

DESENVOLVIMENTO DE LINHAGENS DE INTROGRESSÃO PARA O AMENDOIM (*Arachis hypogaea* L.) E AVALIAÇÃO DE PLANTAS BC₁F₂ QUANTO À RESISTÊNCIA A MANCHAS FOLIARES

Rodrigo Furtado dos Santos¹, Ediene Galdino de Gouveia², Talles Pereira Dias³, Leandro Chinalia⁴, David John Bertoli⁵, Austerclínio Lopes Faria Neto⁶, Joseane Padilha da Silva⁷, Marcelo Ayres Carvalho⁸, Soraya Cristina de Macêdo Leal-Bertoli⁹ e Márcio de Carvalho Moretzsohn¹⁰

Resumo

Espécies silvestres de *Arachis* constituem uma importante fonte de genes para várias características de interesse para o melhoramento do amendoim. Uma vez que a espécie cultivada é alotetraplóide (AABB), a transferência de genes para o amendoim é feita via cruzamentos envolvendo anfidiplóides sintéticos de espécies silvestres diplóides. Neste trabalho, foram desenvolvidas linhagens de introgressão (ILs), a partir de cruzamentos entre IAC Runner 886 e um anfidiplóide sintético *A. duranensis* (genoma AA) x *A. ipaënsis* (BB). As plantas RC₁ e RC₂ estão sendo genotipadas com marcadores microssatélites, mostrando que proporções variáveis do genoma doador estão sendo introgrididas nas diferentes linhagens. Essas plantas foram avaliadas quanto à resistência a manchas fúngicas de parte aérea e os resultados sugerem que a população estudada possui potencial para a introgressão de genes de resistência às manchas foliares no amendoim.

Introdução

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é uma cultura importante internacionalmente, tanto para consumo direto, devido ao seu alto conteúdo de proteína, como para produção de óleo. *Arachis hypogaea* apresenta uma baixa variabilidade para diversas características de interesse agrônomo, tais como resistências a doenças como mancha preta (*Cercosporidium personatum* (Berk. & Curtis) Deighton), mancha castanha (*Cercospora arachidicola* Hori) e ferrugem (*Puccinia arachidis* Speg.), a pragas e à restrição hídrica, típica do semi-árido brasileiro.

O gênero *Arachis* é nativo da América do Sul e contém 80 espécies descritas, sendo diplóide a grande maioria (KRAPOVICKAS; GREGORY, 1994) e (VALLS; SIMPSON, 2005). Essas espécies apresentam, em geral, maior variabilidade genética e constituem uma importante fonte de genes para várias das características de interesse para o melhoramento do amendoim (DWIVEDI *et al.*, 2006). A exploração da variabilidade genética do germoplasma disponível de espécies silvestres de *Arachis* é ponto fundamental para ampliar a base genética no desenvolvimento de populações adaptadas em programas de melhoramento genético. Uma vez que a espécie cultivada é alotetraplóide (AABB), a transferência de genes de resistência para o amendoim é feita via cruzamentos envolvendo anfidiplóides sintéticos de espécies silvestres.

Linhagens de introgressão (ILs) são um conjunto de linhagens quase isogênicas desenvolvidas por sucessivos retrocruzamentos, em que cada linhagem carrega um segmento cromossômico específico de um genoma divergente. Essas linhagens são ferramentas úteis para transferência apenas dos genes de interesse do parental doador para o recorrente. Uma população completa de ILs reconstitui o genoma doador parental pela sobreposição de segmentos cromossômicos e imortaliza este genoma, uma vez que estas linhagens podem ser mantidas por autopolinização. Tais populações

¹Analista da Embrapa Agroenergia e Mestrando da Universidade de Brasília, PqEB, W5 Norte, Brasília, DF. rodrigofurtado@gmail.com

²Graduada em Ciências Biológicas, Bolsista DTI na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB, W5 Norte, Brasília, DF. dydygg@gmail.com

³Graduado em Ciências Biológicas, Bolsista de DTI na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB, W5 Norte, Brasília, DF. ttdias2004@yahoo.com.br

⁴Estudante de graduação em Ciências Biológicas da Universidade Católica de Brasília, Campus II, Águas Claras, DF. leandrochinalia@gmail.com

⁵Professor Adjunto da Universidade de Brasília, Departamento de Genética, Campus Darcy Ribeiro, Brasília, DF. david@pos.uceb.br

⁶Pesquisador da Embrapa Cerrados, Planaltina, DF. auster@cpac.embrapa.br

⁷Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB, W5 Norte, Brasília, DF. joseane@cenargen.embrapa.br

⁸Pesquisador da Embrapa Cerrados, Planaltina, DF. marcelo@cpac.embrapa.br

⁹Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB, W5 Norte, Brasília, DF. soraya@cenargen.embrapa.br

¹⁰Pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB, W5 Norte, Brasília, DF. marciocm@cenargen.embrapa.br

são especialmente úteis na identificação de QTL, pois a diferença fenotípica entre uma linhagem e o parental recorrente é atribuída aos genes localizados no segmento cromossômico introgressado (Lippman et al., 2007).

