas de espécies e híbridos interespecíficos de *Arachis*. Brasília, 2008.

Descritor morfológico das folhas	Média (mm)	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação
Ramo Principal Folíolo Distal Comprimento	34,49	8,81	25,54%
Ramo Principal Folíolo Distal Largura	15,74	3,84	24,38%
Ramo Principal Folíolo Proximal Comprimento	30,10	8,37	27,81%
Ramo Principal Folíolo Proximal Largura	13,13	3,32	25,27%
Ramo Principal Pecíolo Comprimento	29,84	7,19	24,10%
Ramo Principal Pecíolo Espessura	1,41	0,28	19,85%
Ramo Lateral Folíolo Distal Comprimento	27,10	6,28	23,16%
Ramo Lateral Folíolo Distal Largura	15,82	3,40	21,52%
Ramo Lateral Folíolo Proximal Comprimento	23,58	5,96	25,26%
Ramo Lateral Folíolo Proximal Largura	12,91	2,49	19,26%
Ramo Lateral Pecíolo Comprimento	17,51	7,26	41,44%
Ramo Lateral Pecíolo Espessura	1,20	0,18	15,06%

Foi possível notar que o comprimento do pecíolo da folha do ramo lateral é o descritor morfológico que apresentou a maior taxa de variação. Isto pode estar relacionado com as condições de luz em que tais plantas se encontraram, que pode ou não induzir uma

expansão do pecíolo das folhas em busca de luminosidade, além de outros fatores exógenos. Por outro lado, no mesmo ramo, a espessura do pecíolo apresentou o menor coeficiente de variação, dentre as características avaliadas. Também vale notar que a taxa de variação calculada para a espessura do pecíolo no ramo principal foi uma das mais baixas obtidas. Estes resultados indicam que o caráter espessura do pecíolo é, aparentemente, o mais homogêneo dentre os descritores estudados. O baixo desvio padrão encontrado para esse descritor, em ambos os ramos das plantas, da mesma forma, evidencia uma homogeneidade dos valores encontrados para tal característica.

5.5 Anatomia

O trabalho descritivo e comparativo desenvolvido a partir das análises dos cortes transversais de lâminas foliolas (Figura 11) das espécies e híbridos em questão, resultou na identificação de vários caracteres comuns às nove espécies e seus respectivos híbridos estudados.

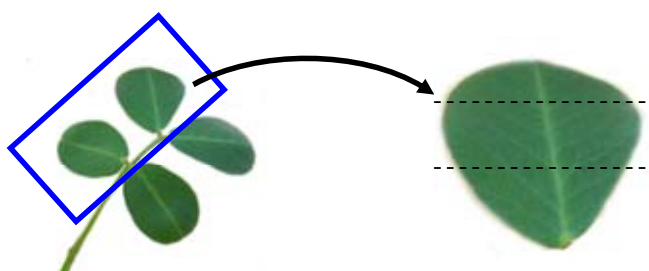


Figura 11: Região do folíolo onde foram realizados os cortes anatômicos transversais.

5.5.1 Descrição da lâmina foliolar

Em todas as espécies e híbridos estudados, os cortes transversais da lâmina foliolar são lineares e abertos. Em secção transversal da lâmina foliar, a epiderme, comumente, apresenta-se uniestratificada. As células epidérmicas possuem tamanhos e formatos irregulares, com paredes retas e paredes periclinais externas revestidas por cutícula em ambas as faces. Sobre as nervuras principais as células epidérmicas possuem tamanhos menores e formatos regulares, além de apresentarem paredes e cutículas mais espessas.

Nota-se uma ornamentação da cutícula (Figura 18-A), evidenciada principalmente em regiões de bordo foliar e da nervura mediana. Essa característica apenas não foi observada nas espécies *A. gregoryi*, *A. hoehnei*, *A. valida*, e nos híbridos diplóides *A. gregoryi* x *A. valida* e *A. vallsii* x *A. williamsii*. Estudos anatômicos descritivos afirmam que, em algumas cultivares de *A. hypogaea*, a cutícula da epiderme uniestratificada pode se apresentar de forma espessa (Veiga *et al.*, 1994).

Todos os exemplares estudados apresentaram uma organização anfiestomática (Figura 18 A-B). Os estômatos encontram-se no mesmo nível das demais células comuns da epiderme. Em todos os casos é notável a presença de amplas câmaras subestomáticas. Estas ocorrem mais comumente ao longo das lâminas foliolares, mas não deixam de aparecer na região da nervura principal, mesmo sendo de menor tamanho. Outra característica comum é o fato de que essas câmaras são bem mais amplas e evidentes na face abaxial do que na face adaxial, aonde chegam a ser de duas a três vezes menores.

Nos cortes transversais de folha, obtidos à mão livre, foi evidenciada a presença de tricomas unisseriados e multicelulares em todas as espécies e híbridos. Neste caso, o fator variante é a quantidade de tricomas encontrados e a localização desses ao longo da lâmina foliar, para cada exemplar estudado. A análise quantitativa destes caracteres deve ser feita

posteriormente, a fim de estimar melhor suas variações. Outro fato importante, notado após a inclusão do material vegetal em historresina, é a ausência das células apicais nos diversos tricomas encontrados. Isto pode ocorrer como uma consequência dos processos de fixação e armazenamento, em que os materiais vegetais são tratados com substâncias que podem degradar certos compostos celulares. É importante a ressaltar a presença de tricomas em *A. vallsii*, evidenciados nos cortes transversais de folha realizados a mão livre. Tal característica ainda não havia sido relatada para essa espécie. A descrição original (Krapovickas & Gregory, 1994) aponta *A. vallsii* como uma espécie que apresenta folíolos glabros, com eventual presença de tricomas apenas nas margens dos folíolos.

Células mucilaginosas foram evidenciadas na face adaxial em todos os materiais analisados, sendo que, para *A. hypogaea*, isto já havia sido relatado anteriormente (Veiga *et al.*, 1994). Os corpos mucilaginosos foram encontrados em formato de cone junto à epiderme voltada para a face adaxial, se expandindo em direção ao parênquima paliádico (Figura 12). Essas células possuem tamanhos distintos que variam desde pequenas, em *A. ipaënsis* e no híbrido diplóide *A. ipaënsis* x *A. duranensis*, até tamanhos que chegam a ocupar $\frac{1}{4}$ do mesofilo foliar, nos híbridos diplóides *A. vallsii* x *A. ipaënsis* e *A. gregoryi* x *A. williamsii*. A maioria dos indivíduos estudados apresentou células com conteúdo mucilaginoso cuja expansão se deu até aproximadamente a metade da região do mesofilo. Além disso, as células de mucilagem apresentaram uma distribuição irregular ao longo de toda a lâmina foliolar. Esse tipo celular não foi encontrado na face abaxial dos folíolos em nenhum dos materiais verificados. Corpos mucilaginosos foram classificados como longos ou curtos para genótipos de *A. hypogaea* (Veiga *et al.*, 1994), sendo que os curtos aparecem em ambas as faces.

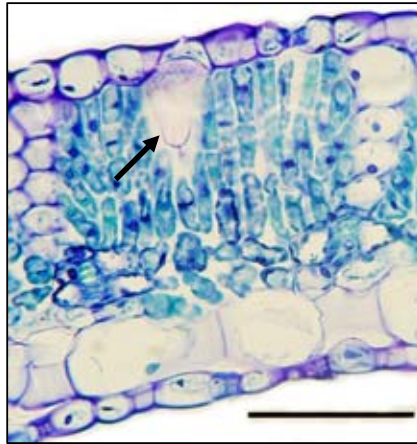


Figura 12: Célula mucilaginosa em evidência na face adaxial (*Arachis hypogaea*).
Barra=1 mm.

A presença de corpos silicosos na epiderme foi evidenciada principalmente nas regiões da nervura principal e de bordo foliar. As espécies *A. hoehnei*, *A. vallsii* e o híbrido diplóide *A. gregoryi* x *A. magna* não apresentaram esse tipo celular. Aparentemente, para *A. magna* e para os híbridos diplóides *A. ipaënsis* x *A. magna* e *A. vallsii* x *A. williamsii*, não foi possível confirmar a presença desta substância. Neste caso, faz-se necessário um estudo histoquímico mais detalhado a fim de confirmar a presença de sílica.

No bordo foliar, é comum que as células da epiderme apresentem um formato regular tabular e um tamanho menor, quando comparadas ao tamanho das células epidérmicas presentes ao longo da lâmina foliolar. Além disso, nesta região são comumente encontrados tricomas unisseriados e multicelulares.

Logo abaixo da epiderme voltada para a face abaxial apresenta-se uma camada de células distintas, a hipoderme, que está possivelmente relacionada à economia hídrica da planta. As células hipodérmicas são bastante amplas quando comparadas com as células epidérmicas comuns, podendo chegar a ocupar um espaço equivalente a aproximadamente de $\frac{1}{3}$ do mesofilo. Em *A. magna* a presença de uma hipoderme mais estreita, próximo a

região do bordo foliar (Figura 13-A) e da nervura principal, é uma característica que a distingue dos demais materiais estudados, inclusive de *A. ipaënsis* e do híbrido diplóide respectivo a essas espécies. Em *A. valida* e no híbrido *A. gregoryi* x *A. williamsii* (Figura 13-B), nota-se um estreitamento dessa camada de células em regiões restritas ao longo da lâmina foliar. Tal característica não foi evidenciada nem nos híbridos em que *A. valida* esteve envolvida e nem nas espécies genitoras do híbrido diplóide *A. gregoryi* x *A. williamsii*.

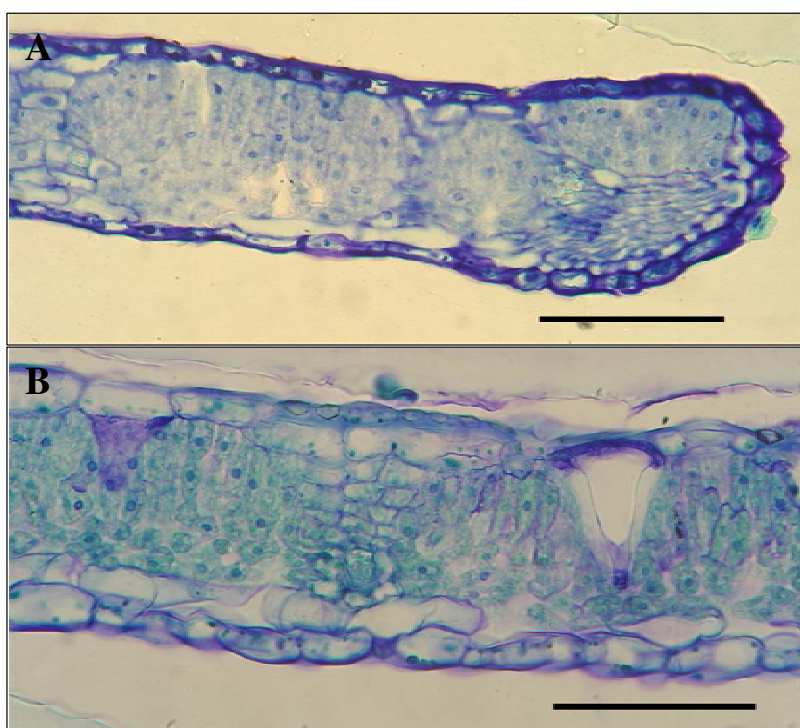


Figura 13: Estreitamento da hipoderme. Barra = 1 mm. (A) Bordo foliar de *Arachis magna*. (B) Mesofilo do híbrido diplóide *A. gregoryi* x *A. williamsii*.

Essa camada de células é evidenciada em toda a lâmina foliolar e possui uma organização uniforme na região da nervura principal. Essa organização nem sempre ocorre ao longo das lâminas foliolares, onde por muitas vezes essas células apresentam paredes

retorcidas e dividem espaços com as amplas câmaras subestomáticas. O formato das células da hipoderme varia de arredondadas até retangulares ao longo da lâmina foliar.

A hipoderme é considerada a estrutura mais comum para armazenamento foliar de água, estando presente em espécies epífitas de Gesneriaceae, Ericaceae, Clusiaceae, Araliaceae e Bromeliaceae (Madison, 1977). Segundo Haberlandt (1914) e Madison (1977), além de armazenar água, a hipoderme exerce um papel importante na economia de calor, especialmente nas epífitas com metabolismo CAM.

Em *A. hoehnei*, foram encontradas células que sugeriram infestação por fungo na região da hipoderme (Figura 14). Isto pode indicar uma possível suscetibilidade dessa espécie a contaminações fungicidas. O fato mencionado sugere estudos fitopatológicos para a averiguação do tipo de fungo encontrado. Fávero (2004) e Ramos (2007) afirmaram que alguns acessos de *A. hoehnei*, dentre os quais está o acesso utilizado na presente pesquisa, apresentaram alta resistência a cercosporioses, manchas causadas por fungos.

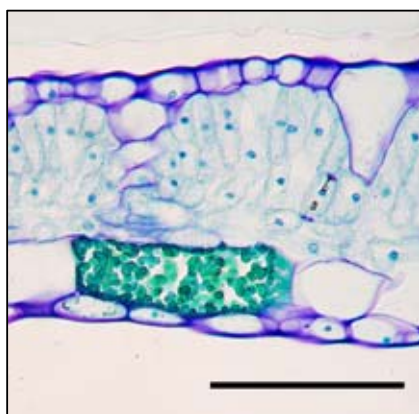


Figura 14: Provável infestação fúngica na hipoderme de *Arachis hoehnei*. Barra = 1 mm.

O mesofilo das espécies e híbridos analisados apresenta, em secção transversal da lâmina foliar, uma organização regular e bilateral, ou seja, dorsiventral, com uma clara distinção entre parênquima paliçádico e parênquima lacunoso. O parênquima paliçádico é

formado por dois, três ou mais extratos de células, que se encontram organizadas de forma compacta, com estreitos espaços intercelulares. As células paliçádicas são curtas, possuem extremidades arredondadas, paredes retas e cloroplastos em sua composição, dispostos na periferia das células.

O parênquima lacunoso é comumente constituído por um ou dois extratos de células amplamente distribuídas. Tais células apresentam formatos irregulares e tamanhos expandidos, o que favorece a formação de numerosos espaços intercelulares, freqüentes ao longo da lâmina foliar. Nestas células também nota-se a presença de cloroplastos dispostos perifericamente para todos os materiais estudados.

