



IV Encontro Latino Americano de Especialistas em Arachis

11-14 de maio de 2004 - Brasília, DF



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

José Amauri Dimázio

Presidente

Clayton Campanhola

Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires

Dietrich Gerhard Quast

Sérgio Fausto

Urbano Campos Ribeiral

Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa

Clayton Campanhola

Diretor-Presidente

Gustavo Kauark Chianca

Herbert Cavalcante de Lima

Mariza Marilena T. Luz Barbosa

Diretores-Executivos

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

José Manuel Cabral de Souza Dias

Chefe -Geral

Maurício Antonio Lopes

Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Maria Isabel de Oliveira Pentead

Chefe-adjunto de Comunicação e Negócios

Maria do Rosário de Moraes

Chefe-Adjunto de Administração

Documentos 127

IV ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE ESPECIALISTAS EM *ARACHIS*

IV ENCUESTRO LATINO-AMERICANO DE ESPECIALISTAS EN *ARACHIS*

IV LATIN-AMERICAN MEETING OF *ARACHIS* SPECIALISTS

Comissão Organizadora

José Francisco M. Valls (Coordenador)

Alessandra Pereira Fávero

Andréa del Pilar de Souza Peñaloza Adriana Regina Custodio

**Brasília – DF
2004**

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa - Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão

Parque Estação Biológica, Av. W5 Norte (Final) - Brasília, DF

CEP 70770-900 - Caixa Postal 02372

PABX: (61) 448-4600

Fax: (61) 340-3624

<http://www.cenargen.embrapa.br>

e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Maria Isabel de Oliveira Penteado

Secretária-Executiva: Maria da Graça Simões Pires Negrão

Membros: Arthur da Silva Mariante

Maria Alice Bianchi

Maria da Graça S. P. Negrão

Maria de Fátima Batista

Maria Isabel de O. Penteado

Maurício Machain Franco

Regina Maria Dechechi Carneiro

Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares de Campos Carneiro

Supervisor Editorial: Maria da Graça Simões Pires Negrão

Normalização Bibliográfica: Maria Iara *Pereira Machado*

Editoração Eletrônica: Maria da Graça Simões Pires Negrão

Tratamento de Ilustrações: Altevir Carvalho Freitas

1ª edição

1ª impressão (2004):

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

E 56 Encontro Latino-Americano de Especialistas em Arachis (4. : 2004 : Brasília, DF)

IV Encontro Latino-Americano de Especialistas em Arachis / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia = IV Encuentro Latino-Americano de Especialista em Arachis / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia = IV Latin-American Meeting of Arachis Specialists / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. – Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004.

213 p. – (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 0102-0110; 127)

1. Arachis. I. Título. II. Série.

633.368 – CDD 21

Apresentação

Os laços de colaboração entre pesquisadores do gênero *Arachis* brasileiros e argentinos e outros especialistas internacionais vêm sendo continuamente estreitados, desde 1980. Pela importância regional do gênero e diante de sua circunscrição ao Brasil, Bolívia, Paraguai, Argentina e Uruguai, decidiu-se realizar encontros técnicos bienais de pesquisadores dos países acima e demais interessados, para análise diagnóstica e discussão dos progressos e problemas da pesquisa, na busca de modelos de integração científica e prática, voltados à definição de prioridades compartilhadas para o trabalho de cada biênio subsequente.

Em 1997, o Instituto Agrônomo do Estado de São Paulo promoveu, em Campinas, o I Encontro Latino-americano de Especialistas em *Arachis*, que contou com 13 palestrantes e a apresentação de 32 painéis, gerando dados importantes para a pesquisa das espécies silvestres de *Arachis*. O II Encontro ocorreu em 1999, na cidade de Córdoba e na Estação Experimental de Manfredi, a mais tradicional instituição de melhoramento genético de amendoim na Argentina, contando com a apresentação de 6 palestras e 16 painéis, que abriram maior espaço para o conhecimento da variabilidade e aspectos fitotécnicos de *A. hypogaea*. O III Encontro foi realizado em 2001, em Londrina, no Paraná, com amplo comparecimento dos especialistas e apresentação de 18 palestras e 15 painéis, permitindo maior aprofundamento sobre a variabilidade do amendoim em outros países latino-americanos e sobre as características forrageiras de algumas espécies.

Tais encontros colaboraram para a intensa integração de esforços dos especialistas envolvidos, que hoje se reflete na complementaridade de publicações, na efetivação de várias co-autorias interinstitucionais e internacionais, e mesmo na submissão de projetos colaborativos à Comunidade Européia e ao Centro Argentino-Brasileiro de Biotecnologia, cobrindo aspectos da conservação e uso sustentável dos recursos genéticos de *Arachis*, ambos aprovados.

Diante da fecundidade científica e da sólida contribuição para a formação de recursos humanos dos três Encontros anteriores, um IV Encontro foi organizado em Brasília, no Distrito Federal, pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, a instituição presentemente mais ativa na pesquisa e conservação dos recursos genéticos do gênero na América e sede do Banco Ativo de Germoplasma de Espécies Silvestres de *Arachis*.

O IV Encontro Latino-americano de Especialistas em *Arachis* foi organizado pelo Grupo de Pesquisa em Conservação e Caracterização de Recursos Genéticos de *Arachis* e *Paspalum*, do Diretório 5.0 do CNPq, sob coordenação do Curador Nacional do germoplasma do gênero *Arachis* e com a cooperação de colegas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e da Universidade Católica de Brasília.

O comparecimento de especialistas nacionais e internacionais foi excelente, totalizando mais de 100 assistentes, com ênfase em pesquisadores e produtores brasileiros, argentinos e de outros países vizinhos, além de representantes do IPGRI-Américas, do ICRISAT-Índia e da Texas A&M University, instituição norte-americana fortemente envolvida no melhoramento genético do amendoim a partir da introgressão de genes de seus parentes silvestres sul-americanos.

O evento teve palestras, mesas-redondas, apresentação de painéis e momentos de discussão de prioridades para as diversas linhas de pesquisa de *Arachis*. Houve 18 palestras, várias preparadas em co-autoria, o que amplia o

número de envolvidos a 32. As quatro mesas redondas contaram com 21 participantes, 14 deles distintos dos autores de palestras. Por fim, 22 painéis preparados por 54 autores ou co-autores elevaram o total dos que contribuíram para ao menos uma atividade a 89 cientistas, estudantes e empresários.

As palestras cobriram informações sobre aspectos históricos da pesquisa do gênero, sobre a evolução e domesticação de espécies na América do Sul, variabilidade apresentada pelo amendoim em áreas indígenas, taxonomia das espécies silvestres, citogenética, fitogeografia, incluindo dados resultantes da utilização de Sistemas de Informação Geográfica, aspectos fitopatológicos e de contaminação por toxinas, importantes para o melhoramento genético do amendoim, busca de genes de resistência e seqüências análogas em espécies silvestres, mapa genético, caracterização dos genomas dos distintos grupos de espécies, trabalhos de pré-melhoramento em andamento, abrangência da caracterização molecular, desenvolvimento de protocolos para conservação *in vitro* e criopreservação, e oportunidades de treinamento informal e formal, em serviço e acadêmico, em aspectos múltiplos dos recursos genéticos de *Arachis*.

As mesas redondas abordaram os temas “Novas prioridades para a coleta de germoplasma”, “Demandas do melhoramento genético do amendoim”, “Estratégias complementares e integradas de conservação” e “Desenvolvimento e adoção de cultivares de amendoins forrageiros”. A primeira e a terceira reuniram representantes dos cinco países com espécies de *Arachis* em sua flora, além de especialistas internacionais com grande dedicação ao tema. As outras tiveram a participação de melhoristas nacionais e estrangeiros, de representantes de outras áreas de pesquisa, de produtores rurais e da indústria.

Entre os resultados alcançados, destacam-se o intenso avanço do conhecimento e a troca de experiências científicas entre todos os envolvidos, bem como a consolidação da prática do trabalho multidisciplinar e multi-institucional como padrão bem sucedido na abordagem dos recursos genéticos brasileiros e regionais.

A contribuição para a formação de recursos humanos especializados tem sido um ponto forte desta série de Encontros. Em 20 anos de vinculação das atividades de enriquecimento, conservação e caracterização do germoplasma de *Arachis* com a orientação acadêmica em várias universidades, foram defendidas mais de 30 dissertações e teses, orientadas por membros da equipe e outros colaboradores. Alguns dos primeiros treinandos já têm seus próprios orientados, garantindo continuidade ao processo. Quatro doutores com teses sobre *Arachis* foram contratados pela Embrapa, nos últimos anos, em função de excelentes colocações em concurso público, e sua atuação inclui a continuação das pesquisas na equipe.

A presença de pesquisadores de várias instituições e países permitiu que, durante o Encontro, fosse concluída a montagem de duas propostas de projetos de grande interesse para a comunidade científica, com foco nas espécies de *Arachis*. A primeira foi submetida ao Generation Challenge Program, do Consultative Group on International Agriculture Research - CGIAR, com o título “*Unlocking the genetic diversity in peanut's wild relatives with genomic and genetic tools*”. Esta proposta envolve parcerias com o IBONE-Argentina, ICRISAT-Índia e Quênia, Agrópolis-França, CEERAS-Senegal e Universidade de Aarhus-Dinamarca. A segunda, denominada “*Identificação e mapeamento da distribuição geográfica e caracterização da diversidade biológica das espécies brasileiras de Arachis (Leguminosae), com vistas à conservação dos parentes silvestres e das raças locais ou variedades crioulas do amendoim (Arachis hypogaea L.)*”, foi submetida ao

Ministério do Meio Ambiente–MMA, no âmbito do Projeto de Conservação e Utilização Sustentável da Diversidade Biológica Brasileira–PROBIO. Ambas propostas foram aprovadas e já estão implementadas, assegurando a continuidade de implementação das idéias e prioridades discutidas por ocasião do IV Encontro.

Por gentil oferta dos participantes argentinos, foi marcado um próximo V Encontro Latino-americano de Especialistas em *Arachis*, em Rio Cuarto, Córdoba, Argentina, a ser realizado em março ou abril de 2006. Os trâmites para a realização desse encontro já se encontram avançados, com pleno suporte das instituições argentinas envolvidas.

Comissão Organizadora

José Francisco M. Valls (Coordenador), Alessandra Pereira Fávero, Andréa del Pilar de Souza Peñaloza, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, e Adriana Regina Custodio, aluna de mestrado da UnB e estagiária da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Colaborando com esta comissão, colegas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e da Universidade Católica de Brasília apoiaram ações específicas do evento. A UCB forneceu excelente local e infraestrutura para a realização do Encontro e a apresentação de painéis foi realizada na Embrapa Sede.

Patrocínio

Além dos fundos aportados pelo CNPq, diretamente à coordenação do IV Encontro, ou pelo apoio de “grants” à participação de bolsistas de Produtividade em Pesquisa, a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia forneceu recursos institucionais para o apoio logístico aos participantes em Brasília. Também se recebeu suporte das instituições de origem dos palestrantes e de outros envolvidos nas atividades principais, através de sua liberação para o evento, além da cobertura de custos parciais ou totais de alguns participantes.

A Comissão Organizadora agradece mensamente pelo suporte recebido, neste momento de divulgação dos Anais do IV Encontro Latino-americano de Especialistas em *Arachis*.

Entidades promotoras e co-participantes

O evento contou com o apoio das instituições abaixo, seja pelo fornecimento de recursos, ou pela liberação de seus funcionários, bolsistas e estudantes para participação efetiva no Encontro:

EMBRAPA/Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

UCB-DF/Universidade Católica de Brasília, DF

EMBRAPA/Centro Nacional de Pesquisa de Algodão, Campina Grande, PB

EMBRAPA/Centro de Pesquisa Agroflorestal do Acre, Rio Branco, AC

EMBRAPA/Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados, Planaltina, DF

IAC/Instituto Agrônomo do Estado de São Paulo, Campinas, SP
UNESP/Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, SP
UERJ/Universidade do Estado do Rio de Janeiro, RJ
UFPR/Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR
USP/Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP
Faculdades Santa Júlia, Taquaritinga, SP
CEPLAC/Itabuna, BA
CNPQ/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico,
Brasília, DF
CAPES/Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior,
Brasília, DF
FAPESP/Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, SP
Santa Helena Indústria de Alimentos, Ribeirão Preto, SP
Fazenda Alqueire, Rio Pardo, RS
IICA, Brasília, DF
PROCISUR, Montevideo, Uruguai.
IPGRI/Américas, Cali, Colômbia
IBONE, Corrientes, Argentina
INTA, Manfredi, Argentina
Criadero El Carmen, General Cabrera, Córdoba, Argentina
Universidad del Siglo XXI, Córdoba, Argentina
ANAPO, Cochabamba, Bolívia
SEFO-Sefosam, Cochabamba, Bolívia
DIA, Asunción, Paraguai
Facultad de Agronomía de Montevideo, Uruguai
Texas A&M University-TAES, Stephenville, Texas, USA
ICRISAT, Hyderabad, Índia

**IV ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE ESPECIALISTAS EM ARACHIS
IV ENCUESTRO LATINO-AMERICANO DE ESPECIALISTAS EN ARACHIS
IV LATIN-AMERICAN MEETING OF ARACHIS SPECIALISTS**

Programa/ Program

11/05/2004 - Terça-feira / Martes / Tuesday

08:00 – 10:00 - **Inscrições / Inscripciones / Registration**

10:00 – 12: 00 - **Abertura / Apertura / Opening**

Diretor Executivo da Embrapa

Coordenador de Pós-Graduação da Universidade Católica de Brasília/UCB

Chefe Geral da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Representantes de Cursos de Pós-Graduação

Representantes de Organismos Financiadores

Representantes do IBONE, Regensur/PROCISUR e IPGRI-Américas

PALESTRA / CONFERENCE: Catalina Romero Lopes - UNESP/Botucatu, SP & Marcos Aparecido Gimenes – UNESP/Botucatu & Faculdades Santa Júlia, Taquaritinga, SP / David John Bertoli – UCB, DF / José F. M. Valls - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Impacto da pesquisa botânica, genética e agrônômica de espécies de *Arachis* na formação de recursos humanos latino-americanos. Impacto de la investigación botánica, genética y agronómica de *Arachis* en la formación de recursos humanos latino americanos. Impact of the botanical, genetic and agronomic research of *Arachis* on the development of Latin American human resources

12:00 – 14:00 - ALMOÇO / ALMUERZO / LUNCH

14:00 – 18:00: **Visita guiada à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Embrapa Cenargen). Visita orientada a Embrapa Recursos Genéticos y Biotecnología. Guided tour of Embrapa Genetic Resources and Biotechnology**

12/05/2004 – Quarta-feira / Miércoles / Wednesday

8:30 – 9:30 - PALESTRA / CONFERENCE: Antônio Krapovickas – IBONE, Argentina
La evolución de *Arachis* y la domesticación de especies del género. Evolution of *Arachis* and the domestication of species of the genus. Evolução em *Arachis* e a domesticação de espécies do gênero.

