

RETROCRUZAMENTO ENTRE UM ANFIDIPLÓIDE SINTÉTICO DE *Arachis* E O AMENDOIM CULTIVADO (*Arachis hypogaea*)

Carolina Périco Graciano¹, João Francisco dos Santos², Ailton Ferreira de Paula³, Daniel Daizo Shitara⁴, José Ignácio de Godoy⁵, Marcos Donizeti Michelotto⁶, Alessandra Pereira Fávero⁷

¹Universidade Camilo Castelo Branco / Graduando em Engenharia Agrônômica, carolina.graciano@hotmail.com

²Instituto Agrônômico . Campinas, SP / Pesquisador Científico, joaofsantos@iac.sp.gov.br,

³Universidade Federal de São Carlos / Pós Graduação em Genética e Evolução, ailtonfp_biolog@yahoo.com.br

⁴Centro de Estudos em Agronegócios / Técnico em Agropecuária, ddshitara@gmail.com

⁵Instituto Agrônômico . Campinas, SP / Pesquisador Científico, ijgodoy@iac.sp.gov.br

⁶APTA Regional Centro-Norte Pindorama, SP / Pesquisador Científico, michelotto@apta.sp.gov.br

⁷Embrapa Pecuária Sudeste / Pesquisadora Científico , alessandra.favero@embrapa.br

Resumo: O amendoim (*Arachis hypogaea*) é considerado uma importante fonte de óleo e proteína. Um dos principais problemas da cultura são as doenças fúngicas foliares, que se não controladas adequadamente afetam consideravelmente a produção de grãos. Diversas espécies silvestres apresentam resistência a doenças fúngicas foliares, podendo ser utilizadas em programas de pré-melhoramento. O objetivo deste trabalho foi a obtenção de sementes RC₁ F₁ entre um híbrido F₁ de *A. hypogaea* cv. IAC OL 4 x An 10 (*A. magna* KG 30097 x *A. stenosperma* V 15076)^{4x} e a mesma cultivar. Foram realizados cruzamentos na safra 2012/2013 e foram obtidas 264 sementes RC₁F₁. O número de sementes obtidas foi considerado satisfatório para a continuação das próximas fases do programa de melhoramento, que são a seleção de indivíduos com resistência a doenças e o início do retrocruzamento 2. Conclui-se que é possível utilizar outras espécies silvestres ainda não combinadas anteriormente na forma de anfidiplóides para a introgressão de genes de resistência a doenças no amendoim cultivado.

Palavras-chave: anfidiplóide, retrocruzamento, cruzabilidade, melhoramento genético.

Introdução

O amendoim (*Arachis hypogaea*) representa, em nível mundial, uma importante fonte de proteína e óleo. Os grãos possuem teores de óleo e proteína em torno de 45% e 20-25% respectivamente (Godoy et al., 2005). O amendoim é considerado como a quarta maior cultura oleaginosa no mundo, com 10,23% do total da safra, estando atrás da soja, algodão e colza. A produção mundial em 2009/2010 foi de 33,36 milhões de toneladas. Os principais produtores em 2010 foram a China (44,09%), Índia (14,69%), Estados Unidos da América (5,04%), Nigéria (4,65%), Indonésia (3,75%), Senegal (3,09%) e Burma (3,09%). O Brasil ocupa o 13º lugar em produção, mas a produtividade é a quarta do mundo (USDA, 2013). No mercado internacional, o amendoim é amplamente difundido como alimento humano, sendo classificado no grupo das castanhas, para efeitos de comercialização e monitoramento da qualidade (Godoy et al., 2005). O volume mundial de exportações de amendoim em grãos é de 2,3 milhões de toneladas. A comunidade europeia, Japão e outros países

asiáticos são os principais importadores de amendoim. China, Estados Unidos e Argentina são os principais exportadores, mas os dois primeiros também são grandes consumidores.

As doenças fúngicas foliares constituem fatores limitantes para a produtividade do amendoim e seu controle químico eleva os custos de produção. As cercosporioses (mancha castanha . *Cercospora arachidicola* e mancha preta . *Cercosporidium personatum*) e a ferrugem (*Puccinia arachidis*) constituem-se nas doenças de maior expressão e potencial de danos para o amendoim nas condições do estado de São Paulo (Santos et al., 2011). A verrugose (*Sphaceloma arachidis*) e a mancha barrenta (*Phoma arachidicola*) podem eventualmente causar danos econômicos, principalmente em genótipos do grupo ereto precoce (Moraes e Godoy, 1997). A mancha preta tem sido a mais prevalente doença na cultura em São Paulo (Moraes e Godoy, 1985; Moraes et al., 1988; 1994).