No bordo foliar comumente foi encontrado um mesofilo diferenciado em parênquima paliçádico, mais estreito do que o parênquima paliçádico que ocorre ao longo da lâmina foliar, e em um amplo conjunto de fibras de paredes espessas e com pontoações simples.

O bordo foliar tende a ser arredondado para todas as espécies e híbridos estudados, podendo variar quanto ao local de disposição das fibras e forma (Figura 15). Entretanto, é notável que o conjunto de fibras nesta região sempre aparece próximo à periferia do bordo. Nos materiais analisados nota-se a presença de feixe vascular com extensão da bainha parenquimática para face adaxial, com exceção de *A. williamsii*, que não apresentou essa extensão nos cortes obtidos.

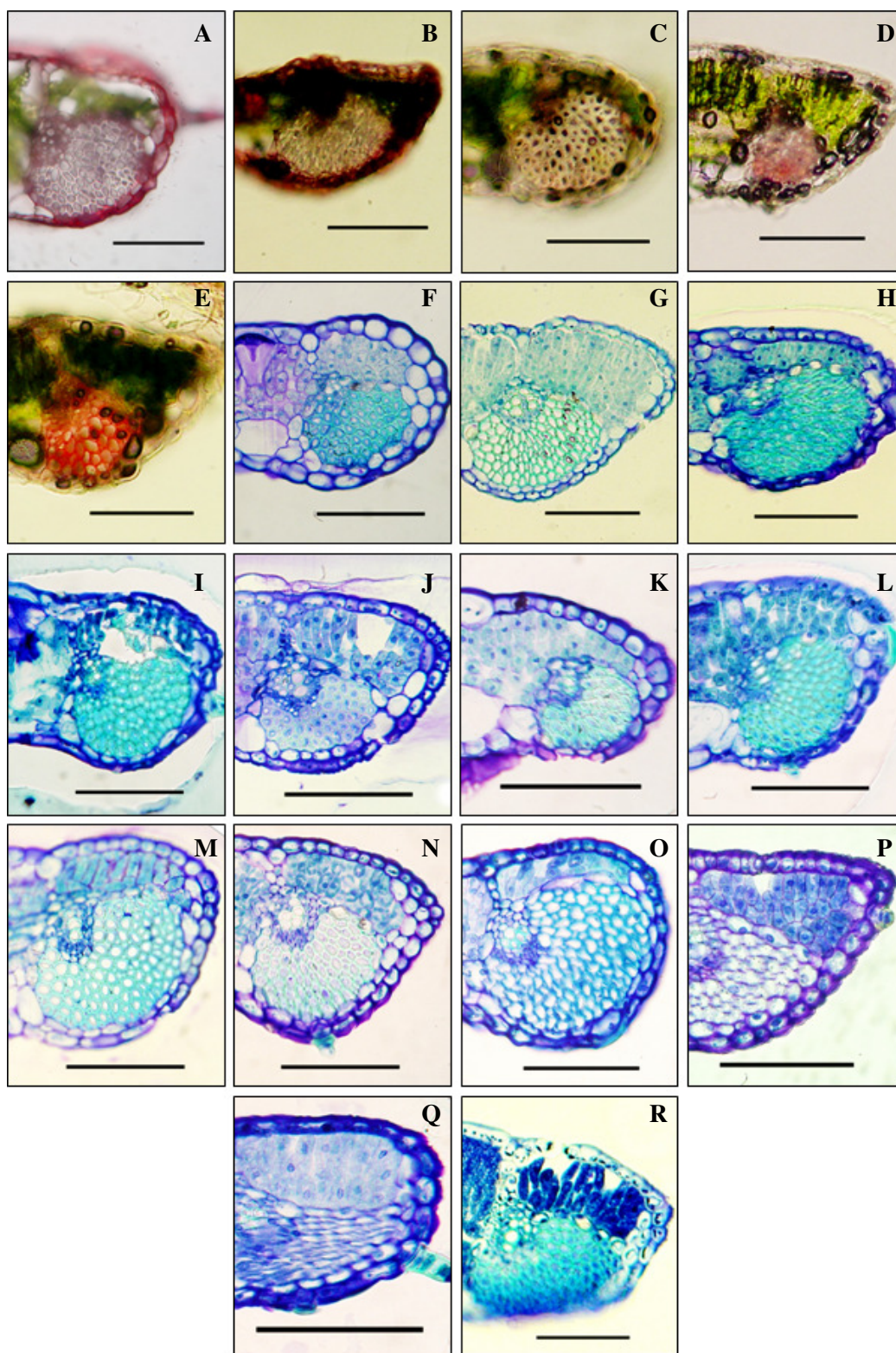


Figura 15: Formato dos bordos foliolares. (A) *Arachis ipaënsis*; (B) *A. duranensis*; (C) *A. ipaënsis* x *A. duranensis* $2n = 20$; (D) *A. ipaënsis* x *A. duranensis* $2n = 40$; (E) *A.*

hypogaea; (F) *A. hoehnei*; (G) *A. vallsii*; (H) *A. gregoryi*; (I) *A. gregoryi* x *A. magna* 2n = 20; (J) *A. vallsii* x *A. ipaënsis* 2n = 20; (K) *A. williamsii*; (L) *A. gregoryi* x *A. williamsii* 2n = 20; (M) *A. vallsii* x *A. williamsii* 2n = 20; (N) *A. valida*; (O) *A. gregoryi* x *A. valida* 2n = 20; (P) *A. ipaënsis* x *A. magna* 2n = 20; (Q) *A. magna*; (R) *A. vallsii* x *A. williamsii* 2n = 40. Cortes transversais de folíolo: A – E, realizados a mão livre; F – R, obtidos com auxílio de micrótopo rotativo. Barra = 1 mm.

A organização do sistema vascular no mesófilo é amplamente distribuída ao longo da lâmina foliar. Os feixes são colaterais e é evidente a formação de feixes de primeira, segunda e terceira ordem (Metcalf, 1960), envoltos por uma bainha de células parenquimáticas que possui extensões celulares em direção à face adaxial da folha, que podem ser bisseriadas ou unisseriadas. Essa bainha pode apresentar cloroplastos em sua composição, fato este, que deve estar relacionado aos processos fotossintéticos desenvolvidos pelas plantas. No feixe vascular de primeira ordem o floema é envolto por fibras de paredes espessas. Os feixes vasculares de terceira ordem podem se apresentar envoltos por bainha parenquimática sem extensões para as faces da folha.

O feixe vascular central, presente na nervura principal, é do tipo arco aberto e pode estar envolto por uma distinta e contínua camada de fibras (em *A. hypogaea*, *A. gregoryi* e no híbrido diplóide *A. ipaënsis* x *A. magna*). Na maioria dos casos essas fibras apresentam-se dispostas em forma descontínua, próximas ao floema no feixe vascular da nervura mediana. Para as espécies *A. magna*, *A. williamsii*, e para os híbridos diplóides *A. ipaënsis* x *A. duranensis* e *A. gregoryi* x *A. williamsii*, não foi evidenciada a existência de fibras na região da nervura principal. Há presença de xilema e floema em crescimento secundário, com evidente presença de câmbio vascular, para alguns dos indivíduos analisados, como *A. hypogaea*, *A. magna* e no híbrido diplóide *A. ipaënsis* x *A. duranensis*. Uma bainha

parênquimática é evidenciada ao redor do feixe colateral e extensões da bainha do feixe são vistas em direção a face adaxial da lâmina foliar, tal como no mesofilo. Essas extensões podem variar de unisseriadas até plurisseriadas, podendo, também, variar em um mesmo indivíduo.

Em secção transversal da lâmina foliar, a nervura mediana apresenta epiderme uniestratificada em ambas as faces. A concavidade da nervura central está voltada para a face abaxial. O formato da concavidade desta região é geralmente semelhante, exceto para a espécie *A. valida*, que se destaca das demais por apresentar um formato distinto e protuberante de nervura principal, no qual suas células são mais volumosas e há um maior número de extratos celulares no parênquima desta região (Figura 16).

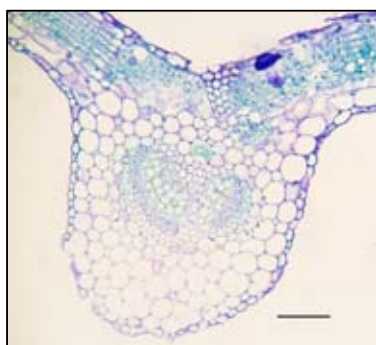


Figura 16: Nervural principal de *Arachis valida*. Barra = 1 mm.

A organização colateral dos tecidos é semelhante à descrição realizada para as outras regiões da folha. O parênquima paliçádico também é composto por poucos extratos celulares e tem organização compacta. Nesta região, foi possível observar a expansão de células parênquimáticas isodiamétricas dispostas logo abaixo da hipoderme.

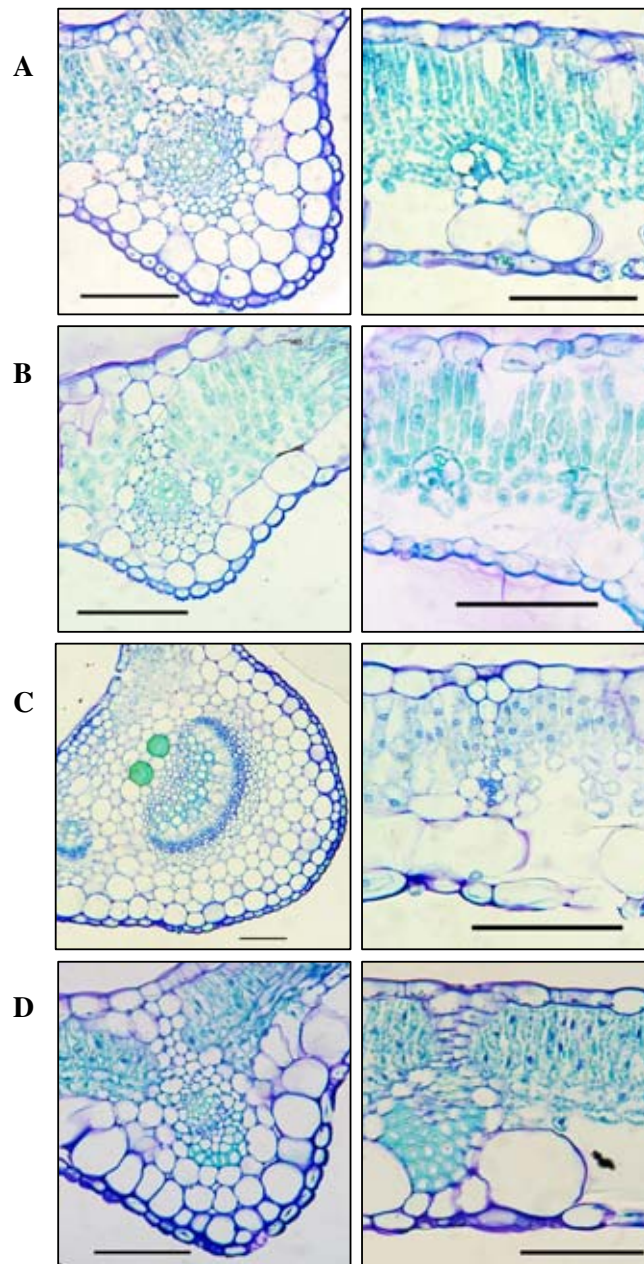


Figura 17: Nervura principal e mesofilo em secção transversal de folíolo de *Arachis ipaënsis* (A), *A. duranensis* (B), *A. ipaënsis* x *A. duranensis* $2n = 20$ (C) e *A. ipaënsis* x *A. duranensis* $2n = 40$ (D). Barra = 1 mm.

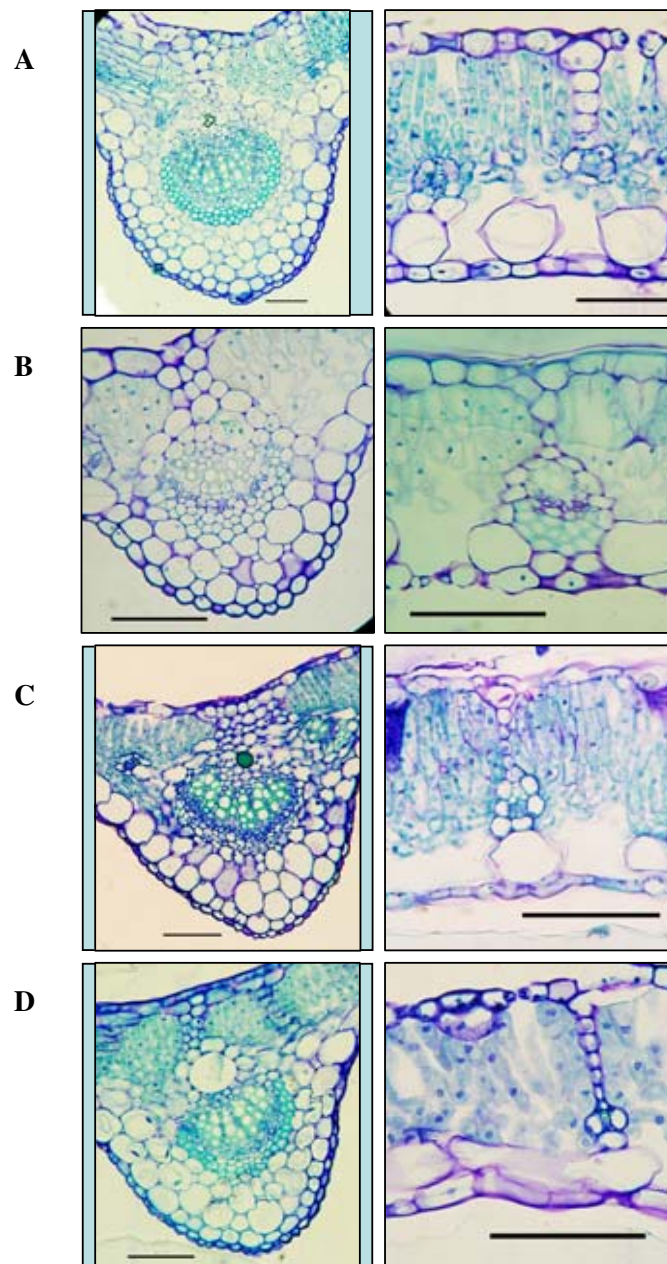


Figura 18: Nervura principal e mesófilo em secção transversal de folíolo de *Arachis hypogaea* (A), *A. hoehnei* (B), *A. vallsii* (C) e *A. gregoryi* (D). Barra = 1 mm.

