

## Identificação Genética de Híbridos Interespecíficos de *Arachis*

Raquel Onorato de Lima<sup>1</sup>, Luciélio Manoel da Silva<sup>2</sup>, André Lucas Domingos da Silva<sup>3</sup> e Tatiana de Campos<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Graduanda em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Acre, bolsista do CNPq na Embrapa Acre, Rio Branco, AC.

<sup>2</sup>Engenheiro-agrônomo, doutor em Biotecnologia e Biodiversidade, analista da Embrapa Acre, Rio Branco, AC.

<sup>3</sup>Biólogo, mestre em Ciência, Inovação e Tecnologias para a Amazônia, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, AC.

<sup>4</sup>Bióloga, doutora em Genética e Biologia Molecular, pesquisadora da Embrapa Acre, Rio Branco, AC.

**Resumo** – O *Arachis pintoii* Krapov. & W.C. Gregory vem se destacando no uso consorciado com pastagens devido ao seu potencial nutritivo e à capacidade de fixação de nitrogênio no solo. Atualmente, uma das restrições para a expansão do uso dessa forrageira é o elevado preço da semente. Para facilitar o processo de colheita e reduzir o custo, o presente estudo buscou realizar a transferência do PEG (alongamento do ovário que liga o embrião à planta-mãe) rígido do amendoim comum (*Arachis hypogaea* L.), por meio de dois cruzamentos interespecíficos, e a genotipagem com marcador microsatélite. Dentre a análise de 229 progênies, não foi identificado o genótipo híbrido. A dificuldade do cruzamento envolve a divergência das secções botânicas e as ploidias entre as duas espécies. Diante do desafio biológico, estratégias adicionais são propostas ao programa de melhoramento como o uso da espécie diploide como receptor de pólen, a duplicação cromossômica de *A. pintoii* com colchicina antes da hibridação, a fusão de protoplastos e também a expansão de novas combinações parentais em busca de maior compatibilidade.

Termos para indexação: amendoim forrageiro, Fabaceae, poliploidia.

## Introdução

O uso do amendoim forrageiro (*Arachis pintoii* Krapov. & W.C. Gregory) consorciado com gramíneas vem se destacando como um importante procedimento para mitigar o desmatamento e garantir um melhor desempenho na produtividade e sustentabilidade da pecuária na região Amazônica (Oliveira et al., 2019). A atividade de criação de gado e outros animais (pecuária) e o superpastoreio são capazes de causar grandes impactos relacionados ao meio ambiente, como a degradação do solo e a erosão (Wust et al., 2015). O amendoim forrageiro contém grande potencial econômico pela sua alta capacidade de adaptação ao pastejo, contribuindo assim para impedir o processo de degradação do solo (Fialho, 2015). No estado do Acre, o uso da cultura apresentou um impacto positivo de aproximadamente R\$ 91 milhões ao ano em pastagens consorciadas (Embrapa, 2019).

O *Arachis pintoii* possui a habilidade de fixação de nitrogênio atmosférico no solo, enriquecendo seu conteúdo a baixo custo, além da aptidão em fornecer nutrientes importantes à dieta dos animais como a alta quantidade de proteínas nas folhas e estolões, variando de 13% a 18% e de 10% a 15%, respectivamente, fator importante na boa produção de leite e no aumento da musculatura de bovinos (Lima et al., 2003). O amendoim forrageiro pertence à ordem Fabales, família Fabaceae e secção *Caulorhizae* (Rincón et al., 1992; Silva, 2007). Contudo, há adversidades para o fornecimento e a expansão do uso do *A. pintoii* como forrageira, sendo a principal o esforço de trabalho para a colheita de sementes, por estarem dispostas abaixo do solo. Assim, o alto custo da produção da semente representa um significativo gargalo a ser superado para a expansão do uso da cultura (Valentim et al., 2009). O valor de mercado de 1 kg de sementes encontra-se na faixa de R\$ 100 a R\$ 300 (Realpecuaria, 2020).