O objetivo deste trabalho foi o de iniciar o desenvolvimento de uma população de ILs, com auxílio de marcadores microssatélites e avaliar a primeira geração de retrocruzamento (BC₁) quanto à resistência a manchas fúngicas de parte aérea.

Material e Métodos

Material vegetal

Para o desenvolvimento das linhagens de introgressão (ILs), plantas da variedade elite IAC Runner 886 foram cruzadas com o anfidiplóide sintético *Arachis ipaënsis* Krapov. & W.C.Greg. (genoma B) x *Arachis duranensis* Krapov. & W.C.Greg. (genoma A), em condições de telado. Para isso, foi feita a emasculação dos botões florais do genitor feminino no período da tarde, quando os grãos de pólen ainda estão imaturos impedindo que ocorra a autopolinização. Na manhã do dia seguinte foi realizada a polinização, utilizando-se genitores masculinos escolhidos. A população RC₁ foi produzida na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (estação de cruzamentos 2006/07).

Extração de DNA e PCR dos locos

DNA genômico total foi extraído de folíolos jovens, de acordo com o método descrito por Ferreira, Grattapaglia (1998), com pequenas modificações. A concentração de DNA de cada tubo foi estimada por eletroforese em gel de agarose a 1% de concentração. As PCRs foram realizadas em volumes de 5 µL, utilizando o Kit Qiagen Multiplex PCR (Qiagen) e primers (0,2 uM) marcados com fluorescências 6-FAM, HEX e NED e 7,5 ng de DNA genômico. As amplificações foram realizadas em termocicladores ABI 9700 (Applied Biosystems), nas seguintes condições: 95°C por 15 minutos (1 ciclo), 94°C por 30 seg, 52-60°C (dependendo do sistema multiplex) por 90 seg, 72°C por 90 seg (35 ciclos); e uma extensão final a 72°C por 30 minutos (1 ciclo). A montagem dos sistemas multiplex foi feita pelo programa Multiplexer 4.0, desenvolvido pelo Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho da Universidade Federal de Goiás. Os dados obtidos após eletroforese em sequenciador automático de DNA ABI 3700 foram analisados pelos programas GeneScan 3.7 e Genotyper 3.7 (Applied Biosystems).

Avaliação de resistência a manchas foliares

Quarenta famílias derivadas do cruzamento (*Arachis hypogaea* cv IAC-Runner 886 x (*A. ipaënsis* KG30076 x *A. duranensis* V14167)^{4x} (10 F₂ de cada BC₁, perfazendo um total de 400 plantas, foram semeadas no Campo Experimental da Embrapa Cerrados, em Planaltina (DF), na estação de 2008/2009, em dez blocos com parcelas distribuídas aleatoriamente). Foram avaliados três componentes da resistência à mancha preta e mancha castanha: período de latência (dias para aparecimento do primeiro sintoma), porcentagem de área foliar lesionada e desfolha (avaliação visual e atribuição de notas de 1 a 5, sendo 1 pouca desfolha e 5, plantas sem folhas).

Resultados e Discussão

Foram obtidas 205 plantas na estação de cruzamentos de 2006/07, as quais foram genotipadas com oito marcadores microssatélites, para identificação dos híbridos. Dentre essas, 43 híbridos RC₁ foram identificados. Essas 43 plantas foram retrocruzadas com *A. hypogaea* cv IAC-Runner 886 e 40 híbridos RC₂ foram identificados. As plantas RC₁ e RC₂ estão sendo genotipadas com cerca de 200 marcadores microssatélites mapeados nos genomas A e B do amendoim (Moretzsohn et al., 2005; 2009), para identificação dos segmentos introgressados. Dessa forma, os segmentos exóticos doados pelo anfidiplóide sintético serão ilhados em um “background” do genoma da variedade elite cultivada, formando linhagens com uma alta porcentagem do genoma do parental recorrente vinculada a uma pequena fração do genoma do parental doador. Como esperado, essas análises têm mostrado que

proporções variáveis do genoma doador são introgridas nas diferentes linhagens, variando de cerca de 15% a 80%, já na geração BC₂.

