

Detecção precoce de híbridos de *Arachis pintoi* utilizando ferramentas da biologia molecular

Jônatas Chagas de Oliveira⁽¹⁾, Edson Gomes de Oliveira⁽²⁾, Giselle Mariano Lessa de Assis⁽³⁾ e Tatiana de Campos⁽⁴⁾

⁽¹⁾ Técnico de laboratório, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, AC. ⁽²⁾ Bolsista, Embrapa Acre, Rio Branco, AC. ⁽³⁾ Pesquisadora, Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS. ⁽⁴⁾ Pesquisadora, Embrapa Cerrados, Planaltina, DF.

Resumo – O amendoim forrageiro (*Arachis pintoi*) é uma leguminosa forrageira que possui atributos como fixação biológica de nitrogênio, contribuindo para a recuperação de áreas degradadas, aumento do ganho de peso dos animais e redução do tempo de abate. No processo de desenvolvimento de cultivares, duas etapas são cruciais: cruzamentos entre genótipos e identificação precoce dos híbridos. Assim, o objetivo deste estudo foi identificar híbridos de amendoim forrageiro oriundos de hibridação natural por meio de marcadores microssatélites. Foram coletadas e plantadas 1.744 sementes, das quais 512 (29,36%) germinaram. Análises com marcadores microssatélites revelaram 13 híbridos, resultando em taxa de cruzamento de 2,54%. O uso de marcadores microssatélites mostrou-se relevante por permitir a identificação precoce dos híbridos na população, separando-os das plantas oriundas de autofecundação, o que é crucial na base do Programa de Melhoramento Genético do Amendoim Forrageiro realizado na Embrapa Acre.

Termos para indexação: amendoim forrageiro, identificação molecular, melhoramento genético, SSR.

Early detection of *Arachis pintoi* hybrids using molecular biology tools

Abstract – Forage peanut (*Arachis pintoi*) is a forage legume that has attributes such as biological nitrogen fixation, contributing to the recovery of degraded areas, improving cattle gain and reducing slaughter time. In the cultivar development process, two stages are crucial: crossings between genotypes and the early identification of hybrids. Thus, the objective of this study was to identify forage peanut hybrids originating from natural crosses using microsatellite markers. A total of 1,744 seeds were collected and planted, of which 512 (29.36%) germinated. Analysis with microsatellite markers revealed 13 hybrids, resulting in a crossing rate of 2.54%. The use of microsatellite markers showed to be relevant as it allows the early identification of hybrids in the population, separating them from those that were self-fertilized, which is crucial at the basis of the forage peanut breeding program carried out at Embrapa Acre.

Index terms: forage peanut, genetic improvement, molecular identification, SSR.

Introdução

O amendoim forrageiro (*Arachis pintoi* Krapov. e W.C. Greg.) é uma leguminosa forrageira cuja utilização tem crescido nos últimos anos. Seu uso em pastagens consorciadas com gramíneas tem contribuído para aumento do ganho de peso dos animais, diminuição do tempo de abate, além da redução significativa de emissões de gases de efeito estufa (Homem et al., 2024). Adicionalmente, vem sendo utilizado como planta ornamental, como cobertura verde, na proteção contra erosão, na recuperação de áreas degradadas e no controle de ervas daninhas, tendo como vantagens a fixação biológica de nitrogênio e auxílio na manutenção da umidade do solo (Sousa et al., 2024). No estado do Acre, a adoção do amendoim forrageiro em pastagens consorciadas teve um impacto econômico positivo anual de cerca de R\$ 127,7 milhões (Embrapa, 2024).

Apesar disso, a quantidade de cultivares disponíveis ao produtor ainda é limitada, havendo demanda por genótipos que combinem a alta produtividade de sementes com a elevada produção de forragem. Uma das técnicas empregadas no desenvolvimento de novas cultivares é o cruzamento entre genótipos com características agrônomicas desejáveis, podendo ser utilizadas técnicas de cruzamento artificial ou natural. A taxa de sucesso da hibridação é usualmente baixa, sendo limitada por fatores como umidade, temperatura, genótipos utilizados, horário de polinização, receptividade do estigma, compatibilidade do pólen com o estigma e experiência do operador (Vishnuprabha et al., 2020). O uso da polinização natural possui como vantagens a redução do tempo e a não dependência de mão de obra especializada para realizar os procedimentos de polinização artificial (Coffelt, 1989).