A introgressão de genes entre espécies do gênero *Arachis* tem sido realizada desde 1940 e o grande desafio da hibridização é a diferença na ploidia entre as espécies e nos tipos de cromossomos entre as nove secções (Simpson, 2001; Fávero, 2004). Apesar da divergência na estrutura cromossômica, há detecção de hibridação em cruzamentos interespecíficos em *Arachis* (Krapovickas; Gregory, 1994).

Diferentemente dos frutos do amendoim comum, o amendoim forrageiro não apresenta PEG rígido (alongamento do ovário que liga o embrião à planta-mãe) e as sementes se desprendem da planta adulta (Lima et al., 2003). Assim, a introgressão de genes relacionados à rigidez e maior espessura do PEG do amendoim comum no amendoim forrageiro é uma meta do programa de melhoramento da cultura para facilitar o processo de colheita dos frutos. Os cruzamentos interespecíficos iniciaram-se em 2019 no programa de melhoramento da Embrapa. Assim, o presente estudo propôs auxiliar o programa de melhoramento de amendoim forrageiro por meio da hibridação interespecífica e a certificação molecular.

## Material e métodos

Dois cruzamentos foram testados: com o genótipo 18.2001 (*A. hypogaea* L.  $2n=4X=40$ ) x W34 (*A. pintoi*  $2n=2X=20$ ) e entre BRS 421 (*A. hypogaea* L.) x W34. Os cruzamentos foram realizados, por hibridação artificial, em casa de vegetação da Embrapa Acre, em Rio Branco, AC, no período de fevereiro a maio de 2019. Foram obtidas 177 sementes do primeiro teste e 52 do segundo experimento, totalizando 229 amostras. As sementes foram plantadas em células de germinação e, após 15 dias, já apresentaram folíolos para extração do DNA. O DNA genômico de cada progênie foi extraído com CTAB (Hoisington et al., 1994). Todas as amostras foram quantificadas em fluorímetro *Qubit* (Thermo Scientific).

Após a extração de DNA, a reação de amplificação foi realizada de acordo com os parâmetros: solução tampão 1X; 2,0 mM de  $MgCl_2$ ; 0,25 mg  $mL^{-1}$  BSA (albumina sérica bovina); 0,25 mM dNTP (desoxirribonucleotídeos livres); 0,8  $\mu M$  de *primers* (iniciadores); 1 U de enzima Taq DNA polimerase; e 7,5 ng  $\mu L^{-1}$  das amostras de DNA. Os ciclos de amplificação foram: 94 °C por 5 minutos, seguindo-se 30 ciclos a 94 °C por 1 minuto para a desnaturação, 1 minuto na temperatura de anelamento com a temperatura adequada e específica para cada iniciador e, por fim, a fase de extensão a 72 °C por 1 minuto; após os 30 ciclos uma extensão final por 5 minutos (Campos et al., 2016). Foi utilizado o marcador microssatélite Ap(CT)68. Esse loco apresenta polimorfismo para a detecção por genotipagem de progênie híbrida.

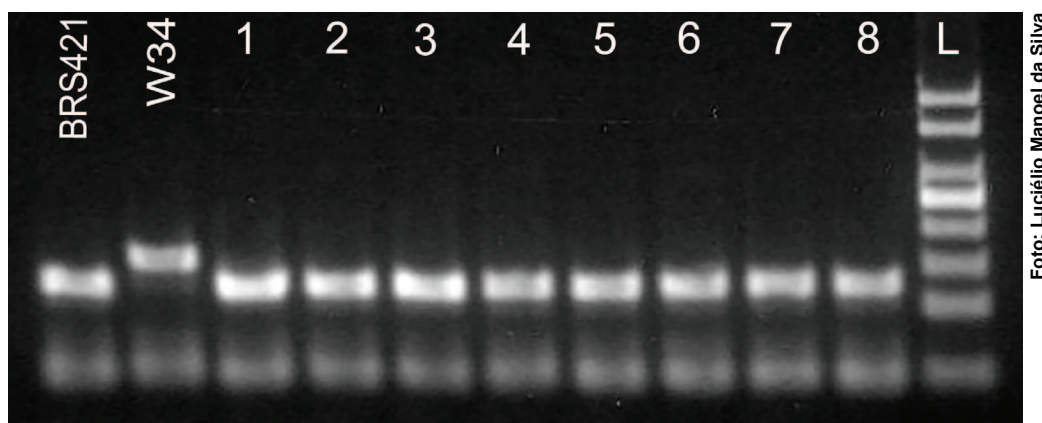
O marcador microssatélite possui comportamento codominante, o que significa que é capaz de detectar tanto homocigotos quanto heterocigotos, facilitando assim a identificação de híbridos (Abad et al., 2014). Para verificar a amplificação utilizou-se a técnica de eletroforese. Os produtos de amplificação foram aplicados em gel de agarose 3% em TBE 1 X e migrados a 80 V, por 1 hora. Após a corrida eletroforética, o gel foi fotografado em transiluminador com luz ultravioleta (Campos et al., 2016).

