

**AVALIAÇÃO PARA RESISTÊNCIA A MANCHA PRETA E FERRUGEM EM
HÍBRIDOS ENTRE O AMENDOIM E ESPÉCIES SILVESTRES DE *Arachis***

República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Roberto Rodrigues
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

Luis Carlos Guedes Pinto
Presidente

Silvio Crestana
Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires
Ernesto Paterniani
Helio Tollini
Marcelo Barbosa Saintive
Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa

Silvio Crestana
Diretor Presidente

José Geraldo Eugênio de França
Kepler Euclides Filho
Tatiana Deane de Abreu Sá
Diretores Executivos

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

José Manuel Cabral de Sousa Dias
Chefe-Geral

Maurício Antônio Lopes
Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Maria Isabel de Oliveira Penteado
Chefe-Adjunto de Comunicação e Negócios

Maria do Rosário de Moraes
Chefe-Adjunto de Administração

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 96

**AVALIAÇÃO PARA RESISTÊNCIA A MANCHA PRETA
E FERRUGEM EM HÍBRIDOS ENTRE O AMENDOIM E
ESPÉCIES SILVESTRES DE *Arachis***

**Alessandra P. Fávero
Patrícia M. Guimarães
David J. Bertioli
Soraya C. Leal Bertioli**

Brasília, DF
2005

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão

Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –

Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 3348-4739 Fax:

(61) 3340-3666 <http://www.cenargen.embrapa.br>

e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Maria Isabel de Oliveira Penteado*

Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros: *Arthur da Silva Mariante*

Maria Alice Bianchi

Maria de Fátima Batista

Maurício Machain Franco

Regina Maria Dechechi Carneiro

Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares de Campos Carneiro

Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Maria Iara Pereira Machado*

Editoração eletrônica: *Maria da Graça S. P. Negrão*

1ª edição

1ª impressão (2005):

A 945 Avaliação para resistência a mancha preta e ferrugem em híbridos entre o amendoim e espécies silvestres de *Arachis* / Alessandra P.

Fávero ... [et. al.]. – Brasília, DF : Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005.

17p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa

Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340 ; 96)

1. Mancha preta - resistência. 2. Ferrugem - resistência. 3. *Arachis*.
I. Guimarães, Patrícia M. II. Bertioli, David, J. III. Bertioli, S. C. L. IV. Série.

571.995 – CDD 21

SUMÁRIO

RESUMO	6
INTRODUÇÃO.....	7
MATERIAL E MÉTODOS.....	7
Cruzamentos	7
Isolamento de fungos e montagem dos bioensaios.....	8
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	9
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	10

AVALIAÇÃO PARA RESISTÊNCIA A MANCHA PRETA E FERRUGEM EM HÍBRIDOS ENTRE O AMENDOIM E ESPÉCIES SILVESTRES DE *Arachis*

Alessandra P. Fávero¹
Patrícia M. Guimarães²
David J. Bertioli³
Soraya C. Leal-Bertioli⁴

RESUMO

O amendoim é uma das leguminosas de maior importância ao nível mundial. No Brasil, as doenças foliares são uma das maiores causadoras de prejuízos nesta cultura. Espécies silvestres têm alta resistência a doenças do amendoim. Para encontrar locos associados a genes de resistência e transferi-los ao amendoim cultivado, foi realizado cruzamento entre duas espécies silvestres: *A. ipaënsis* e *A. duranensis*. O híbrido foi tetraploidizado e cruzado com *A. hypogaea* cv. IAC-Runner e gerada uma população F₂ segregante que foi avaliada para resistência a mancha preta e a ferrugem. Foi feito uma avaliação fitopatológica com a família completa (genitores, progenitores, testemunha *A. hypogaea* cv. IAC-Tatu-ST, um indivíduo F₁ e 143 indivíduos F₂ para ferrugem e 153 para mancha preta). Todos os indivíduos segregantes foram mais resistentes do que o parental cultivado. Uma vez concluído o mapa genético, espera-se encontrar marcadores associados aos locos de resistências para sua utilização em melhoramento com seleção assistida por marcadores.

¹ PhD. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

² PhD. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

³ PhD. Universidade Católica de Brasília.