Uma das dificuldades para a aplicação dos cruzamentos está na identificação dos híbridos com uso de marcadores morfológicos. Nesse sentido, o uso de marcadores moleculares tem contribuído na redução do tempo de desenvolvimento de novas cultivares, pois permite a identificação precoce de híbridos obtidos de cruzamentos intra e interespecíficos realizados no programa de melhoramento. Dentre as ferramentas moleculares, os marcadores microssatélites (SSR) são desejáveis para essa finalidade, pois apresentam elevado polimorfismo, natureza codominante, além de estarem amplamente distribuídos pelo genoma (Campos et al., 2016). Assim, o objetivo deste estudo foi identificar híbridos de amendoim

forrageiro oriundos de hibridação natural por meio de marcadores microssatélites.

Material e métodos

Foram utilizadas sementes resultantes de cruzamentos entre genótipos de amendoim forrageiro realizados nos anos de 2021 e 2022. As sementes foram contadas e armazenadas em sacos de papel no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Acre. A quebra de dormência das sementes foi realizada em duas etapas: colocação em estufa com circulação forçada de ar com temperatura de 50 °C por 7 dias, seguida pela imersão em solução de Ethrel, preparada em uma proporção de 0,6 mL do produto comercial para 100,0 mL de água destilada, por 16 horas. As sementes foram plantadas em bandejas de isopor contendo solo não tratado, adubado, colocando apenas uma semente por célula. As bandejas, identificadas com dados da família do cruzamento, número do indivíduo e data de plantio, foram armazenadas em casa de vegetação e regadas regularmente (Figura 1).

Após a germinação das sementes, foram coletadas folhas jovens para extração de DNA e análises subsequentes. As etapas de extração, quantificação, diluição e amplificação de DNA por PCR, seguidas da genotipagem por eletroforese em gel de poliacrilamida, foram realizadas conforme Campos et al. (2016). Os *primers* para marcadores microssatélites utilizados na identificação dos híbridos foram desenvolvidos por Oliveira et al. (2023).

Resultados e discussão

Foram analisadas 32 famílias de cruzamentos realizados no ano de 2021 e três famílias de cruzamentos realizados em 2022, totalizando 1.360 e 384 sementes, respectivamente. Considerando a soma total dos dois lotes, foi realizada a quebra de dormência e semeadura de 1.744 sementes. Após o plantio, 387 (28,45%) sementes do lote de 2021 e 125 (32,55%) do lote de 2022 germinaram.

Ao utilizar um conjunto de dez microssatélites para analisar as 512 progênies, foram identificados 12 híbridos pertencentes ao lote de 2021 e um ao lote de 2022, com uma taxa total de cruzamento de 2,54% (Figura 2). A taxa de híbridos observada neste estudo está dentro do reportado em cruzamentos naturais (de 0,00 a 80,00%) e artificiais (de 1,10 a 42,30%) no gênero *Arachis* (Coffelt, 1989; Oliveira et al., 2019; Vishnuprabha et al., 2020).



Figura 1. Plântulas obtidas para análise via marcadores microssatélites: bandeja de isopor com plântulas em diferentes estágios de desenvolvimento (A); exemplo de identificação da progênie plantada (B).

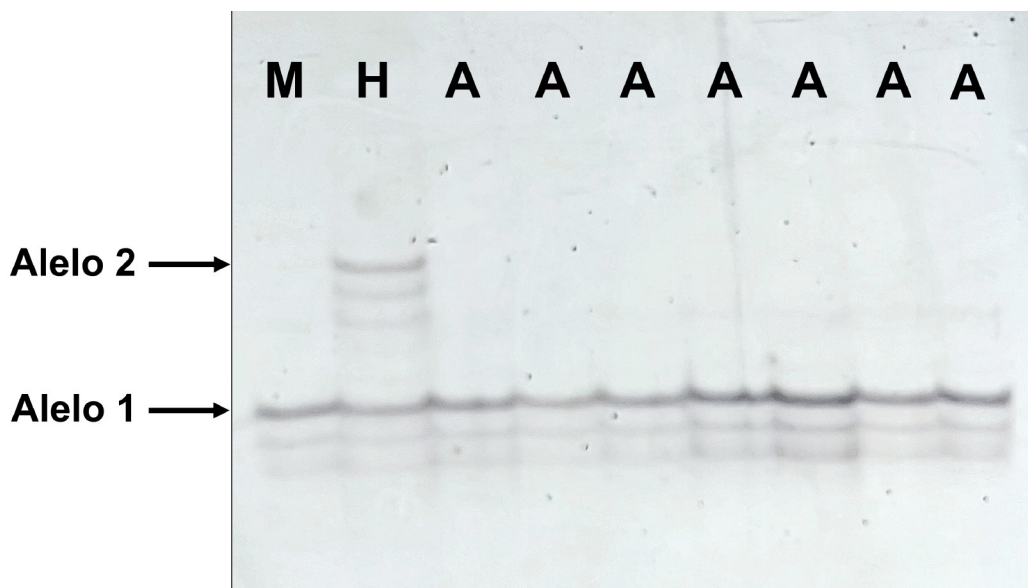


Figura 2. Perfil de bandas com o marcador microssatélite loco Ap(CT)114 na identificação de híbrido em população de progênes oriunda de cruzamento intraespecífico de *Arachis pintoi*: genitor feminino (M); indivíduo híbrido (H); indivíduos resultado de autofecundação (A).