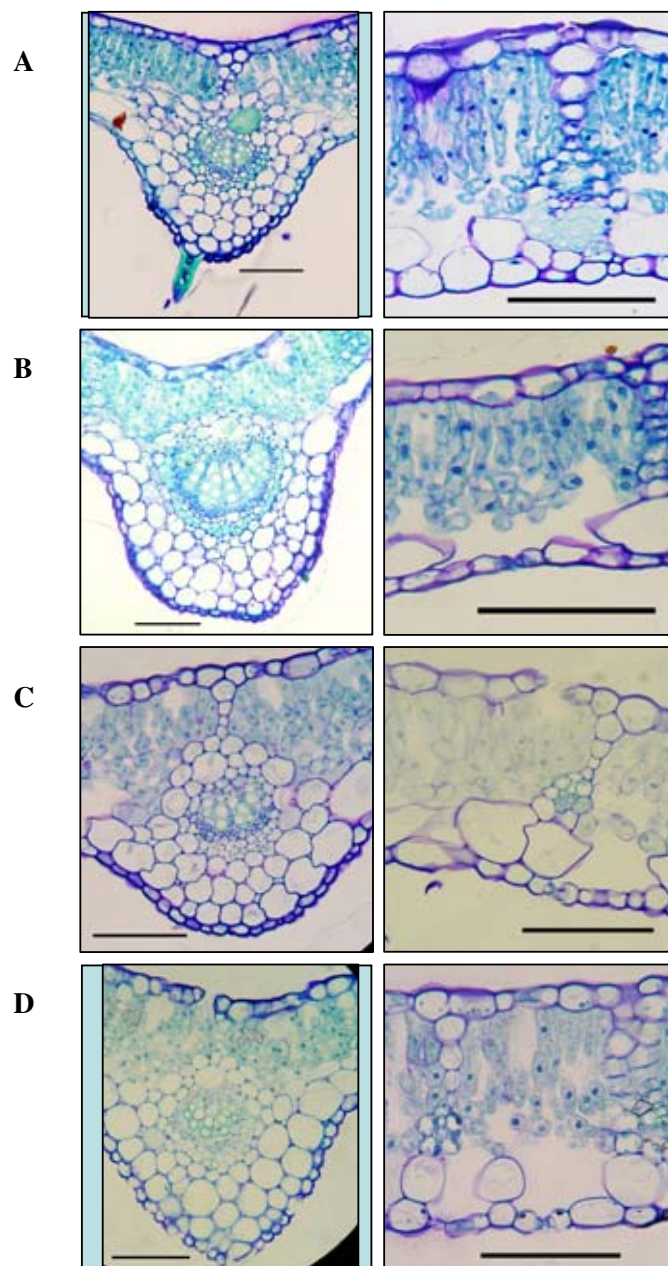


Figura 19: Nervura principal e mesofilo em secção transversal de folíolo de *Arachis gregoryi* x *A. magna* $2n = 20$ (A), *A. vallsii* x *A. ipaënsis* $2n = 20$ (B), *A. williamsii* (C) e *A. gregoryi* x *A. williamsii* $2n = 20$ (D). Barra = 1 mm.

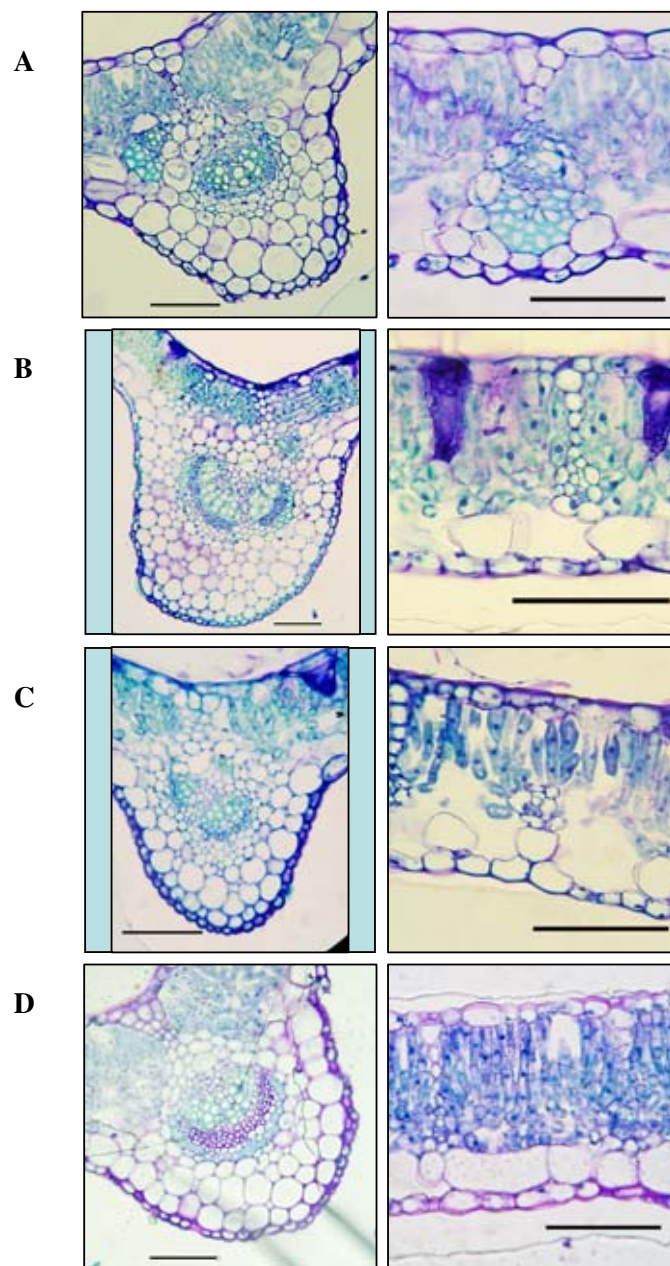


Figura 20: Nervura principal e mesofilo em secção transversal de folíolo de *Arachis vallsii* x *A. williamsii* $2n = 20$ (A), *A. valida* (B), *A. gregoryi* x *A. valida* $2n = 20$ (C) e *A. ipaënsis* x *A. magna* $2n = 40$ (D). Barra = 1 mm.

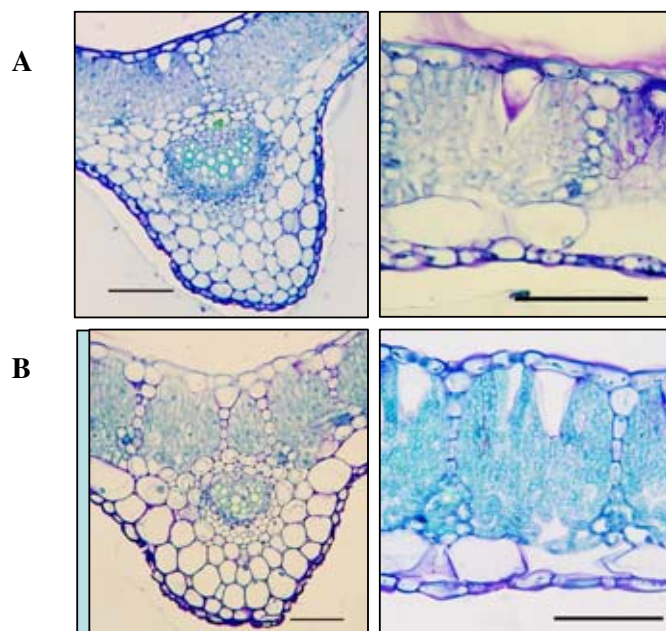


Figura 21: Nervura principal e mesofilo em secção transversal de folíolo de *Arachis magna* (A); e *A.vallsii* x *A. williamsii* $2n = 40$ (B). Barra = 1 mm.

5.5.2. Estudo comparativo

Nas análises comparativas entre os híbridos e suas espécies progenitoras obtiveram-se os resultados ilustrados nas tabelas a seguir.

Na tabela 8 notam-se as principais características anatômicas relacionadas às espécies *A. hoehnei*, *A. hypogaea*, *A. ipaënsis*, *A. duranensis*, e o híbrido diplóide e o anfidiplóide destas últimas espécies obtidos. Dentre essas, é possível destacar o híbrido *A. ipaënsis* x *A. duranensis* ($2n = 20$ cromossomos) como sendo o único que apresenta uma distinta expansão de parênquima na região da nervura principal, sendo ele também o que possui maior desenvolvimento da extensão de bainha parenquimática para a face adaxial (Figura 17-C). Para esse mesmo indivíduo e para *A. hypogaea*, foi notado crescimento

secundário com evidência de câmbio vascular, também na região da nervura mediana. Tal fato pode ser interpretado como um contra-senso, já que *A. hypogaea* teoricamente deveria se assemelhar mais ao anfidiplóide anteriormente citado. Apesar da evidência de crescimento secundário, este híbrido diplóide é um dos poucos indivíduos que não apresentam fibras próximas ao feixe vascular desta região, do mesmo modo que *A. magna*, *A. williamsii* e o híbrido diplóide *A. gregoryi* x *A. williamsii*.

Tabela 8: Análise anatômica comparativa de alguns dos materiais estudados. Brasília, 2008.

Caracteres anatômicos	Espécies e híbridos analisados					
	Hy	Ip	IpDr	IpDr ^{4x}	Dr	Ho
Ornamentação da cutícula na nervura principal	+	+	+	+	+	-
Fibras contínuas na nervura principal	+	-	¹	-	-	-
Organização anfiestomática	+	+	+	+	+	+
Compostos silicosos	+	+	+	+	+	-
Células mucilaginosas	+	²	²	+	+	³
Hipoderme	+	+	+	+	+	+
Estratos de células parenquimáticas na nervura	Até 4	Até 3	Até 5	Até 2	Até 2	Até 3
Bainha parenquimática na nervura	Bi	Bi	Pluri	Bi	Bi	Pluri
Crescimento secundário evidente	+	-	+	-	-	-

(+): Presença; (-): Ausência; ⁽¹⁾: Não apresenta fibras na nervura principal; ⁽²⁾: Menores corpos mucilaginosos; ⁽³⁾: Maiores corpos mucilaginosos; **Bi**: bisseriada; **Pluri**: plurisseriada.

Indivíduos: (Hy) *Arachis hypogaea*; (Ip) *A. ipaënsis*; (IpDr) *A. ipaënsis* x *A. duranensis* 2n = 20 cromossomos; (IpDr^{4x}) *A. ipaënsis* x *A. duranensis* 2n = 40 cromossomos; (Dr) *A. duranensis*.

Arachis hoehnei, que é uma das espécies que mais se distanciam do grupo de espécies e híbridos relacionados na Tabela 8, apresenta corpos mucilaginosos maiores, cutícula sem ornamentação, bainha parenquimática na região da nervura principal semelhante ao híbrido diplóide *A. ipaënsis* x *A. duranensis* deste mesmo grupo, ausência

de sílica e fibras em forma descontínua próximo ao feixe vascular da nervura principal, tal como *A. ipaënsis*, *A. duranensis* e o anfidiplóide *A. ipaënsis* x *A. duranensis*. A ocorrência de fibras em forma contínua na região de nervura mediana, dentre as espécies relacionadas na Tabela 8, só foi evidenciada em *A. hypogaea*.

Os outros exemplares estudados na presente pesquisa estão também listados na Tabela 9. Nota-se, para esse grupo de indivíduos, que as grandes diferenças encontradas estão relacionadas com a ornamentação da cutícula, presença de sílica e crescimento secundário.

A evidência ou não de cutícula ornamentada nas espécies relacionadas na Tabela 9 pode separar em dois grupos os distintos indivíduos analisados. O grupo que abrange os materiais que não apresentam tal ornamentação é composto por *A. gregoryi*, *A. valida* e o híbrido diplóide produzido a partir dessas duas espécies, além do híbrido diplóide *A. vallsii* x *A. williamsii*. Tal caráter foi suplantado no híbrido diplóide entre *A. vallsii* x *A. williamsii*, cujos genitores apresentam a referida ornamentação. No entanto o anfidiplóide produzido a partir desses híbridos evidenciou essa característica. Estudos anteriores propõem que essa ornamentação pode ser tratada como caráter taxonômico. Reis *et al.* (2005), afirmam que a ornamentação da cutícula foi um dos caracteres utilizados na distinção entre espécies de dois gêneros de Melastomataceae. Através dos resultados obtidos no presente trabalho, notou-se que a ornamentação da cutícula pode comportar-se como um caráter dominante. É importante ressaltar novamente que *A. gregoryi*, *A. valida* e o híbrido diplóide *A. gregoryi* x *A. valida* não apresentaram cutícula ornamentada. Em contrapartida, quando estas espécies foram cruzadas com outras que apresentavam essa característica, seus híbridos passaram, então, a manifestar também o caráter. Além destas espécies e deste híbrido, *A. hoehnei*, que se mantém morfológicamente afastada do grupo, não manifestou essa característica.

Também é importante salientar que para as espécies *A. gregoryi*, *A. williamsii* e para o híbrido diplóide *A. gregoryi* x *A. williamsii*, evidenciou-se diferença quanto à ornamentação da cutícula. Tal característica não foi observada em *A. gregoryi*, porém, o híbrido diplóide já citado, apresentou essa ornamentação. Associações de afinidade apontadas por marcadores moleculares entre *A. williamsii* e *A. gregoryi* já foram estudadas anteriormente (Gimenes *et al.*, 2002a, 2002b; Moretzsohn *et al.*, 2004; Milla *et al.*, 2005; Bravo *et al.*, 2006).

A presença de sílica e de outros compostos químicos deverão ser, num futuro próximo, alvo de um aprofundamento dos estudos histoquímicos, para se delinear a presença ou ausência de substâncias semelhantes entre as espécies e seus respectivos híbridos. Apenas *A. magna*, *A. vallsii*, os híbridos diplóides *A. ipaënsis* x *A. magna*, *A. gregoryi* x *A. magna* e *A. vallsii* x *A. williamsii* não apresentaram tal característica.

