

¹Hibridações entre espécies silvestres de *Arachis* visando a introgressão de genes de resistência à insetos-praga no amendoim (*A. hypogaea*).

Daniel Daizo Shitara¹, Carolina Périco Graciano², Ignácio José de Godoy³, Marcos Doniseti Michelotto⁴, Alessandra Pereira Fávero⁵

Resumo

A suscetibilidade à pragas, como o tripses-do-prateamento (*Enneothrips flavens*) e a lagarta-do-pescoço-vermelho (*Stegasta bosquella*), é uma das principais limitações para a cultura do amendoim e a resistência a esses agentes constitui importante objetivo para o melhoramento genético. Neste estudo foram realizados cruzamentos entre espécies silvestres de *Arachis*, visando a obtenção de híbridos com genes de resistência a pragas localizados em espécies silvestres para futuramente introgressá-los no amendoim cultivado. O experimento foi desenvolvido no ano agrícola de 2012/2013 na Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP. Nesse trabalho, utilizou-se a hibridação artificial em condições de casa de vegetação, onde quatro acessos de genoma A foram cruzados com dois acessos de genoma B, um de genoma K e um de genoma ainda não identificado, totalizando o uso de seis espécies distintas nos cruzamentos, em 16 combinações no formato de dialélio parcial. Os acessos de *A. magna* mostraram melhor cruzabilidade entre as espécies, podendo-se obter híbridos com maior resistência desejáveis.

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. A produção mundial em 2009/2010 foi de 33,36 milhões de toneladas em casca. China e Índia são os maiores produtores, e a maior parte da produção nesses países é destinada para extração de óleo comestível (USDA, 2011).

O Brasil já se situou entre os sete primeiros países produtores de amendoim no contexto mundial, cujo principal produto comercializado era o óleo. Até o final dos anos 60 e início da década de 70, a cultura de amendoim tinha papel de destaque na economia brasileira, uma vez que o óleo contribuiu para o processo de substituição da banha de porco por óleos vegetais, sendo um dos pioneiros na alteração do hábito alimentar, juntamente com o óleo de algodão (Rocha & Barbosa, 1990). A área colhida chegou a alcançar 758.585ha com uma produção de 956.228t na safra 1971/1972. A partir de meados de 1974 devido, entre outros fatores, à queda da qualidade do produto no mercado internacional, decorrente dos sucessivos problemas de contaminação com aflatoxina, superior à permitida pela legislação externa, o preço do amendoim começou a cair, perdendo lugar no mercado, o que interferiu drasticamente na área plantada e, consequentemente, na produção (Almeida, 1996). Com a redução das exportações, o destino do produto no mercado nacional também mudou. Antes, a produção era destinada às indústrias de esmagamento; atualmente, cerca de 80% da produção destina-se ao mercado de consumo in natura (Freitas *et al.* 1995; Freire *et al.* 1996).

Um dos principais problemas da cultura são pragas de parte aérea. Diversos trabalhos têm demonstrado que, muitas espécies silvestres do gênero *Arachis* são resistentes a várias pragas, como o tripses-do-prateamento (*Enneothrips flavens*) e a lagarta-do-pescoço-vermelho (*Stegasta bosquella*). Neste sentido, projetos de pré-melhoramento no Brasil têm buscado identificar espécies silvestres da Seção *Arachis* resistentes as principais pragas da cultura, realizar cruzamentos entre espécies de genoma “A” e “não A” resistentes, duplicar cromossomos de híbridos diploides estéreis obtendo-se os anfidiplóides sintéticos, e gerar híbridos complexos (híbridos entre dois anfidiplóides). A caracterização fitopatológica, morfológica, molecular e reprodutiva dos híbridos também são realizadas. A conservação dos híbridos é realizada via sementes, via plantas vivas mantidas em casa de vegetação e/ou *in vitro*.

Assim os programas de pré-melhoramento da cultura visam a geração de populações de plantas com características agrônomicas similares ao amendoim cultivado e também com genes de resistência identificadas em espécies silvestres.

¹ Técnico em Agropecuária – Centro paulista de estudos em agronegócios/São Carlos – SP. Biotecnologia vegetal – Universidade de Agricultura e Tecnologia de Tokyo. e-mail: ddshitara@gmail.com

² Graduação em Engenharia Agrônoma – Universidade Camilo Castelo Branco/Descalvado – SP. e-mail: carolina.graciano@hotmail.com

³ Pesquisador Científico – Instituto Agronômico, Campinas-SP. E-mail: ijgodoy@iac.sp.gov.br

⁴ Pesquisador Científico – APTA Regional Centro-Norte, Pindorama, SP. E-mail: michelotto@apta.sp.gov.br

⁵ Pesquisadora – Embrapa Pecuária Sudeste/São Carlos – SP. e-mail: alessandra.favero@embrapa.br

O objetivo deste trabalho foi avaliar a cruzabilidade das espécies silvestres resistentes a tripes e a lagarta-do-pescoço-vermelho, obtendo-se híbridos que futuramente serão utilizados para a introgressão destes genes no amendoim cultivado (*Arachis hypogaea*).

