

ANÁLISIS CROMOSÓMICO DEL HÍBRIDO *ARACHIS PINTOI* X *A. REPENS* (LEGUMINOSAE) MEDIANTE CITOGENÉTICA CLÁSICA Y MOLECULAR

ORNELLA PUCCIARIELLO¹, ALEJANDRA M. ORTIZ^{1, 2}, AVELIANO FERNÁNDEZ¹ y GRACIELA I. LAVIA^{1, 2}

Summary: Chromosome analysis of the *Arachis pintoi* x *A. repens* (Leguminosae) hybrid by classical and molecular cytogenetics. Karyotypic analysis was carried out in the parental species, *Arachis pintoi* and *A. repens*, and in the interspecific hybrid. The three entities presented the same karyotype formula (18m+2sm) and one satellited chromosome pair. This satellited pair presented one pair of proximal CMA⁺ bands which corresponded to heterochromatin associated with NORs, in coincidence with the localization of 45S DNAr loci. The number of identified DAPI⁺ bands ranged between three and five pairs. The number of 5S DNAr loci was variable, with four in *A. pintoi*, two in *A. repens* and an intermediate number of three in the hybrid. The results showed chromosome similarities between parental species, indicating that they constitute a natural group. On the other hand, the three entities presented a normal meiotic behavior, with the formation of ten bivalents (10 II) in metaphase I and regular segregation of homologs in anaphase I. *Arachis pintoi*, *A. repens* and the interspecific hybrid presented a percentage for pollen viability of 97.43%, 99.4% and 97.53%, respectively. Our results indicate that the pairing and segregation of chromosomes during meiosis and the pollen formation were normal, and thus that the lack of seed production is not due to meiotic irregularities.

Key words: *Arachis*, *Caulorrhizae*, interspecific hybrid, karyotypic features, meiotic behavior, natural group.

Resumen: El análisis cariotípico fue realizado en las especies parentales *Arachis pintoi* y *A. repens*, y el híbrido interespecífico. Las tres entidades presentan la misma fórmula cariotípica (18m+2sm) y un par de cromosomas satelitados. Este par satelitado presenta un par de bandas proximales CMA⁺ que corresponden a la heterocromatina asociada a NORs, en coincidencia con la localización de loci ADNr 45S. El número de bandas DAPI⁺ identificadas oscilan entre 3 y 5 pares. El número de sitios ADNr 5S fue variable, con 4 en *A. pintoi*, 2 en *A. repens* y un número intermedio de 3 en el híbrido. Los resultados obtenidos demuestran similitudes cromosómicas entre las especies parentales, indicando que constituyen un grupo natural. Por otro lado, las tres entidades mostraron comportamiento meiótico normal, con formación de diez bivalentes (10 II) en metafase I y segregación regular de homólogos en anafase I. *Arachis pintoi*, *A. repens* y el híbrido interespecífico presentaron un porcentaje de viabilidad del polen de 97.43%, 99.4% y 97.53%, respectivamente. Nuestros resultados indican que el apareamiento y segregación de cromosomas durante la meiosis y la formación de polen son normales, por lo tanto la falta de producción de semillas no es debido a irregularidades meióticas.

Palabras clave: *Arachis*, *Caulorrhizae*, híbrido interespecífico, análisis cariotípico, grupo natural, irregularidades meióticas.

INTRODUCCIÓN

El género *Arachis* L. comprende 80 especies, todas ellas nativas de América del Sur y distribuidas

en nueve secciones taxonómicas (Krapovickas & Gregory, 1994; Valls & Simpson, 2005). La sección *Caulorrhizae* Krapov. & W.C. Greg. incluye sólo dos especies, nativas de los valles de los ríos Paraná, San Francisco y Jequitinhonha (Brasil), *Arachis pintoi* Krapov. & W.C. Greg. y *A. repens* Handro, ambas diploides y estoloníferas.

Arachis pintoi, n.v. maní forrajero perenne, tiene una alta producción de semillas y persiste en pasturas consociadas con gramíneas de crecimiento

¹ Laboratorio de Citogenética y Evolución Vegetal, Instituto de Botánica del Nordeste (UNNE-CONICET), C.C. 209, 3400 Corrientes, Argentina.

² Facultad de Cs. Exactas y Naturales y Agrimensura (UNNE), Av. Libertad 5450, 3400 Corrientes, Argentina.

agresivo como *Brachiaria* y *Cynodon*. Además, por su hábito de crecimiento postrado y tolerancia a la sombra, se considera como alternativa para la cobertura del suelo y control de la erosión en cultivos perennes, como el café, los cítricos y la palma africana (Rincón *et al.*, 1992). Esta especie fue coleccionada originalmente en Bahía (Brasil), y se ha distribuido a muchas regiones del Neotrópico por ser una buena fijadora de N y por adaptarse bien a suelos ácidos de mediana fertilidad, con alto contenido de hierro y aluminio y pobres en P y Ca (Argel & Pizarro, 1992; Pizarro & Rincón, 1994). Con adecuado sistema de manejo, la producción de carne por hectárea en pasturas en base a *A. pintoi* es mayor que en la mayoría de las forrajeras tropicales cultivadas en suelos ácidos (Lascano & Thomas, 1988; Lascano & Estrada, 1989). La plasticidad de *A. pintoi* le permite crecer en diferentes tipos de suelo, además la característica de producir semilla bajo tierra le otorga la ventaja de no necesitar resiembra. Las características mencionadas hacen de esta forrajera la leguminosa ideal para las regiones tropicales y subtropicales de América (Pizarro, 2001).