Reforçando o estudo realizado por Krapovickas & Gregory (1994), em que são relacionadas grandes semelhanças morfológicas entre *A. ipaënsis* e *A. magna*, o estudo comparativo descritivo da lâmina foliolar de *A. ipaënsis*, *A. magna* e do híbrido diplóide *A. ipaënsis* x *A. magna* apontou indícios que corroboram essa similaridade. Para este grupo de indivíduos notou-se apenas diferenças quanto à presença de corpos silicosos, não observados em *A. magna* e no híbrido diplóide já mencionado. Além disso, para esse híbrido entre *A. ipaënsis* x *A. magna* notou-se também uma alta taxa de viabilidade polínica, o que também contribui para o estreitamento das relações de afinidade entre tais espécies.

Ainda em relação à presença de corpos silicosos, o híbrido diplóide *A. gregoryi* x *A. magna* e *A. gregoryi* não apresentam tais compostos. Notou-se que apesar de ser encontrado em *A. magna*, tal caráter não foi evidenciado no híbrido resultante do cruzamento dessas duas espécies.

Quanto ao número de estratos celulares evidenciados no parênquima encontrado na região da nervura principal, é predominante dentre os materiais estudados a ocorrência de até dois estratos de células (Tabela 9).

Tabela 9: Análise comparativa do estudo anatômico. Brasília, 2008.

Caracteres anatômicos	Espécies e híbridos analisados												
	Ip	IpM	M	GM	G	GVd	Vd	GW	W	VsW	VsW ^{4x}	Vs	VsIp
Ornamentação da cutícula na nervura principal	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+
Fibras contínuas na nervura principal	-	+	- ¹	-	+	-	-	- ¹	- ¹	-	-	-	-
Organização anfiestomática	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Compostos silicosos	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+
Células mucilaginosas	+ ²	+	+	+	+	+	+	+ ³	+	+	+	+	+ ³
Hipoderme	+	+	+ ³	+	+	+	+ ⁴	+ ⁴	+	+	+	+	+
Estratos de células parenquimáticas na nervura	Até 3	Até 2	Até 4	Até 2	Até 2	Até 3	Até 4	Até 2	Até 2	Até 3	Até 3	Até 2	Até 2
Bainha parenquimática na nervura	Bi	Tri	Bi	Bi	Uni	Tri	Tri	Uni	Uni	Uni	Tri	Pluri	Uni
Crescimento secundário evidente	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(+): Presença; (-): Ausência; (¹): Não apresenta fibras na nervura principal; (²): Menores corpos mucilaginosos; (³): Maiores corpos mucilaginosos; (⁴): Ocorre estreitamento da hipoderme; **Uni**: unisseriada; **Bi**: bisseriada; **Tri**: trisseriada; **Pluri**: plurisseriada.

Indivíduos: (Vs) *Arachis vallsii*; (G) *A. gregoryi*; (GM) *A. gregoryi* x *A. magna* 2n = 20; (VsIp) *A. vallsii* x *A. ipaënsis* 2n = 20; (W) *A. williamsii*; (GW) *A. gregoryi* x *A. williamsii* 2n = 20; (VsW) *A. vallsii* x *A. williamsii* 2n = 20; (Vd) *A. valida*; (GVd) *A. gregoryi* x *A. valida* 2n = 20; (IpM) *A. ipaënsis* x *A. magna* 2n = 20; (M) *A. magna*; (VsW^{4x}) *A. vallsii* x *A. williamsii* 2n = 40.

Em relação à caracterização da bainha parenquimática do feixe vascular encontrado na região da nervura mediana, *A. vallsii* se destaca por ser o único material que apresenta bainha plurisseriada. Por outro lado, há maiores evidências de que a bainha unisseriada predomine dentre os materiais estudados. Para os materiais relacionados na Tabela 9, apenas observou-se a presença de crescimento secundário na região da nervura

principal em *A. magna*. É importante lembrar que esse caráter também foi observado em *A. hypogaea* e no híbrido diplóide *A. ipaënsis* x *A. duranensis*.

5.6 Histoquímica

Os testes histoquímicos realizados com os reagentes vermelho congo, ácido tânico / cloreto de ferro III e azul de metileno 1% com bórax, não foram distintivos. Nesses casos notaram-se colorações inespecíficas. Por essa razão estes dados não foram incluídos nestes resultados (Tabela 10).

O Sudan IV revelou para todos os indivíduos estudados que as células basais dos tricomas unisseriados multicelulares são compostas por substâncias cerosas. Essas células apresentaram uma coloração alaranjada (Figura 22-A).

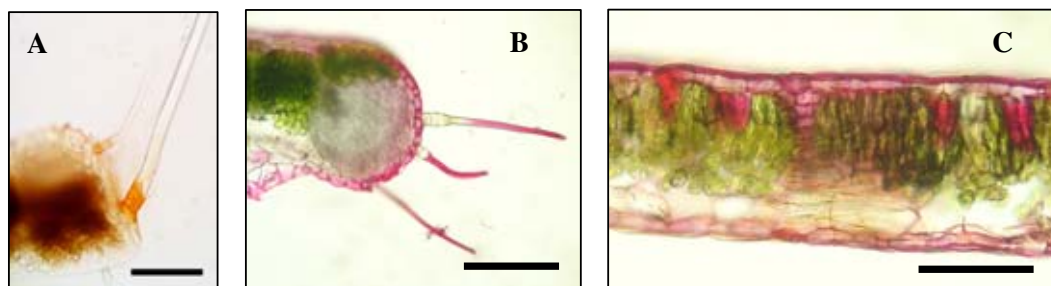


Figura 22: Análise histoquímica foliar. Barra = 1 mm. (A): Teste histoquímico com Sudan IV em *Arachis ipaënsis* x *A. magna*, com destaque para coloração das células basais dos tricomas; (B-C): Teste histoquímico com vermelho de rutênio; (B): Destaque para a coloração das células apicais dos tricomas em *A. gregoryi*; (C): Destaque para a coloração dos corpos de mucilagem na epiderme voltada para a face adaxial em *A. ipaënsis* x *A. magna*.

Tabela 10: Análise histoquímica foliar utilizada para evidenciar corpos cerosos e mucilaginosos.

Indivíduo	SUDAN IV (Cutina, Suberina, Ceras)	Vermelho de rutênio (Mucilagem)
<i>Arachis hypogaea</i>	+ ¹	+
<i>Arachis duranensis</i>	+	+
<i>Arachis ipaënsis</i> x <i>Arachis duranensis</i> 2n = 20	+	+
<i>Arachis ipaënsis</i> x <i>Arachis duranensis</i> 2n = 40	+	+
<i>Arachis ipaënsis</i>	+	+
<i>Arachis ipaënsis</i> x <i>Arachis magna</i> 2n = 20	+	+
<i>Arachis magna</i>	+	+
<i>Arachis gregoryi</i> x <i>Arachis magna</i> 2n = 20	+	+
<i>Arachis gregoryi</i>	+	+
<i>Arachis gregoryi</i> x <i>Arachis valida</i> 2n = 20	+	-
<i>Arachis valida</i>	+	+
<i>Arachis gregoryi</i> x <i>Arachis williamsii</i> 2n = 20	+	+
<i>Arachis williamsii</i>	+	+
<i>Arachis vallsii</i> x <i>Arachis williamsii</i> 2n = 20	+	+ ²
<i>Arachis vallsii</i> x <i>Arachis williamsii</i> 2n = 40	+	+
<i>Arachis vallsii</i>	+ ¹	+
<i>Arachis vallsii</i> x <i>Arachis ipaënsis</i> 2n = 20	+	+
<i>Arachis hoehnei</i>	+	+

(¹): Foram evidenciados poucos tricomas nos cortes transversais a mão livre; (²): Evidência de muitos tricomas nos cortes transversais a mão livre.

O teste histoquímico realizado com vermelho de rutênio resultou na confirmação da presença comum de células mucilaginosas na epiderme voltada para a face adaxial (Figura 22-B). Além disso, este reagente evidenciou, para todos os materiais avaliados, que as células apicais dos tricomas unisseriados multicelulares também continham mucilagem

(Figura 22-B). Notou-se que a espécie *A. gregoryi* e o híbrido *A. vallsii* x *A. ipaënsis*, apresentaram muito pouca mucilagem, após um período de aproximadamente 24 horas. Apenas, o híbrido diplóide *A. gregoryi* x *A. valida* não apresentou células de mucilagem coradas. Este resultado foi considerado surpreendente, já que se esperava encontrar essa característica neste híbrido diplóide, tal como foi encontrada em suas espécies genitoras. Por outro lado, quando *A. gregoryi* foi cruzada com *A. magna* e com *A. valida* e obtiveram-se híbridos diplóides, tais corpos mucilaginosos foram evidenciados.

5.7 Comparação anatômica entre espécies

O estudo comparativo realizado entre as espécies analisadas indicou que os caracteres anatômicos mais variáveis foram: ornamentação da cutícula, evidente crescimento secundário no feixe vascular da nervura mediana, presença de fibras na região da nervura principal e presença de corpos silicosos, por meio dos quais *A. hoehnei*, *A. valida* e *A. vallsii* demonstraram peculiaridades. Das espécies analisadas *A. hoehnei* foi a que mais se destacou por apresentar características menos comuns às demais espécies, tal como células da hipoderme com provável infestação fúngica, cutícula não ornamentada, fibras em forma descontínua na região da nervura principal, ausência de corpos silicosos e de crescimento secundário evidente na nervura mediana. Essa espécie, juntamente com *A. vallsii*, destaca-se por apresentar bainha parenquimática plurisseriada na região da nervura. *Arachis vallsii* também se destaca por apresentar ornamentação da cutícula, ausência de fibras contínuas na nervura mediana e ausência de sílica. Também vale destacar *A. valida*, que apresentou formato distinto da nervura principal e que, tal como *A. hoehnei*, não apresentou ornamentação da cutícula, nem fibras contínuas na região medular e nem mesmo crescimento secundário evidenciado nessa região.

Quando comparamos *A. hypogaea* com suas espécies genitoras, *A. ipaënsis* (relacionada ao genoma B de *A. hypogaea*) e *A. duranensis* (relacionada ao genoma A da mesma espécie), tem-se que as maiores discrepância ocorrem quanto a presença de fibras em forma contínua na nervura principal e quanto a evidência de crescimento secundário na mesma região, por meio das quais de destaca *A. hypogaea* por apresentar tais características. Outro aspecto a ser destacado entre essas espécies é quanto às células mucilaginosas, que apesar de estarem presentes nos genitores, são consideravelmente menores em *A. ipaënsis*.

Ao comparar *A. gregoryi* com *A. magna* e *A. valida*, tem-se como peculiaridades que *A. magna* não apresentou fibras na nervura principal (Figura 21-A). Neste caso, a presença de tais células é evidenciada de forma contínua em *A. gregoryi*, e de forma descontínua em *A. valida*. Além disso, *A. magna* destaca-se destas espécies por apresentar ornamentação da cutícula, corpos silicosos e crescimento secundário evidente na região da nervura mediana, tal como em *A. hypogaea*. Esses caracteres não foram evidenciados em *A. gregoryi* e *A. valida*. Dentre as espécies estudadas no presente trabalho, *A. magna* e *A. valida*, ainda se destacam por apresentarem estreitamento da hipoderme, o que não foi evidenciado em nenhum outro material avaliado.

Arachis williamsii, ambas associada ao genoma B de *A. hypogaea*, e *A. vallsii*, também sem o par de cromossomos “A” (Lavia, 1996), mas considerada mais distante do amendoim (*A. hypogaea*), apresentaram-se diferentes apenas quanto à presença de fibras na região da nervura mediana (apenas evidente em *A. vallsii*), presença de corpos silicosos (apenas evidente em *A. williamsii*) e quanto ao tipo de bainha parenquimática presente na nervura. Para *A. vallsii* foi observado uma bainha parenquimática plurisseriada e para *A. williamsii*, unisseriada.

5.8 Comparação anatômica entre os genitores e seus híbridos

No estudo comparativo entre *A. hypogaea* e o anfidiplóide *A. ipaënsis* x *A. duranensis*, além de sua forma diplóide e os genitores envolvidos, encontrou-se peculiaridades quanto à presença de fibras na região da nervura principal, quanto ao tamanho das células mucilaginosas, quanto à organização da bainha parenquimática na região da nervura e quanto à evidência de crescimento secundário nesta mesma região. O híbrido diplóide se destacou por apresentar grandes células mucilaginosas, tal como em *A. ipaënsis*, mesmo sendo este um caráter não apresentado por sua outra espécie genitora. Além disso, esse híbrido também se destacou por não apresentar fibras na região da nervura central. Tal aspecto contradiz o que ocorre em suas espécies genitoras, que apresentam fibras em forma não contínua na região de nervura principal. Da mesma forma, esse híbrido apresentou evidente crescimento secundário nessa região, sendo que nenhuma das suas espécies genitoras possuem tal característica. Quanto à organização da bainha parenquimática presente na região central da lâmina foliar, as espécies *A. ipaënsis* e *A. duranensis*, assim como o anfidiplóide produzido a partir dessas, apresentaram uma bainha bisseriada. Para o híbrido diplóide em questão e quanto a essa última característica, tem-se a formação de um caráter discrepante, já que esse apresenta bainha plurisseriada.

Arachis hypogaea e o anfidiplóide *A. ipaënsis* x *A. duranensis*, apenas se diferenciam na região da nervura central quanto à organização das fibras, ao número de estratos de células parenquimáticas e a presença de crescimento secundário. Por apresentar uma organização contínua das fibras e crescimento secundário, *A. hypogaea* se destaca do anfidiplóide, que não apresenta tais caracteres. Além disso, destaca-se também por apresentar até quatro estratos celulares no parênquima da região da nervura, enquanto que

o anfidiplóide apresenta até dois estratos. É importante salientar que o caráter crescimento secundário na nervura aparece no híbrido diplóide, o que contradiz o esperado.