9:30 – 10:00 - INTERVALO / PAUSE

10:00 – 12:00 - PALESTRAS / CONFERENCES:

Fábio Oliveira Freitas & Márcio C. Moretzsohn - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Variabilidade de *Arachis hypogaea* em aldeias indígenas brasileiras. Variabilidad de *Arachis hypogaea* en villas indígenas brasileiras. Variability of *Arachis hypogaea* in Brazilian Indian villages.

Andréa del Pilar de Souza Peñaloza – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Avanços da citogenética de *Arachis* no Brasil. Avances de la citogenética de *Arachis* en Brasil. Advances of *Arachis* cytogenetics in Brazil.

Graciela Lavia & Guillermo Seijo - IBONE

Contenido de ADN, distribución de heterocromatina y cariotipos en la caracterización del germoplasma de maní. DNA content, heterochromatin distribution and karyotypes in the characterization of groundnut germplasm. Conteúdo de DNA, distribuição da heterocromatina e cariótipos na caracterização do germoplasma de amendoim.

Guillermo Seijo & Graciela Lavia - IBONE

Qué nos cuentan los genes ribosomales sobre el origen del maní? What do ribosomal genes tell us about the groundnut origin? O que nos contam os genes ribossomais sobre a origem do amendoim?

12:00 – 14:00 - ALMOÇO / ALMUERZO / LUNCH

14:00 – 15:30 - PALESTRAS / CONFERENCES:

Andrew Jarvis – IPGRI-Américas, Cali, Colombia

Biogeography of Wild *Arachis*: Potential new sites of occurrence. Biogeografía de espécies silvestres de *Arachis*. Novos sítios potenciais de ocorrência. Biogeografía de especies silvestres de *Arachis*: Nuevos sitios potenciales de ocurrencia.

Guillermo Seijo - IBONE / Charles E. Simpson – Texas A & M University / Esteban A. Pizarro – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná / José F. M. Valls, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Nuevas recolecciones de *Arachis* desde la publicación de la basis de datos en Internet. New *Arachis* collections since the publication of the Internet database. Novas coletas de *Arachis* desde a publicação da base de dados na Internet.

15:30 – 16:00 - INTERVALO / PAUSE

16:00 – 18:00 - MESA REDONDA / ROUND TABLE: **Novas prioridades para a coleta de germoplasma. Nuevas prioridades para la recolección de germoplasma. New priorities for germplasm collection.**

MODERADOR / MODERATOR: Renato Ferraz de Arruda Veiga – IAC, Campinas, Brasil

Antonio Krapovickas - IBONE
Representante da Bolívia (a confirmar)
José F. M. Valls, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Victor Santander – DIA, Asunción, Paraguai
Esteban A. Pizarro – Universidade Federal do Paraná
David E. Williams - Foreign Agriculture Service, USDA, USA

18:00 - 18:15 - INTERVALO / PAUSE

18:15 – 20:00 - **SESSÃO DE POSTERS. PANELES. POSTER SESSION.**

13/05/2004 – Quinta-feira / Jueves / Thursday

8:30 – 10:00 - PALESTRAS / CONFERENCES:

Nelson Dias Suassuna – Embrapa Algodão, Campina Grande, Brasil
Problemas fitopatológicos no amendoim. Problemas fitopatológicos en el maní.
Phytopathological problems of the peanut crop.

(Apresentador a confirmar / Speaker to be confirmed)
Micotoxinas no amendoim. Micotoxinas en el maní. Mycotoxins in peanut.

10:00 – 10:30 - INTERVALO / PAUSE

10:30 – 12:00 - PALESTRAS / CONFERENCES:

Patrícia M. Guimarães e Soraya Leal-Bertioli – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia / David John Bertioli – Universidade Católica de Brasília / UCB, Brasília, Brasil

Busca de genes de resistência e seqüências análogas para resistência a nematóides e doenças foliares em parentes silvestres do amendoim. Búsqueda de genes de resistencia y secuencias análogas para resistencia a enfermedades foliares en parentes silvestres del maní. Search for resistance genes and analogue sequences for resistance to foliar diseases in the peanut wild relatives.

Marcos Aparecido Gimenes – UNESP/Botucatu & Faculdades Santa Júlia / Márcio de Carvalho Moretzsohn – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Avanços recentes na caracterização molecular e mapeamento genético em *Arachis*. Avances recientes en la caracterización molecular y mapeo genético en *Arachis*. Recent advances in molecular characterization and genetic mapping in *Arachis*.

12:00 – 14:00 - ALMOÇO / ALMUERZO / LUNCH

14:00 – 15:40 - PALESTRAS / CONFERENCES:

Charles E. Simpson – Texas A & M University, Texas, USA

Diversity in Section *Arachis* and its potential for peanut breeding. Diversidade na Secção *Arachis* e seu potencial para o melhoramento do amendoim. Diversidad en la Sección *Arachis* e su potencial para el mejoramiento del maní.

Alessandra P. Fávero – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia / Charles E. Simpson – Texas A & M University

Pré-melhoramento em amendoim utilizando espécies silvestres. Pré-mejoramiento en maní utilizando espécies silvestres. Peanut pre-breeding using wild relatives.

Hari D. Upadhyaya – ICRISAT, Patancheru, AP, India

ICRISAT work on diversity and enhancing use of *Arachis* germplasm in crop improvement. Pesquisas do ICRISAT sobre a diversidade e utilização do germoplasma de *Arachis* no melhoramento. Investigaciones del ICRISAT sobre la diversidad y utilización del germoplasma de *Arachis* en el mejoramiento.

15:40 – 16:00 - INTERVALO / PAUSE

16:00 – 18:00 - MESA REDONDA / ROUND TABLE: **Demandas do melhoramento genético do amendoim. Requerimientos del mejoramiento genético del maní. Requirements of peanut breeding.**

MODERADOR / MODERATOR: Luciano Nass – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Jorge Baldessari - INTA, Manfredi, Argentina

Ignácio José de Godoy – IAC, Campinas, Brasil

Taís Falleiro Suassuna – Embrapa Algodão, Campina Grande, Brasil

Renato Fecino – Diretor Geral da Santa Helena Indústria de Alimentos

Dejair Minotti - Cooperativa COPLANA, Jaboticabal, Brasil

Charles E. Simpson – Texas A & M University

14/05/2004 – Sexta-feira / Viernes / Friday

8:30 – 9:30 - PALESTRAS / CONFERENCES:

Hebe Rey – IBONE, Corrientes, Argentina

Desarrollo de protocolos para conservación *in vitro* de *Arachis* en Argentina.

Development of protocols for *in vitro* conservation of *Arachis* in Argentina.

Desenvolvimento de protocolos para conservação *in vitro* de *Arachis* na Argentina.

Elisabeth Mansur – UERJ , Rio de Janeiro, Brasil

Desenvolvimento de protocolos para conservação *in vitro* de *Arachis* no Brasil.

Desarrollo de protocolos para conservación *in vitro* de *Arachis* en Brasil.

Development of protocols for *in vitro* conservation of *Arachis* in Brazil.

9:30 – 10:00 - INTERVALO / PAUSE

10:00 – 12:30 - MESA REDONDA / ROUND TABLE: **Estratégias complementares e integradas de conservação dos recursos genéticos de espécies de *Arachis*. Estrategias complementares e integradas de conservación de los recursos genéticos de especies de *Arachis*. Complementary and integrated strategies for *Arachis* germplasm conservation.**

MODERADOR / MODERATOR: (A confirmar / to be confirmed)

Jorge Baldessari - INTA, Manfredi, Argentina

Representante da Bolívia (a confirmar / to be confirmed)

Victor Santander – DIA, Paraguai

Representante do Uruguai (a confirmar / to be confirmed)

Elisabeth Mansur – UFRJ , Rio de Janeiro, Brasil

Representante da Gerência de Recursos Genéticos, Secretaria de Biodiversidade e Florestas, Ministério do meio Ambiente, Brasília, DF

David E. Williams - Foreign Agriculture Service, USDA, USA

12:30 – 14:30 - ALMOÇO / ALMUERZO / LUNCH

14:30 – 16:30 - MESA REDONDA / ROUND TABLE: **Desenvolvimento e adoção de cultivares de amendoins forrageiros. Desarrollo y adopción de cultivares de maní forrajero. Development and adoption of forage peanut cultivars.**

MODERADOR / MODERATOR: (A confirmar / to be confirmed)

Gaston Sauma – SEFO-SAM, Cochabamba, Bolívia

José Marques Pereira – CEPLAC / CEPEC, Itabuna, BA, Brasil

Judson Ferreira Valentim – Embrapa Acre, Rio Branco, AC, Brasil

Cláudio Takao Karia – Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, Brasil

Naylor Bastiani Perez – Fazenda Alqueire, Rio Pardo, RS, Brasil

Esteban A. Pizarro –Universidade Federal do Paraná

16:30 - 17:00 - INTERVALO / PAUSE

17:00 - 17:40 - PALESTRA / CONFERENCE: José F. M. Valls – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

O que não sabíamos sobre *Arachis* e o que ainda continuamos sem compreender: Novas metas de pesquisa. Lo que no se sabía sobre *Arachis* y lo que aún continuamos sin comprender: Nuevas metas de investigación. What we did not know about *Arachis* and still do not understand: New research targets.

17:40 - 18:00 - Encerramento / Clausura / Closing ceremony

PALESTRAS

IMPACTO DA PESQUISA BOTÂNICA, GENÉTICA E AGRONÔMICA DE ESPÉCIES DE *Arachis* NA FORMAÇÃO DE RECURSOS HUMANOS LATINO-AMERICANOS

Lopes, C.R. ^{1*} Gimenes, M. A.;¹ Bertioli, D. J.;² Valls, J. F. M^{3*}.

¹ Depto de Genética/IB, Universidade Estadual Paulista “ Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Campus de Rubião Jr. s/n° - Botucatu, SP, Brasil E-mail: catalina@ibb.unesp.br ; dccatalina@terra.com.br; mgimenes@btu.flash.tv.br

² Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF, Brasil. E-mail: david@cenargen.embrapa.br

³ Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia/Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (CENARGEN/EMBRAPA), Brasília, DF, Brasil E-mail: valls@cenargen.embrapa.br

* CNPq Research Fellowships

Segundo estimativas já divulgadas, das 300.000 espécies de plantas já descritas, o homem utilizou para sua alimentação, cerca de 3.000 que presentemente estão reduzidas a menos de 300 espécies. De acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), nos dias de hoje apenas 15 espécies são responsáveis por cerca de 90% de toda a dieta humana , sendo elas o arroz,o trigo,o milho, o sorgo, a cevada, a cana-de-açúcar, a beterraba, a batata, a batata-doce, a mandioca, o feijão, a soja, o amendoim, o côco e a banana. Mesmo dentre essas espécies sabemos que algumas já apresentam significativas perdas de diversidade.

Em 1950, Bem Smith, citado por Valls e Simpson (1994), chamava a atenção para o fato de que “nenhuma planta de tão evidente valor para o homem, tem recebido tão pouca atenção botânica como o amendoim, *A.hypogaea* L.” Embora fosse verdade, silenciosamente mas com grande competência e dedicação,cientistas hoje renomados e reconhecidos como V. A Rigoni, A Krapovickas, W. C. Gregory e J. Pietrarelly estavam arduamente desenvolvendo competências para darem início à coleta e à caracterização do germoplasma do *Gênero Arachis*, germoplasma esse que desde então vem se tornando mais amplo, valioso e conhecido. Começava a ser formado uma preciosa coleção de germoplasma de *Arachis* e a ser realizados estudos botânicos essenciais para o futuro uso e entendimento desse material.

Não saberemos dizer com precisão em qual momento da década de 80 o Dr. A. Krapovickas e o Dr. J.F.M.Valls conheceram-se. O Dr. Valls, no CENARGEN, preparava-se para sua primeira viagem de coleta de *Arachis* no Brasil e como seria normal de acontecer, o Dr. Krapovickas pertencente à Universidade Nacional Del Nordeste, Corrientes, Argentina, já emérito conhecedor do gênero, enviou-lhe uma lista de possíveis locais de ocorrência de espécies conhecidas ou ainda não conhecidas, com as características das já descritas para que pudesse identifica-las. Dessa aproximação resultaram seis viagens conjuntas de coleta, a revisão do herbário do CENARGEN e uma parceria que se mantém até hoje. Cabe enfatizar que o Dr. Krapovickas foi o orientador da tese da Dra. Graciela Lavia em citogenética de *Arachis* que, presentemente, faz parte junto com o Dr. Guillermo Seijo da Pós-Graduação da Universidade de Córdoba, Argentina, abrindo-se mais uma possibilidade para a formação de recursos humanos.

Nessa mesma década de 80, a partir de 1983, começava no Depto de Genética do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, a implementação de um Curso de Pós-Graduação em Genética Humana e Animal. Procedentes do Instituto Agrônomo de Campinas, éramos a única docente com doutorado pela USP em

pesquisas na área vegetal, especialmente com caracterização de diversidade genética por meio de marcadores bioquímicos (flavonóides, isoenzimas e proteínas de reserva). Não conseguimos convencer o Conselho do Departamento da necessidade imediata de introduzirem a Genética Vegetal e só cinco anos mais tarde, em 1988, nossa produção científica com a Agronomia, a Botânica, o CENARGEN e outros grupos, comprovou o grande interesse pela Genética Vegetal e pela nossa atuação e o curso todo foi reestruturado passando a chamar-se Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Área de Concentração em Genética, com as áreas humanas, animal e vegetal à disposição dos alunos selecionados para Mestrado e Doutorado. Já havíamos então desenvolvido um sólido grupo de Iniciação Científica e de bolsistas de Aperfeiçoamento e havíamos montado um eficiente laboratório para pesquisas com marcadores. Trabalhávamos com germoplasma de mandioca, couve-flor, espécies silvestres de arroz, eucaliptos, citros, etc, com colegas da ESALQ e do IAC e até na área animal com alguns colegas do próprio departamento. O Dr. Norberto da Silva, reconhecido melhorista de espécies hortícolas e que pertence a Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu, UNESP, tornou-se orientador em nosso grupo responsabilizando-se pelas disciplinas de melhoramento vegetal.

Devido a nossa especialização na caracterização de recursos genéticos, desde 1986 desempenhávamos a função de Assessora Científica junto ao CENARGEN, mais especificamente junto à Seção de Caracterização de Germoplasma Vegetal. Foi essa feliz oportunidade que nos aproximou do Dr. J.F.M.Valls e permitiu um contato científico mais estreito com o mesmo.

O Dr. Valls vem desenvolvendo, ao longo dos anos, um importantíssimo trabalho botânico de coleta e conservação de espécies de *Arachis*, determinação de suas áreas de ocorrência, descrição de novas espécies, das quais seis em co-autoria com Krapovickas e Gregory na monografia publicada em 1994 por esses autores e dez novas espécies que estão sendo descritas. A partir desse nosso contacto no CENARGEN ficou claro para ambos a vantagem de uma nova e proveitosa parceria. A Coleção Viva de Germoplasma de Espécies Silvestres de *Arachis* nos comprovou a existência de uma coleção viva, bem amostrada e bem documentada, que satisfaria a maioria dos problemas referentes à amostragem genética cientificamente satisfatória. Nosso trabalho junto à Universidade nos havia levado a descobrir um prazer imenso nas tarefas de orientação e um dom inato para isso e, de repente, estávamos diante de uma coleção de germoplasma inigualável e, além disso com um germoplasma quase todo nativo, um recurso genético nosso e valioso, sob a responsabilidade de um notável curador, botânico reconhecido do gênero, interagindo com pesquisadores importantes da área. Por sua vez ocorreu ao Dr. Valls que estava diante de pesquisadora interessada, com competência para desenvolver pesquisas sobre caracterização genética e outros estudos importantes com esse material e, acima de tudo, trabalhando num pólo gerador e formador de recursos humanos.