Por su parte, *A. repens*, que también posee atributos como forrajera, presenta resistencia a algunas enfermedades (Herbert & Stalker, 1981) y plagas (Stalker & Campbell, 1983), características que la convierten en un recurso genético muy interesante para ser utilizado en programas de mejoramiento que incluyan la transferencia de genes de interés agronómico.

Por lo expuesto y debido a la carencia de leguminosas forrajeras adaptadas a los sistemas pastoriles subtropicales, en los últimos años ha crecido el interés y se ha puesto mayor énfasis en la evaluación agronómica y mejoramiento genético de las especies de la sección *Caulorrhizae* (Cook & Crosthwaite, 1994; Valls & Simpson, 1994).

La realización de cruzamientos artificiales, originando nuevas combinaciones híbridas es de gran interés para el mejoramiento genético del maní forrajero, no sólo por la potencialidad de explorar el vigor híbrido en la generación F1 sino también por la introducción de características de interés agrícola. Con ese objetivo se obtuvieron varias combinaciones híbridas entre *A. pintoi* y *A. repens* (Oliveira & Valls, 2003; Castro *et al.*, 2003), pero lamentablemente los híbridos obtenidos no producen semillas (Oliveira & Valls, 2002, 2003).

Hasta el momento no hay evidencias del origen de la falta de producción de semillas.

La deficiencia en la producción de semillas puede ser originada, entre otras causas, por irregularidades meióticas ocurridas en las células madre del grano de polen por falta de homología entre los genomas. Por lo tanto, el análisis del comportamiento meiótico de los mencionados híbridos, determinando el número y los tipos de asociaciones cromosómicas (uni, bi, tri, tetraivalentes, etc.) y las irregularidades que se presentan en las células estudiadas, constituye una valiosa herramienta para la determinación del origen de la no producción de semillas.

Por otra parte, la determinación del número y morfología de los cromosomas de las especies parentales, mediante técnicas de citogenética clásica y molecular (hibridación con genes ribosomales por FISH), brinda información relevante en cuanto a la homología de los genomas. La localización de genes ribosomales por FISH en otras especies de *Arachis* ha incrementado el número de marcadores cromosómicos permitiendo establecer las homologías en un mayor número de pares cromosómicos (Seijo *et al.*, 2004; Ortiz *et al.*, 2008), particularmente en los citotipos diploide y triploide de *A. pintoi* (Lavia *et al.*, 2011).

En este contexto, en el presente trabajo se realizó: 1) la caracterización cromosómica de las especies parentales y del híbrido mediante citogenética clásica y molecular con el objetivo de determinar el grado de homología cromosómica existente entre las especies parentales y la constitución genómica del híbrido, y 2) el análisis meiótico del híbrido interespecífico a fin de aportar información sobre el origen de la falta de producción de semillas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material. En el banco de germoplasma del IBONE se mantienen plantas vivas de *A. pintoi* cv. maní forrajero perenne, derivado de la población original -BRASIL, BA, IPEAL, Cruz das Almas, 31-III-1967, Gregory & Krapovickas 12787 (CEN, CTES)-, una accesión de *A. repens* -BRASIL, MG, Sete Lagoas, 2-V-1961, Gregory *et al.* 10538 (CEN, LIL)- y el híbrido originado del cruzamiento artificial entre ambas especies (Gregory & Gregory, 1979).

Análisis mitóticos. Para la confección de los

cariotipos se realizó el aplastado de ápices de raíces obtenidas de estolones, pretratados en 8-hidroquinoleína 2mM durante 3h, fijados en alcohol etílico absoluto:ácido láctico (3:1) durante 12h a 4 °C y conservados en etanol 70% a 4 °C (Fernández & Krapovickas, 1994). Para la coloración se siguió la técnica de Feulgen. Las mediciones de los cromosomas se realizaron utilizando el programa MicroMeasure 3.3 y la clasificación de los pares de cromosomas SAT se realizó sobre la base del tamaño relativo del satélite y la posición del centrómero (Fernández & Krapovickas, 1994). A partir de estos resultados se confeccionó el idiograma para cada una de las tres entidades en estudio utilizando el programa Corel Draw versión 12.

Bandeo CMA/DAPI. Los preparados cromosómicos se realizaron siguiendo los mismos pasos que para la hibridación *in situ* hasta el secado al aire. Se utilizó la técnica de doble tinción con CMA (cromomicina A3) y DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol), siguiendo el protocolo descrito por Schweizer (1976) con modificaciones.

Hibridación *in situ* fluorescente

- Preparados cromosómicos. Se siguieron los mismos pasos que en el ítem anterior hasta la fijación. Los meristemas de ápices de raíces fueron sometidos a digestión enzimática antes de su aplastado, posteriormente despegados por congelamiento y secados al aire según Gerber & Schweizer (1988).