A pesquisa com pré-melhoramento genético do amendoim buscando introgridir resistência no amendoim cultivado que foi perdida ao longo da sua domesticação, é um dos

possíveis caminhos para tentar minimizar a perda da produção. Um dos métodos para se obter esta resistência, é a utilização de acessos conservados em Bancos de Germoplasma de espécies silvestres de amendoim. Esses bancos são responsáveis por armazenar genótipos, caracterizá-los e conservá-los principalmente para utilizá-los em programas de melhoramento de espécies com importância econômica. O banco ativo de germoplasma de espécies silvestres de *Arachis* localiza-se na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília e conta com 1250 acessos desse germoplasma, em sua grande maioria coletados em território brasileiro. Em relação à espécie cultivada, o Instituto Agrônomo de Campinas é o que detém a maior coleção do país (2100 acessos). Esse acervo genético torna essas duas instituições parceiras naturais na utilização dessa variabilidade para o aprimoramento tecnológico da cultura por meio da criação de cultivares.

Um entrave para o uso de espécies silvestres de amendoim em programas de melhoramento genético é a barreira criada pela diferença de ploidia. As espécies silvestres de amendoins são diploides ($2n = 20$ cromossomos), enquanto o amendoim cultivado é um alotetraploide ($4n = 40$ cromossomos). A espécie cultivada (*A. hypogaea*), alotetraploide, possui dois genomas, A e B, enquanto que a maioria das espécies silvestres próximas ao amendoim são diploides, possuem genomas A ou B. Assim, a estratégia consiste em cruzar espécies dos dois genomas distintos, obtendo-se híbridos diploides estéreis AB e caracterizar os híbridos quanto sua morfologia e viabilidade de pólen. Tais híbridos são tratados com colchicina, no intuito da produção de indivíduos AABB, que são cruzados com *A. hypogaea*. Para resgatar as características de interesse do amendoim cultivado, como por exemplo, produtividade e porte de planta e manter as características de resistência a doenças localizadas nas espécies silvestres, são realizados vários retrocruzamentos seguidos de seleção a campo.

O objetivo deste trabalho foi obter sementes de retrocruzamento entre um híbrido interespecífico F_1 de *A. hypogaea* cv. IAC OL 4 x An 10 (*A. magna* KG 30097 x *A. stenosperma* V 15076)^{4x} com a mesma cultivar, obtendo-se híbridos $RC_1 F_1$ que serão avaliados por marcadores moleculares quanto a resistência a doenças e seguindo a geração de $RC_2 F_1$. Serão selecionados aqueles indivíduos com características agrônomicas herdadas do amendoim cultivado e resistência as doenças oriunda das espécies silvestres.

Material e métodos

O amendoim é uma planta autógama, necessitando-se assim da emasculação e polinização artificial para a realização de cruzamentos controlados.

O experimento foi conduzido na Embrapa Pecuária Sudeste localizada na cidade de São Carlos, São Paulo e no Instituto Agrônomo de Campinas.

Os acessos utilizados como genitor masculino foi um híbrido interespecífico F_1 , oriundo do cruzamento entre a cv. IAC OL 4 de *Arachis hypogaea* e o anfidiploide An 10 (*A. magna* KG30097 x *A. stenosperma* V15076)^{4x}, e a cv. IAC OL 4 de *Arachis hypogaea* como genitor feminino. Foram utilizadas duas repetições (vasos) do genitor masculino para cinco repetições do genitor feminino.

O trabalho iniciou-se em setembro de 2012 com o preparo do solo para receber as sementes de amendoim. Foi feita uma mistura de areia, terra, adubo (NPK) e calcário conforme a necessidade observada na análise de solo. As sementes dos genitores foram tratadas com Ethrel (6ml/l) e revestidas com Thiram® e mantidas em saquinhos por três semanas até as plântulas adquirirem um tamanho de 15cm quando foram transplantadas para os vasos.

Os cruzamentos foram conduzidos em condições de casa de vegetação. O período de florescimento começou no final de novembro, as flores foram pouco numerosas a princípio e atingiram um número máximo quatro a seis semanas mais tarde, e daí em diante declinaram em quantidade. O aparecimento das flores se dá da base para a ponta dos ramos e cada axila só apresenta uma flor aberta por vez, sendo muito raro encontrar duas flores abertas numa mesma axila. A flor é muito efêmera, os botões se abrem nas primeiras horas da manhã e no fim do dia as flores já estão murchas.