Ao comparar as espécies *A. ipaënsis*, *A. magna*, *A. gregoryi* e *A. valida*, com seus respectivos híbridos, peculiaridades foram observadas quanto às características anatômicas. Apesar de *A. magna* não apresentar fibras na região da nervura principal isto não se manteve em seus híbridos com *A. ipaënsis* e *A. gregoryi*, já que esses híbridos apresentaram, de formas distintas, fibras em sua composição. Em contrapartida, quanto ao caráter presença de sílica, os híbridos em que *A. magna* é uma das espécies genitoras, mantém a ausência desses corpos, mesmo que sua outra espécie genitora possua característica distinta. Além disso, quanto ao número de estratos celulares e a bainha presentes na região da nervura, surgiram caracteres intermediários no cruzamento entre *A. ipaënsis* e *A. magna*. Isto ocorreu devido à presença de caracteres distintos das espécies genitoras no híbrido diplóide *A. ipaënsis* x *A. magna*. Esse híbrido manteve o caráter de organização da bainha de *A. magna*, e manteve o caráter referente ao número de estratos celulares e ausência de crescimento secundário de sua outra espécie genitora. Quanto ao crescimento secundário, o híbrido diplóide *A. ipaënsis* x *A. magna* não evidenciou tal característica presente em *A. magna*.

A presença de fibras na região da nervura vista em *A. gregoryi* foi evidenciada no híbrido diplóide *A. gregoryi* x *A. valida* de forma distinta, e não foi observada no híbrido diplóide *A. gregoryi* x *A. williamsii*, que manteve a característica de sua outra espécie genitora. Quanto à ornamentação da cutícula, a presença desta característica neste híbrido pode estar relacionada a *A. williamsii*, que possui tal ornamentação diferentemente de *A. gregoryi*. Para todos os outros aspectos avaliados, este híbrido apresentou características comuns a suas espécies genitoras.

Para as espécies *A. vallsii*, *A. williamsii* e os híbridos delas produzidos, características relacionadas à ornamentação da cutícula, presença de sílica e organização das células e bainha parenquimáticas na região da nervura principal, foram as que apresentaram particularidades. Mesmo estando presente em ambas as espécies, a ornamentação não foi evidenciada no híbrido diplóide *A. vallsii* x *A. williamsii*, ao contrário do que ocorre com o anfidiplóide, que manteve as características das espécies genitoras. Quanto à presença de fibras, somente evidenciada em *A. vallsii*, tanto o híbrido diplóide quanto o anfidiplóide mantiveram o caráter dessa espécie genitora. Isto pode ser indício de que esta característica se comporte como dominante. Um outro aspecto a ser apontado é a manutenção do caráter de *A. vallsii*, relacionado a presença de sílica, pelo híbrido diplóide e não pelo anfidiplóide, que se assemelhou a *A. williamsii*. O surgimento de caracteres intermediários também foi observado nesses cruzamentos, quando se observou os caracteres relacionados a organização das bainhas parenquimáticas da região da nervura principal.

Por último, na comparação realizada entre *A. ipaënsis*, *A. vallsii* e o híbrido diplóide originado do cruzamento entre essas espécies, foram observadas distinções quanto a presença de sílica e organização das células e bainhas parenquimáticas da região da nervura mediana. Tal híbrido apresentou corpos silicosos em sua composição, tal como *A. ipaënsis*, diferindo de sua outra espécie genitora. Para a organização da bainha parenquimática da nervura principal já destacada, neste caso, surgiram caracteres intermediários.

5.9 Estudo meiótico

As análises meióticas dos híbridos avaliados nesta etapa do trabalho dependeram, além da disponibilidade das plantas vivas, de uma intensa floração do material para que se obtivessem botões florais de tamanho e maturidade adequados para se observar células em divisão meiótica.

Durante as análises das inflorescências coletadas dos materiais relacionados na Tabela 5, a maioria dos botões florais coletados já apresentaram grãos de pólen. Isso pode indicar que o tamanho e ou a maturidade dos botões florais não estavam de acordo com os adequados para as análises meióticas.

Os indivíduos híbridos diplóides de *A. vallsii* V 7635 x *A. williamsii* Wi 1118 floresceram e deles foram coletados botões florais. As análises meióticas desses botões demonstraram que a maturação das anteras de um mesmo botão não é uniforme, já que num único botão foram encontradas tanto células em telófase II, quanto tétrades e grãos de pólen.

Nas análises meióticas, 79,4% das tétrades foram consideradas normais (Figura 23). Além disso, foram encontradas tétrades anormais (0,8%), díades (4,9%), tríades (12,9%), pentades (1,0%) e hexades (1,0%) (Tabela 11). A alta percentagem de tétrades normais, ou seja, alto índice meiótico, que reflete a estabilidade meiótica de um organismo (Schifino-Wittmann, 2004), pode indicar que, apesar de ocorrerem anormalidades durante a divisão meiótica, como a presença de cromossomos retardatários e alguns fragmentos cromossômicos, a terminalização da meiose apresenta uma alta taxa de normalidade.

As evidências aqui demonstradas, quanto ao híbrido com *A. williamsii*, contribuem para a alocação de *A. vallsii* na secção *Arachis* do gênero.

A duplicação dos cromossomos com colchicina, já obtida em outros indivíduos representativos do mesmo cruzamento, com o conseqüente restabelecimento da normalidade do comportamento meiótico, das taxas de germinabilidade dos grãos de pólen e da floração, facilita o uso desses híbridos no programa de pré-melhoramento de *A. hypogaea* (amendoim) de grande interesse econômico e alimentício.

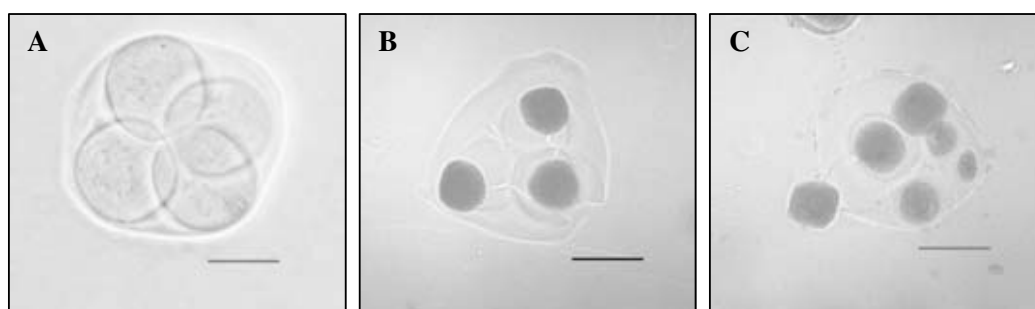


Figura 23: Células em meiose do híbrido *Arachis vallsii* (V7635) x *A. williamsii* (Wi 1118). Barra = 10 μ m. (A): Tétrade normal; (B): Tríade; (C): Hexade.

Além dessas análises, várias outras amostras deste mesmo material apenas apresentaram grãos de pólen, situação na qual esses dados não foram tabulados.

Tabela 11: Meiose em *Arachis vallsii* (V 7635) x *A. williamsii* (Wi 1118), com demonstrativo de número de células analisadas. Brasília, 2008.

Amostras	Grãos de pólen	Prófase I (inicial)	Anáfase I	Telófase II				
				Inicial	Díades	Tríades	Tétrades	Políades
1	60	-	-	-	13	20	57	1
2	-	65	-	-	16	61	450 (12)*	-
3	-	23	-	-	19	50	271 (13)*	-
4	1	33	7	12	4	-	26	-

*: Tétrades anormais.

Para os híbridos diplóides que envolveram *A. ipaënsis* e *A. magna* as análises meióticas se concentraram nos indivíduos representativos dos cruzamentos de *A. ipaënsis* x *A. magna*, *A. ipaënsis* x *A. villosa* e *A. gregoryi* x *A. linearifolia*. Nestas análises somente foram encontrados botões florais que já apresentavam grãos de pólen em suas anteras. Sobre as espécies *A. magna* e *A. gregoryi* já se sabe da evidente ocorrência de similares quando a diversidade genética destas é avaliada por marcadores microssatélites (Custódio *et al.*, 2007).

Os dados meióticos referentes aos outros materiais avaliados nesta etapa do estudo não foram satisfatórios.

6. CONCLUSÕES

A partir dos estudos realizados é possível apontar grandes semelhanças entre *A. hypogaea*, o anfidiplóide *A. ipaënsis* x *A. duranensis*, sua forma diplóide e os genitores envolvidos. Alguns caracteres semelhantes entre esses indivíduos: mesofilo dorsiventral, hipoderme uniforme, organização anfiestomática e presença de células mucilaginosas próximas a face adaxial. As diferenças observadas nesses materiais são sutis e nem sempre aparecem da forma esperada, especialmente no híbrido diplóide.

Arachis hoehnei é a espécie anatomicamente mais distinta, dentre aquelas examinadas. Para esta espécie notou-se a ausência de ornamentação da cutícula, ausência de crescimento secundário na região da nervura principal, presença de grandes corpos mucilaginosos e ausência de sílica.

Quanto às demais espécies analisadas, que, à exceção de *A. vallsii*, tem sido associadas ao genoma B de *A. hypogaea* (amendoim), as diferenças são poucos marcantes e nem sempre se mostram de forma coerente nos híbridos entre os distintos pares de genitores. O detalhamento anatômico foi a favor da conspecificidade entre as espécies: *A. magna* e *A. ipaënsis*. Alguns caracteres, tais como a ornamentação da cutícula, organização anfiestomática, corpos silicosos, hipoderme e organização da bainha parenquimática na nervura mediana, apontaram indícios para essa conspecificidade, que é reforçada pela alta viabilidade polínica de seus híbridos. Todavia, os caracteres envolvendo presença de fibras, sílica e crescimento secundário, mostraram-se diferentes no material analisado das duas espécies procedentes de sementes das populações que abrangem seus exemplares tipo.

As evidentes semelhanças anatômicas entre *A. vallsii* e *A. williamsii* apontadas também em seu híbrido diplóide e no anfidiplóide dele obtido, são corroboradas por um

elevado índice meiótico encontrado nas análises citogenéticas do híbrido diplóide *A. vallsii* x *A. williamsii*, que indica uma alta estabilidade meiótica para esse indivíduo. Este fato pode ser visto como mais um indício de que *A. vallsii*, embora não associado ao genoma de *A. hypogaea*, pertence, em realidade, à secção *Arachis*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEM, A. C. & VALLS, J. F. M. Recursos Forrageiros do Pantanal Mato-Grossense. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Centro Nacional de Recursos Genéticos: Brasília, 1987. 339 p.
- ALVAREZ, J. M.; ROCHA, J. F.; MACHADO, S. R. Estrutura foliar de *Loudetiopsis chrysothrix* (Nees) Conert e *Tristachya leiostachya* Nees (Poaceae). **Rev. Brasil. Bot.**, v. 28, n. 1, p. 23–37, 2005.
- BAKER, H. G.; BAKER, I. The Cytotaxonomy of *Filipendula* (Rosaceae) and Its Implications. **American Journal of Botany**, v. 54, p. 1027–1034, 1967.
- BASSAM, B. J.; CAETANO-ANOLLES, G.; GRESSHOFF, P. M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, n.196, p. 80, 1991.
- BARBOSA, A. G. **Construção de um mapa de ligação para espécies de genoma B relacionadas ao amendoim (*Arachis hypogaea* - AABB)**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São Paulo, SP, 2005.
- BENTHAM, G. On the structure and affinities of *Arachis* and *Voandzeia*. **Trans. Linn. Soc.** London: v.18, n. 2, p. 155–162, 1841.
- BENTHAM, G. *Leguminosae* en Martius C. **Flora brasiliensis**, v. 15, n. 1, p. 86–87, 1859.
- BRAVO, J. P.; HOSHINO, A. A.; ANGELICI, C. M. L. C. D.; LOPES, C. R.; GIMENES, M. A. Transferability and use of microsatellite markers for the genetic analysis of the germplasm of some *Arachis* section species of the genus *Arachis*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 3, p. 516–524, 2006.
- CAMACHO-DE-TORRES, E. F.; SUBERO, L. Características anatómicas foliares de interes fitopatológico en tres cultivares de mani (*Arachis hypogaea*). **Ernstia**, v. 1, n. 2, p. 61–72, 1991.
- CONTERATO, I. F.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T. New chromosome numbers, meiotic behavior and pollen fertility in American taxa of *Lupinus* (Leguminosae): contributions to taxonomic and evolutionary studies. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 150, n. 2, p. 229 – 240, 2006.
- CORADIN, L. Parentes Silvestres e Variedades Crioulas das Espécies de Plantas Cultivadas no País. In: Ministério do Meio Ambiente. **Parentes Silvestres das Espécies de Plantas Cultivadas**. Brasília: MMA, p. 7–10, 2006.