- Sondas de genes ribosomales. Los loci para las secuencias repetidas ADN_r 45S y 5S se localizaron usando como sonda: pA18S y pA26S, dos fragmentos de 1573 y 3296pb, respectivamente, correspondientes a las secuencias de los ARN_r 18S y 26S de *A. hypogaea* var. *fastigiata* Waldron; y pA5S, un fragmento de ~400pb correspondiente a una unidad repetida del gen ADN_r 5S de *A.*

hypogaea var. *fastigiata*, incluyendo el espaciador intergénico adyacente (Robledo & Seijo, 2008).

- Microscopía de fluorescencia y análisis de imágenes. Las preparaciones cromosómicas fueron observadas y fotografiadas utilizando un microscopio Leica DMRX asistido con una cámara digital Leica DC 350. Las imágenes digitales fueron posteriormente pseudocoloreadas y combinadas utilizando los programas Leica Q-FLUO y Leica IM 1000. El procesamiento final de las mismas se realizó utilizando el programa Adobe Photoshop versión 7.0.

Análisis meióticos. Los preparados se realizaron a partir de material fresco o de botones florales fijados en alcohol:ácido acético (3:1) y conservados en alcohol 70%. Para la coloración se utilizó orceína lactopropiónica 2% (Dyer, 1963). Se estudió el comportamiento meiótico de los cromosomas (formación de bivalentes y/o multivalentes, puentes, cromosomas rezagados) en las células madre del polen (CMP). Los datos de comportamiento meiótico de *A. pintoi* fueron extraídos de Lavia *et al.* (2011).

Viabilidad de polen. La tinción de granos de polen se realizó con carmín glicerina (Pittenger & Frolik, 1951), en anteras extraídas de flores abiertas. Los granos de polen no teñidos se consideraron inviables.

RESULTADOS

Las características cromosómicas analizadas se presentan en la Tabla 1.

Análisis mitóticos. El número cromosómico observado en los tres taxones analizados es $2n=20$ (Fig. 1). La fórmula cariotípica determinada es la misma para las tres entidades, la cual está compuesta por 9 pares de cromosomas metacéntricos y un par de cromosomas submetacéntricos (18m+2sm),

Tabla 1. Características cromosómicas de las especies *Arachis pintoi*, *A. repens* y el híbrido interespecífico *A. pintoi* x *A. repens*.

	Fórmula cariotípica	Tamaño cromosómico		Satélite	
		Rango	Promedio	Ubicación	Tipo
<i>A. pintoi</i>	18 m + 2 sm	1,68 - 2,34	2,01	Par 6	2
<i>A. repens</i>	18 m + 2 sm	1,43 - 2,11	1,77	Par 3	3
<i>A. pintoi</i> x <i>A. repens</i>	18 m + 2 sm	1,55 - 2,41	1,98	Par 3	2 3

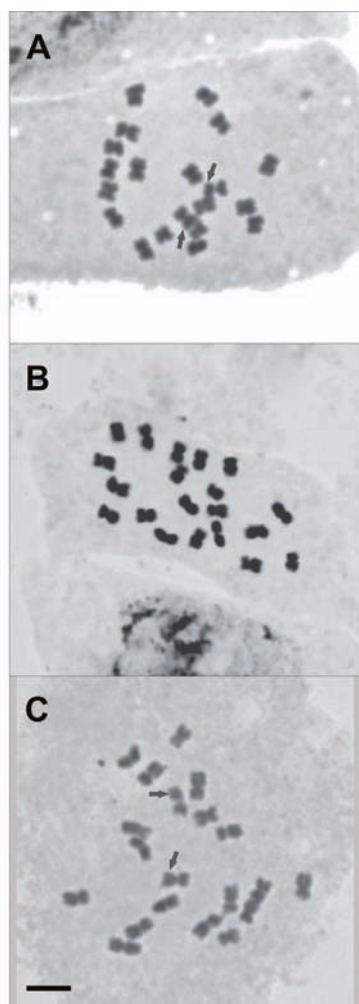


Fig. 1 A-C. Cromosomas mitóticos de especies de la Sección *Caulorrhizae* teñidos con Feulgen. **A:** *A. repens*: $2n=2x=20$. **B:** *A. pintoii*: $2n=2x=20$. **C:** *A. pintoii* x *A. repens*: $2n=2x=20$. Las flechas indican los satélites. Barra= 5 μ m.

observándose entre los metacéntricos un par con satélite. En *A. pintoii* el tamaño cromosómico varió entre 1,68 y 2,34 μ m con un promedio de 2,01 μ m y los cromosomas SAT (par 6) presentan el satélite de menor longitud que el brazo 1 y el segmento proximal diminuto, por lo que correspondería a un cromosoma SAT tipo 2. Para *A. repens* se determinó un tamaño de cromosomas de 1,43 a 2,11 μ m con un promedio de 1,77 μ m y un par de cromosomas SAT (par 3) que corresponden al tipo 3 en el cual el satélite es más o menos igual al brazo 1 más el segmento proximal que es diminuto. El híbrido

A. pintoii x *A. repens* presenta cromosomas cuyo tamaño cromosómico oscila entre 1,55 y 2,41 μ m con un promedio por cromosoma de 1,98 μ m y, dos cromosomas SAT, uno tipo 2 y otro tipo 3 ambos satélites ubicados en el par cromosómico 3.