Como docente de uma universidade, de há muito havíamos nos conscientizado da importância de formar recursos humanos, uma das poucas formas inquestionáveis de contribuir para o progresso do país, sentimento esse compartilhado pelo Dr. Valls. Ambos já tínhamos experiências prévias de orientação e partimos para a concretização da nova tarefa.

Em 1989 começamos a orientar três mestrandos, um dos quais, a pós-graduanda Maria Letícia Galgaro, deu início a um projeto sobre o estudo da

variabilidade genética e das relações de similaridade entre e dentro das espécies *A. villosulicarpa*, *A. Pietrarelli* e *A. hypogaea*, pelo uso de isoenzimas. M. L. Galgaro foi a nossa primeira aluna a fazer parte de uma coleta junto com o Prof. Dr. Valls, tendo visitado a região das tribos dos Nhambiquaras para coleta de material de *A villosulicarpa*.

Enquanto se desenvolvia o credenciamento do Dr. Valls junto ao nosso Curso de Pós-Graduação partimos para os EUA como bolsista de pós-doutorado da FAPESP, para desenvolvermos competência na análise de marcadores moleculares, na época, com RFLP e com RAPD e lá permanecemos por cerca de um ano. Fomos para o laboratório do Dr. Gary Hart junto à Texas A&M University, College Station, Texas. O pós-doutorado foi excelente, de grande proveito e nos permitiu abrir as portas para o doutorado “sandwich” de nosso primeiro orientado de doutorado, o Dr. Celso Luis Marino, hoje nosso colega no Depto. de Genética.

Em 1991 nossos três mestrados se completaram e demos início a outros mestrados e doutorados e hoje contamos com cinco mestrados e oito doutorados concluídos em *Arachis*, além de um doutorado em andamento, dentre as quarenta e cinco orientações de dissertações e teses nas quais temos trabalhado. Diversas orientações de IC e de Aperfeiçoamento também foram realizadas. Numa de nossas visitas ao Dr. Gary Hart, ele gentilmente nos levou para Stephenville na Texas Agricultural Experimental Station, também pertencente a Texas A&M University, para que pudéssemos conhecer o Dr. Simpson que já a bastante tempo partilhava pesquisas com o Dr. Valls, companheiro de oito expedições de coleta e, que mesmo a distância tem sempre apoiado e co-orientado nossos trabalhos de melhoramento e pré-melhoramento. O Dr. Simpson trabalha na coleta e preservação de germoplasma silvestre e obtenção de híbridos interespecíficos.

Em 1993 entramos em contato com o Prof. Dr. Gary Kochert professor do “Department of Botany, Crop and Soil Sciences, University of Georgia, Athens, GA, USA” que já trabalhava com espécies silvestres de *Arachis* e com o amendoim cultivado, dando assessoria a plantadores de amendoim do Estado da Geórgia e, após um estágio de dois meses em seu laboratório estabelecemos um projeto conjunto para o desenvolvimento de bolsas de doutorado tipo “sandwich” (concedidas pelo CNPq) e que foram utilizadas pelos doutorandos Maria Letícia Galgaro e Marcos Ap. Gimenes que lá permaneceram por dois anos desenvolvendo projetos em *Arachis* e utilizando diferentes marcadores moleculares. O Prof. Kochert visitou-nos mais tarde participando de nossa P.G. com um curso rápido de uma semana, sobre “Aspectos de Biologia Molecular na Área Vegetal”, tendo participado com sua esposa e conosco de visita ao Dr. Valls no CENARGEN e de uma mini coleta.

Em 1993, o Dr. Valls tornou-se para nós o Prof. Valls e deu início a três orientações de mestrado, dois na UNESP e um na UnB. A partir de então ele já orientou oito mestrados, cinco na UNESP e três na UnB com mais dois mestrados em andamento e já orientou cinco doutorados na UNESP com mais dois doutorados em andamento, também na UNESP.

Como seria de se esperar, nosso laboratório ao qual denominamos desde a bastante tempo de BIOGEM (Laboratório de Biotecnologia e Genética Molecular), no Depto de Genética, IB, Botucatu, UNESP, não se deteve no tempo, mas soube acompanhar a evolução dos marcadores genéticos moleculares. Foram incluídos nas nossas competências os usos do marcador AFLP e de marcadores altamente polimórficos e por isso altamente discriminativos, como são os microssatélites.

Com o acúmulo de conhecimento gerado ao longo de todos esses anos, naturalmente o grupo, e aqui incluímos o Dr. Valls e toda sua equipe, tem investido não só na formação de recursos humanos nas áreas básicas, como botânica (desenvolvimento de descritores morfológicos), citogenética (contagem do número de cromossomos nas diferentes espécies, $2n=18$; $2n=20$; $2n=40$) e utilização de marcadores moleculares para caracterização da diversidade genética nas espécies de *Arachis*, uso de seqüências de espaçadores de genes ribossomais ("ITSs - Internal Transcribed Spacers) do DNA para estudo de relações filogenéticas, etc, mas também na formação de recursos humanos que levem a valorização do germoplasma em estudo, por meio das mais avançadas técnicas de Biologia Molecular e de Genética Molecular. Por esse motivo temos projetos para prospecção de genes de resistência às principais doenças do amendoim cultivado, *A. hypogaea*, projetos para a identificação de genes diferencialmente expressos em função da resposta do amendoim à infecção por fungos e projetos de construção de mapas saturados com integração de diferentes marcadores moleculares que nos permitam facilitar a detecção de QTLs. É necessário esclarecer que um outro aspecto de máxima importância para nosso grupo tem sido e continuará a ser a pesquisa com os materiais forrageiros. Embora esses assuntos referentes às pesquisas sejam os mais interessantes para uma apresentação e discussão, respeitamos o fato de que serão os assuntos a serem tratados nas palestras dos Profs. Drs. Marcos Ap. Gimenes e David J. Bertioli.

Na década de 90, um novo aliado, o Dr. Esteban Pizarro, chegou proveniente do CIAT e passou a trabalhar no CPAC, próximo a Brasília. A partir de então temos contado com mais um co-orientador e membro de várias bancas de teses em *Arachis*, que se dedicou a avaliação de materiais importantes e de uma série de expedições para coleta, especialmente de materiais forrageiros. Presentemente o Dr. Pizarro trabalha junto à Pós-Graduação em forrageiras na Universidade Federal do Paraná e esperamos que lá esteja compartilhando da formação de outros recursos humanos.

Outro centro de formação de recursos humanos para pesquisas em *Arachis* tem como orientadora a Dra Elisabeth Atalla Mansur de Oliveira da Pós-Graduação em Biociências Nucleares da Universidade Estadual do Rio de Janeiro. A referida pesquisadora já concluiu a orientação de duas dissertações de mestrado e de uma tese de doutorado além de orientações de iniciações científicas. Seus projetos referem-se a transformações genéticas de amendoim por meio de eletroporação e morfogênese, micropropagação e preservação *in vitro* de espécies silvestres.

Um grupo recente mas bastante produtivo estabeleceu-se na Universidade Católica de Brasília sob a liderança do Dr. David John Bertioli. Duas Iniciações Científicas já foram orientadas pelo Dr. Bertioli e três pela Dra Soraya Leal-Bertioli e outras se encontram em andamento. Três orientações de mestrado já foram concluídas pelo Dr. Bertioli e um mestrado e três teses de doutorado encontram-se em andamento. O Prof. Valls e nosso grupo de Botucatu fazem parte de projetos com essa nova equipe.

Os investimentos intelectuais, morais e científicos desses anos todos resultou na multiplicação do número de pesquisadores envolvidos em pesquisas referentes ao *Gênero Arachis*. É com muita alegria que vemos surgindo uma segunda geração de pesquisadores, na UNESP (Botucatu/SP), no IAC (Campinas/SP), na Faculdade de Agronomia Luis Meneghel (Bandeirantes/PR), no CENARGEN/EMBRAPA (Brasília/DF), na Universidade Católica de Brasília (Brasília/DF) etc, a maior parte

deles como produtos de nossas mãos, todos pesquisadores eficientes e realmente interessados já produzindo novos conhecimentos. A descoberta da importância econômica do gênero para o Brasil e o mundo e da existência dos valiosos recursos genéticos que possuímos também tem atraído novos pesquisadores, o que só aumenta a produção de resultados de grande importância e convence a todos nós que temos trabalhado com *Arachis*, de que um excelente trabalho foi executado.

APOIO FINANCEIRO:

FAPESP-SÃO PAULO/SP; CNPq-BRASÍLIA/DF; FINEP-RIO DE JANEIRO/RJ;CFC-AMSTERDAM/HOLANDA; UNIÃO EUROPÉIA; PRODETAB.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

KRAPOVICKAS, A.,GREGORY, W.C. *Bonplandia* v. 8, p.1-186. 1994.

VALLS, J.F.M., SIMPSON, C.E. Taxonomy, Natural Distribution and Attributes of *Arachis*. In: KERRIDGE, P.C. and HARDY, B. (eds). *Biology and Agronomy of Forage Arachis*. Cali, 1994. p. 1-18.

AVANÇOS RECENTES NA CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E MAPEAMENTO GENÉTICO EM *Arachis*

Gimenes, M.A.¹. & Moretzsohn, M.C²

¹Depto de Genética / IB, UNESP, Rubião Jr. s/nº, Botucatu-SP, Brasil. E-mail: mgimenes@btu.flash.tv.br

²Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, C.P. 02372, 70.770-900, Brasília-DF, Brasil. E-mail: marciocm@cenargen.embrapa.br

O gênero *Arachis* compreende uma espécie de importância agrônômica e espécies de grande potencial, principalmente para uso forrageiro. A principal espécie do gênero é *A. hypogaea* L., o amendoim cultivado, a qual é amplamente cultivada em mais de 80 países e é utilizada para vários fins, como por exemplo, para produção de óleo e para consumo direto. Devido à importância de *A. hypogaea*, a maior parte dos estudos no gênero *Arachis*, até alguns anos atrás, concentrava-se na seção *Arachis*, uma das nove seções do gênero *Arachis*. Essa seção inclui o amendoim cultivado (*A. hypogaea* – genoma AABB), *A. monticola*, também alotetraplóide, e outras 25 espécies diplóides silvestres, que possuem genomas similares aos de *A. hypogaea*, segundo evidências citogenéticas (Fernandez & Krapovickas, 1994; Lavia, 1998), moleculares (Kochert *et al.*, 1996; Moretzsohn *et al.*, 2004) e de cruzabilidade (Krapovickas & Gregory, 1994). Essas espécies, portanto, podem ser utilizadas como fontes de genes em programas de melhoramento genético do amendoim, por meio de introgressão de genes de interesse, como por exemplo, genes de resistência a doenças e pragas.

A seção *Arachis* ainda é alvo da maioria dos estudos, mas não é mais o único foco de estudos no gênero. O número de estudos envolvendo outras seções tem aumentado bastante nos últimos anos (Galgaro *et al.*, 1998; Gimenes *et al.*, 2000; Palmieri *et al.*, 2002), em consequência do trabalho de coleta que tem sido realizado e que tem aumentado consideravelmente a quantidade de germoplasma disponível. Com isso, uma maior variabilidade torna-se disponível para ser utilizada em programas de melhoramento das espécies já cultivadas, elevando as chances de novos cultivares serem obtidos. As coletas realizadas tiveram ainda como consequência a identificação de novas espécies no gênero. Além disso, o aumento foi impulsionado pelo sucesso que algumas espécies de *Arachis* têm alcançado como plantas forrageiras, principalmente *A. pintoi* (seção *Caulorrhizae*) e *A. glabrata* (seção *Rhizomatosae*).

Uma grande parte dos estudos moleculares publicados sobre o gênero *Arachis* são referentes à caracterização da variabilidade genética do germoplasma, mas ultimamente tem aumentando o número de estudos visando a prospecção de genes de interesse nas espécies silvestres do gênero, que possam ser utilizados no melhoramento genético de *A. hypogaea* (Leal-Bertioli *et al.*, 2000; Pande & Rao, 2001).

A avaliação da variabilidade genética é um dos passos mais importantes para manutenção e uso do germoplasma de uma espécie. No gênero *Arachis*, a caracterização da variabilidade genética tem sido realizada entre e dentro de espécies, abrangendo praticamente todas as suas seções. Esses estudos têm mostrado que espécies silvestres de *Arachis* apresentam uma grande variabilidade genética, mas pouca variabilidade tem sido detectada no amendoim cultivado, por meio de marcadores bioquímicos e moleculares. A falta de polimorfismo no

amendoim tem limitado muitos estudos genéticos a partir do uso de marcadores moleculares, tais como a construção de mapas de ligação e a seleção assistida por marcadores. No entanto, tem se observado, nos últimos anos, uma grande evolução na análise da variação intra-específica em *A. hypogaea* e em outras espécies de *Arachis*. Os estudos iniciais geralmente envolveram um número bastante reduzido de acessos por espécie, e atualmente o número é muito maior em função do aumento de acessos, o que é consequência direta do esforço realizado para se aumentar o germoplasma disponível do gênero.

Com relação aos métodos utilizados para a avaliação de variabilidade, tem se observado que os métodos têm acompanhado a evolução dos marcadores genéticos, a qual tem ocorrido no sentido de desenvolvimento de marcadores mais informativos, isto é, marcadores que permitam a análise de regiões altamente polimórficas do genoma. Como aconteceu em outras espécies vegetais, os primeiros marcadores utilizados em *Arachis* foram as isoenzimas e proteínas (Cherry, 1975; Krishna & Mitra, 1988). Em seguida, vieram os polimorfismos de fragmentos de restrição ou RFLPs (Paik-Ro *et al.*, 1992; Kochert *et al.*, 1996; Galgaro *et al.*, 1998), os RAPDs (Halward *et al.*, 1991, 1992, Gimenes *et al.*, 2000), AFLPs (He & Prakash, 1997, 2001; Gimenes *et al.*, 2002) e os marcadores do tipo microssatélites (Hopkins *et al.*, 1999, He *et al.*, 2003; Ferguson *et al.*, 2004; Moretzsohn *et al.*, 2004). Nos últimos anos, um grande esforço tem sido feito para desenvolvimento de marcadores microssatélites para *Arachis* spp. Marcadores microssatélites ou SSR ("Simple Sequence Repeats") constituem a ferramenta ideal para diversos estudos em plantas, incluindo a análise da variabilidade genética de coleções de germoplasma e a construção de mapas de ligação (revisto por Gupta & Varshney, 2000), por serem multialélicos, codominantes e baseados em PCR. Atualmente, existem mais de 500 marcadores microssatélites descritos ou sendo caracterizados para o amendoim.