⁴ PhD. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

INTRODUÇÃO

O amendoim é a quarta oleaginosa mais plantada no mundo, utilizada principalmente na produção de óleo comestível, confeitos, doces ou para consumo *in natura*. Na safra brasileira de 2003/2004, a área plantada foi de 98,2 mil ha, sendo 73,2 mil ha plantados em São Paulo (74,54% da área plantada no Brasil) e a produção foi de 175,7 mil t (80,86% da produção brasileira). A produtividade média brasileira é de 2,21t/ha (COMPANHIA..., 2004).

Estima-se que a produção mundial esteja superior a 30 milhões de toneladas ao ano (COMPANHIA..., 2002). O principal problema dos produtores de amendoim no Brasil e no mundo é o ataque de doenças fúngicas, como a mancha barrenta (*Phoma arachidicola* Marasas et al.), mancha castanha (*Cercospora arachidicola* Hori), mancha preta (*Cercosporidium personatum* (Berk & Curt.) Deighton), ferrugem (*Puccinia arachidicola* Speg) e verrugose (*Sphaceloma arachidis* Bitancourt & Jenkins), que podendo causar sérios prejuízos à cultura, atingindo 70% da produção quando não controlada.

O gênero *Arachis* vem sendo estudado com intensidade crescente, graças ao potencial demonstrado por algumas de suas espécies silvestres para o melhoramento do amendoim (*Arachis hypogaea* L.). Várias das espécies possuem níveis de resistência a pragas e doenças superiores aos encontrados em acessos de germoplasma de *A. hypogaea* (STALKER e MOSS, 1987). O gênero possui nove seções, sendo que *A. hypogaea* está situada na seção *Arachis*, juntamente com outras 26 espécies silvestres, a maioria diplóide, sendo que a espécie cultivada é tetraplóide. Dwivedi et al. (2002) estudaram a resistência à mancha preta e ferrugem em indivíduos oriundos de hibridações interespecíficas obtidos a partir de cruzamentos entre *A. hypogaea* e as espécies *A. cardenasii*, *A. batizocoi*, *A. duranensis* e *A. villosa*. Como resultados as resistências à ferrugem e mancha preta parecem ser devido ao longo período de incubação e latência, menos lesão por folha, menor diâmetro de lesão, menor índice de esporulação, menor dano de área foliar e escore de doença.

O objetivo do presente trabalho foi realizar avaliação fitopatológica de híbridos interespecíficos com o fim de encontrar locos associados a genes de resistência a mancha preta e ferrugem e transferi-los ao amendoim cultivado.

MATERIAL E MÉTODOS

Cruzamentos

Foram cruzados dois acessos silvestres: *A. ipaënsis* K 30076 e *A. duranensis* V 14167 cujo híbrido estéril foi tetraploidizado com uso de colchicina tornando-se fértil. O híbrido fértil, chamado de anfidiplóide sintético foi cruzado com a *A. hypogaea* cv. IAC-Runner, com sucesso, gerando 21 indivíduos F₁. Posteriormente, foi obtida uma população F₂ segregante, com 153 indivíduos.

Isolamento de fungos e montagem dos bioensaios

O isolado *Puccinia arachidis* foi coletado de folhas afetadas por infestação natural em casa de vegetação na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (DF). A cultura de *Cercosporidium personatum* foi isolada de folhas de amendoim em Campinas, na safra 2002/2003 e mantida em meio aveia-agar, com repicagens a cada 14 dias.

A técnica escolhida para os testes de resistência foi desenvolvida por Moraes & Salgado (1982). A técnica de folha destacada escolhida consiste no acondicionamento das folhas destacadas das plantas em placas de petri. Dentro das placas de petri são colocadas: no fundo uma camada de algodão, por cima desta coloca-se uma folha de papel de filtro e uma lâmina de vidro para sustentar os folíolos. Colocou-se aproximadamente 20 ml de água destilada e autoclavada por placa de petri. As folhas foram coletadas no telado, colocadas dentro de sacos plásticos e levadas para o Laboratório de Patologia de Sementes, localizado na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Lá, as folhas foram lavadas, tiveram a ponta do pecíolo cortada dentro de um frasco com água destilada e foram imediatamente colocadas nas placas de petri previamente preparadas com um chumaço de algodão úmido na ponta do pecíolo. Desde a coleta até o acondicionamento nas placas, todas as etapas foram feitas no mesmo dia. Já a inoculação, às vezes, por indisponibilidade de tempo, foi feita no dia seguinte.