Bandeo CMA/DAPI. En las tres entidades se identificaron entre 3 y 5 pares de bandas DAPI⁺ en posición paracentromérica, no pudiéndose determinar el número exacto en cada una de ellas. En cuanto a las regiones heterocromáticas CMA⁺ se identificó un par en cada una de las entidades analizadas.

Hibridación in situ fluorescente. En cuanto a los sitios ADNr 45S, todas las entidades presentan un par ubicado en la región proximal del cromosoma SAT, y se corresponden con las regiones heterocromáticas CMA⁺. El número de sitios correspondientes a los loci ADNr 5S fue variable en cada una de las entidades analizadas, identificándose cuatro en *A. pintoii*, dos en *A. repens* y tres en el híbrido interespecífico, siempre en posición paracentromérica; teniendo en cuenta el tamaño y la morfología de los cromosomas, y el tamaño del sitio ADNr 5S, se estima que dos de los sitios presentes en el híbrido serían aportados por el parental *A. pintoii* y un sitio aportado por *A. repens*.

Comportamiento meiótico. El análisis de las CMP de *A. repens*, *A. pintoii* y el híbrido interespecífico en metafase I mostró que presentan comportamiento meiótico normal, con formación de 10 bivalentes. La segregación de los cromosomas es regular en anafase I. Sin embargo, en el híbrido interespecífico se observó la formación de puentes sin fragmento.

Por otro lado, en las tres entidades se observó el fenómeno de citomixis en profase, metafase y telofase de la meiosis I. Como resultado de la transferencia de material cromosómico, se observan células con material cromosómico extra y células vacías.

Viabilidad de polen. El porcentaje de granos de polen viables determinado para *A. pintoii*, *A. repens* y el híbrido interespecífico es de 97,43%, 99,4% y 97,53%, respectivamente.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Se confirman los números cromosómicos de *A. pintoii* y *A. repens*, ambas especies son diploides con número básico $x=10$ (Fernández & Krapovickas, 1994; Conagin 1962); y además

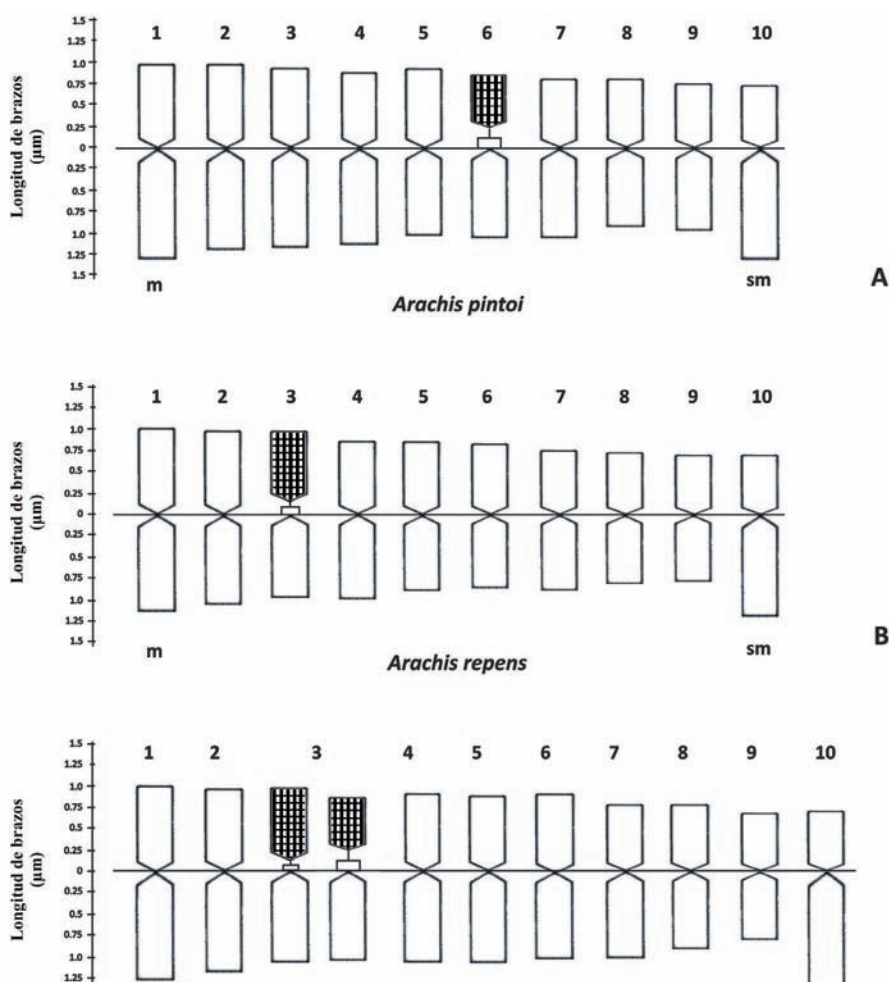


Fig. 2. Idiograma de las especies de la sección *Caulorrhizae*. **A:** *Arachis repens*. **B:** *A. pintoi*. **C:** *A. pintoi* x *A. repens*.  satélite.

el número de sitios ribosomales ADNr 45S y 5S en *A. pintoi* (Lavia *et al.*, 2011). Por su parte, el híbrido interespecífico obtenido entre ambos taxones también ha presentado $2n=2x=20$. Las características cromosómicas observadas en el híbrido interespecífico tales como: longitud cromosómica intermedia entre las dos especies parentales, el par heteromórfico de cromosomas SAT y el número de sitios de ADNr 5S confirman su condición de híbrido interespecífico.