A avaliação da variabilidade genética no germoplasma das espécies de *Arachis*, além de contribuir com informações importantes para a manutenção do germoplasma de *Arachis*, tem também sido útil para responder a várias questões e para levantar várias outras, principalmente sobre relações entre as espécies e taxa de fecundação cruzada em algumas delas. As perguntas que surgiram fizeram com que fossem utilizados outros tipos de análises moleculares, como por exemplo, a de seqüências de espaçadores de genes ribossomais (ITS - Internal Transcribed Spacers) do rDNA, as quais têm se demonstrado muito úteis no estabelecimento de relações filogenéticas entre espécies de diversos gêneros. As análises de ITSs das espécies de *Arachis* têm permitido a resposta a várias questões, como por exemplo, a origem comum das espécies de 18 cromossomos da seção *Arachis* (*A. decora*, *A. praecox*, *A. palustris*), a partir de uma espécie de genoma B.

As dúvidas sobre a taxa de fecundação cruzada entre espécies foram um dos motivos para o desenvolvimento de marcadores microssatélites para três espécies (*A. hypogaea*, *A. glabrata* e *A. pintoii*). Este tipo de marcador, por ser codominante e multialélico, tem fornecido dados importantes sobre o tipo de sistema de cruzamento nas espécies de *Arachis*. Por exemplo, a análise do germoplasma de *A. glabrata* com microssatélites revelou uma heterozigosidade observada muito alta para uma espécie considerada autógama, de acordo com evidências morfológicas. Marcadores do tipo microssatélite certamente ainda contribuirão muito na avaliação de germoplasma de *Arachis*, pois além das vantagens citadas acima, estes têm se mostrado altamente transferíveis entre espécies e, devido ao modo de detecção, facilitam a integração e comparação entre dados obtidos a partir da análise de

materiais diferentes. Outros marcadores como RAPD e RFLP têm se mostrado inadequados neste sentido, devido à falta de repetibilidade e por dificuldades na interpretação dos resultados, uma vez que é detectado um grande número de locos ao mesmo tempo em uma única análise.

Marcadores microssatélites têm ainda contribuído enormemente na prospecção de genes em *Arachis*, pois estão sendo utilizados para obtenção de mapas genéticos, que estão sendo construídos, utilizando-se populações resultantes de cruzamentos intra-específicos (*A. stenosperma* x *A. stenosperma*, *A. magna* x *A. magna*) e interespecíficos (*A. ipaënsis* x *A. magna*, *A. duranensis* x *A. stenosperma*). Microssatélites facilitarão a comparação entre os mapas e a integração com marcadores derivados de RGAs (resistance gene analogs) e marcadores desenvolvidos a partir de ESTs ("Expressed Sequence Tags"), selecionados em experimentos nos quais pretende-se identificar genes diferencialmente expressos em função da infecção aos nematóides das galhas (*Meloidogyne* spp.) e fungos, como *Cercosporidium personatum*, causador da mancha preta e *Cercospora arachidicola*, causador da mancha parda. O mapeamento de marcadores associados a locos que conferem resistência a esses nematóides e fungos irá acelerar sobremaneira o processo de introgressão dos genes de resistência para o amendoim cultivado, pelo método de retrocruzamento. A integração de todos esses marcadores moleculares em um mapa facilitará a identificação dos genes envolvidos na resistência e futuramente a clonagem dos mesmos, uma vez que os ESTs e RGAs que forem mapeados nas regiões onde os QTLs são encontrados podem ser considerados fortes candidatos a genes envolvidos na característica em estudo e têm sido uma excelente alternativa para a clonagem posicional. Esta estratégia tem se demonstrado bastante promissora para identificação de genes de diversas características em diferentes espécies (Zheng *et al.*, 2003; Flandez-Galvez *et al.*, 2003). Além disso, estudos demonstraram que QTLs para a mesmas características podem ser conservados em relação à constituição e posição entre espécies relacionadas (Changé *et al.*, 2003), o que sugere que os dados obtidos podem contribuir para identificação de QTLs em outras espécies do gênero.

REFERENCIAS

- CHAGNÉ, D. *Molecular Breeding* v.12, p. 185-195, 2003.
- CHERRY, J.P. *Peanut Science* v.2, p. 57-65, 1975.
- FERGUSON, M.E. *Theor. Appl. Genet.*, v.108, p.1064-1070, 2004.
- FERNANDEZ, A. & KRAPOVICKAS, A., *Bonplandia*, v.8, p.187-220, 1994.
- FLANDEZ-GALVEZ, H. *Theor. Appl. Genet.*, v. 107, p. 1257-1265, 2003
- GALGARO, L., *Genome*, v.41, p.445-454, 1998.
- GIMENES, M.A., *Euphytica*, v.116, p.187-195, 2000.
- GIMENES, M.A., *Genet. Mol. Biol.*, v.25, p.349-353, 2002.
- GUPTA, P.K. & VARSHNEY, R.K. *Euphytica*, v.113, p.163-185, 2000.
- HALWARD, T.M., *Genome*, v.34, p.1013-1020, 1991.
- HALWARD, T.M., *Plant Mol Biology*, v.18, p.315-325, 1992.
- HE, G., *BMC Plant Biology*, v.3, 2003 [<http://www.biomedcentral.com/1471-2229/3/3>].
- HE, G. & PRAKASH, C.S. *Euphytica* v.97, p.143-149, 1997.
- HE, G. & PRAKASH, C.S. *Gen. Resour. Crop Evol.*, v.48, p.347-352, 2001.
- HOPKINS, M.S., *Crop Sci.*, v.39, p.1243-1247, 1999.
- KOCHERT, G., *Am. J. Bot.* v.83, p.1282-1291, 1996.
- KRAPOVICKAS, A & GREGORY, W. *Bonplandia* v.8, p.1-186, 1994.
- KRISHNA, T.G. & MITRA R. *Euphytica*, v.37, p.47-42, 1988.
- LAVIA, G.I., *Cytologia*, v.63, p.177-181, 1998.
- LEAL-BERTIOLI, S.C.M., Boletim de Pesquisa n° 20. EMBRAPA, 2000.
- MORETZSOHN, M.C., *BMC Plant Biology*, 4:11, 2004.

PAIK-RO, *Theor. Appl. Genet.*, v.84, p.201-208, 1992.
PALMIERI, D.A., *Mol. Ecol. Notes*, v.2, p.551-553, 2002
PANDE, S. & RAO, J.N., *Plant Disease*, v.85, p.851-855, 2001.
ZHENG, B.S. *Theor Appl Genet*, v. 107, 1505-1515, 2003.

USING WILD SPECIES AND GENOMIC TOOLS TO IMPROVE RESISTANCE IN PEANUT (*Arachis hypogaea* L.)

Bertioli, D.J.¹, Fávero, A.P.², Gimenes, M.A.³, Guimarães, P.M.², Krapovickas, A.⁴, Lavia, G.⁴, Leal-Bertioli, S.C.M.², Leoi, L.C.T.¹, Madsen, L. H.⁵, Moretzsohn, M. C.², Parniske, M.⁶, Proite, K.², Sandal, N.⁵, Seijo, J.G.³, Stougaard, J.⁵ and Valls, J.F.M.².

¹ Universidade Católica de Brasília, Campus II, Biotecnologia e Ciências Genômicas - SGAN Quadra 916, Módulo B, Av. W5 Norte, Brasília - DF, 70790-160, Brazil.

² EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica-pqEB, Final Av. W5 Norte, Brasília-DF, 70770-900, Brazil.

³ Universidade Estadual de São Paulo, Instituto de Biociências, Distrito de Rubião Júnior s/n, Botucatu, São Paulo 18618-000 Brazil.

⁴ Instituto de Botánica del Nordeste, Laboratorio de Citogenética Vegetal, Sargento Cabral 2131 Corrientes, 3400 Argentina.

⁵ Laboratory of Gene Expression, Department of Molecular and Structural Biology, Gustav Weides Vej 10 8000C, Aarhus, Denmark

⁶ Sainsbury Laboratory, John Innes Centre, Norwich Research Park, Colney, Norwich, NR4 7UH, England.

INTRODUCTION

The legume genus *Arachis* is native to South America, and contains 69 described species. One of these, peanut, is the fifth most important oilseed in the world, and is also widely consumed as peanut butter, salted nuts, sweets, bakery products, and animal feed, and is a key plant in tropical subsistence agriculture in South America, Africa, India and Asia.

Improvement of peanut by breeding achieved much in the last century, but has been fundamentally limited by an extreme genetic bottleneck at the origin of the crop. This origin was through the hybridisation of two diploid wild species of *Arachis* followed by a spontaneous duplication of chromosomes. The resultant plant, would have had hybrid vigor, but be reproductively isolated from its wild relatives. This has led to a lack of diversity for traits of agricultural interest, and to a lack of genetic diversity, which has made genetic characterization very difficult.

Wild diploid *Arachis* species are, on the other hand genetically very diverse and have been selected during evolution by distinct environments and biotic stresses. This presentation describes the progress of two projects which fund a consortium of 6 labs in 4 different countries. The research aims to unlock the genetic diversity of wild *Arachis*, identifying sources of resistances to biotic stress in wild *Arachis* germplasm and developing tools and a knowledge-base for the incorporation of these resistances in cultivated peanut by breeding.

The diseases and pests targeted are the fungal leaf spots *Cercospora arachidicola* and *Cercosporidium personatum*, the rust *Puccinia arachidis* and root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). The tools and knowledge base being developed consist of genetic and physical maps of *Arachis*, and analysis of orthologous genomic regions of *Arachis* and the model legume *Lotus japonicus*.

MATERIALS AND METHODS

Detached leaf bioassays (5) were done using mixed strains of *C. arachidicola*, *C. personatum* and a pure strain of *P. arachidis* from São Paulo State, Brazil. Selected accessions were then tested with pure strains in detached leaf bioassays

and field tested in Northeast Argentina.

M. arenaria race 1 from Texas, USA; and an unusual population of *M. javanica* from *A. pintoii* from Paraná, Brazil were used for bioassays as described by Hussey and Barker (3).

Fluorescent *in-situ* hybridization (FISH) was done as described by Pedrosa et al. (7)

Hybridisations of *Arachis* plants were as described by Nigam et al. (6).

Microsatellite containing sequences were obtained from: enriched genomic libraries as described by (8); ESTs of *A. stenosperma* produced by us, and *Arachis* spp. sequences available in Genbank. "Troll" was used for identification of microsatellites (2).

Isolation of resistance gene analogues (RGAs) was described by Bertoli et al. (1).

For anchor-marker development, legume EST sequences which had a single strong homologue in *Arabidopsis* were selected from *L. japonicus*, *Medicago truncatula* and *Glycine max*. Conserved regions flanking inferred introns were used for primer design.

RESULTS

Bioassays

Bioassays with the fungal diseases were done using 109 wild accessions of *Arachis* spp. and ten varieties of *A. hypogaea*. The *A. hypogaea* were more susceptible than any of the wild *Arachis* spp. tested. Numerous wild *Arachis* spp. showed no disease symptoms when inoculated with the fungi. The selected accessions tested in field conditions in Argentina showed the same resistance as against mixed and pure strains in detached leaf assays using Brazilian isolates.

Bioassays with *M. javanica* and *M. arenaria* also showed that *A. hypogaea* was more susceptible than any of the wild *Arachis* spp. tested. Several wild *Arachis* which supported no detectable nematode replication were identified (Fig.1).

Cytology

Only two pairs of *A. hypogaea* chromosomes can be distinguished based on morphology. The SAT pair, that has a submedian secondary constriction that bears the nucleolar organizer, and the "A" pair that is small. The presence of the A pair distinguishes wild diploid *Arachis* of the botanical section *Arachis* with A genome types. Silver staining allows the recognition of a further two pairs of chromosomes.

C-DAPI staining showed that the chromosomes of A type genomes have densely staining heterochromatic centromeric bands, whilst non-A (B) type genomes do not. In *A. hypogaea*, 20 chromosomes (half of the total) are of the former type, and 20 of the latter. Some of the chromosome pairs presented characteristic bands that provide further physical markers.

In the diploid species, the numbers of rDNA 45S and rDNA 5S signals were variable. However, in all varieties of *A. hypogaea* there were three pairs of sites of rDNA 45S and one pair of rDNA 5S on the B genome component; and two pairs of rDNA 45S and one pair of rDNA 5S on the A genome component.

Careful comparison of the morphology, staining and distribution of ribosomal sites in *Arachis* spp. supported the hypothesis that peanut arose by hybridization and

polyploidization of individuals with genomes similar to *A. duranensis* (A genome) and *A. ipaensis* (B genome) (9).

Mapping populations

Two mapping populations of 93 F₂ plants derived from crosses between diploid *Arachis* have been obtained so far: One derived from *A. duranensis* K7988 and *A. stenosperma* V10309. The parents are respectively, susceptible and resistant to: Brazilian and Argentinan isolates of *C. arachidicola*, *C. personatum* and to *M. javanica*, and *M. arenaria*. The second mapping population is derived from a cross of *A. ipaensis* K30076 and *A. magna* K30097. The parents are respectively, susceptible and resistant to *C. personatum*.

Marker development

Microsatellite markers

Sequencing of genomic DNA libraries of *A. hypogaea* enriched for microsatellite repeats (mostly TC, AC, GA and TTG) allowed the design of 240 primer pairs; about 166 microsatellite markers for *Arachis* are available from the literature; a further c.60 primer pairs were designed using *A. stenosperma* ESTs; and c.60 primer pairs were designed using *Arachis* sequences in Genbank that were not annotated as microsatellite containing.

RGAs

A total of 78 DNA sequences encoding nucleotide-binding regions complete between P-loop and GLPL motifs were obtained. These sequences represented 61 non-redundant protein sequences. 45 of these are of the TIR-type and 16 of the non-TIR type.

Anchor-markers

867 pairs of conserved legume sequences flanking inferred intron sites were identified. Of 50 primer pairs tested in the parents of the A genome mapping population, 25 amplified the correct product. The degree of nucleotide polymorphism between the parents was, on average, 1 SNP per 88 bp and 1 indel per 1640 bp. So far 20 anchor-markers have been developed.

Genetic Mapping

About 45% of microsatellite markers tested were polymorphic between the A genome mapping parents, di-nucleotide microsatellites having slightly higher polymorphism than tri. So far 110 microsatellite markers have been scored for this population, of these the segregation of 50% is distorted. The parents of the B genome population have lower levels of polymorphism, of the 50 microsatellite markers tested so far 11 were polymorphic. Bioassays were done on the A genome mapping population with *C. arachidicola*, segregation of resistance to susceptibility was 53:18 (2.94:1).

Complex hybrids

Twelve A genome and 6 B genome wild *Arachis* spp. with high levels of disease resistance were selected for crossing. Of the 26 crosses attempted, 17 gave sterile AB hybrids. Colchicine treatment to regain fertility was so far successful for 4 of these. To date three complex hybrids between wild *Arachis* species and peanut have been created (see Fig. 2):

A. hypogaea x (*A. hoehnei* x *A. cardenasii*)^c

A. hypogaea x (*A. aff. magna* x *A. villosa*)^c

A. hypogaea x (*A. ipaensis* x *A. duranensis*)^c

DISCUSSION

The c.80 described species of wild *Arachis* are divided into nine taxonomical accessions, based upon morphology and sexual compatibilities. This work was confined to species within the section *Arachis* that includes *A.hypogaea*.