- CRESTE, S.; TULMANN-NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphism in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, n.4, v.19, p.1-8, 2001.
- CUSTODIO, A. R. **Biogeografia e variabilidade genética de *Arachis stenosperma* Krapov. & W. C. Gregory (Leguminosae), com ênfase em aspectos etnobotânicos, na resistência diferencial às doenças foliares e em sua conservação**. Tese de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília – DF, 2005.
- CUSTODIO, A.R.; SCHMIDT, A.B.; VALLS, J.F.M. Caracterización molecular de espécies de *Arachis*, con énfasis en aquellas asociadas al genômio “B” del maní. In: JORNADAS ARGENTINAS DE BOTÂNICA, 30, 2007, Corrientes. **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**, v.42, Suplemento, p.51-52, 2007. ISSN 0373-520X.
- DOP, P. ; GAUTIÉ, A. **Manuel de technique botanique**. Paris, J. Lamane, 1909. 534p.
- FÁVERO, A.P. **Cruzabilidade entre espécies silvestres de *Arachis*, visando à introgressão de genes de resistência a doenças no amendoim cultivado**. Tese de Doutorado, PG/Genética e Melhoramento de Plantas-ESALQ-USP/Piracicaba, SP, 2004.
- 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.
- FÁVERO, A.P.; SIMPSON, C.E.; MORAES, S.A.; VALLS, J.F.M.; VELLO, N.A. Potencial de utilização de genes de espécies silvestres com resistência a doenças fúngicas no amendoim cultivado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2, 2003, Porto Seguro. **Trabalhos ...** Porto Seguro: Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas, 2003. CD-ROM. Trabalho nº 149 [Livro eletrônico, p.2615-2619]
- FERNÁNDEZ, A.; KRAPOVICKAS, A. Cromosomas y evolución en *Arachis* (Leguminosae). **Bonplandia**, v. 8, p. 187–220, 1994.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**. 2ª ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995. 220 p.
- FREITAS, F. O.; VALLS, J. F. M. Nota sobre a ocorrência de um tipo distinto de amendoim no Parque Indígena do Xingú e arredores e suas implicações

- etnobotânicas. In: SIRGEALC. Simpósio de Recursos Genéticos para a América Latina e o Caribe, 3, 2001, Londrina. **Anais ...** Londrina: IAPAR, 2001. p. 303–304.
- FREITAS, F. O.; MORETZSOHN, M. C.; VALLS, J. F. M. Genetic variability of Brazilian Indian landraces of *Arachis hypogaea* L. **Genetics and Molecular Research**, v. 6, n.3, p.675-684, 2007.
[<http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2007/vol3-6/pdf/GMR0347.pdf>]
- FIGUEIREDO, L. F. A. & GRACIANO-RIBEIRO, D. **Confecção de lâminas permanentes de plantas**. Brasília: Universa, 2000 (Texto Universitário).
- GERLACH, D. **Botanische Microtechnik**. Stuttgart: Georg Thieme, 1984.
- GIMENES, M. A.; LOPES, C. R.; GALGARO, L. M.; VALLS, J. F. M.; KOCHERT, G. RFLP analysis of genetic variation in species of section *Arachis*, genus *Arachis* (Leguminosae). **Euphytica**, v. 123, n. 3, p. 421–429, 2002a.
- 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, p. 349–353, 2002b.
- GHAFFARI, S. M. Cytotaxonomy of some species of *Acanthophyllum* (Caryophyllaceae) from Iran. **Biologia**, Bratislava, v. 59, p. 53–60, 2004.
- GRANT, J. E.; GRACE, J. P.; BROWN, A. H. D.; PUTIEVSKY, E. Interspecific Hybridization in *Glycine* Willd. Subgenus *Glycine* (Leguminosae). **Australian Journal of Botany**, v. 32, p. 655–663, 1984.
- GREGORY, M. P. & GREGORY, W. C. Exotic germ plasm of *Arachis* L. interspecific hybrids. **Journal of Heredity**, v. 70, p. 185–193, 1979.
- GREGORY, W. C.; GREGORY, M. P.; KRAPOVICKAS, A.; SMITH, B. W.; YARBROUGH, J. A. Structures and genetic resources of Peanuts. In: C. T. Wilson (ed.) **Peanuts – Culture and Uses**. Am. Peanut Res. and Educ. Assoc., Stillwater, v. 3, p. 47–134, 1973.
- GREGORY, W. C.; KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, M. P. Structure, variation, evolution and classification in *Arachis*. In: Summerfield, R.J.; Bunting, A.H. eds. **Advances in Legume Sciences**. London: Royal Botanical Garden, Kew, 1980. p. 469–481.
- HABERLANDT, G. F. J. **Physiological plant anatomy**. MacMillan & Co., London, 1914.

- HAMMONS, R. O. The origin and history of the groundnut. In: Smartt, J. (ed.). **The Groundnut Crop- A Scientific Basis for Improvement**. London: Chapman & Hall, 1994. p. 24–42.
- HERMANN, F. J. A synopsis of the genus *Arachis*. **USDA Agricultural Monographs**. 19. Washington: USDA, 1954. 26 p.
- HICKENBICK, M. C. M.; VALLS, J. F. M.; SALZANO, F. M.; FERNANDES, M. I. B. M. Cytogenetic and evolutionary relationships in the genus *Axonopus* (Gramineae).. **Cytologia**, v. 40, p. 185–204, 1975.
- HOEHNE, F. C. Leguminosas-Papilionadas. Gênero: *Arachis*. In: HOEHNE, F. C. **Flora Brasílica**, v. 25, p. 1–20. São Paulo: Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio de São Paulo-Brasil, 1940.
- HOEHNE, F. C. **Relatório da Comissão das Linhas Telegráficas Estratégicas do Mato Grosso ao Amazonas**. Botânica, Anexo 5, pt. 12, p. 21, tab. 190, 1922.
- HUSTED, L. 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**, v. 7, p. 396–423, 1936.
- HUSTED, L. Cytological studies of the peanut *Arachis*. I. Chromosome number and morphology. **Cytologia**, v. 5, p. 109–117, 1933.
- HUSTED, L. Chromosome number in species of peanut, *Arachis*. **Amer. Naturalist**, v. 65, p. 476–477, 1931.
- IBPGR & ICRISAT. Preliminary descriptors for *Arachis*. In: **IBPGR**. Report of a Workshop on the genetic resources of wild *Arachis* species. Rome, International Board for Plant Genetic Resources, 1990. p. 1-37.
- JENSEN, W. A. **Botanical histochemistry: principles and practice**. San Francisco: W. H. Freeman & Co., 1962. 408 p.
- JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York, McGraw-Hill, 1940. 528p.
- KAWAKAMI, J. Chromosome numbers in Leguminosae. **Bot. Mag.**, v. 44, p. 319–328, 1930.
- KOCHERT, G.; STALKER, H. T.; GIMENES, M.; GALGARO, L.; LOPES, C. R.; MOORE, K. RFLP and cytogenetic evidence on the origin and evolution of allotetraploid domesticated peanut, *Arachis hypogaea* (Leguminosae). **American Journal of Botany**, v. 83, p. 1282–1291, 1996.
- KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, W. C. Taxonomía del género *Arachis*. **Bonplandia**, v. 8, p. 1–186, 1994.

- KRAPOVICKAS, A.; LAVIA G. I.; Advances in the Taxonomy of the Genus *Arachis*. In: APRES Meetings, 32, 2000. **Proceedings...** Alabama: APRES. p. 46, 2000.
- KRAPOVICKAS, A.; RIGONI, V. A. Estudios citológicos en el género *Arachis*. **Revista Invest. Agríc.**, v. 5, n. 3, p.289–293, 1951.
- LAVIA, G. I. **Caracterización cromosómica del germoplasma de maní**. Tese de Doutorado, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, 1999.
- LAVIA, G. I. Karyotypes of *Arachis palustris* and *A. praecox* (Section *Arachis*), two species with basic chromosome number $x=9$. **Citología**, v. 63, p. 177–181, 1998.
- LAVIA, G. I. Estudios cromosómicos en *Arachis* (Leguminosae). **Bonplandia**, v. 9, p. 111–120, 1996.
- LAVIA, G. I.; FERNÁNDEZ, A.; SIMPSON, C. E.; SEIJO, G. Análisis meiótico en especies silvestres de *Arachis*. **Ciencia y Técnica. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2001**. UNNE: Corrientes, 2001.[Comunicacione 016] [Disponível em: <http://www1.unne.edu.ar/cyt/2001/cyt.htm>]
- LAVIA, G. I.; FERNÁNDEZ, A.; SEIJO, J.G. Cytogenetic and molecular evidences on the evolutionary relationships among *Arachis* species. In: Sharma, A.K.; Sharma, A. **Plant Genome: Biodiversity and Evolution**. v.1, part E. Phanerogams – Angiosperm. Enfield: Science Publishers, 2008. [Chapter 5, p.101-134]
- LANGERON, M. Précis de microscopie. **Masson et Ciencie**, Paris, p. 1430, 1949.
- MADISON, M. Vascular epiphytes: their systematic occurrence and salient features. **Selbyana**, v. 2, p. 1-13, 1977.
- MENZEL, M. Y.; MARTIN, D. W. Cytotaxonomy of Some Australian Species of *Hibiscus* Sect. *Furcaria*. **Australian Journal of Botany**, v. 22, p. 141–156, 1974.
- METCALF, C. R. **Anatomy of monocotyledons**. Oxford, Claredon Press., v. 1, p. 207, 1960.
- MILLA, S. R.; ISLEIB, T. G.; STALKER, H. T. Taxonomic relationships among *Arachis* sect. *Arachis* species as revealed by AFLP markers. **Genome**, v. 48, p. 1–11, 2005.
- MONÇATO, L. **Caracterização de Acessos de Germoplasma de *Arachis stenosperma* A. Krapov. & W. C. Gregory Através de Análise Morfológica Molecular**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Botucatu – SP, 2000.

- MONÇATO, L. **Caracterização morfológica de germoplasma de espécies de *Arachis*, secção *Caulorrhizae*, pela análise multivariada.** Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista, Botucatu – SP, 1995.
- 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. **BMC Plant Biology**, v. 4, n. 11, 2004. [Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/4/11>]
- MUSSURY, R. M.; BETONI, R.; SCALON, S. P. Q.; BATISTA, M. R.; GOMES, A. A.; OLIVEIRA, A. P. A. Anatomia como Subsídio para a Taxonomia de *Gomphrena* L. ocorrentes em Antônio João – MS. **Rev. Brasil. Biociências**, v. 5, p. 393–395, 2007.
- NEWELL, C. A.; HYMOWITZ, T. Hybridization in the Genus *Glycine* Subgenus *Glycine* Willd. (Leguminosae, Papilionoideae). **American Journal of Botany**, v. 70, p. 334–348, 1983.
- OLIVEIRA, M.A.P.; VALLS, J.F.M. Morphological characterization and reproductive aspects in genetic variability studies of forage peanut. **Scientia Agricola**, v.60, n.2, p.299-304, 2003.
- OLIVEIRA, R. P.; LONGHI-WAGNER, H. M.; LEITE, K. R. B. A contribuição da anatomia foliar para a taxonomia de *Raddia* Bertol. (Poaceae: Bambusoideae). **Acta bot. bras.**, v. 22, n. 1, p. 1–19, 2008.
- OTERO, J. R. **Nota de uma viagem de estudos aos campos do sul de Mato Grosso.** Servicio de Informação Agrícola. Ministério da Agricultura, 1941. 53p.
- PAIVA, J. G. A.; FANK-DE-CARVALHO, S.; MAGALHÃES, M. P.; GRACIANO-RIBEIRO, D. Verniz vitral incolor 500: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 20, p. 257-264, 2006.
- PEÑALOZA, A. P. S. **Caracterização citogenética de diferentes genomas do gênero *Arachis* L. (Leguminosae).** Tese de Doutorado, Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Botucatu–SP, 2003.
- PEÑALOZA, A. P. S.; VALLS, J. F. M. Chromosome number and satellited chromosome morphology of eleven species of *Arachis* (Leguminosae). **Bonplandia**, v. 14, 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, 1, 1997, Campinas, **Programa e Resumos ...** Campinas: IAC, 1997. p. 39.
- PITTMAN, R. N.; VALLS, J. F. M.; SIMPSON, C. E.; SILVA, G. P.; PEÑALOZA, A. P. S. New findings on the geographical distribution of wild *Arachis* species in Central and Western Brazil. In: APRES Meetings, 28, 1996. **Proceedings ...** Orlando: APRES. p. 32, 1996.
- PIZZOLATO, P; LILLIE, R. D. Mayer's tannic acid-ferric chloride stain for mucins. **J Histochem Cytochem**, v. 21, p. 56–64, 1973.
- RAMOS, V. R. **Caracterização da resistência às Cercosporioses, lagarta do cartucho e lagarta da soja em espécies silvestres do gênero *Arachis*, para uso no melhoramento genético do amendoim.** Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista, Botucatu – SP, 2007.
- REED, E. L. Anatomy, Embryology, and Ecology of *Arachis hypogaea*. **Botanical Gazette**, v. 78, n. 3, p. 289-310, 1924.
- REIS, C.; BIERAS, A. C.; SAJO, M. G. Anatomia foliar de Melastomataceae do Cerrado do Estado de São Paulo. **Revista Brasil. Bot.**, v.28, n. 3, p. 451–466, 2005.
- RESSLAR, P. M.; GREGORY, W. C. A cytological study of three diploid species of the genus *Arachis* L. **Journal of Heredity**, v. 70, p. 13–16, 1979.
- RIO, M. C. S.; KINOSHITA, L. S.; CASTRO, M. M. Anatomia foliar como subsídio para a taxonomia de espécies de *Forsteronia* G. Mey. (Apocynaceae) dos cerrados paulistas. **Rev. Brasil. Bot.**, v. 28, n. 4, p. 713–726, 2005.
- ROCHA, J. F.; ROSA, M. M. T.; FRADE, C. C. M.; DIERSMANN, E. M.; Estudo anatômico e histoquímico em folhas de *Plantago major* L. e *Plantago australis* Lam. (Plantaginaceae). **Rev. Univ. Rural**, Série. Ciências da Vida, v. 22, n. 1, p. 33–41, 2002.
- RODRIGUES, L. S.; SEIJO, J. G.; LAVIA, G.; FERNÁNDEZ, A.; SIMPSON, C. E. Meiotic Behavior in Wild Diploid *Arachis* (Leguminosae) Species. **Cytologia**, v. 69, p. 209–214, 2004.
- RODRIGUES, L. S.; VALLS, J. F. M. Cruzabilidade de *Arachis vallsii* com espécies das secções *Arachis*, *Caulorrhizae*, *Erectoides* e *Procumbentes* do gênero *Arachis*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 3,

- 2005, Gramado. **Anais...** Passo Fundo: SBMP/Embrapa Trigo, 2005. CD-ROM. [Resumo 7178]
- SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Citogenética do gênero *Leucaena* Benth. **Ciência Rural**, v. 34, p. 309–314, 2004.
- SEIJO, J. G.; LAVIA, G. I.; FERNÁNDEZ, A.; KRAPOVICKAS, A.; DUCASSE, D.; MOSCONE, E. A. Physical mapping of the 5S and 18S–25S rRNA genes by FISH as evidence that *Arachis duranensis* and *A. ipaënsis* are the wild diploid progenitors of *A. hypogaea* (Leguminosae). **American Journal of Botany**, v. 91, p. 1294–1303, 2004.
- SIMPSON, C. E.; FARIAS, M. J. Advances in the characterization of diversity in section *Arachis*: archeological evidence, crossing results and their relationship in understanding the origins of *Arachis hypogaea* L. In: SIRGEALC. Simpósio de Recursos Genéticos para a América Latina e o Caribe, 2001, Londrina. **Anais ... Londrina: IAPAR**, 2001. p. 103–104.
- SINGH, U.; SINGH, B. Tropical grain legumes as important human foods. **Economic Botany**, v. 46, p. 310–321, 1992.
- SILVA, L. M.; ALQUINI, Y. Anatomia comparativa de folhas e caules de *Axonopus scoparius* (Flügge) Kuhl. e *Axonopus fissifolius* (Raddi) Kuhl. (Poaceae). **Rev. Brasil. Bot.**, v. 26, n. 2, p. 185–192, 2003.
- SILVA, L. M.; ALQUINI, Y.; CAVALLET, V. J. Inter-relações entre a anatomia vegetal e a produção vegetal. **Acta bot. bras.**, v. 19, n. 1, p. 183–194, 2005.
- SOMAROO, B. H.; GRANT, W. F. Chromosome differentiation in diploid species of *Lotus* (Leguminosae). **TAG Theoretical and Applied Genetics**, v. 42, p. 34–40, 1972.
- 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.
- STALKER, H. T.; MOSS, J. P. Speciation, cytogenetics, and utilization of *Arachis* species. **Advances in Agronomy**, v. 41, p. 1–40, 1987.
- SUBRAHMANYAM, P.; ANAIDU, R.; REDDY, L. J.; KUMAR, P. L.; FERGUSON, M. N. Resistance to groundnut rosette disease in wild *Arachis* species. **Annals of Applied Biology**, v. 139, p. 45–50, 2001.
- TEIXEIRA, C. C. **Estudo da cruzabilidade de espécies das secções *Caulorrhizae*, *Erectoides* e *Procumbentes* do gênero *Arachis* (Leguminosae)**. 1999. 93 f.