A técnica de cruzamentos foi a mesma utilizada por Conagin (1956) com adaptações, que consta de dois processos: primeiro, faz-se a emasculação dos botões, e, depois a polinização. A emasculação precisa ser feita em botões ainda fechados, a partir das 15 horas. Com uma pinça de pontas finas elimina-se o lábio inferior; afasta-se o estandarte e asas força-se a quilha para baixo, removendo-a, deixando expostas as anteras e o estilo com seu estigma; elimina-se então as anteras e torna-se a fechar o botão. Se houver grãos de pólen sobre elas, esta flor já foi contaminada e deve ser eliminada. A polinização se faz na manhã seguinte, entre oito e nove horas, coletando o pólen desejado com a pinça e

colocando-o sobre o estigma da flor que foi emasculada na véspera.

Feito o cruzamento, põe-se uma linha envolvendo a flor polinizada e prendendo com uma presilha próximo a axila de onde saiu a flor. Foram utilizadas quatro cores diferentes de linha para a identificação, cada semana usando uma cor diferente e sempre observando se originou um %peg+ de cada cruzamento. Quando os %peg+ começaram a aparecer, estes foram amarrados com a linha da mesma cor que foi presa a um gancho estaqueado no meio do vaso. Desse modo tem-se a certeza que o %peg+ que aí se formar é o produto do cruzamento identificado. Os %peg+ obtidos foram monitorados diariamente, até que a planta mãe terminasse seu ciclo.

O %peg+ é dotado de geotropismo positivo e logo começa a crescer e encurva para o solo, onde se enterra para formar o fruto subterrâneo. Como os %peg+ são frágeis, e podem ser danificados pelos movimentos realizados nos ramos, estes foram presos com arame para imobilizá-los.

O esquema de cruzamentos é apresentado na Figura 2, desde os cruzamentos iniciais entre espécies diploides de genomas A e B, seguindo da obtenção de um híbrido estéril que foi poliploidizado pelo uso da colchicina, gerando o anfidiplóide sintético. Este foi cruzado com *A. hypogaea* e retrocruzado com o mesmo genitor recorrente.

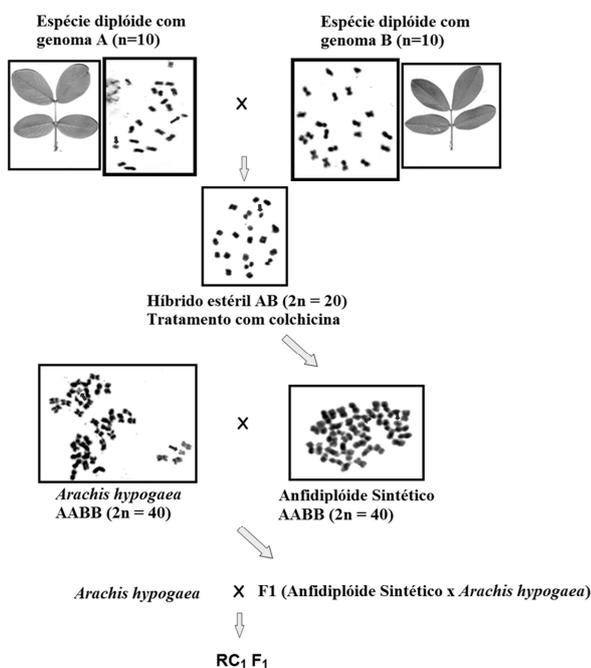


Figura 2: Representação do esquema de cruzamentos envolvidos no programa de pré-melhoramento.

Resultados

Aproximadamente duas a três semanas depois de serem polinizadas, os %peg+ começaram a surgir, com as flores emasculadas penduradas na ponta do mesmo. Observou-se que a quantidade de %peg+ foi pequena e a de sementes menor ainda quando comparado ao número de polinizações.

Foram realizadas mais de 1000 polinizações, e foram obtidas 264 sementes no total. Toda a progênie será avaliada a quanto a marcadores moleculares e selecionada para resistência a doenças fúngicas de parte aérea, seguindo também para novas fases de retrocruzamentos.

Discussão

O número de sementes obtidas foi considerado satisfatório para a continuação das próximas fases do programa de melhoramento, que são a seleção de indivíduos com resistência a doenças e o início do retrocruzamento 2.