Los cromosomas de las tres entidades estudiadas pertenecen a la categoría de pequeños de acuerdo a la clasificación de Lima de Faría (1980), ya que la media por cromosoma varió entre 1,77 y 2,01 μm (Tabla 1). Los cromosomas de los tres

taxones son en su mayoría metacéntricos y sólo un par lleva satélite, estos resultados están de acuerdo con la mayoría de las especies de *Arachis* (Stalker & Dalmacio, 1981; Singh & Moss, 1982; Cai *et al.*, 1987; Singh *et al.*, 1990; Fernández & Krapovickas, 1994; Lavia 1998, 2000, 2001; Lavia *et al.*, 2009).

Una característica cromosómica que constituye un marcador cromosómico básico en muchas especies pero particularmente en el género *Arachis*, es el tipo de cromosoma SAT (Fernández & Krapovickas, 1994). En el presente trabajo las especies parentales presentaron cromosoma SAT tipo 2 y 3, mientras que en el híbrido se ha observado un par de cromosomas SAT

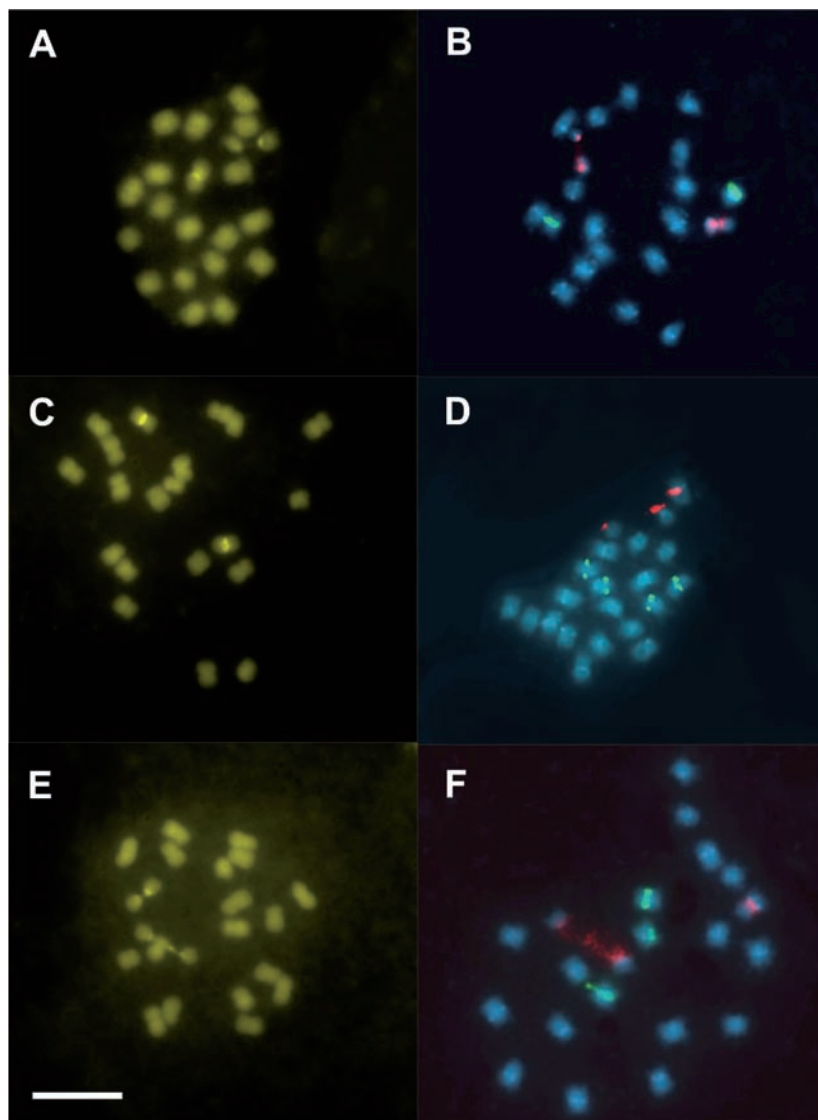


Fig. 3. Cromosomas somáticos teñidos con CMA (A, C y E) y localización de sitios ribosomales ADNr 45S y 5S mediante hibridación *in situ* fluorescente (B, D y F). Las señales fluorescentes amarillas corresponden a regiones CMA⁺, las señales verdes a sitios ADNr 5S y las señales rojas a sitios ADNr 45S. **A-B:** *Arachis repens*. **C-D:** *A. pintoii*. **E-F:** *A. pintoii* x *A. repens*. Barra= 5µm.

heteromórfico, ya que los miembros del par son diferentes, uno del tipo 2 y otro del tipo 3 (Fig. 2). Por lo tanto, el cromosoma SAT tipo 2 habría sido heredado de *A. pintoii*, mientras que el tipo 3 de *A. repens*.