Bioassays identified abundant sources of disease resistance in wild diploid *Arachis* to the most important fungal diseases in Latin America, the fungal leaf spots *C. arachidicola* and *C. personatum*, and the rust *Puccinia arachidis*; and to the very damaging and difficult to control root-knot nematodes (*Meloidogyne*).

Classical cytological methods underlined the substantial differences between the A and B component genomes of peanut. The use of FISH showed that the extant wild diploid species with genomes most similar to the component genomes of peanut are *A. ipaensis* and *A. duranensis*.

Because peanut is tetraploid and has very low levels of polymorphism, genetic mapping is very difficult. Therefore we decided to generate maps for the diploid A and B genomes separately. For this, we made two F₂ populations, one representing the A genome; derived from a cross of *A. duranensis* with *A. stenosperma*, the other representing the B genome from a cross of *A. ipaensis* with *A. magna*. Taking into consideration the bioassays results, the parentals were chosen to enable the placing of disease resistances on the diploid maps. Bioassays done on the A genome mapping population with *C. arachidicola* show a segregation very close to 3:1 suggesting that a single gene may determine resistance against this fungal pathogen.

For the construction of genetic maps we developed three types of marker: microsatellites, because they are highly transferable between *Arachis* species; anchor-markers, to allow comparisons of the *Arachis* and *Lotus* genomes; and RGAs because they are more likely to be linked to disease resistances.

Results so far show that the A genome population has a level of polymorphism that is very favourable for marker development, however, segregation distortion will limit the use of this cross for the study of certain regions of the genome. Therefore, further inter-specific crosses have been made to develop another A genome mapping population. In addition, a tetraploid mapping population derived from the cross *A. hypogaea* x (*A. ipaensis* KG30076 x *A. duranensis* V14167)^c is under development.

For the incorporation of wild *Arachis* genes into peanut, we used the diploid tetraploid/pathway with two-way cross (10). In this way, so far, three complex hybrids between wild *Arachis* species and peanut have been created. These hybrids incorporate new disease resistance genes through both the A and B genomes. The usefulness of their resistances was further confirmed this season in our greenhouse during a severe combined attack by *C. personatum*, *P. arachidis*. All *A. hypogaea* were severely affected, many losing almost all of their leaves, whilst all complex hybrids showed high degrees of resistance.

The *Arachis* microsatellite markers, genetic maps, and complex hybrids will be used in marker-assisted breeding programs. One of the first aims of the breeding program will be the selection for wild disease resistance genes on both the A and B genomes of peanut, we hope that this way the durability of disease resistance can be maximised. In addition we anticipate that new peanut varieties incorporating wild *Arachis* genes will have other characteristics and allelic combinations unavailable in peanut varieties developed only using lines of *A. hypogaea*.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by the European Union: INCO-DEV, Contract ICA4-CT-2001-10072 Project "ARAMAP" and by the World Bank and EMBRAPA "The Agricultural Technology Development Project for Brazil" (PRODETAB), project reference 004/01/01.

REFERENCES

- (1) BERTIOLI, D.J., LEAL-BERTIOLI, S.C.M., LION, M.B., SANTOS, V.L., PAPPAS, J.R. G., CANNON, S.B.; GUIMARÃES, P.M. *Mol. Genet. Genom.*, v.270, p.34-45. 2003.
- (2) CASTELO, A.; MARTINS, W.S.; GAI, G. *Bioinformatics*, v.18, p. 634-636. 2002
- (3) HUSSEY RS. and BARKER KR. *Plant Dis. Rep.* v. 57, p. 1025-1028. 1973.
- (4) KOCHERT G., HALWARD T. and STALKER HT. In: PICKERSGILL, B.; LOCK, J. M. (eds). *Advances in Legume Systematics 8: Legumes of Economic Importance*, Royal Botanic Gardens, Kew. p. 11-17. 1996.
- (5) MORAES, S. A.; SALGADO, C. L. *Sum. Phytopath.* v.8, p. 39-55. 1982.
- (6) NIGAM, S.N.; RAO, M. J. V.; GIBBONS, R. W. ICRISAT (Information Bulletin, 29). 1990.
- (7) PEDROSA, A.; SANDAL, N.; STOUGAARD, J.; SCHWEIZERA, D.; BACHMAIRA, A. *Genetics*, v.161, p.1661-1672. 2002.
- (8) RAFALSKI, J. A.; MORGANTE M.; POWELL W.; VOGEL, J. M.; TINGEY, S. V. In: Birren B. and Lai, E. (eds). *Analysis of Non-mammalian Genomes - A Practical Guide*, pp. 75-134. Academic Press, New York. 1996.
- (9) SEIJO, J. G, LAVIA, G. I., FERNÁNDEZ, A., KRAPOVICKAS, A., DUCASSE, D. and MOSCONE, E. A. *Am. J. of Botany* (In press).
- (10) SIMPSON CE. *Peanut science*, v.28, p.114-116. 2001.

NOVAS PRIORIDADES PARA A COLETA DE GERMOPLASMA DE ESPÉCIES DE *Arachis* NO BRASIL

Valls, J. F. M.

Bolsista PP/CNPq. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. C.P.02372, CEP 70770-900, Brasília, DF, Brasil. e-mail: valls@cenargen.embrapa.br

O histórico das expedições de coleta de germoplasma de *Arachis* foi atualizado na Monografia de Krapovickas & Gregory (1994), em capítulo de Valls & Pizarro sobre espécies forrageiras (1994) e em novo capítulo em livro-texto sobre a atividade de coleta de germoplasma (Valls *et al.*, 1995). Durante o III Encontro Latino-americano de Especialistas em *Arachis*, em 2001, tivemos oportunidade de elaborar breve sumário sobre a situação da coleta e utilização de germoplasma de espécies silvestres do gênero naquele momento (Valls, 2001). Passados pouco mais de dois anos, a demanda por novas coletas no Brasil permanece inalterada, diante das restrições impostas pela legislação, ainda em consolidação, sobre o acesso ao patrimônio genético nacional, ao que deveria considerar-se atividades oficiais e rotineiras de coleta de germoplasma, vinculadas à conservação complementar *ex situ* de amostras representativas de populações de espécies brasileiras do gênero.

Todavia, a publicação de Jarvis *et al.*, 2003, com o título “Biogeography of wild *Arachis*: Assessing conservation status and setting future priorities” trouxe à luz novas perspectivas e prioridades, pela análise acurada da distribuição natural das espécies de *Arachis* nos cinco países da América do Sul que as contém em sua flora. A partir de uma base de dados com coordenadas geográficas dos sítios de ocorrência de 2175 populações, coletadas no passado para herbários e/ou bancos de germoplasma, e a associação dessa base a uma matriz de utilização agrícola dos solos, Jarvis *et al.* (2003) prevê sérias dificuldades para a persistência das espécies de *Arachis* na natureza, definindo áreas de ocorrência potencial de novas populações de várias espécies, ainda não exaustivamente documentadas, e áreas de máxima concentração da diversidade, que demandam intensa pesquisa de campo e a busca de formas adequadas de proteção.

Um dos pontos mais críticos da elaboração do trabalho, foi a necessidade de omitir algumas espécies na análise por Sistemas de Informação Geográfica, em vista da escassa documentação de sua ocorrência. De modo geral, foi considerada insuficiente a documentação da presença em menos que dez sítios. No que toca às espécies brasileiras, *A. brevipetiolata*, *A. giacomettii*, *A. martii*, *A. microsperma*, *A. pietrarellii*, *A. praecox*, *A. valida*, *A. vallsii* e *A. villosulicarpa* enquadram-se nesta condição, o que implica aumento da demanda pela localização e documentação adequada (ao menos em herbário) de novos sítios de ocorrência de cada uma delas. Diante das pressões a que tais populações normalmente estão submetidas *in situ*, parece racional que sua localização e coleta para depósito em herbário, única forma racional e universalmente aceita de documentação científica da ocorrência de espécies vegetais, seja associada à coleta de germoplasma, garantindo sua conservação paralela *ex situ*. Em algumas situações, esta será, lamentavelmente, a única alternativa viável de preservação de representantes de populações fadadas ao desaparecimento na natureza.

As demandas anteriores, referentes a áreas ainda não percorridas no país, roteiros percorridos de forma incompleta ou aqueles extremamente problemáticos, por serem de difícil trânsito nos períodos mais adequados para a localização e coleta

das espécies, continuam a definir as prioridades, também associadas à necessidade de coleta mais ampla de entidades taxonômicas com circunscrição ainda insatisfatoriamente definida ou aquelas com circunscrição já bem definida, mas ainda inéditas, quase todas documentadas em um número muito pequeno de sítios de ocorrência. A este conjunto, deve-se acrescentar a necessidade de aumentar o número de pontos de ocorrência conhecida e documentada das espécies já descritas cujos dados foram deixados à margem no artigo de Jarvis *et al.* (2003), inclusive com vistas ao aprofundamento e busca de maior precisão nas análises hoje proporcionadas pelas novas tecnologias disponíveis para a localização geográfica e para o manejo de informações de origem múltipla.

Tendo em vista os aspectos acima, arrolam-se, a seguir, as maiores prioridades para coleta de germoplasma de espécies de *Arachis* no Brasil, considerando-as quanto à lista taxonômica, aos ecossistemas, às regiões do país e a aspectos peculiares diretamente vinculados às perspectivas de sobrevivência na natureza e possibilidades de conservação *ex situ* para disponibilidade futura.

1. Prioridades por secções e espécies

O Brasil é o único país que apresenta em sua flora representantes de todas as secções taxonômicas do gênero *Arachis*. Destas, a secção típica é compartilhada com a Bolívia (*A. magna*, *A. glandulifera*, *A. diogoi*, *A. simpsonii*), Paraguai (*A. diogoi*, *A. microsperma*), Argentina e Uruguai (*A. villosa*); a secção *Rhizomatosae* é compartilhada com o Paraguai (*A. glabrata*, *A. pseudovillosa* e uma espécie ainda não descrita), com a Argentina (*A. glabrata* e *A. burkartii*) e com o Uruguai (*A. burkartii*); *Procumbentes* é compartilhada com a Bolívia (*A. matiensis*) e o Paraguai (*A. lignosa*); *Erectoides* é compartilhada com o Paraguai (*A. major* e *A. paraguariensis*), assim como *Trirectoides* (*A. guaranítica*). As demais secções (*Extranervosae*, *Heteranthae*, *Triseminatae* e *Caulorrhizae*) são endêmicas do Brasil, se bem que as espécies de *Caulorrhizae* (*A. pintoii* e *A. repens*) podem ser encontradas, sempre sob cultivo, nos países vizinhos. O Brasil apresenta 47 espécies consideradas endêmicas, algumas das quais, no entanto (*A. appressipila*, *A. vallsii*, *A. hoehnei*, *A. kuhlmannii*, *A. valida*) por ocorrerem muito próximo à fronteira, poderiam vir a ser detectadas em países como a Bolívia, pela intensificação de coletas em áreas adjacentes com habitats similares. Seguem, com destaque para as peculiaridades, as principais prioridades de coleta de populações de cada secção taxonômica.

TRIRECTOIDES - As populações de *Arachis guaranítica* e de *A. tuberosa* estão sob forte pressão antrópica, com suas áreas preferenciais de ocorrência marcadas pelo avanço veloz dos cultivos de soja e de forrageiras do gênero *Brachiaria*. Trata-se de espécies ainda pouco representadas em bancos de germoplasma, ambas de crescimento lento e com sementes que não suportam a secagem para armazenamento. O caráter primitivo da secção recomenda sua maior disponibilidade para estudos e esforços para conservação de mais acessos, sendo necessário manter as plantas vivas em telado, de forma permanente.

ERECTOIDES - É preciso realocar-se *A. martii*, uma das raras espécies hoje sem qualquer acesso de germoplasma disponível, cujo sítio original de coleta foi engolfado pela expansão de Campo Grande, no Mato Grosso do Sul. Isto exige a continuação de sua procura em raras áreas remanescentes próximas, com vegetação pouco alterada, ou em ambientes eventualmente similares em raio mais

longo. A espécie já esteve disponível *ex situ*, mas o acesso em pauta, obtido em 1968 (Krapovickas & Gregory, 1994) não sobreviveu a longo prazo. As populações de *A. brevipetiolata* são raras, difíceis de localizar e sofrem forte pressão antrópica. A espécie é bastante primitiva, talvez mostrando sementes com comportamento semelhante às de *Trirectoides*, razão pela qual os poucos indivíduos dos raros acessos disponíveis tem sido conservados permanentemente como plantas vivas em vasos. Apesar das poucas coletas documentais, a espécie mostra uma distância de mais de 500 km entre os pontos de ocorrência mais extremos e é óbvio que sua escassa documentação deriva da dificuldade de localização a campo. Também nesta secção, é necessário recoletar-se populações de *A. cryptopotamica*, espécie cujas sementes perdem a viabilidade rapidamente e encontra-se sob forte pressão antrópica (lavouras de soja e pastagens de *Brachiaria*).

EXTRANERVOSAE - Nesta secção, *Arachis marginata* é uma das espécies de conservação por sementes mais problemática, mostra crescimento lento e sua área de ocorrência vem sendo tomada pela agricultura mecanizada. Novas coletas permitiriam sua inclusão em coleções *in vitro*, aproveitando a disponibilidade de vários protocolos já desenvolvidos para as espécies da secção (Gagliardi *et al.*, 2000, 2002).

PROCUMBENTES - Plantas de *Arachis subcoriacea* se mostram muito variáveis entre sítios distintos e até em um mesmo sítio. O entendimento dessa variação só será possível a partir de novas coletas, que amostram adequadamente as formas variantes. O ponto mais setentrional de ocorrência documentada de *A. lignosa*, hoje estabelecido pouco ao norte de Porto Murtinho, no Mato Grosso do Sul, poderá estar ainda mais ao norte, diante da continuidade da faixa estreita de vegetação pantaneira em que vegeta, dominada pela palmeira carandá. Todavia, as dificuldades de locomoção na área só permitiram, até o momento, a documentação de uma população brasileira.

HETERANTHAE - A compreensão da ampla variação morfológica mostrada por *A. pusilla* depende de mais coletas. Com base na informação atualmente disponível, a porção mais setentrional de sua área de ocorrência mostra plantas com eixo central curto e ramos longos e a porção meridional as mostra desta forma ou com eixos longos e ramos curtos. Também há variação entre populações e mesmo entre indivíduos de uma mesma população, na distribuição da pilosidade e das cerdas do hipófilo. A secção também inclui duas espécies inéditas, cada uma até hoje restrita a uma única população e, por isto, inadequadas para análises por Sistemas de Informação Geográfica. Por sua vez, *A. dardani* mostra algumas populações no nordeste de Goiás, com ocorrência claramente disjunta de sua área típica na caatinga nordestina. No entanto, a zona intermediária não tem sido pesquisada e poderia constatar-se a continuidade de ocorrência, com novas coletas.