Para a inoculação de *Cercosporidium personatum*, as folhas foram colocadas nas placas com o seu lado adaxial para cima. Já para *Puccinia arachidis*, a face abaxial foi voltada para cima. Para todos os testes de resistência foi utilizada uma solução de água destilada + Tween 20 a 0,5% e esporos, à concentração de 100.000 esporos por ml. Para a contagem de esporos, foi utilizada uma câmara de Neubauer. A inoculação foi feita com pincelamento da solução de esporos contra as folhas já dentro das placas, de forma a molhá-las sem escorrer. Durante as primeiras 48 horas, as placas permaneceram fechadas com um plástico entre as partes da placa para a manutenção da umidade e escurecimento do ambiente de dentro da placa. Depois deste período, os saquinhos plásticos foram retirados.

Um bioensaio para verificação de resistência a mancha preta e um para ferrugem foram realizados com a família completa (genitores, progenitores, testemunha *A. hypogaea* cv. IAC-Tatu-ST, um indivíduo F_1 e 143 indivíduos F_2 para ferrugem e 153 para mancha preta). As placas de Petri foram acondicionadas em ambiente controlado com temperatura de 23-25°C e 10 h de luz e 14 h de escuro. Para cada indivíduo, foram preparadas quatro unidades experimentais.

O período necessário para a avaliação dos testes de resistência variou conforme a espécie de fungo utilizada. Para testes feitos com *Puccinia arachidis*, o período foi de 25 dias. Para *Cercosporidium personatum*, o período foi de 30 dias.

Para avaliação de *Puccinia arachidis*, tomou-se como parâmetros o número de lesões e área lesionada (mm^2) por área foliar (mm^2). Para *Cercosporidium personatum*, usou-se apenas a área lesionada (mm^2) por área foliar (mm^2).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No bioensaio de mancha preta, todos os indivíduos da população apresentaram menos lesões do que a testemunha, a cultivar IAC-Tatu-ST, sendo que três indivíduos foram totalmente imunes (Figura 1). O anfidiplóide e o indivíduo híbrido oriundo do cruzamento entre a cv. IAC-Runner e o anfidiplóide apresentaram lesões, porém menores e em menor número que a testemunha. Foi observado que há uma fraca correlação positiva entre o nível de resistência à mancha preta e à ferrugem ($r=0,208$). Para a ferrugem, a cultivar IAC-Runner mostrou-se suscetível, assim como a testemunha, a cv. IAC-Tatu-ST. O anfidiplóide sintético mostrou-se resistente, juntamente com *A. duranensis*. *Arachis ipaënsis* apresentou pústulas menores e em menor quantidade que *A. hypogaea*. Indivíduos da população F2 mostraram-se segregantes e de alto contraste, sendo que 24 indivíduos não apresentaram lesão, e os demais apresentaram número de lesões e tamanho significativamente diferentes (Tabela 1).

Em trabalhos de melhoramento, acredita-se que há um grande potencial para seleção de materiais resistentes a ambas as doenças, contudo, a seleção para resistência à ferrugem aparenta ser de menor dificuldade quando comparada a seleção para mancha preta, devido à maior repetibilidade entre as amostras. Além disso, acredita-se que o número de genes envolvidos na resistência a mancha preta é muito maior do que os envolvidos na resistência à ferrugem. Um fator limitante nos bioensaios à ferrugem, contudo, é a impossibilidade em se multiplicar inóculo in vitro, uma vez que este é um patógeno obrigatório. Desta maneira, a execução do experimento depende de condições ambientais favoráveis para o aparecimento natural de inóculo.

Um mapa genético baseado em SSRs e RGAs está sendo produzido, assim como uma população F3 com 6 indivíduos oriundos de cada indivíduo da geração anterior para validar a fenotipagem obtida em F2. Uma vez concluído o mapa genético, espera-se encontrar marcadores associados aos locos de resistências para sua utilização em melhoramento com seleção assistida por marcadores moleculares. Acredita-se que, pelo grande contraste entre os genitores e a ampla gama de dados obtidos na população F2, será possível a identificação de QTLs envolvidos na resistência às duas doenças estudadas neste trabalho.

O potencial de cruzamentos de acessos silvestres e sua tetraploidização como forma de introgressão de resistências é claro neste trabalho. Em infestação natural em casa de vegetação, os anfidiplóides, híbridos e indivíduos segregantes se mostram sempre mais resistentes que o amendoim cultivado (Figura2). Todos os indivíduos segregantes foram mais resistentes que o amendoim cultivado desta população (mais resistentes para esta e outras doenças, e com características agrônômicas desejáveis). Indivíduos selecionados estão sendo retrocruzados com a cultivar Runner. As resistências serão acompanhadas nas progênies posteriores com bioensaios e com marcadores moleculares associados. Este é o início de um programa de melhoramento em amendoim assistido por marcadores moleculares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB (2002, 2004). Disponível em: <http://www.conab.gov.br/download/safra/safra20022003Lev06.pdf> >. Acesso em: 23, set., 2003.