Famílias BC₁F₂ foram avaliadas a campo para resistência/suscetibilidade a fungos causadores de manchas de parte aérea no amendoim. Foram avaliados três componentes da resistência aos fungos *C. personatum* (mancha preta) e *C. arachidicola* (mancha castanha): período de latência, área total lesionada e desfolha. Foi observada uma grande diversidade de resposta para os três componentes avaliados entre as famílias (Figura 1). O anfidiplóide (Anf1) apresentou um período de latência superior e uma maior resistência às manchas foliares, quando comparado a Runner (parental suscetível), embora também tenha se mostrado moderadamente suscetível. Apesar disso, foram identificadas famílias com resistências superiores às observadas nos parentais. Esses resultados sugerem que a população estudada possui potencial para a introgressão de genes de resistência às manchas foliares no amendoim, e que novas combinações alélicas têm o potencial de introgridir características superiores às dos parentais doadores.

Conclusões

No conjunto de todas as linhagens, o genoma completo do anfidiplóide estará representado. Essa metodologia permitirá a análise fenotípica de um QTL específico através da comparação entre duas ou mais linhagens e/ou o parental cultivado. Essas linhagens de introgressão, desenvolvidas a partir de espécies silvestres de *Arachis*, com o auxílio de marcadores moleculares, abrem novas perspectivas para introgressão e clonagem de genes úteis para o amendoim.

Agradecimentos

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Embrapa Cerrados e ao Generation Challenge Program (Project 31 e TLI).

Referências

- DWIVEDI, S.L.; BERTIOLI, D.J.; CROUCH, J.H.; VALLS, J.F.M.; UPADHYAYA, H.D.; FÁVERO, A.P.; MORETZSOHN, M.C.; PATERSON, A.H. Peanut Genetics and Genomics: Toward Marker-assisted Genetic Enhancement in Peanut (*Arachis hypogaea* L.). In: KOLE, C. (Ed.). *Oilseeds*. Series: Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants, Vol. 2, Springer, 2006. 302p.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. EMBRAPA-CENARGEN, Brasília, 220 p., 1998.
- KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, W. C. Taxonomía del género *Arachis* (Leguminosae). *Bonplandia*, v.8, p.1-186, 1994.
- LIPPMAN, Z. B.; SEMEL, Y.; ZAMIR, D. An integrated view of quantitative trait variation using tomato interspecific introgression lines. *Current Opinion in Genetics & Development*, v.17, p.1-8, 2007.
- MORETZSOHN, M.C.; LEOI, L.; PROITE, K.; GUIMARÃES, P.M.; LEAL-BERTIOLI, S.C.M.; GIMENES, M.A.; MARTINS, W.S.; VALLS, J.F.M.; GRATTAPAGLIA, D.; BERTIOLI, D.J. A microsatellite based, gene-rich linkage map for the AA genome of *Arachis* (Fabaceae). *Theoretical and Applied Genetics*, v.111, p.1060-1071, 2005.
- MORETZSOHN, M.C.; BARBOSA, A.V.G.; ALVES-FREITAS, D.M.T.; TEIXEIRA, C.; LEAL-BERTIOLI, S.C.M.; GUIMARÃES, P.M.; PEREIRA, R.W.; LOPES, C.R.; CAVALLARI, M.M.; VALLS, J.F.M.; BERTIOLI, D.J.; GIMENES, M.A. A linkage map for the B-genome of *Arachis* (Fabaceae) and its synteny to the A-genome. *BMC Plant Biology*, v. 9:40, 2009.
- VALLS, J.F.M.; SIMPSON, C.E. New species of *Arachis* L. (Leguminosae) from Brazil, Paraguay and Bolivia. *Bonplandia*, v.14, p.35-64, 2005.

Figura 1: Período de latência para aparecimento de sintomas, nível de desfolha e percentagem de área foliar lesionada por manchas foliares (*Cercosporidium personatum* e *Cercospora arachidicola*) em 40 genótipos BC₁F₂ de *Arachis*, derivados do cruzamento entre um anfidiplóide sintético (Anf1) e *A. hypogaea* cv. IAC-Runner886 (Runner).