## Resultados e discussão

A identificação da hibridação ou cruzamento consistiu no reconhecimento, por meio do uso de marcador microssatélite, dos alelos na progênie e a comparação com os perfis dos genitores usados (Ferreira et al., 2012). A extração e diluição do DNA ocorreram sem falhas para a produção dos

amplicons. O DNA extraído apresentou qualidade e alto grau de pureza, o que foi fundamental para a reação de amplificação e posteriormente a análise em eletroforese (Campos et al., 2016; Hepp; Nonohay, 2016). Portanto, a metodologia de genotipagem em eletroforese horizontal encontra-se bem estabelecida e pode ser estendida para análises da rotina do programa de melhoramento.

A proposta inicial do projeto era analisar 100 amostras. Como não foi obtido híbrido na amostragem, mais 129 sementes foram germinadas para aumentar a chance de detectar híbridos. Dentre as 229 progênies analisadas não ocorreu a identificação de híbridos (Figura 1).



**Figura 1.** Imagem da genotipagem em gel de agarose de oito progênies do teste do cruzamento entre BRS 421 (*Arachis hypogaea*) x W34 (*Arachis pintoi*).

L = Marcador de peso molecular 50 pb.

Foto: Luciélio Manoel da Silva

A análise da migração dos fragmentos de DNA em gel de agarose, diante do processo de eletroforese, identificou alelos somente com peso molecular conforme a banda da planta-mãe, *A. hypogaea* L. (BRS 421). Isso significa que ocorreu somente autofecundação, característica reprodutiva predominante no gênero *Arachis* spp. (Krapovickas; Gregory, 1994; Oliveira, 2015). Sem a confirmação do cruzamento entre as espécies não se tem ainda a introgressão da característica de interesse, PEG rígido, nas progênies. Esse fato pôde ser comprovado por meio da utilização do marcador microssatélite, por apresentar o comportamento codominante e ser altamente informativo, uma vez que possui a capacidade de detectar quando há tanto homozigiosidade quanto heterozigiosidade, muito comum em testes de paternidade (Fávero, 2004; Weiler et al., 2009).

O resultado corrobora com a literatura, uma vez que a hibridação entre *A. pintoi* e *A. hypogaea* não foi obtida em outros estudos (Gregory; Gregory, 1979; Fávero, 2004; Custodio, 2009). Apesar de pertencentes ao mesmo gênero, são espécies de secções botânicas distintas: *Caulorhizae* e *Arachis*. Neste estudo, um provável fator para a dificuldade do cruzamento entre *A. hypogaea* e *A. pintoi* se dá justamente por apresentarem diferenças entre ploidia tetraploide (4X) e diploide (2X) (Simpson, 2001; Fávero, 2004), além da composição genômica distinta entre genomas AABB e CC (Zhuang et al., 2019). *Arachis hypogaea* tem como origem dois ancestrais diploides (*A. duranensis* (AA) e *A. ipaensis* (BB)) que não apresentam a mesma estrutura de PEG rígido do amendoim comum (Fonseca, 2007).

Outro fato que deve ser considerado é a instabilidade genômica de um híbrido triploide. Esse indivíduo poderia apresentar mitoses anormais no desenvolvimento embrionário, podendo causar a eliminação de cromossomos (aneuploidias) ou mesmo a eliminação de conjuntos de cromossomos de um dos pais (Abreu, 2008). Assim, um híbrido poderia ter sido obtido no processo de hibridação, mas não resistiu à etapa de desenvolvimento até a produção de folhas jovens para extração de DNA.