Los resultados cariotípicos obtenidos por medio de técnicas convencionales en *A. pintoii* coinciden con los resultados previos (Fernández & Krapovickas, 1994; Lavia *et al.* 2011), en cuanto al

número cromosómico, la fórmula cariotípica y el tipo de satélite. Sin embargo, se hallaron diferencias en lo que respecta al tamaño cromosómico -Fernández & Krapovickas (1994) 2,33 µm, presente trabajo 2,01 µm-, que podrían deberse a la diferente metodología utilizada para realizar los cariotipos, ya que los primeros efectuaron las mediciones sobre cromosomas dibujados con cámara clara y en el presente trabajo se utilizaron imágenes digitales.

Las tres entidades analizadas han presentado bandas DAPI⁺ siempre localizadas en la región paracentromérica del cromosoma, esto permite establecer un patrón de bandeo para la sección *Caulorrhizae* -bandas heterocromáticas ricas en AT en regiones paracentroméricas-. Esta misma localización ha sido observada por Seijo & Lavia (2004) en *A. pintoi*. En este aspecto, a diferencia de lo expuesto para las especies estoloníferas, las especies de la sección *Arachis* presentan bandas pericentroméricas (Robledo *et al.*, 2009; Robledo & Seijo, 2010). Las diferencias en la localización de las bandas heterocromáticas ricas en AT sugiere la existencia de discrepancias cromosómicas estructurales entre especies de diferentes secciones. En cuanto a las bandas CMA⁺, en los tres taxones éstas coinciden con los sitios ADN_r 45S revelados por FISH, lo cual sugiere que estos sitios serían ricos en GC.

La posición paracentromérica de los clusters de ADN_r 5S de las especies de la sección *Caulorrhizae* coincide con los reportes realizados de estos sitios en posiciones cercanas al centrómero para todas las especies del género *Arachis* hasta ahora analizadas (Seijo *et al.*, 2004; Robledo *et al.*, 2009; Ortiz *et al.*, 2008). Este patrón de distribución conservado de los loci ADN_r 5S podría ser consecuencia de la posición cercana al centrómero, por el hecho de que estas regiones en cromosomas pequeños raramente sufren rearrreglos y que la mayoría de los quiasmas en *Arachis* ocurren distalmente (Robledo *et al.*, 2009).

Las similitudes encontradas en el análisis cromosómico realizado, tanto mediante técnicas de citogenética clásica como de hibridación in situ fluorescente confirman que las especies de la sección *Caulorrhizae*, *A. pintoi* y *A. repens* y el híbrido entre ambas conforman un grupo natural, como fue propuesto por Krapovickas & Gregory (1994) quienes las agruparon en la misma sección en base a caracteres exomorfológicos. Asimismo, dichas semejanzas cariotípicas permiten establecer que comparten el mismo tipo genómico y de acuerdo a la nomenclatura utilizada por Smartt & Stalker (1982), la fórmula genómica de las tres entidades sería CC.

Uno de los objetivos de este trabajo fue realizar el análisis meiótico del híbrido interespecífico a fin de aportar información sobre el origen de la falta de producción de semillas. La deficiencia en la producción de semillas puede ser originada, entre otras causas, por irregularidades meióticas

ocurridas en las células madre del grano de polen Diao *et al.*, 2009, 2010). El análisis meiótico del híbrido interespecífico realizado mostró la formación de 10 bivalentes en metafase I lo cual constituye una evidencia de que los genomas de ambos parentales presentan un alto grado de homología. Por otro lado, la ocurrencia de irregularidades meióticas como citomixis y la formación de puentes durante la segregación cromosómica en metafase I se dan en frecuencias muy bajas por lo que no contribuirían significativamente a la esterilidad del híbrido, ya que el porcentaje de viabilidad del polen es muy elevado y ambos fenómenos ocurren regularmente en ambos parentales que tienen elevada fertilidad. Por lo tanto, el comportamiento regular en meiosis I y la alta viabilidad del polen indican que la falta de producción de semillas no tendría su origen en irregularidades meióticas.

En este sentido, algunos autores proponen que la falta de producción de semillas en ciertas especies del género *Arachis* podría atribuirse a la morfología del estigma ya que la longitud de los pelos epidérmicos del mismo evitarían el acceso del grano de polen al estilo y por ende al ovario (Lu *et al.*, 1990, Oliveira & Valls, 2003). En consecuencia, el esclarecimiento de las causas de la falta de producción de semillas en el híbrido interespecífico no estaría resuelto y es un objetivo a alcanzar mediante el planteo de nuevas hipótesis en futuros estudios.