TRISEMINATAE - As populações já conhecidas de *A. triseminata* mostram formas extremas, com diferenças de mais de dez vezes nas dimensões de suas folhas e frutos. O conhecimento incipiente deste grupo isolado, mas com grande potencial econômico para a produção de forragem de alta qualidade no semi-árido, demanda maiores estudos, a partir de coletas que permitam compreender a amplitude de variação entre os indivíduos de cada população e entre populações. Não se descarta a possibilidade de ocorrência de mais de uma espécie na secção.

CAULORRHIZAE - Intensos estudos genéticos (Bertozo & Valls, 2001; Gimenes *et al.*, 2000) ainda não evidenciaram redundância entre acessos desta

secção coletados na natureza, apesar de seu número elevado, acima de 150. O potencial de uso econômico de *A. pintoi*, para fins forrageiros, ornamentais, ou para a conservação de solos (Kerridge & Hardy, 1994; Veiga *et al.*, 2003) demanda exploração mais ampla da variabilidade da secção. Neste contexto, seria interessante explorar mais sítios de *A. pintoi* em locais com sérias restrições hídricas, como na área de Correntina, na Bahia, à divisa com Minas Gerais, em que foram coletadas populações extremamente prolíferas e de crescimento muito rápido em condições de telado.

RHIZOMATOSAE - A compreensão do(s) sistema(s) reprodutivos de *A. glabrata*, espécie de grande importância forrageira e muito variável (Nobile *et al.*, 2004), bem como das demais espécies da secção depende de novas coletas, que permitam análises populacionais, incluindo a intensificação de busca de sementes nos raros locais em que elas são produzidas, de forma a possibilitar estudos de progênes.

ARACHIS - A afinidade genética ao amendoim requer aprofundamento no conhecimento das espécies da secção, o que requer novas coletas. O grupo de espécies com $2n=18$ ainda não tem os limites da área de ocorrência confirmados. Além disto, é provável a ocorrência de *A. stenosperma* entre os locais de ocorrência já documentados do Centro-oeste e Litoral Atlântico. As relações fitogeográficas das espécies anuais brasileiras sem o par "A" com as da Bolívia precisa ser melhor estabelecida. Até há poucos anos, *A. magna* e *A. glandulifera* eram consideradas espécies exclusivas da Bolívia. No entanto, ambas foram encontradas no Brasil (Valls, 2001). Da mesma forma, acredita-se que espécies como *A. hoehnei* e *A. kuhlmannii* possam ser encontradas na Bolívia, em ambientes semelhantes àqueles em que ocorrem, a pequena distância da fronteira, no Brasil.

2. Prioridades por ecossistemas

Embora a maior parte das espécies brasileiras de *Arachis* ocorra nos Cerrado, a crescente malha viária do Centro-oeste do país tem permitido razoável acesso às áreas planejadas para coleta. Por sua vez, o Pantanal e a Caatinga merecem pesquisa mais intensa. Há grandes áreas do Pantanal sem cobertura e espécies que vegetam em seu interior, como *A. diogoi*, precisariam ter representantes da área total de ocorrência herborizados e com germoplasma disponível. A variação evidenciada por *A. hoehnei* ainda não está bem compreendida e a interpretação da variação de *A. kuhlmannii* exige maiores estudos populacionais, com amostragem mais adequada em toda sua área de ocorrência, que inclui sítios pantaneiros nos Estados do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. A situação de *A. pusilla* é semelhante à de *A. hoehnei* e requer coletas em mais fisionomias distintas da Caatinga.

3. Prioridades por áreas geográficas

NORTE - Pouco tem-se coletado na região, à exceção do Estado do Tocantins. Há indícios de grande variação em tipos locais de *A. hypogaea* e a possibilidade de *A. benensis* alcançar o Estado de Rondônia. Uma espécie coletada em Marajó está tentativamente identificada como *A. dardani* na Monografia (Krapovickas & Gregory, 1994), mas pode ser distinta, e talvez ocorram outras espécies naquela ilha. Uma espécie da secção *Arachis*, muito cultivada para gramados em Belém, no Pará, parece distinta de *A. helodes*, à qual havia sido

inicialmente associada, diferindo pelo aspecto de suas estípulas, que mais lembram as de *A. kempff-mercadoi*. Sua origem ainda é desconhecida. Material de *A. burchelli* recebido de Gorotire, no Pará, mostra que a espécie se estende bastante ao norte dos locais mais setentrionais de seu resgate com germoplasma naquele Estado.

NORDESTE - O restrito período de localização das espécies anuais da região recomenda mais coletas, com ênfase na busca de populações adicionais da nova espécie só conhecida de Acari, Rio Grande do Norte, bem como das formas variantes de *A. pusilla*. A investigação em áreas próximas a jazidas arqueológicas, bem como dos próprios vestígios eventualmente disponíveis sem identificação em museus (Valls, 1996) poderá trazer evidências adicionais do uso das espécies silvestres de *Arachis* pelo homem primitivo da região.

CENTRO-OESTE - Mesmo sendo a região percorrida com maior frequência pelos coletores de *Arachis*, ainda há grandes lacunas, em que a intensificação da pesquisa tem demonstrado a ocorrência de novas espécies e de mais populações de espécies conhecidas. A rapidez da devastação dos ambientes naturais determina a necessidade de coletas para resgate de materiais que não sobreviverão na natureza, principalmente pelo uso cada vez mais generalizado de herbicidas em lavouras de soja e em pastagens cultivadas de espécies de *Brachiaria*.

SUDESTE - A área de ocorrência de *A. stenosperma* ainda não está bem definida e novas populações tem sido localizadas, mesmo na área urbana de São Paulo. Coletas centenárias no Rio de Janeiro (Krapovickas & Gregory, 1994) não foram repetidas nos períodos de mais intensa busca de germoplasma, certamente em vista da total alteração dos ambientes citados, como Botafogo, mas isto não exclui a possibilidade de persistência da espécie naquela cidade e daí para o sul, até São Sebastião, em São Paulo, de onde provém o germoplasma disponível de origem mais próxima. Uma coleta em local intermediário, em Ubatuba, São Paulo, realizada apenas para herbário, em 1987 (Krapovickas & Gregory, 1994) demanda sua realocação, para conservação paralela *ex situ*, em vista da rapidez do desenvolvimento imobiliário nas cidades da orla marítima. Também há grande interesse na prospecção de populações da espécie ao longo do traçado documentado do antigo caminho Peabirú, bem como na análise de vestígios arqueológicos da área. Finalmente, o Norte de Minas Gerais deve conter populações adicionais de uma espécie nova da seção *Heteranthae*, até hoje unicamente coletada na localidade de Gado Bravo, no Município de Monte Azul.

4. Prioridades pela situação de conservação

A velocidade de perturbação de muitos ecossistemas brasileiros, a dificuldade de conservação de algumas espécies por sementes, os poucos locais conhecidos de ocorrência de várias delas e o potencial de adoção de muitas delas como novas alternativas agrícolas, ou como fornecedoras de genes úteis para melhoramento do amendoim, exigem a implementação de processos complementares, desde sua preservação *in situ* e sua conservação *ex situ*, por sementes ou em condição vegetativa, até o uso das técnicas avançadas *in vitro*. O desenvolvimento de cada um desses processos exige a coleta documental e a disponibilização de germoplasma para o próprio estabelecimento dos protocolos. Nesta situação, as espécies brasileiras já descritas de *Arachis*, com maior prioridade de coleta são: *A. guaranítica*, *A. tuberosa*, *A. martii*, *A. brevipedunculata*, *A. gracilis*, *A. stenophylla*, *A. setinervosa*, *A. marginata*, *A. pietrarellii*, *A. villosulicarpa*, *A. subcoriacea*, *A. lignosa*,

A. vallsii, *A. giacomettii*, *A. triseminata*, *A. pseudovillosa*, *A. glandulifera*, *A. praecox*, *A. microsperma* e *A. villosa*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERTOZO, M.R.; VALLS, J.F.M. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.48, p.121-130, 2001.
- GAGLIARDI, R.F.; COCULILO, S.P.; PACHECO, G.P.; VALLS, J.F.M.; MANSUR, E. **Biodiversity and Conservation**, v.9, p.943-951, 2000.
- GAGLIARDI, R.F.; PACHECO, G.P.; VALLS, J.F.M.; MANSUR, E. **Biologia Plantarum**, Praha, v.45, n.3, p.353-357, 2002.
- GIMENES, M.A.; LOPES, C.R.; GALGARO, M.L.; VALLS, J.F.M.; KOCHERT, G. **Euphytica**, v.116, p.187-195, 2000.
- JARVIS, A.; FERGUSON, M.E.; WILLIAMS, D.E.; GUARINO, L.; JONES, P.G.; STALKER, H.T.; VALLS, J.F.M.; PITTMAN, R.N.; SIMPSON, C.E.; BRAMEL, P. **Crop Science**, v.43, p.1100-1108, 2003.
- KERRIDGE, P.C.; HARDY, B. (ed.) **Biology and Agronomy of Forage Arachis**. 1994.
- KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, W. C. **Bonplandia**, v.8, p.1-186, 1994.
- NÓBILE, P. M.; GIMENES, M. A.; VALLS, J. F. M.; LOPES, C. R. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.51, n.3, p.299-307, 2004
- VALLS, J.F.M. **Coleção Arqueologia**, nº 1, v.2, p.265-280, 1996.
- VALLS, J. F. M. In: SIRGEALC, 3, 2001. **Anais ...** p.105-108.
- VALLS, J.F.M.; PIZARRO, E.A. In: **Biology and Agronomy of Forage Arachis**. Chapter 2, p.19-27, 1994.
- VALLS, J.F.M.; SIMPSON, C.E.; RAO, V.R. In: **Collecting Plant Genetic Diversity. Technical Guidelines**. Chapter 35, p.677-684, 1995.
- VEIGA, R.F.A.; VALLS, J.F.M.; TOMBOLATO, A.F.C.; BARBOSA, W; PIRES, E.G. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.9, n.1, p.7-15, 2003.

CONSIDERACIONES SOBRE EL ORIGEN DEL MANÍ

Krapovickas, A.

IBONE, .C.Correo 209, 3200 Corrientes, Argentina

Nuevas evidencias cromosómicas demuestran que las especies que aportaron los dos genomas de *Arachis hypogaea* L. son *A. duranensis* Krapov. & W.C-Gregory y *A. ipaensis* Krapov. & W.C.Gregory . Por ello consideramos de interés analizar la situación geográfica del área donde conviven ambas especies silvestres, las condiciones del clima y las poblaciones indígenas que allí habitaron.

Hay evidencias de que los indígenas han utilizado especies silvestres para la alimentación y sometido a transportes a gran distancia. Por ejemplo, en el nordeste de Brasil, al maní cultivado se lo llama únicamente "amendoim", palabra derivada de "amendoa". A las especies silvestres el campesino las llama "amendoim" o "mundubí do caracará" o "do porco", siendo "mundubí" palabra antigua de origen guaraní.

Nosotros encontramos nuestra primera población de *A. monticola* en Yala, Jujuy, gracias a unos niños que la conocían y que desenterraban sus frutos para comerlos.

En la costa del Pacífico en Perú, se halló junto con cáscaras de *A. hypogaea* arqueológicas. una caja uniseminada con cáscara lisa y tamaño correspondiente al de especies silvestres, de las cuales las más cercanas crecen del otro lado de la Cordillera de los Andes a más de 1.000 km de distancia en línea recta.

Arachis stenosperma Krapov. & W.C.Gregory crece en Mato Grosso y en la costa atlántica entre Rio de Janeiro y Paraná a unos 1.000 km, distancia sólo explicable por el transporte humano.

Arachis duranensis y *A. ipaensis* conviven en las cercanías de Villa Montes, en el SE de Bolivia, donde el río Pilcomayo después de cruzar la cordillera se transforma en río de llanura. El clima es árido y las temperaturas de verano muy altas. suelen pasar los 50°. Es el límite occidental de la vegetación chaqueña. rica en recursos alimenticios como algarrobos, chañar, mistol, cactáceas, etc.

Arachis ipaensis se la conoce de una sola localidad, en el albardón del arroyo Ipa, afluente del río Pilcomayo.

Arachis duranensis tiene mayor área. se extiende desde Villa Montes hacia el sur hasta las provincias de Salta y Jujuy en Argentina, desde los 250 hasta 1.250 m de altura.

En las proximidades de estas áreas vive *A. monticola* Krapov. & Rigoni, en las proximidades de las ciudades de Salta y Jujuy, entre 1.250 y 1.565 m de altura

Los conquistadores españoles llamaron "valle del maní" a la quebrada de Tumbaya, en la entrada de la quebrada de Humahuaca, a 2094 m de altura, en el límite altitudinal de los cultivos actuales del maní-

Existen restos arqueológicos de maní encontrados en yacimientos de Jujuy, Salta, Catamarca y San Juan, todos pertenecientes al período agro-alfarero, posteriores a 600 años aC y a alturas superiores a los 2.000 metros, posiblemente transportados por los indígenas durante sus viajes.

En el área en que conviven los ancestros de *A. hypogaea* , en el sur de Bolivia, se encuentra un centro de variación muy importante del maní, donde se cultivan aún razas con caracteres primitivos.

En esta misma área viven también los ancestros del tabaco, *Nicotiana tabacum*: *N. sylvestris* (500-2.500 m), *N. otophora* (500-2.500 m) y no muy lejos *N. tomentosiformis* (1.200-1.800 m).

En esta región crecen parientes silvestres de cultígenos como *Phaseolus aborigineus* (1.000-2.000 m) de *Ph. vulgaris* o poroto, *Chenopodium hircinum* (0-500 m) de *Ch. quinoa* o quinoa, *Amaranthus quitensis* (0-1.000 m) de *A. caudatus* y *Capsicum baccatum* (0-1.500 m) de *C. pendulum* o ají.

Más al sur, pero también en las zonas bajas, vive *Cucurbita andreana* (0-500 m), pariente silvestre del zapallo criollo, *C. maxima*.

En la costa de Perú, donde las condiciones del clima son excepcionales para la conservación de restos vegetales, aparecen restos de maní desde unos 1.800 años antes de Cristo en adelante. Es decir hace cerca de 4.000 años que el cultígeno maní ya ha sido diferenciado de sus parientes silvestres.

La creación de un cultígeno no es un acontecimiento, sino más bien el producto de un largo proceso en el cual es imprescindible el cultivo y el mejoramiento genético por selección. El maní se adapta al cultivo, el clavo se hace tenaz, el istmo desaparece lo que facilita la cosecha y los frutos y las semillas son mayores por la presión de selección dirigida a aumentar la producción. Este proceso debe haberse iniciado muchísimo antes que los registros arqueológicos más antiguos

Sobre los pobladores del área en tiempos precolombinos e inmediatos a la llegada del hombre blanco, se tiene alguna información.