- Dissertação (Mestrado)– Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 1999.
- THERMAN, E. Cytotaxonomy of the Tribe *Polygonatae*. **American Journal of Botany**, v. 43, p. 134–142, 1956.
- VALLS, J. F. M. Taxonomia do gênero *Arachis* à luz das investigações mais recentes. **V Encontro Nacional de Especialistas em Arachis**. Córdoba – Argentina, 2006.
- VALLS, J. F. M. Recursos genéticos de *Arachis*: Avanços no conhecimento botânico e a situação atual de conservação e uso. **Agrociencia**, Montevideú, v. 9, p. 123–132, 2005.
- VALLS, J. F. M.; SIMPSON, C. E. New species of *Arachis* L. (Leguminosae) from Brazil, Paraguay and Bolivia. **Bonplandia**, v. 14, p. 35–63, 2005.
- VALLS, J. F. M.; SIMPSON, C. E. Novas espécies de *Arachis* (Leguminosae). Simpósio Latino-Americano de Recursos Genéticos Vegetais, 1, 1997, Campinas. Programas e Resumos... Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, p. 27–28, 1997.
- VEIGA, R. F. A.; CORSO, G. M.; CURI, P. R. Aspectos da organografia e anatomia foliar do amendoim: genótipos SO–53 e So–909. **Bragantia**, Campinas, v. 53, n. 1, p. 1–17, 1994.
- VEIGA, R. F. A.; CORSO, G. M.; CURI, P. R. Morfologia dos estômatos em folíolos de amendoim, cultivares Tatu e SO-909. **Bragantia**, Campinas, v. 51, n. 1, p. 7–15, 1992a.
- VEIGA, R. F. A.; CORSO, G. M.; CURI, P. R.; TEIXEIRA, J. P. F. Análise histoquímica foliar do amendoim: genótipos ‘Tatu’ e SO–909. **Bragantia**, Campinas, v. 51, n. 2, p. 129–149, 1992b.
- VEIGA, R.F.A.; GODOY, I.J.; SAVY FILHO, A.; GERIN, M.A.N.; VALLS, J.F.M. **Descritores de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) utilizados no Instituto Agronômico**. Campinas: Instituto Agronômico, 1986. (Boletim Técnico, 108). p 21.
- YARBROUGH, J. A. *Arachis hypogaea*. The Seedling, its Epicotyl and Foliar Organs. **American Journal of Botany**, v. 44, n 1, p. 19-30, 1957.

APÊNDICE

Tabulação dos dados referentes às análises de coloração de grão de pólen.

<i>A. hypogaea</i>	Dia 01	Dia 02	Dia 03	Dia 04	Dia 05	Dia 06	Dia 07
	5-mar	12-mar	18-mar	20-mar	26-mar	31-mar	2-abr
	35%	53%	96%	96%	94%	89%	97%
	52%	45%	100%	97%	96%	90%	92%
	82%	54%	98%	97%	98%	92%	92%
	84%	68%	99%	91%	97%	85%	92%
	80%	52%	98%	95%	94%	92%	96%
Média do Dia	66,60%	54,40%	98,20%	95,20%	95,80%	89,60%	93,80%
Média Total	84,80%						
Desvio Pad.	17,17%						

<i>A. duranensis</i>	Dia 01	Dia 02	Dia 03	Dia 04	Dia 05	Dia 06	Dia 07
	27-fev	11-mar	18-mar	19-mar	20-mar	25-mar	26-mar
	96%	88%	96%	93%	94%	98%	86%
	96%	96%	100%	94%	94%	97%	83%
	93%	96%	96%	94%	97%	95%	89%
	91%	95%	100%	91%	92%	95%	91%
	97%	92%	95%	91%	96%	98%	90%
Média do Dia	94,60%	93,40%	97,40%	92,60%	94,60%	96,60%	87,80%
Média Total	93,86%						
Desvio Pad.	3,15%						

<i>A. ipaënsis</i> x <i>A. duranensis</i> 2n = 40	Dia 01	Dia 02	Dia 03	Dia 04	Dia 05	Dia 06	Dia 07
	14-fev	14-fev	14-fev	15-fev	15-fev	15-fev	15-fev
	90%	84%	76%	88%	95%	96%	95%
	82%	86%	83%	88%	96%	100%	96%
	88%	81%	86%	82%	91%	100%	100%
	92%	86%	90%	82%	99%	99%	94%
	87%	89%	80%	89%	96%	100%	99%
Média do Dia	87,80%	85,20%	83,00%	85,80%	95,40%	99,00%	96,80%
Média Total	90,43%						
Desvio Pad.	6,45%						

<i>A. ipaënsis</i> x <i>A. magna</i> 01 B	Dia 01	Dia 02	Dia 03	Dia 04	Dia 05	Dia 06	Dia 07
	15-fev	20-fev	26-fev	27-fev	27-fev	2-abr	14-abr
	73%	95%	96%	89%	94%	98%	85%
	89%	94%	93%	93%	89%	98%	95%
	83%	92%	92%	86%	89%	97%	88%
	83%	95%	87%	86%	97%	96%	95%
	79%	93%	91%	87%	92%	95%	89%
Média do Dia	81,40%	93,80%	91,80%	88,20%	92,20%	96,80%	90,40%
Média Total	90,66%						
Desvio Pad.	4,88%						

<i>A. ipaënsis</i> x <i>A. magna</i> 02 B	Dia 01	Dia 02	Dia 03	Dia 04	Dia 05	Dia 06	Dia 07
	19-fev	19-fev	20-fev	22-fev	26-fev	28-fev	29-fev
	93%	93%	85%	93%	95%	94%	89%
	84%	89%	82%	88%	87%	90%	90%
	85%	98%	89%	90%	89%	93%	85%
	95%	93%	89%	96%	92%	83%	89%
	83%	90%	92%	100%	90%	85%	90%
Média do Dia	88,00%	92,60%	87,40%	93,40%	90,60%	89,00%	88,60%
Média Total	89,94%						
Desvio Pad.	2,32%						

<i>A. ipaënsis</i> x <i>A. magna</i> 10 B	Dia 01	Dia 02	Dia 03	Dia 04	Dia 05	Dia 06	Dia 07
	15-fev	21-fev	22-fev	3-mar	26-mar	31-mar	1-abr
	91%	86%	84%	87%	87%	98%	80%
	88%	78%	92%	84%	80%	100%	81%
	89%	80%	76%	84%	81%	100%	85%
	89%	85%	80%	79%	74%	100%	83%
	81%	78%	87%	75%	80%	94%	81%
Média do Dia	87,60%	81,40%	83,80%	81,80%	80,40%	98,40%	82,00%
Média Total	85,06%						
Desvio Pad.	6,34%						

<i>A. ipaënsis</i> x <i>A. magna</i> 11 B	Dia 01	Dia 02	Dia 03	Dia 04	Dia 05	Dia 06	Dia 07
	25-mar	26-mar	9-abr	10-abr	11-abr	14-abr	15-abr
	100%	100%	98%	100%	100%	99%	100%
	99%	98%	100%	99%	97%	98%	100%
	99%	99%	99%	98%	99%	100%	100%
	99%	100%	100%	99%	99%	100%	100%
	99%	99%	98%	99%	99%	99%	99%
Média do Dia	99,20%	99,20%	99,00%	99,00%	98,80%	99,20%	99,80%
Média Total	99,17%						
Desvio Pad.	0,31%						

<i>A. ipaënsis</i> x <i>A. magna</i> 12 B	Dia 01	Dia 02	Dia 03	Dia 04	Dia 05	Dia 06	Dia 07
	29-fev	6-mar	12-mar	26-mar	28-mar	1-abr	3-abr
	91%	88%	90%	95%	97%	94%	94%
	94%	87%	94%	95%	95%	91%	92%
	92%	93%	96%	98%	90%	96%	92%
	92%	90%	94%	95%	98%	91%	92%
	89%	86%	97%	89%	91%	93%	97%
Média do Dia	91,60%	88,80%	94,20%	94,40%	94,20%	93,00%	93,40%
Média Total	92,80%						
Desvio Pad.	2,01%						

<i>A. ipaënsis</i> x <i>A. magna</i> 13 B	Dia 01	Dia 02	Dia 03	Dia 04	Dia 05	Dia 06	Dia 07
	22-fev	4-mar	7-mar	13-mar	18-mar	25-mar	27-mar
	98%	98%	100%	100%	98%	99%	99%
	99%	100%	96%	100%	100%	100%	98%
	100%	99%	100%	100%	100%	96%	95%
	95%	98%	100%	99%	99%	100%	99%
	100%	98%	100%	98%	98%	99%	100%
Média do Dia	98,40%	98,60%	99,20%	99,40%	99,00%	98,80%	98,20%
Média Total	98,80%						
Desvio Pad.	0,43%						

<i>A. ipaënsis</i> x <i>A. magna</i> 14 B	Dia 01	Dia 02	Dia 03	Dia 04	Dia 05	Dia 06	Dia 07
	15-fev	22-fev	19-mar	20-mar	25-mar	31-mar	1-abr
	99%	99%	99%	97%	99%	100%	100%
	99%	100%	100%	97%	100%	98%	98%
	100%	98%	100%	100%	100%	99%	99%
	100%	98%	100%	100%	98%	100%	98%
	99%	98%	98%	99%	99%	99%	100%
Média do Dia	99,40%	98,60%	99,40%	98,60%	99,20%	99,20%	99,00%
Média Total	99,06%						
Desvio Pad.	0,34%						

<i>A. ipaënsis</i> x <i>A. magna</i> 15 B	Dia 01	Dia 02	Dia 03	Dia 04	Dia 05	Dia 06	Dia 07
	27-fev	28-fev	3-mar	26-mar	28-mar	10-abr	16-abr
	98%	100%	97%	99%	100%	99%	97%
	100%	98%	97%	97%	100%	98%	98%
	98%	100%	99%	97%	100%	99%	99%
	98%	100%	95%	96%	99%	100%	98%
	97%	99%	94%	100%	100%	99%	99%
Média do Dia	98,20%	99,40%	96,40%	97,80%	99,80%	99,00%	98,20%
Média Total	98,40%						
Desvio Pad.	1,14%						

<i>A. ipaënsis</i> x <i>A. magna</i> 16 B	Dia 01	Dia 02	Dia 03	Dia 04	Dia 05	Dia 06	Dia 07
	25-fev	28-fev	29-fev	13-mar	18-mar	28-mar	28-abr
	92%	91%	89%	91%	96%	100%	90%
	89%	93%	93%	87%	95%	100%	91%
	94%	93%	89%	84%	91%	99%	94%
	93%	91%	97%	89%	92%	99%	96%
	93%	90%	86%	87%	96%	100%	94%
Média do Dia	92,20%	91,60%	90,80%	87,60%	94,00%	99,60%	93,00%
Média Total	92,69%						
Desvio Pad.	3,66%						

<i>A. ipaënsis</i> x <i>A. magna</i> 18 B	Dia 01	Dia 02	Dia 03	Dia 04	Dia 05	Dia 06	Dia 07
	22-fev	27-fev	28-fev	28-fev	29-fev	25-mar	28-mar
	97%	100%	99%	99%	100%	99%	99%
	99%	99%	99%	100%	100%	99%	99%
	97%	99%	99%	99%	100%	99%	99%
	100%	100%	100%	99%	100%	100%	100%
	100%	100%	99%	99%	100%	99%	100%
Média do Dia	98,60%	99,60%	99,20%	99,20%	100,00%	99,20%	99,40%
Média Total	99,31%						
Desvio Pad.	0,43%						

<i>A. ipaënsis</i> x <i>A. magna</i> 19 B	Dia 01	Dia 02	Dia 03	Dia 04	Dia 05	Dia 06	Dia 07
	25-fev	29-fev	7-mar	19-mar	26-mar	27-mar	2-abr
	99%	99%	99%	98%	100%	99%	99%
	100%	100%	99%	95%	98%	99%	98%
	98%	99%	99%	100%	100%	99%	98%
	99%	98%	99%	98%	99%	99%	99%
	100%	98%	99%	98%	100%	98%	100%
Média do Dia	99,20%	98,80%	99,00%	97,80%	99,40%	98,80%	98,80%
Média Total	98,83%						
Desvio Pad.	0,51%						

<i>A. ipaënsis</i> x <i>A. magna</i> 01A	Dia 01	Dia 02	Dia 03	Dia 04	Dia 05	Dia 06	Dia 07
	21-fev	27-mar	28-mar	1-abr	2-abr	3-abr	7-abr
	100%	100%	100%	99%	100%	99%	100%
	98%	100%	100%	98%	99%	99%	99%
	100%	100%	100%	100%	99%	100%	99%
	100%	100%	100%	99%	100%	99%	99%
	100%	100%	100%	100%	99%	99%	99%
Média do Dia	99,60%	100,00%	100,00%	99,20%	99,40%	99,20%	99,20%
Média Total	99,51%						
Desvio Pad.	0,36%						