Las especies de la sección *Caulorrhizae* presentan características que las han ubicado entre las leguminosas forrajeras más importantes para las regiones tropicales y subtropicales de América. Por ello, la información obtenida en este estudio constituye un invaluable aporte para el diseño de planes de mejoramiento genético con mayor eficiencia ya que las hibridaciones y transferencias génicas son más exitosas entre especies que presentan genomas semejantes.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero de: Concejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas –CONICET, PIP 6265-, la Secretaría General de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional del Nordeste –SGCyT UNNE, PI 038-2008- y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica –ANPCyT, PICTO 2007-00099.

BIBLIOGRAFÍA

- ARGEL, P.J. & E. A. PIZARRO. 1992. Germplasm case study: *Arachis pintoi*. Pastures for the tropical lowlands: CIAT's contribution. *Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT)*: 57-73. Colombia.
- CAI Q., S. LU & C.C. CHINNAPPA. 1987. Analysis of karyotypes and Giemsa C-banding patterns in eight species of *Arachis*. *Genome* 29: 187-194.
- CASTRO, C.M., J.F.M. VALLS & C.T. KARIA. 2003. Novas combinações híbridas entre acessos da seção *Caulorrhizae* do gênero *Arachis*. *Resúmenes del IV Simposio de Recursos Genéticos para América Latina y el Caribe*. Mar del Plata, Argentina.
- CONAGIN, C.H.T.M. 1962. Espécies selvagens do gênero *Arachis*. Observações sobre os exemplares da coleção da Seção de Citologia. *Bragantia* 21: 341-374.
- COOK, B.G. & I.C. CROSTHWAITE. 1994. Utilization of *Arachis* species as forage. In: SMARTT, J. (ed.), *The groundnut crop*, pp: 624-657. London, Chapman & Hall.
- DIAO W.P., S.Y. BAO, B. JIANG, L. CUI, C.T. QIAN & J.F. CHEN. 2009. Cytogenetic studies on microsporogenesis and male gametophyte development in autotriploid cucumber (*Cucumis sativus* L.): implication for fertility and production of trisomics. *Plant Syst. Evol.* 279: 87-92.
- DIAO W.P., S.Y. BAO, B. JIANG, CUI L., C.T. QIAN & J.F. CHEN. 2010. Cytological studies on meiosis and male gametophyte in autotetraploid cucumber. *Biol. Plant.* 54: 373-376.
- DYER, A.F. 1963. The use of lacto-propionic orcein in rapid squash methods for chromosome preparations. *Stain Technol.* 38: 85-90.
- FERNÁNDEZ, A. & A. KRAPOVICKAS. 1994. Cromosomas y evolución en *Arachis* (Leguminosae). *Bonplandia* 8: 187-220.
- GERBER, G. & D. SCHWEIZER. 1988. Cytochemical heterochromatin differentiation in *Sinapis alba* using a simple air-drying technique for producing chromosome spreads. *Plant Syst. Evol.* 158: 97-106.
- GREGORY, M.P. & W.C. GREGORY. 1979. Exotic germplasm of *Arachis* L. interspecific hybrids. *Journal of Heredity* 70: 185-193.
- HERBERT, T.T. & H.T. STALKER. 1981. Resistance to peanut stunt virus in cultivated and wild *Arachis* species. *Peanut Sci.* 8: 45-47.
- KRAPOVICKAS, A. & W.C. GREGORY. 1994. Taxonomía del género *Arachis* (Leguminosae). *Bonplandia* 8: 1-186.
- LASCANO, C.E. & D. THOMAS. 1988. Forage quality and animal selection of *Arachis pintoi* in association with tropical grasses in the eastern plains of Colombia. *Grass. Forage Sci.* 43: 433-439.
- LASCANO, C.E. & J. ESTRADA. 1989. Long-term productivity of legume-based and pure grass pastures in the Eastern Plains of Colombia. *Proc. XVI Int. Grassl. Congr.* Nice, France: 1179-1180.
- LAVIA, G.I. 1998. Karyotypes of *Arachis palustris* and *A. praecox* (section *Arachis*), two species with basic chromosome number $x = 9$. *Cytologia* 63: 177-181.
- LAVIA, G.I. 2000. Chromosome studies in wild *Arachis* (Leguminosae). *Caryologia* 53: 277-281.
- LAVIA, G.I. 2001. Chromosomal characterization of germplasm of wild species of *Arachis* L. belonging to sections *Trierectoides*, *Erectoides* and *Procumbentes*. *Caryologia* 54: 115-119.
- LAVIA, G.I., A.M. ORTIZ & A. FERNÁNDEZ. 2009. Karyotypic studies in wild germplasm of *Arachis* (Leguminosae). *Genet. Resour. Crop Evol.* 56: 755-764.
- LAVIA, G.I., A.M. ORTIZ, G. ROBLEDO, A. FERNÁNDEZ & J.G. SEIJO. 2011. Origin of triploid *Arachis pintoi* Krapov. & W.C. Gregory (Leguminosae) by autopolyploidy evidenced by FISH and meiotic behavior. *Ann. Bot.* 1: 103-111.
- LIMA DE FARÍA, A. 1980. Classification of genes, rearrangements and chromosomes according to the chromosome field. *Hereditas* 93: 1-46.
- LU, J., A. MAYER & B. PICKERSGILL. 1990. Stigma morphology and pollination in *Arachis* L. (Leguminosae). *Ann. Bot.* 66: 73-82.
- OLIVEIRA, M.A.P. & J.F.M. VALLS. 2002. Produção de híbridos de amendoim forrageiro por meio de hibridação artificial. *Pesq. Agropec. Bras.* 37: 885-888.
- OLIVEIRA, M.A.P. & J.F.M. VALLS. 2003. Morphological characterization and reproductive aspects in genetic variability studies of forage peanut. *Scientia Agricola* 60: 299-304.
- ORTIZ, A., J.G. SEIJO, A. FERNÁNDEZ & G.I. LAVIA. 2008. Caracterización genómica de especies de la sección *Rhizomatosae* por medio de citogenética clásica y molecular. *Resúmenes del VI Encuentro Internacional de Especialistas en Arachis y II Simposio de Maní en el Mercosur*. San Lorenzo, Paraguay.
- PITTENGER, T.H. & E.F. FROLIK. 1951. Temporary mounts for pollen abortion determinations. *Stain Technol.* 26: 181-184.
- PIZARRO, E.A. 2001. Progresos en la inserción de especies forrajeras de *Arachis* en la matriz agrícola latinoamericana y mundial. *Resúmenes del III Simposio de Recursos Genéticos para América Latina y Caribe*. IAPAR. Londrina, Brasil. : 94-97.
- PIZARRO, E.A. & A. RINCÓN. 1994. Regional experience with forage *Arachis* in South America. En: *Biology and Agronomy of Forage Arachis*. Ed: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Colombia. : 144-157.
- RINCÓN, C.A., P.A. CUESTA, R. PÉREZ, C.E. LASCANO & J. FERGUSON. 1992. Maní Forrajero