Los habitantes indígenas en la actualidad son: Mataco-Wichi, Toba, Chorote o Xorote, Chulupi, Nivakle o Ashushlay, Tapieté (prob. Mataco chiriguanizados), Chané (Arawak chiriguanizados) y Chiriguanos (Guaraníes)

Los Chané y los Chiriguanos parecen llegados poco antes de la Conquista. Los Chiriguanos-guaraní llegaron a esta región en tiempos históricos y sojuzgaron a los Chané -arawak, quienes al parecer arribaron hacia finales del primer milenio después de Cristo. Ambas etnias son agricultoras y ceramistas.

La base económica de los Mataco, Toba, Chorote y Ashushlay está en la pesca, la caza. el consumo de frutos silvestres (algarroba, tusca, tasi, chañar y mistol) y de miel y agricultura muy rudimentaria que contribuye en pequeña porción a la dieta. Tienen dos clases de cultivos, uno en las playas después de las crecientes de los ríos generalmente no pasan de una hectárea y el otro en los interfluvios, con parcelas muy pequeñas, no pasan de media hectárea y muchas veces de aproximadamente 4 x4 m.

Ninguna de estas etnias tiene nombre propio para el maní.

En las proximidades se desarrolló la cultura del río San Francisco, en ambientes similares a los de algunas poblaciones de *A. duranensis* y que se habría iniciado entre 1400 y 800 aC y con extensiones que llegarían a 300 dC. Era una cultura agro-alfarera muy temprana y rica en pipas de fumar,.

Los domesticadores del maní fueron anteriores a todas estas etnias. Los indígenas que lograron la domesticación de los primeros cultígenos debían ser primariamente cazadores-recolectores agrupados en bandas. Su actividad itinerante, con asentamientos temporarios, les permitió adquirir un conocimiento y un dominio remarcable de los recursos alimenticios de su territorio. La adopción de las técnicas de cultivo debió ser paulatina, dirigida a mejorar su sustento. Con el palo recolector transformado en sembrador o plantador comienza a modificar el ambiente produciendo un nuevo agroecosistema que permite expandir sus cultivos fuera del

área natural de las especies útiles.

Es así que se posibilita un nuevo tipo de evolución alterando las condiciones para mantener las frecuencias génicas en poblaciones muy grandes y panmícticas (ley de Hardy-Weinberg).

Los cultivos primitivos eran pequeños, se reduce el tamaño de la población y se permite la acción de la deriva genética.

La vida errante de los cazadores-recolectores posibilita la migración.

El cultivador ejerce selección voluntaria en busca de mayor rendimiento y tamaño del fruto y otra involuntaria que aumenta la tenacidad del clavo y elimina del istmo que separa las cajas en todas las especies silvestres de *Arachis*.

VARIABILIDADE DE *Arachis hypogaea* EM ALDEIAS INDÍGENAS BRASILEIRAS

Freitas, F.O. & Moretzsohn M. C.

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – PqEB – Parque Estação Biológica W5 Norte Final.,
Caixa Postal 02372, 70770-900, Brasília – DF, Brasil.

Introdução

A região que se estende do sudoeste do estado do Mato Grosso do Sul ao sul de Goiás, no Brasil, é a provável área de origem do gênero *Arachis*, o qual possui ao redor de 80 espécies, distribuídas em 9 seções distintas (Valls, 2000).

O amendoim comum - *A. hypogaea* - é uma das espécies americanas domesticadas pelo homem, há mais de 5000 anos, o qual selecionou e difundiu esta planta por amplas regiões das Américas e, posteriormente, pelo mundo.

O amendoim cultivado é uma planta alotetraploide ($2n = 4x = 40$ cromossomos), formada por dois genomas distintos, AA e BB. Acredita-se que se tenha originado da união de gametas de duas espécies diplóides distintas, cada uma com $2n = 20$ cromossomos, sendo uma possuidora de genoma AA e outra, de BB. Esse processo foi seguido pela duplicação do número de cromossomos, que restaurou a fertilidade do híbrido, formando assim a nova espécie tetraplóide, que o homem ajudou a moldar, por seleção de mutantes mais adaptados aos distintos ambientes para onde a levava.

O local exato onde esta espécie se originou e quais foram suas espécies parentais diplóides, ou seja, que deram origem à primeira planta de amendoim, é ainda uma questão controversa. Além disso, ainda existem dúvidas se houve um único evento de domesticação ou se a hibridização de diplóides seguida da duplicação e seleção teria ocorrido mais de uma vez, em diferentes localidades e momentos históricos.

O amendoim cultivado é dividido, atualmente, em duas subespécies e seis variedades, segundo Krapovickas & Gregory (1994), mas estes mesmos autores não descartam a possibilidade de participação de mais de duas espécies diplóides na origem do amendoim, levando em consideração as diferenças existentes no tipo de cromossomos SAT entre as subespécies *hypogaea* e *fastigiata*. Este fato fica mais evidente por um conjunto de acessos de germoplasma coletado no Parque Indígena do Xingu e arredores, o qual escapa, morfológicamente, ao âmbito de variação já descrito. Neste trabalho apresentaremos os resultados da análise genética de amostras de amendoins cultivados pelos índios Kayabi, do Parque Indígena do Xingu.

O conhecimento da variabilidade genética existente nesses acessos é essencial para seu eficiente uso em programas de melhoramento, para estudos de filogenia e para a conservação de germoplasma. Marcadores microssatélites ou SSR (“Simple Sequence Repeats”) constituem a ferramenta ideal para estes estudos, por serem multialélicos, codominantes e baseados em PCR.

Objetivo

O objetivo deste estudo foi a análise da variabilidade genética de variedades de amendoim coletadas em duas aldeias Kayabi, do Parque Indígena do Xingu, por meio de marcadores microssatélites.

Materiais e Métodos

Amostras utilizadas: Foram utilizados acessos de germoplasma de amendoim existentes no Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), representantes da máxima variação já conhecida e que incluem acessos das seis variedades de amendoim descritas, além de um acesso coletado no passado no Parque Indígena do Xingu e arredores, totalizando 12 acessos.

Foram incluídas, ainda, 30 amostras de etnovariedades obtidas nas aldeias Guarujá e Ilha Grande, ambas pertencentes à tribo indígena Kayabi, situadas no Parque Indígena do Xingu, estado do Mato Grosso, Brasil.

Finalmente, cinco acessos de cinco espécies de *Arachis* silvestre foram incluídos nas análises.

Extração de DNA e PCR dos locos SSR: Folhas jovens de cada uma das amostras foram submetidas à extração usando o protocolo descrito por Ferreira & Grattapaglia (1998). As PCRs foram realizadas em volumes de 13- μ l, contendo tampão de PCR 1X, 0,2 mM de cada dNTP, 1 unidade de *Taq* DNA polimerase, DMSO 50% (1,3 μ l), 5 pmol de cada primer e 10 ng de DNA genômico. As amplificações foram realizadas com as seguintes condições: 96°C por 2 min (1 ciclo), 94°C por 1 min, 55-66°C por 1 min, 72°C por 1 min (30 ciclos); e 72°C por 7 min (1 ciclo). As temperaturas de anelamento variaram para cada primer. Os fragmentos amplificados foram visualizados em géis de poliacrilamida a 4%, corados com nitrato de prata (Creste *et al.*, 2001).

Análise dos dados: Um total de 13 (treze) locos SSR previamente conhecidos foram utilizados para análise da variabilidade genética. As similaridades genéticas entre os 47 acessos foram determinadas através da análise da presença ou ausência de bandas em cada um dos acessos, usando-se o coeficiente de Dice (1945). Um dendrograma foi construído, em seguida, pelo método UPGMA ("unweighted pair-group method analysis"). Estas análises foram realizadas usando-se o programa NTSYS 2.0 (Rohlf, 1993).

Resultados e Discussão

O Parque Indígena do Xingu, situado na região Norte-Nordeste do estado do Mato Grosso, foi oficialmente criado no dia 14 de abril de 1961, através do Decreto 50.455, durante o efêmero governo do presidente Jânio Quadros, após mais de 10 anos de trabalho intenso dos irmãos Villas Boas, do Marechal Rondon, de Darcy Ribeiro, Noel Nutels, Café Filho dentre outros, possuindo uma área de cerca de 30.000 km² (Novaes, 1985).

Em termos florísticos, o Parque se encontra em uma zona de transição entre os biomas Cerrado, ao sul, e a Floresta Amazônica, ao norte. Os rios Kuluene,

Ronuro e Batoví se encontram dentro do Parque para formar o rio Xingu, cujo destino final é o rio Amazonas.

A região foi primeiramente visitada e documentada em 1884, por Karl von den Steinen, que descreveu diversas tribos da área, e que, ainda hoje permanecem ali, como os Kamaiurá, Suiá, Yawalapití, Waurá, registrando a sua localização geográfica e os seus costumes (Steinen, 1942).

Atualmente, vivem no Parque mais de 4.000 índios de 14 etnias distintas, pertencentes a seis troncos lingüísticos, demonstrando a grande diversidade cultural ali encontrada, algumas delas moradoras antigas do local, como os Yawalapiti e Waurá. Outras etnias foram remanejadas para o parque após sua criação oficial, em virtude dos conflitos de terra com fazendeiros, como é o caso dos Kayabi (Villas Boas, 1976; Ferreira, 1994).

Culturalmente, os Kayabi pertencem ao tronco lingüístico Tupi. Eles migraram nas três últimas décadas para o presente local, vindo da região Noroeste do estado do Mato Grosso e Sudoeste do estado do Pará, junto aos rios Teles Pires e rio dos Peixes. No Parque Indígena do Xingu, esta etnia formou diversas aldeias, possuindo atualmente 14 aldeias no Parque. Algumas famílias desta etnia não migraram, permanecendo ainda hoje na região do rio Teles Pires e rio dos Peixes. A etnia Kayabi possui grande tradição no cultivo de amendoim, sendo esta a planta cultivada de maior importância, tanto na cultura, como na dieta deste povo, refletindo no grande número de variedades existentes sob manejo dessas populações.

As relações genéticas entre os 47 acessos foram estimadas por presença ou ausência de fragmentos, amplificados pelos 13 pares de primers. Considerando apenas os acessos de *A. hypogaea*, um índice de similaridade de Dice médio igual a 0,647 foi obtido para os 42 acessos. Apenas um par de acessos não pôde ser diferenciado por estes 13 primers, o que mostra a utilidade dos marcadores microssatélites para a caracterização de acessos de amendoim.

Um dendrograma, baseado nos índices de similaridade de Dice, foi construído para os 47 acessos (Figura 1). Considerando apenas os acessos coletados no Xingu, três grupos principais tornaram-se evidentes. O grupo superior (Grupo I) foi constituído por 11 acessos coletados no Xingu, além dos dois acessos da subespécie *fastigiata/peruviana* e um dos acessos de *fastigiata/aequatoriana* incluídos nesta análise. O Grupo II foi formado por sete acessos do Xingu, o único acesso de *hypogaea/hirsuta* e um dos acessos de *hypogaea/hypogaea* do tipo Guaicuru. Os demais 12 acessos do Xingu, inclusive o acesso coletado anteriormente (identificado na Figura 1 por Xingu) formaram o Grupo III. Além disso, o acesso número 20 formou um pequeno grupo com o acesso de *A. monticola* e um dos acessos de *hypogaea/hypogaea*.

Os acessos de *fastigiata/fastigiata* e de *fastigiata/vulgaris* formaram um grupo diferenciado. Finalmente, os acessos das espécies diplóides de *Arachis* formaram um outro grupo, sendo que *A. duranensis* (genoma AA) e *A. ipaënsis* (genoma BB), considerados os possíveis ancestrais do amendoim apresentaram uma maior similaridade genética com os acessos de *A. hypogaea* do que as outras duas espécies diplóides incluídas na análise.

Foram formados grupos de similaridade, para os acessos do Xingu, geneticamente distantes uns dos outros. Estes grupos são relacionados a aspectos morfológicos, tais como forma das vagens, cor do tegumento das sementes, entre outros. O estabelecimento de grupos de similaridade, junto à caracterização morfológica e agrônômica, será de grande utilidade na seleção e cruzamento de

plantas superiores, possibilitando um uso mais eficiente da variabilidade genética disponível para o melhoramento.

O Xingu apresenta-se como importante centro de diversidade para o amendoim. Sem esquecer que parte desta diversidade veio migrada da parte oeste do Mato Grosso, quando da mudança dos Kayabi. A região de vivência desta etnia encontra-se historicamente na borda sul Amazônica, região onde especialistas consideram como tendo sido uma área de domesticação de diversas espécies, entre elas a mandioca.

De modo geral, o gráfico mostra uma expansão da diversidade conhecida para o amendoim, sugerindo inclusive a possibilidade de ter ocorrido no passado mais de um evento de domesticação. As análises levantam dúvidas quanto à classificação da variedade *peruviana* dentro da subespécie *fastigiata*, em razão da baixíssima similaridade genética observada entre os dois acessos desta variedade e os demais acessos das variedades *fastigiata/fastigiata* e *fastigiata/vulgaris*. Os dois acessos de *fastigiata/aequatoriana* não agruparam de forma coerente e precisam ser analisados mais detalhadamente. Nota-se ainda que as duas aldeias não apenas manejam uma diversidade muito distinta da até então conhecida, como também trabalham com uma ampla diversidade genética entre as variedades, o que demonstra que esta etnia utiliza esta espécie há muito tempo, mantendo e ampliando a diversidade genética de seus cultivos tradicionais.

A possibilidade de tal amendoim ter-se originado de outro par de espécies diplóides precisa ser investigada, já que a confirmação de origem polifilética do cultivo pode beneficiar todas as linhas de pesquisa voltadas ao melhoramento genético do amendoim.

Por fim, nota-se que esta etnia possui um material de suma importância e que deve ser preservado, assim como assegurar a este povo sua manutenção cultural e benefícios de qualquer uso futuro que se faça deste material milenarmente trabalhado e preservado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CRESTE, S. *Plant Mol. Biol. Rep.*, v.19, p.299-306, 2001.
- DICE, L.R. *Ecology*, v.26, p.297-302, 1945. 1945.
- FERREIRA, M.K.L. 1994. **Histórias Do Xingu**. Nhii/USP, Ed. Fapesp. São Paulo, 1994.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998.
- KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, W.C. *Bonplandia* v.8, p.1-186, 1994.
- NOVAES, W. **Xingu – uma flecha no coração**. Editora Brasiliense S.A. São Paulo, 1985.
- ROHLF, F.J. **NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate System**. Version 2.0. New York: Applied Biostatistics Inc., 1993.
- STEINEN, K. **O Brasil Central: expedição em 1884 para a exploração do rio Xingu**. Tradução. São Paulo: Campanha Editora nacional (Brasiliense, série extra, 3), 1942.
- VALLS, J.F.M. Diversidade genética no gênero *Arachis* e a origem do amendoim. In: BANDEL, G. et al (eds.) Encontro Sobre Temas De Genética e Melhoramento, 17, 2000.
- VILAS BOAS, O.; VILAS BOAS, C. **Xingu – os índios, seus mitos**. ZAHAR editores. Rio de Janeiro, 1976.