<i>A. ipaënsis</i> x <i>A. magna</i> 02A	Dia 01	Dia 02	Dia 03	Dia 04	Dia 05	Dia 06	Dia 07
	7-mar	10-mar	25-mar	26-mar	31-mar	1-abr	2-abr
	100%	100%	99%	100%	99%	100%	100%
	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%
	100%	100%	100%	99%	98%	99%	100%
	100%	100%	100%	100%	98%	100%	99%
	100%	100%	99%	100%	100%	100%	97%
Média do Dia	100,00%	100,00%	99,60%	99,80%	99,00%	99,80%	99,00%
Média Total	99,60%						
Desvio Pad.	0,43%						

<i>A. ipaënsis</i> x <i>A. magna</i> 03A	Dia 01	Dia 02	Dia 03	Dia 04	Dia 05	Dia 06	Dia 07
	25-mar	28-mar	31-mar	1-abr	23-abr	24-abr	28-abr
	100%	100%	100%	99%	99%	100%	100%
	99%	100%	98%	100%	99%	96%	100%
	99%	98%	98%	99%	99%	97%	100%
	100%	97%	99%	97%	99%	96%	98%
	100%	99%	100%	99%	98%	94%	99%
Média do Dia	99,60%	98,80%	99,00%	98,80%	98,80%	96,60%	99,40%
Média Total	98,71%						
Desvio Pad.	0,99%						

<i>A. ipaënsis</i> x <i>A. magna</i> 04A	Dia 01	Dia 02	Dia 03	Dia 04	Dia 05	Dia 06	Dia 07
	12-mai	12-mai	12-mai	12-mai	12-mai	14-mai	16-mai
	93%	98%	99%	97%	97%	99%	98%
	99%	100%	99%	98%	100%	99%	97%
	100%	99%	100%	96%	99%	99%	98%
	99%	100%	99%	98%	100%	100%	98%
	100%	98%	100%	97%	99%	100%	94%
Média do Dia	98,20%	99,00%	99,40%	97,20%	99,00%	99,40%	97,00%
Média Total	98,46%						
Desvio Pad.	1,01%						

<i>A. hoehnei</i> 01	Dia 01	Dia 02	Dia 03	Dia 04	Dia 05	Dia 06	Dia 07
	3-mar	7-mar	18-mar	19-mar	26-mar	28-mar	31-mar
	98%	100%	99%	100%	100%	96%	100%
	97%	99%	100%	99%	97%	99%	100%
	100%	100%	100%	100%	100%	97%	98%
	98%	100%	100%	97%	100%	97%	99%
	99%	99%	99%	99%	99%	95%	100%
Média do Dia	98,40%	99,60%	99,60%	99,00%	99,20%	96,80%	99,40%
Média Total	98,86%						
Desvio Pad.	1,00%						

<i>A. hoehnei</i> 02	Dia 01	Dia 02	Dia 03	Dia 04	Dia 05	Dia 06	Dia 07
	3-mar	7-mar	10-mar	11-mar	12-mar	18-mar	19-mar
	100%	99%	98%	98%	99%	100%	98%
	97%	100%	96%	100%	99%	100%	100%
	99%	100%	100%	98%	99%	100%	98%
	100%	100%	99%	100%	100%	99%	98%
	99%	100%	99%	99%	100%	98%	96%
Média do Dia	99,00%	99,80%	98,40%	99,00%	99,40%	99,40%	98,00%
Média Total	99,00%						
Desvio Pad.	0,62%						

<i>A. hoehnei</i> 03	Dia 01	Dia 02	Dia 03	Dia 04	Dia 05	Dia 06	Dia 07
	4-mar	10-mar	12-mar	19-mar	20-mar	25-mar	28-mar
	100%	100%	100%	100%	100%	98%	100%
	100%	100%	100%	99%	97%	99%	100%
	99%	100%	99%	100%	100%	100%	100%
	98%	100%	99%	100%	100%	100%	100%
	98%	100%	97%	100%	99%	99%	100%
Média do Dia	99,00%	100,00%	99,00%	99,80%	99,20%	99,20%	100,00%
Média Total	99,46%						
Desvio Pad.	0,46%						

<i>A. hoehnei</i> 04	Dia 01	Dia 02	Dia 03	Dia 04	Dia 05	Dia 06	Dia 07
	6-mar	11-mar	18-mar	20-mar	26-mar	28-mar	31-mar
	99%	100%	100%	100%	100%	100%	99%
	100%	100%	100%	100%	99%	100%	100%
	99%	100%	100%	100%	99%	100%	100%
	98%	100%	99%	98%	97%	100%	100%
	98%	100%	100%	99%	95%	100%	100%
Média do Dia	98,80%	100,00%	99,80%	99,40%	98,00%	100,00%	99,80%
Média Total	99,40%						
Desvio Pad.	0,75%						

<i>A. hoehnei</i> 05	Dia 01	Dia 02	Dia 03	Dia 04	Dia 05	Dia 06	Dia 07
	6-mar	12-mar	18-mar	26-mar	27-mar	31-mar	1-abr
	98%	100%	99%	99%	99%	100%	99%
	98%	99%	99%	100%	100%	100%	99%
	100%	98%	99%	99%	99%	100%	98%
	100%	99%	100%	99%	100%	100%	100%
	99%	100%	100%	99%	99%	100%	100%
Média do Dia	99,00%	99,20%	99,40%	99,20%	99,40%	100,00%	99,20%
Média Total	99,34%						
Desvio Pad.	0,32%						

<i>A. hoehnei</i> 06	Dia 01	Dia 02	Dia 03	Dia 04	Dia 05	Dia 06	Dia 07
	7-mar	26-mar	27-mar	7-abr	9-abr	11-abr	15-abr
	100%	99%	99%	100%	99%	98%	99%
	100%	100%	98%	100%	98%	97%	99%
	98%	99%	100%	100%	99%	95%	99%
	100%	100%	99%	100%	95%	96%	99%
	97%	100%	97%	99%	100%	96%	98%
Média do Dia	99,00%	99,60%	98,60%	99,80%	98,20%	96,40%	98,80%
Média Total	98,63%						
Desvio Pad.	1,13%						

<i>A. hoehnei</i> 07	Dia 01	Dia 02	Dia 03	Dia 04	Dia 05	Dia 06	Dia 07
	18-mar	19-mar	31-mar	3-abr	4-abr	9-abr	9-abr
	100%	100%	100%	97%	100%	100%	99%
	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	99%	98%	100%	96%	100%	98%	98%
	99%	99%	99%	99%	99%	100%	99%
	100%	100%	100%	98%	100%	100%	100%
Média do Dia	99,60%	99,40%	99,80%	98,00%	99,80%	99,60%	99,20%
Média Total	99,34%						
Desvio Pad.	0,63%						

<i>A. hoehnei</i> 08	Dia 01	Dia 02	Dia 03	Dia 04	Dia 05	Dia 06	Dia 07
	20-mar	25-mar	26-mar	2-abr	4-abr	9-abr	10-abr
	100%	98%	99%	100%	99%	100%	100%
	99%	97%	99%	100%	100%	99%	100%
	98%	100%	100%	99%	98%	99%	98%
	100%	100%	100%	99%	100%	100%	99%
	100%	97%	100%	100%	100%	100%	98%
Média do Dia	99,40%	98,40%	99,60%	99,60%	99,40%	99,60%	99,00%
Média Total	99,29%						
Desvio Pad.	0,45%						

<i>A. ipaënsis</i> 02	Dia 01	Dia 02	Dia 03	Dia 04	Dia 05	Dia 06	Dia 07
	25-mar	27-mar	1-abr	8-abr	14-abr	15-abr	6-mai
	80%	92%	83%	69%	95%	76%	76%
	75%	81%	80%	74%	89%	76%	62%
	82%	76%	85%	85%	84%	91%	70%
	79%	85%	86%	79%	87%	83%	71%
	81%	83%	87%	66%	95%	89%	57%
Média do Dia	79,40%	83,40%	84,20%	74,60%	90,00%	83,00%	67,20%
Média Total	80,26%						
Desvio Pad.	7,43%						

<i>A. ipaënsis</i> 03	Dia 01	Dia 02	Dia 03	Dia 04	Dia 05	Dia 06	Dia 07
	27-mar	1-abr	11-abr	18-abr	18-abr	29-abr	6-mai
	99%	100%	99%	100%	100%	100%	91%
	98%	100%	100%	98%	100%	98%	99%
	97%	100%	100%	97%	100%	99%	93%
	97%	100%	100%	99%	100%	100%	93%
	97%	99%	100%	100%	98%	97%	100%
Média do Dia	97,60%	99,80%	99,80%	98,80%	99,60%	98,80%	95,20%
Média Total	98,51%						
Desvio Pad.	1,66%						

<i>A. ipaënsis</i> 04	Dia 01	Dia 02	Dia 03	Dia 04	Dia 05	Dia 06	Dia 07
	3-abr	10-abr	22-abr	23-abr	6-mai	9-mai	13-mai
	97%	99%	98%	98%	95%	100%	96%
	87%	99%	98%	97%	96%	98%	92%
	100%	98%	90%	100%	92%	93%	92%
	100%	99%	98%	98%	97%	98%	98%
	99%	99%	96%	100%	95%	99%	94%
Média do Dia	96,60%	98,80%	96,00%	98,60%	95,00%	97,60%	94,40%
Média Total	96,71%						
Desvio Pad.	1,71%						

<i>A. ipaënsis</i> 05	Dia 01	Dia 02	Dia 03	Dia 04	Dia 05	Dia 06	Dia 07
	1-abr	4-abr	8-abr	15-abr	25-abr	28-abr	8-mai
	99%	97%	74%	100%	97%	98%	98%
	100%	90%	67%	99%	98%	97%	98%
	98%	89%	73%	97%	99%	99%	100%
	100%	90%	67%	98%	99%	98%	99%
	100%	95%	66%	97%	98%	100%	98%
Média do Dia	99,40%	92,20%	69,40%	98,20%	98,20%	98,40%	98,60%
Média Total	93,49%						
Desvio Pad.	10,89%						

Número de Flores avaliadas por indivíduo.

Espécie / Híbrido	2008				Nº de flores
	Fev	Mar	Abr	Mai	
<i>A. hypogaea</i>	3	7	1	0	11
<i>A. duranensis</i>	1	9	1	0	11
<i>A. ipaënsis</i> x <i>A. duranensis</i> 2n = 40	22	11	0	0	33
<i>A. ipaënsis</i> x <i>A. magna</i>					
01 B	5	0	2	0	7
02 B	7	3	0	0	10
03 B	0	0	0	0	0
04 B	0	0	0	0	0
05 B	1	1	1	0	3
06 B	0	0	0	0	0
07 B	3	0	0	0	3
08 B	0	0	0	0	0
09 B	0	0	2	3	5
10 B	3	3	2	0	8
11 B	0	2	6	0	8
12 B	1	4	2	0	7
13 B	1	8	1	0	10
14 B	2	4	3	0	9
15 B	2	3	3	0	8
16 B	3	3	1	0	7
17 B	0	0	0	0	0
18 B	5	2	2	0	9
19 B	2	4	2	0	8
01A	1	2	5	0	8
02A	0	5	2	0	7
03A	0	3	5	0	8
04A	0	0	4	13	17
05A	0	0	0	0	0
<i>A. hoehnei</i>					
01	0	7	1	0	8
02	0	10	1	0	11
03	0	7	0	0	7
04	0	7	1	0	8
05	0	6	2	0	8
06	0	3	4	0	7
07	0	3	4	0	7
08	0	3	4	0	7
<i>A. ipaënsis</i>					
01	0	4	1	0	5
02	0	2	4	1	7
03	0	1	5	1	7
04	0	0	4	4	8
05	0	0	6	1	7
Total	62	127	82	23	294

ANEXO 1

Protocolos de preparação das soluções utilizadas na análise molecular.

1. Tampão 2x CTAB

2% CTAB

100mM Tris-HCl (pH 8,0)

20mM de EDTA (pH 8,0)

1,4 M NaCl

1% PVP 40

2. Tampão de Precipitação CTAB

1% CTAB

50mM Tris-HCl (pH 8,0)

20mM de EDTA (pH 8,0)

3. TE

10 ml Tris-HCl

2 ml EDTA

Completar o volume com água destilada.

4. Tampão Formamida

19,6 ml Formamida

400 µl EDTA 0,5M pH 8,0

5 mg Azul de bromofenol

5 mg Xilenocianol

5. Gel de Agarose 1%

1 g Agarose

100 ml TBE 1x

Dissolver e adicionar 30 µl de brometo de etídeo.

6. TBE

54g Tris

27,5g de ácido bórico

20ml de EDTA 0,5M

7. Revelador

60 g Carbonato de sódio (Na_2CO_3)

1,08 ml Formaldeído a 37% - adicionar na hora do uso

2000 ml H_2O

8. Fixador

200 ml Etanol

20 ml Ácido acético glacial

até 1780 ml H_2O

9. Solução de Oxidação

30 ml Ácido nítrico

1970 ml H_2O

10. Solução de Nitrato de Prata

4 g Nitrato de prata

2000 ml H_2O

11. Solução Stop

100 ml Ácido acético glacial

1900 ml H_2O

ANEXO 2

Protocolo de preparo das soluções utilizadas no estudo histoquímico.

1. Vermelho congo 1%

1,0 g vermelho congo

Completar até 100,0 ml água destilada

O corante deve ser dissolvido em água aquecida a 50° C e filtrado em lã de vidro.

Observação: filtramos em papel filtro absorvente por duas vezes.

2. Vermelho de rutênio 0,02% (solução preparada na hora de sua utilização)

0,02 g vermelho de rutênio

100 ml de água destilada

Observação: utilizei 0,002 g de vermelho de rutênio em 10 ml de água destilada.

3. SUDAN IV 2% em etanol 92%

2,0 g SUDAN IV

100 ml etanol 92%

0,5 ml glicerina

Volume final de aproximadamente 105,0 ml.

Dissolver o corante em etanol aquecido a 60° C. Deixar esfriar e filtrar. Adicionar glicerina.