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.

Foram utilizados quatro acessos de três espécies como genitores femininos: *A. krapovickasii* C.E. Simpson D.E. Williams, Valls & I.G. Vargas (Wi1297), *A. magna* Krapov. W.C. Gregory & C. E. Simpson (V13751), *A. vallsii* (V7635 e KG30097) e quatro acessos de três espécies como genitores masculinos: *A. kuhlmannii* Krapov. & W.C. Gregory (V7639 e V9243), *A. kempff-mercadoi* Krapov. W.C. Gregory & C.E. Simpson (V13250), *A. helodes* Martius ex Krapov. & W.C. Rigoni (V6325). Na Tabela 1 pode-se observar as combinações de cruzamentos em dialelo parcial, bem como o número de polinizações, número de pegs e de sementes obtidas.

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. As sementes dos genitores tratadas com Ethrel (6ml/l) e revestidas com Thiram foram mantidas em saquinhos por três semanas até as plântulas formarem um tamanho de 15cm quando foram transplantadas para os vasos.

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 declinam 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 vida de uma flor é muito curta, os botões se abrem nas primeiras horas da manhã e no fim do dia as flores já estão murchas.

A técnica de cruzamentos 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 15:00 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 8 e 9 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 “pegs” 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.

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 “pegs” são frágeis, e podem ser danificados pelos movimentos realizados nos ramos, estes foram presos com arame em forma de U invertido, para imobilizá-los.

Resultados e discussão

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

Foram realizadas 1.569 hibridações, em que se obteve 87 pegs e 20 sementes no total. Foi observado que os acessos de *A. magna* (KG 30097 e V 13751) tiveram maior número de sementes híbridas quando comparado aos acessos de *A. krapovickasii* (Wi 1297) e *A. vallsii* (V 7635), sendo que nestes o número de “pegs” foi bem menor, e não se obteve nenhuma semente. A porcentagem de sucesso obtida nos acessos de *A. magna* foi considerada baixa, porém já era previsto isso, uma vez que em cruzamentos entre espécies silvestres de *Arachis* de genomas distintos há a ocorrência de alta taxa de aborto de embriões.

Tabela 1. Combinações entre espécies silvestres, número de polinizações, pegs, sementes e sementes abortadas.

Genitor Feminino		Genitor Masculino	Numero de Polinizações	Numero de pegs	Numero de sementes	% de sucesso
KG30097	x	V7639	120	4	1	0,83
KG30097	x	V13250	113	7	4	3,54
KG30097	x	V6325	114	11	3	2,63
KG30097	x	V9243	116	14	5	4,31
V13751	x	V7639	114	6	2	1,75
V13751	x	V13250	105	7	1	0,95
V13751	x	V6325	86	9	0	0,00
V13751	x	V9243	104	22	4	3,85
Wi1297	x	V7639	81	1	0	0,00
Wi1297	x	V13250	69	2	0	0,00
Wi1297	x	V6325	107	0	0	0,00
Wi1297	x	V9243	64	4	0	0,00
V7635	x	V7639	119	0	0	0,00
V7635	x	V13250	102	0	0	0,00
V7635	x	V6325	88	0	0	0,00
V7635	x	V9243	67	0	0	0,00
TOTAL			1.569	87	20	

Agradecimentos

EMBRAPA e CNPq

Referências

Fávero AP et al. (2006) Study of the evolution of cultivated peanut through crossability studies among *Arachis ipaënsis*, *A. duranensis* and *A. hypogaea*. **Crop Science** **46** (4), 1546-1552.

Lopes MA, Fávero AP, Ferreira M, Faleiro FG. (2006) Uso de espécies silvestres no pré-melhoramento do amendoim no Brasil. In: Lopes, MA et al. **Curso Internacional de pré-melhoramento de plantas**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia; Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p.108-111.

Fávero AP et al. (2008) Amendoim. In: Barbieri, RL; Stumpf, ERT **Origem e evolução de plantas cultivadas** Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, p.123-148.

Fávero AP, Valls JFM. Domesticação e melhoramento de amendoim. In: Borém, A, Lopes, MTG, Clement, CR. **Domesticação e melhoramento – Espécies Amazônicas**. UFV, Viçosa, p. 237-249

Conagin, CHTM. (1956) O melhoramento do amendoim cultivado por meio de cruzamentos, **Bragantia**, **15**, no. 8: 297-300.