Devido ao impacto que a transferência dessa característica traria na produção de sementes de amendoim forrageiro, outras estratégias ainda serão testadas no programa de melhoramento. Duas estratégias já estão em andamento com a duplicação cromossômica de *A. pintoi*, por meio do tratamento com colchicina (Barbosa et al., 2007), e o uso de receptor de pólen (o material diploide). Adicionalmente propõe-se também o uso da técnica de fusão de protoplastos (Soriano, 2010) e a busca de compatibilidade em outras combinações de cruzamentos entre os genótipos parentais (Ferreira et al., 2012).

## Conclusões

O híbrido entre amendoim forrageiro e amendoim comum ainda não foi obtido, porém a metodologia molecular de certificação mostrou-se rápida e eficaz. Diante dos ganhos a serem obtidos com a introgressão da característica do PEG rígido, novas estratégias devem ser abordadas no programa de melhoramento.

## Referências

ABAD, C. A.; LOPES, F. A.; PINHEIRO, J. W.; MOTA, R. A. Marcadores moleculares e suas aplicações nas pesquisas em bovinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 8, n. 1, p. 10-18, 2014.

ABREU, P. P. **Análises em *Passiflora palmeri*, *Passiflora foetida* e híbridos f1 ornamentais**: relações citogenéticas e caracterização fisiológica. 2008. 188 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal: Melhoramento de Plantas e Biotecnologia) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus.

BARBOSA, S.; VIDE, L. C. da; PEREIRA, A. V; ABREU, J. C. de. Duplicação cromossômica de híbridos triploides de capim elefante e milheto. **Bragantia**, v. 66, n. 3, p. 365-372, 2007.

CAMPOS, T. de; AZÊVEDO, H. S. F. S. da; OLIVEIRA, J. C. de; FILHO, J. A. F.; YOMURA, R. B. T.; SILVA, L. M. da. **Protocolo para identificação de híbridos de amendoim forrageiro utilizando marcador molecular microsatélite**. Rio Branco, AC: Embrapa Acre, 2016. (Embrapa Acre. Documentos, 146).

CUSTODIO, A. R. **Relações de cruzabilidade entre espécies e acessos de germoplasma do gênero *Arachis* associados ao genoma B do amendoim (*Arachis hypogaea* L.)**. 2009. 159 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

EMBRAPA. **Balanco Social da Embrapa 2019**. Disponível em: <https://bs.sede.embrapa.br/2019/balancosocialeembrapa2019print.pdf>. Acesso em: 2 set. 2020.

FÁVERO, A. P. **Cruzabilidade entre espécies silvestres de *Arachis* visando à introgressão de genes de resistência a doenças do amendoim cultivado**. 2004. 165 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

FERREIRA, J.; CUNHA, M. O. da; ASSIS, G. M. L. de; CAMPOS, T. de. Certificação molecular de hibridação intraespecífica em amendoim forrageiro por meio de marcadores SSRs. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS, 2., 2012, Belém, PA. **Anais...** Brasília, DF: Sociedade Brasileira de Recursos Genéticos, 2012. 4 p.

FIALHO, C. A. **Características morfogênicas e estruturais de amendoim forrageiro (*Arachis pintoi* krapovickas & Gregory cv. Belmonte) submetido a intensidades de pastejo sob lotação contínua**. 2015. 122 f. Tese (Doutorado

em Ciências: Ciência Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

FONSECA, F. C. de A. **História evolutiva de um Retrotransposon-LTR nos dois genomas componentes do amendoim**. 2007. 119 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

GREGORY, M. P.; GREGORY, W. C. Exotic germ plasm of *Arachis* L. interspecific hybrids. **Journal of Heredity**, v. 70, p. 185-193, 1979.

HEPP, D.; NONOHAY, J. S. de. A importância das técnicas e análises de DNA. **Scientia Tec: Revista de Educação, Ciência e Tecnologia do IFRS**, v. 3, n. 2, p. 114-124, jun./dez. 2016.