As espécies silvestres utilizadas são consideradas altamente resistentes a doenças, sendo importantes fontes de alelos a serem introgridos no amendoim cultivado. Outros trabalhos foram realizados com sucesso para a introgressão de genes de resistência a nematoides localizados em espécies silvestres, que culminou com o lançamento de cultivares (Simpson & Starr, 2001; Simpson et al., 2003; Holbrook et al., 2008). Para resistência a doenças, muitas linhagens foram obtidas baseadas em genes oriundos de *Arachis cardenasii*, sendo utilizadas em diversos países dentro dos programas de melhoramento (Stalker et al., 2002, Stalker & Beute, 1993).

Há que se ressaltar que é a primeira vez em que as espécies *A. magna* e *A. stenosperma* são utilizados em programas de retrocruzamento com *A. hypogaea*. Logo, há a possibilidade do uso de outras espécies no intuito de introgridir novos alelos de resistência a doenças no amendoim cultivado.

Agradecimentos

A Embrapa e CNPq pelo apoio financeiro ao trabalho.

Conclusão

Pode-se concluir que há a possibilidade de uso de novas combinações entre anfidiplóide resistente a doenças em *Arachis hypogaea*,

podendo-se introgridir as resistências localizadas em *A. stenosperma* e *A. magna* e manter as demais características agrônômicas do amendoim cultivado.

Referências

Conagin, C.H.T.M. O melhoramento do amendoim cultivado por meio de cruzamentos. **Bragantia**, Campinas, v.15, n. 8, p. 297-300, 1956.

Godoy, I. J.; Moraes, S. A.; Zanotto, M. D.; Santos, R. C. . Melhoramento do Amendoim. In: Borém, A. (Ed.). (Org.). **Melhoramento de Plantas: Culturas Agrônômicas**. Viçosa, MG: UFV, 2005.

Holbrook, C., Timper, P., Culbreath, A., Kviev, C.K. Registration of Tifguard Peanut. **Journal of Plant Registrations**, v.2, n. 2,p. 92-94, 2008

Moraes, S.A.; Godoy, I.J. Amendoim - Controle de Doenças. In: Zambolim, L.; Vale, F.X.R. (Ed.). **Controle de doenças de plantas: Grandes culturas**. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa; Brasília, Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1997. v.1, p.1-49.

Moraes, S.A.; Godoy, I.J.; Gerin, M.A.N.; Pedro JR, M.J.; Pereira, J.C.V.N.A. Epidemiologia de *Cercosporidium personatum* em genótipos de amendoim. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.13, p.255-260, 1988.

Moraes, S.A.; Godoy, I.J. Diferentes níveis de resistência a *Cercosporidium personatum* em genótipos de *Arachis hypogaea*. **Summa Phytopathologica**, v.11, p.74-86, 1985.

Moraes, S.A.; Godoy, I.J.; Martins, A.L.M.; Pereira, J.C.V.N.A.; Pedro, J.R.M.J. Epidemiologia da mancha preta (*Cercosporidium personatum*) em amendoim: resistência, controle químico e progresso da doença. **Fitopatologia Brasileira**, v.19, p. 532-540, 1994.

Santos, J.F.; Godoy, I.J.; Fávero, A.P.; Moura, N.F; Michelotto, M.D.; Martins, A.L.M. Resistência a mancha preta em populações F4 selecionadas de cruzamentos entre o amendoim cultivado e um anfidiplóide de *Arachis*. **Bragantia**, Campinas, v.70, n. 3, p. 512-518, 2011.

Simpson, C.E.; Starr, J.L. Registration of COANq peanut. **Crop Science**, v.41, p.918, 2001.

Simpson, C.E.; Starr, J.L.; Church, G.T.; Burow, M.D.; Paterson,H.A. Registration of NemaTAMq peanut. **Crop Science**, v. 43, p.1561, 2003.

Stalker, H.T.; Beute M.K.; Shew B.B.; Isleib, T.G. Registration of five leafspot-resistant peanut germplasm lines. **Crop Science**, v.42, p.314. 316, 2002.

Stalker, H.T.; Beute, M.K. Registration of four leafspot-resistant peanut germplasm lines. **Crop Science** v.33, p. 1117, 1993.

USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - foreign agricultural service. **Peanut area, yield and production**. Disponível em :
<<http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdreport.aspx?hidReportRetrievalName=BVS&hidReportRetrievalID=918&hidReportRetrievalTemplateID=1>>. Acesso em: 12 de setembro de 2013.