A realização de cruzamentos artificiais é mais onerosa, pois sua taxa de sucesso pode ser afetada por uma série de variáveis que vão desde pessoal treinado até fatores bióticos e abióticos (Vishnuprabha et al., 2020). Por esse motivo, a realização de cruzamentos naturais tem sido apontada como uma alternativa mais interessante, pois reduz boa parte dos custos e da carga de trabalho envolvida no processo (Coffelt, 1989). Aliado a isso, o uso de ferramentas moleculares,

como os microssatélites, tem contribuído na identificação precoce dos híbridos, o que reduz o trabalho e os custos com manutenção de centenas de plantas de autofecundação indesejáveis.

Portanto, a aplicação dos marcadores microssatélites na identificação de híbridos mostrou-se necessária, contribuindo para o desenvolvimento de cultivares no Programa de Melhoramento Genético do Amendoim Forrageiro realizado na Embrapa Acre.

Conclusão

- 1) Os marcadores microssatélites permitem a identificação precoce e precisa de híbridos de amendoim forrageiro.

Agradecimentos

À Embrapa e à Associação para o Fomento à Pesquisa de Melhoramento de Forrageiras (Unipasto) pelo aporte financeiro; e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa DTI a Edson Gomes de Oliveira.

Referências

- CAMPOS, T.; AZÊVEDO, H. S. F. S.; OLIVEIRA, J. C.; FERREIRA FILHO, J. A.; YOMURA, R. B. T.; SILVA, L. M. **Protocolo para identificação de híbridos de amendoim forrageiro utilizando marcador molecular microssatélite**. Rio Branco, AC: Embrapa Acre, 2016. 29 p. (Embrapa Acre. Documentos 146). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1064915>. Acesso em: 10 set. 2024.
- COFFELT, T. A. Natural crossing of peanut in Virginia. **Peanut Science**, v. 16, n. 1, p. 46-48, 1989. DOI: <https://doi.org/10.3146/i0095-3679-16-1-10>.
- EMBRAPA. **Balanco Social 2023**. Brasília, DF: Embrapa, 2024. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1163847>. Acesso em: 10 set. 2024.
- HOMEM, B. G. C.; BORGES, L. P. C.; LIMA, I. B. G.; GUIMARÃES, B. C.; SPASIANI, P. P.; FERREIRA, I. M.; MEO-FILHO, P.; BERNDT, A.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M.; CASAGRANDE, D. R. Forage peanut legume as a strategy for improving beef production without increasing livestock greenhouse gas emissions. **Animal**, v. 18, n. 5, p. 101-158, May 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.animal.2024.101158>.
- OLIVEIRA, J. C.; RUFINO, P. B.; AZÊVEDO, H. S. F. S.; SOUSA, A. C. B.; ASSIS, G. M. L.; SILVA, L. M.; SEBBENN, A. M.; CAMPOS, T. Inferring mating system parameters in forage peanut, *Arachis pintoi*, for Brazilian Amazon conditions. **Acta Amazonica**, v. 49, n. 4, p. 277-282, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1809-4392201900200>.
- OLIVEIRA, J. C.; SILVA, A. L. D.; SILVA, L. M.; FORMIGHIERI, E. F.; PETERS, L. P.; ASSIS, G. M. L.; SILVA, C. C.; SOUZA, A. P.; CAMPOS, T. Novel microsatellite markers derived from *Arachis pintoi* transcriptome sequencing for cross-species transferability and varietal identification. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 42, n. 1, p. 183-192, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11105-023-01402-9>.
- SOUSA, I. B.; GARCIA, R. O.; VALLS, J. F. M.; PACHECO, G.; MANSUR, E. *Arachis pintoi* Krapov. & W.C. Greg. – a multifunctional legume. **Grass and Forage Science**, v. 79, n. 3, p. 343-352, Sept. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1111/gfs.12674>.
- VISHNUPRABHA, R. S.; VISWANATHAN, P. L.; MANONMANI, S.; RAJENDRAN, L.; SELVAKUMAR, T. Studies on efficiency of artificial hybridization in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). **Electronic Journal of Plant Breeding**, v. 11, n. 1, p. 120-123, 2020. Disponível em: <https://www.ejplantbreeding.org/index.php/EJPB/article/view/3444>. Acesso em: 10 set. 2024.