DWIVEDI, S. L.; PANDE, S.; RAO, J. N.; NIGAM, S. N. Components of resistance to late leaf spot and rust among interspecific derivatives and their significance in a foliar disease resistance breeding in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). **Euphytica**, Dordrecht, Netherlands, v. 125, p. 81-88, 2002.

MORAES, S. de A.; SALGADO, C. L. Utilização da técnica de folhas destacadas de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) para inoculações com *Cercospora arachidicola* Hori e *Cercospora personata* (Bert. & Curt.) Ell. & Ev. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, Brasil, v.8, p.39-55, 1982.

STALKER, H. T.; MOSS, J. P. Speciation, cytogenetics and utilization of *Arachis* species. **Advances in Agronomy**, San Diego, v.41, p.1-40, 1987.

Tabela1. Porcentagem de infecção (área lesionada/área foliar) em folhas de *Arachis* inoculadas com *Puccinia arachidis* (ferrugem) e *Cercosporidium personatum* (mancha preta). T1 a T155 são os indivíduos segregantes F₂.

Indivíduo	Ferrugem	Mancha Preta
IAC-Tatu-ST	0,9826	1,3558
IAC-Runner	0,5871	

<i>A. ipaënsis</i>	0,2096	0,0665
<i>A. duranensis</i>	0,0000	0,1581
IAC-Runner x (<i>A. ipaënsis</i> x <i>A. duranensis</i>) ^{x2}	0,0263	0,7760
(<i>A. ipaënsis</i> x <i>A. duranensis</i>) ^{x2}	0,0000	0,8204
T 01	0,0032	0,0337
T 02	0,0200	0,5870
T 03	0,0434	0,4530
T 04	0,0008	0,5270
T 05	0,0442	0,4938
T 06	0,7322	0,1491
T 07	N	0,9377
T 08	0,0642	0,7363
T 09	N	N
T 10	0,0203	0,1285
T 11	0,0000	3,8493
T 12	0,0012	0,1253
T 13	0,0000	0,1705
T 14	0,1060	0,3502
T 15	0,0000	0,0132
T 16	0,1577	0,1794
T 17	0,0000	0,0838
T 18	0,0076	0,0164
T 19	0,0000	0,3838
T 20	N	0,0487
T 21	N	N
T 22	0,2407	0,0359
T 23	N	1,3402
T 24	0,0427	0,6547
T 25	0,0629	0,3366
T 26	0,0036	0,0000
T 27	0,0038	0,0000
T 28	0,0024	0,0000
T 29	0,0000	0,6704
T 30	0,0020	0,1165
T 31	0,0144	N
T 32	0,0014	0,0194
T 33	0,0000	1,3634
T 34	0,0018	1,1254
T 35	0,0015	0,0063
T 36	N	N
T 37	0,0000	N
T 38	0,0000	N
T 39	0,1074	0,3514
T 40	0,0000	2,4561
T 41	N	N
T 42	0,0271	0,0696
T 43	0,0017	N
T 44	0,0081	0,5228
T 45	0,0104	0,2718
T 46	N	0,2407
T 47	N	0,1037
T 48	0,0000	0,0089
T 49	0,0679	N
T 50	0,1622	N
T 51	N	0,1853
T 52	0,0256	0,8399