HOISINGTON, D.; KHAIRALLAH, M.; GONZÁLEZ-DE-LEÓN, D. **Laboratory protocols: CIMMYT applied molecular genetics laboratory**. 2. ed. Mexico, DF: CIMMYT, 1994. p. 2-10.

KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, W. C. Taxonomia del genero *Arachis* (Leguminosae). **Bonplandia**, v. 8, n. 1/4, p. 1-186, 1994.

LIMA, J. A. de; PINTO, J. C.; EVANGELISTA, A. R.; SANTANA, R. A. V. **Amendoim forrageiro (*Arachis pinto* Krav. & Gregory)**. Lavras: Editora UFLA, 2003. p. 11-19. (Ufla. Boletim de extensão).

OLIVEIRA, J. C. de. **Taxa de cruzamento e diversidade genética em *Arachis pinto* com marcador microsatélite**. 2015. 52 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, Universidade Federal do Acre, Rio Branco.

OLIVEIRA, J. C. de; RUFINO, P. B.; AZÊVEDO, H. S. F. da S.; SOUSA, A. C. B. de; ASSIS, G. M. L. de; SILVA, L. M. da; SEBBENN, A. M.; CAMPOS, T. de. 2019. Inferring mating system parameters in forage peanut, *Arachis pinto*, for Brazilian Amazon conditions. **Acta Amazonica**, v. 49, n. 4, p. 277-282, 2019.

REALPECUARIA. Sementes de pastagens e gramados. **Amendoim forrageiro (*Arachis pinto* – cv. amarillo)**. 2020. Disponível em: [http://www.realpecuaria.com.br/detalhes-do-produto?id=29&produto=amendoim%20forrageiro%20\(Arachis%20pinto%20-cv.%20amarillo\)](http://www.realpecuaria.com.br/detalhes-do-produto?id=29&produto=amendoim%20forrageiro%20(Arachis%20pinto%20-cv.%20amarillo)). Acesso em: 23 set. 2020.

RINCÓN, C. A.; CUESTA, M. P. A.; PÉREZ, B. R.; LASCANO, C. E.; FERGUNSON, J. **Maní forrajero perenne *Arachis pinto* Krapovickas y Gregory**: una alternativa para ganaderos e agricultores. Bogotá: Instituto Colombiano Agropecuario, 1992. p. 1-2. (ICA. Boletín técnico, 219).

SILVA, S. da C. **Caracterização citogenética, molecular e morfológica de acessos do gênero *Arachis* com ênfase na seção *Heteranthae***. 2007. 99 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Melhoramento Genético de Plantas) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

SIMPSON, C. E. Use of wild species / introgression of genes into *A. hypogaea* L. **Peanut Science**, v. 28, p. 114-116, 2001.

SORIANO, L. **Hibridação somática visando à produção de genitores tetraplóides para o melhoramento de cultivares copa de citros**. 2010. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências: Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

VALENTIM, J. F.; ASSIS, G. M. L.; SÁ, C. P. Produção de sementes de amendoim forrageiro (*Arachis pinto*) no Acre, **Amazônia: Ciência e Desenvolvimento**, v. 4, n. 8, p. 191-193, 2009.

WEILER, R. L.; BRUGNARA, E. C.; BASTIANEL, M.; MACHADO, M. A.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; SOUZA, P. V. D. de; SCHWARZ, S. F. Teste de paternidade e avaliações agrônômicas de possíveis híbridos de tangerineira 'SUNKI'. **Scientia Agraria**, v. 10, n. 6, p. 429-435, 2009.

WÜST, C.; TAGLIANI, N.; CONCATO, A. C. A pecuária e sua influência impactante ao meio ambiente. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GESTÃO AMBIENTAL, 6., 2015, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: IBEAS, 2015. p. 1-5.

ZHUANG, W.; CHEN, H.; VARSHNEY, R. K. O genoma do amendoim cultivado fornece informações sobre os cariótipos das leguminosas, a evolução poliplóide e a domesticação da cultura. **Nature Genetics**, v. 51, p. 865-876, 2019.