- Perenne (*Arachis pinto* Krapovickas & Gregory): Una alternativa para ganaderos y agricultores. Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) y Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Boletín Técnico N° 219. 23 pp. Cali, Colombia.
- ROBLEDO, G. & G.J. SEIJO. 2008. Characterization of *Arachis* D genome by FISH chromosome markers and total genome DNA hybridization. *Genet. Mol. Biol.* 31: 717-724.
- ROBLEDO, G. & J.G. SEIJO. 2010. Species relationships among the wild B genome of *Arachis* species (section *Arachis*) based on FISH mapping of rDNA loci and heterochromatin detection: A new proposal for genome arrangement. *Theor. Appl. Genet.* 121:1033-1046.
- ROBLEDO, G., G.I. LAVIA & J.G. SEIJO. 2009. Species relations among wild *Arachis* species with the A genome as revealed by FISH mapping of rDNA loci and heterochromatin detection. *Theor. Appl. Genet.* 118: 1295-1307.
- SCHWEIZER, D. 1976. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma* 58: 307-324.
- SEIJO, J.G., G.I. LAVIA. 2004. Caracterización cromosómica de *Arachis pinto* Krapov. & W.C. Gregory (Leguminosae) diploide por bandeado C DAPI. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Universidad Nacional del Nordeste. Argentina.* <http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/com2004/5-Agrarias/A-009.pdf>.
- SEIJO, J.G., G.I. LAVIA, A. FERNÁNDEZ, A. KRAPOVICKAS, D. DUCASSE & E.A. MOSCONE. 2004. Physical mapping of 5S and 18S-25S rRNA genes evidences that *Arachis duranensis* and *A. ipaensis* are the wild diploid species involved in the origin of *A. hypogaea* (Leguminosae). *Amer. J. Bot.* 91: 2293-2303.
- SINGH, A.K. & J.P. MOSS. 1982. Utilization of wild relative in genetic improvement of *Arachis hypogaea* L. *Theor. Appl. Genet.* 61: 305-314.
- SINGH, A.K., A. VENKATESHWAR, J.P. MOSS & T.P.S. RAU. 1990. Chromosome number and karyomorphology of some new accesions of genus *Arachis*. *IAN* 8: 11-14.
- SMARTT, J. & H.T. STALKER. 1982. Speciation and cytogenetics in *Arachis*. In *Peanut science and technology*. Pattee H.E. & C.T. Young (eds.). Yoakun: American Peanut Research Education Society.: 21-49.
- STALKER, H.T. & W.V. CAMPBELL. 1983. Resistance of wild species of peanut to an insect complex. *Peanut Sci.* 10: 30-33.
- STALKER, H.T. & R.D. DALMACIO. 1981. Chromosomes of *Arachis* species, section *Arachis*. *J. Heredity* 72: 403-408.
- VALLS, J.F.M. & C.E. SIMPSON. 1994. Taxonomy, Natural Distribution, and Attributes of *Arachis*. In: KERRIDGE P.C. & B. HARDY (eds.), *Biology and Agronomy of Forage Arachis. Centro Internacional de Agricultura Tropical*. Colombia.
- VALLS, J.F.M. & C.E. SIMPSON. 2005. New species of *Arachis* (Leguminosae) from Brazil, Paraguay and Bolivia. *Bonplandia* 14: 35-64.

Recibido el 24 de febrero de 2012, aceptado el 17 de septiembre de 2012.