T 53	0,0678	0,8193
T 54	N	0,4210
T 55	0,0025	N
T 56	0,0015	0,8360
T 57	N	0,0539
T 58	0,0864	0,2167
T 59	0,0094	0,8738
T 60	0,1751	0,1295
T 61	0,0108	1,5208
T 62	0,0016	0,2473
T 63	0,0000	0,3737
T 64	0,0394	N
T 65	0,1478	0,0822
T 66	0,0680	13,8871
T 67	0,1085	0,2513
T 68	N	N
T 69	0,0096	0,2033
T 70	0,1411	0,3699
T 71	0,0013	0,1428
T 72		0,2964
T 73	0,0000	0,0268
T 74	0,0000	0,0952
T 75	N	N
T 76	N	0,5058
T 77	0,0402	0,7753
T 78	0,3388	0,0843
T 79	N	1,8188
T 80	0,0069	0,2351
T 81	N	0,1382
T 82	N	2,1230
T 83	0,0487	0,1381
T 84	0,0000	0,0518
T 85	N	0,1637
T 86	0,0009	N
T 87	0,0386	0,0697
T 88	0,0778	0,4063
T 89	N	0,7994
T 90	N	1,8085
T 91	0,0010	6,0563
T 92	0,1876	0,5953
T 93	0,1005	0,3518
T 94	N	8,2624
T 95	0,0327	0,1226
T 96	N	0,0310
T 97	N	N
T 98	0,4577	0,0508
T 99	0,4142	1,5946
T 100	N	0,0697
T 101	0,0064	0,0246
T 102	0,0458	0,0435
T 103	0,0000	0,0900
T 104	0,0610	0,0585
T 105	0,0274	0,0937
T 106	0,0000	0,1984
T 107	0,0093	0,0304
T 108	0,0246	0,2054

T 109	0,0066	0,3230
T 110	0,0000	0,3710
T 111	N	0,4119
T 112	0,0008	0,0070
T 113	N	0,0786
T 114	0,0000	0,2694
T 115	N	0,6380
T 116	0,0000	0,4598
T 117	0,4218	0,3968
T 118	N	3,3964
T 119	0,0000	0,0229
T 120	0,7882	0,6639
T 121	0,6689	0,0086
T 122	0,2404	0,6473
T 123	0,0347	3,2439
T 124	0,4142	1,0101
T 125	0,0679	0,1251
T 126	0,4128	0,4200
T 127	0,0068	1,1654
T 128	0,0223	0,1069
T 129	0,1812	0,1542
T 130	0,2269	0,9146
T 131	0,0250	0,0284
T 132	0,0697	0,0599
T 133	N	0,5235
T 134	0,0071	0,1148
T 135	0,3250	0,5805
T 136	0,0000	0,7079
T 137	0,5898	1,5055
T 138	N	0,7508
T 139	0,2128	0,2322
T 140	0,1402	0,3164
T 141	N	0,1321
T 142	0,3048	0,3267
T 143	0,0000	0,4186
T 144	0,0324	0,0963
T 145	0,0073	0,5430
T 146	0,0135	3,0827
T 147	0,0121	0,9144
T 148	0,0851	0,4373
T 149	0,1040	N
T 150	0,2014	0,2046
T 151	0,3122	0,4268
T 152	0,0000	N
T 153	N	0,1178
T 154	0,0389	2,2479
T 155	N	N

Figura 1: a) Em sentido horário: cv. IAC-Runner (R), Indivíduo F1 (F1), *A. ipaënsis* (K), *A. duranensis* (V). b) Indivíduos da população F2 (1 a 6)

A)

B)

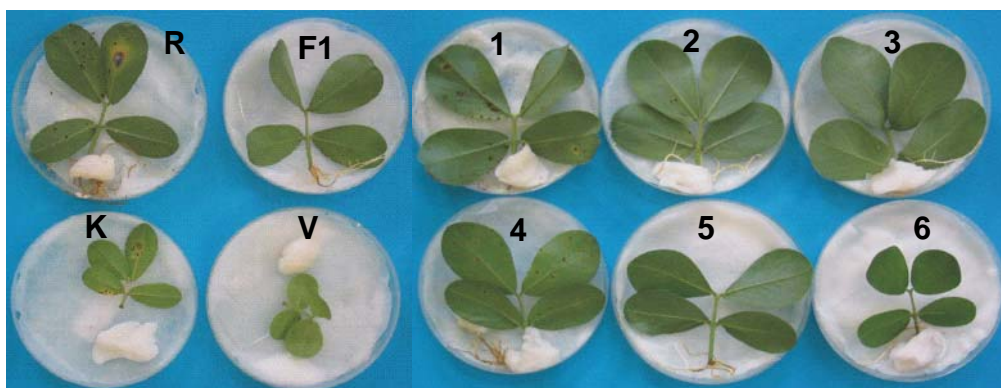


Figura 2: Infecção natural em casa de vegetação com fungos foliares, com predominância de ferrugem. Esquerda: anfidiplóide IAC-Runner x (*A. ipaënsis* x *A. duranensis*)^{x2} (resistente). Direita: *A. hypogaea* cv. Tatu (susceptível).