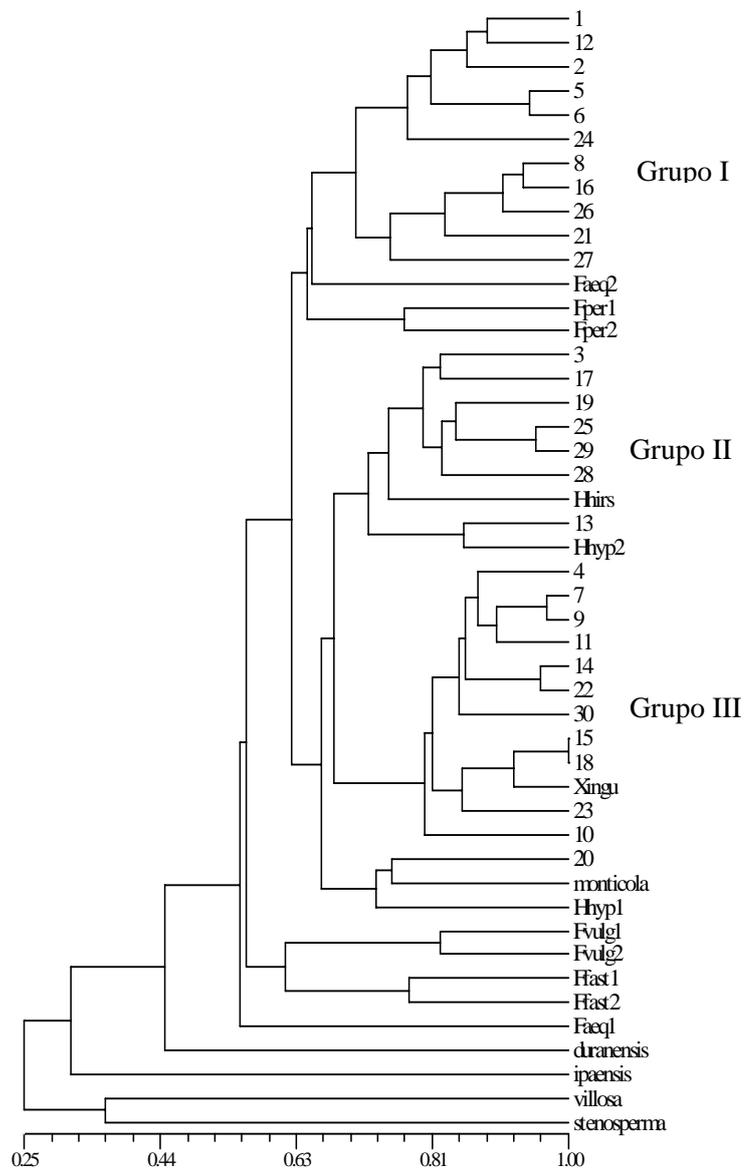


Figura 1. Dendrograma, obtido pelo método UPGMA, para 47 acessos de *Arachis* spp. Os números de 1 a 30 são as amostras indígenas; enquanto as outras siglas referem-se às seis variedades de *Arachis hypogaea* (Ffast–*fastigiata/fastigiata*; Fvulg–*fastigiata/vulgaris*; Fper–*fastigiata/peruviana*; Faeq–*fastigiata/aequatoriana*; Hhyp–*hypogaea/hypogaea* e Hhirs–*hypogaea/hirsuta*). Xingu identifica o acesso de *A. hypogaea* coletado anteriormente.

AVANÇOS DA CITOGENÉTICA DO GÊNERO *Arachis* NO BRASIL

Peñaloza, A. P. S.

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB. Av. W5 Norte (final), CP. 02372, CEP: 70770-900, Brasília-DF. E-mail: andrea@cenargen.embrapa.br

INTRODUÇÃO

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.), embora originário da América do Sul, é uma importante fonte de proteínas para as populações de diversos países em desenvolvimento. Além desta espécie cultivada, outras 80 espécies silvestres, todas exclusivas da América do Sul, são conhecidas para o gênero (Valls & Simpson, 1997). A maioria das espécies do gênero é diplóide com $2n=20$ cromossomos, havendo quatro espécies diplóides com $2n=18$ e apenas cinco espécies tetraplóides, incluindo o amendoim. As informações obtidas pela análise citogenética das espécies de *Arachis* sempre tiveram uma grande importância para a compreensão das relações intrespecíficas, apesar causar surpresa, como no caso dos diplóides com $2n=18$, identificados a menos de uma década, e de ainda não ter permitido, com precisão, indicar os possíveis ancestrais diplóides que contribuíram na formação do alotetraplóide cultivado *A. hypogaea*. A maior parte desse germoplasma, disponível no Banco Ativo de Germoplasma de *Arachis*, na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, e representa uma importante fonte de diversidade genética e potencial para uso na alimentação humana e animal, em cobertura verde, para forração e para contenção de erosões, além de uso paisagístico. Nos últimos anos, a caracterização citogenética de acessos de germoplasma e de híbridos intra e interespecíficos vêm, respaldando estudos taxonômicos no gênero, proporcionando um melhor entendimento das relações entre as espécies silvestres, esclarecendo identificações inicialmente incorretas, onde a caracterização morfológica, por si só, não tem se mostrado suficiente, além de dar suporte a programa de pré-melhoramento do amendoim. O objetivo deste trabalho foi complementar a análise citogenética do gênero, abrangendo espécies novas e espécies já descritas, mas ainda não analisadas quanto a aspectos cromossômicos; identificar possíveis diferenças cromossômicas entre as espécies da seção *Arachis* com $2n=18$ cromossomos; determinar o padrão de distribuição de bandas CMA/DAPI em variedades botânicas do amendoim e em espécies da seção *Arachis*, associadas a sua origem; além da caracterização das diferentes variedades botânicas do amendoim e de espécies silvestres, através de técnicas de citogenética molecular.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho consistiu na análise citogenética de acessos de germoplasma de *Arachis*, incluindo 20 espécies das seções *Caulorrhizae*, *Extranervosae*, *Procumbentes*, *Erectoides*, *Rhizomatosae*, *Heteranthae* e *Arachis*, fornecido pelo Banco Ativo de Germoplasma de *Arachis* spp., localizado na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília, DF, Brasil.

Para a determinação do número cromossômico em células de meristema radicular, as raízes foram coletadas e pré-tratadas em α -bromonaftaleno por 2 ½ horas, à temperatura ambiente. Posteriormente, foram fixadas em solução Carnoy (etanol absoluto: ácido acético glacial, 3:1, v/v) por 24 horas, à temperatura

ambiente. A hidrólise foi realizada em HCl 5N por 20 minutos, à temperatura ambiente. As raízes foram então coradas em solução Schiff e o tecido meristemático, macerado em carmim acético 2%. Alguns acessos foram analisados quanto ao padrão de distribuição de bandas CMA/DAPI, segundo o protocolo descrito por Guerra & Souza (2002) e quanto a distribuição dos sítios de rDNA 45S (pTA 71 de *T. aestivum* L.) e 5S (*P. edulis* Sims), com as mesmas sondas e protocolo descrito por Carvalho & Guerra (2001). As melhores células obtidas por coloração convencional foram fotografadas em filme PB Ilford Pan F Plus ASA 50, ou tiveram sua imagem capturada em microscópio Axiophot, da Carl Zeiss, através do programa Kontron KS 300. As melhores células obtidas por marcação com os fluorocromos CMA/DAPI e por FISH foram fotografadas com filme Kodak Gold ASA 400.

Resultados e discussão

Secção *Caulorrhizae*

Com o grande número de cultivares de *A. pintoi* lançadas nos últimos 15 anos e com a crescente demanda de mercado para esta leguminosa forrageira, tornou-se imprescindível o estudo citogenético de plantas das principais cultivares comerciais. Foi iniciado, na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, um estudo citogenético mais detalhado deste material. Para tanto 12 acessos de germoplasma (Vi 301, V 7394, V 6727, V 6741, V 6791-wf, W34, W902, W903, W647, W207, W220, V13861 e Np s/nº) e quatro cultivares (Amarillo, MG100, Alqueire e Porvenir) foram analisadas quanto ao número cromossômico. Para todos foram observados $2n=20$ cromossomos, conforme o esperado.

Secção *Extranervosae*

Análise mais detalhada da nova espécie da secção *Extranervosae*, *A. submarginata*, revelou que o acesso V 12525 apresenta $2n=20$ cromossomos, com satélite do tipo 3A, o mesmo tipo observado por Lavia (1999) para *A. pietrarelli*, morfológicamente muito próxima a esta nova espécie.

Secção *Procumbentes*

Acessos de duas novas espécies da secção *Procumbentes* foram analisados quanto ao número de cromossomos e morfologia do cromossomo satelitado. Tanto *A. hassleri* Sv 3818, quanto *A. pfluggae* V 13589, apresentam $2n=20$ cromossomos com satélite do tipo 9.

Secção *Erectoides*

Arachis porphyralyx V 7303 apresenta satélite do tipo 8. Este tipo de satélite ainda não havia sido observado em espécies desta secção, mas aparece em *A. tuberosa*, espécie da secção *Triectoides*, bastante relacionada à secção *Erectoides*. Também observou-se, para esta nova espécie, a fórmula cariotípica $14m + 4sm$, que já foi observada em um acesso de *A. stenophylla*, a espécie considerada mais evoluída, sob o aspecto citogenético, na secção *Erectoides*.

Determinou-se, pela primeira vez, o número cromossômico de *A. brevipetiolata*, espécie da secção *Erectoides*. Conhecia-se apenas um acesso desta espécie, coletado em Itumbiara, Goiás, há muitos anos. Recentemente, três novas populações foram localizadas em Água Clara e Alcínópolis, no Mato Grosso do Sul,

e o germplasma coletado. O número cromossômico, determinado para os três acessos (V13959, V14664 e V14665), foi $2n=20$.

Uma nova espécie, *A.* (sec. *Erectoides*) sp. foi analisada quanto ao número e morfologia cromossômica. Os acessos V 14636 e V 14645 apresentaram $2n=20$ cromossomos e satélite do tipo 3A, de acordo com os parâmetros estabelecidos por Fernández & Krapovickas (1994). Este tipo de satélite, já foi observado em espécies das secções *Erectoides*, *Extranervosae*, *Caulorrhizae*, *Rhizomatosae* e *Arachis* (Fernández & Krapovickas, 1994; Lavia, 1999). A mais provável associação desta nova espécie é com as da secção *Erectoides*, devido a suas características vegetativas.

Secção *Rhizomatosae*

Arachis nitida V 14040, a única nova espécie da secção *Rhizomatosae*, apresenta $2n=40$ cromossomos, como *A. glabrata* e *A. pseudovillosa*, as duas outras espécies da série *Rhizomatosae* desta secção. Além disso, apresenta satélite do tipo 3A, como observado para *A. glabrata*. Tanto *A. glabrata*, quanto *A. pseudovillosa* apresentarem $2n=40$, produzem híbridos com os diplóides anuais das secções *Arachis* e com diplóides das secções *Procumbentes* e *Erectoides*, mas somente um dos híbridos entre as secções *Rhizomatosae* X *Arachis*, chegou a florescer (Krapovickas & Gregory, 1994). O indivíduo utilizado como pai nesses cruzamentos, uma planta do acesso HLK 569, era de fato *A. nitida*, e não *A. glabrata*, como se pensava (Valls, comunicação pessoal), indicando que esta nova espécie apresenta boa capacidade para cruzamentos interseccionais. Morfologicamente, *A. nitida* assemelha-se a *A. burkartii* Handro, espécie diplóide da série *Prorhizomatosae* da secção *Rhizomatosae*, que não produz híbridos quando cruzada com outras espécies diplóides do gênero, mostrando um grande isolamento reprodutivo (Krapovickas & Gregory, 1994).

Secção *Heteranthae*

A secção *Heteranthae* é composta por seis espécies, todas de ciclo bastante curto e que, em sua maioria, produzem sementes em abundância. Embora não tenha seu uso muito difundido, muitas dessas espécies apresentam um grande potencial para uso forrageiro. Essas espécies apresentam os menores cromossomos já observados para as espécies do gênero, o que dificulta muito sua análise e interpretação dos resultados. Três espécies da secção *Heteranthae* foram estudadas. Tanto para *A. seridoënsis* V 10969, quanto para *A. pussilla* V 6677, foram encontrados $2n=20$ cromossomos e o satélite do tipo 10. Quatro acessos de *A. sylvestris* apresentaram $2n=20$. Para *A. seridoënsis* V 10969 foi possível identificar bandas CMA⁺ no par de cromossomos satelitado.

Secção *Arachis*

Os acessos de *A. decora* analisados apresentaram $2n=18$, conforme relatos para outros acessos (Peñaloza & Valls, 1997). Foi encontrado um autotriplóide ($2n=27$) de *A. decora* V 9955. A causa mais provável para este tipo de ocorrência é a provável fecundação, de um dos óvulos por um gameta não reduzido, com $n=18$. Alguns fatores abióticos, atuantes durante a fase reprodutiva da planta, podem ter provocado essa não redução gamética. Não é a primeira vez que se observa esse fenômeno em *Arachis*. O padrão de distribuição das bandas DAPI observado para *A. decora* V 9955, *A. palustris* V 13023 e *A. praecox* V 14682 foi o mesmo, com bandas

DAPI pericentroméricas em todos os cromossomos. Entretanto, *A. decora* W648, apresentou apenas 8 pares de cromossomos apresentaram bandas DAPI+ pericentromérica, o que evidencia ainda mais a variação já observada para esta espécie.

O grupo de acessos associados a *A. hoehnei* foi analisado quanto a morfologia cromossômica. O acesso V9923, antes designado como *A. hoehnei*, foi designado como uma nova espécie por apresentar o par de cromossomos A, ausente em *A. hoehnei*. A marcação cromossômica através de fluorocromos CMA/DAPI no acesso de *A. hoehnei* V 9146 indica a presença de bandas intersticiais DAPI, característica ainda não observada para outras espécies do gênero, analisadas com esses fluorocromos. Estudos citogenéticos mais detalhados estão sendo realizados com este grupo na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

A marcação dos cromossomos em *A. cardenasii* GK10017 com fluorocromo DAPI revelou a presença de bandas pericentromérica em 9 pares e uma banda intersticial no outro par de cromossomos. Em *A. duranensis* V 14167, outra espécie associada ao genoma A de *A. hypogaea*, observaram-se de 10 pares DAPI+ na região pericentromérica.

Arachis batizocoi foi, por muitos anos, a única espécie conhecida da secção *Arachis*, sem o par de cromossomos A. Desta forma foi tida como a doadora do genoma B do amendoim. A partir da década de 80, com a intensificação de coletas de germoplasma de *Arachis*, ampliou-se o número de espécies da secção *Arachis* que não apresentavam o par de cromossomos A. Kochert et al. (1991) e Fernández & Krapovickas (1994) realizaram estudos que levaram a fortificação da hipótese de que os progenitores do amendoim teriam sido *A. ipaënsis* (sem par "A") e *A. duranensis* (com o par "A"). A antiga hipótese de que *A. batizocoi* teria sido o doador do genoma B, passou a ser questionada. Neste trabalho observou-se que *A. batizocoi* K 9484 apresenta apenas 9 pares dos 10 pares de cromossomos com bandas DAPI+ pericentroméricas.

Arachis magna é outra espécie que apresenta várias populações em território brasileiro, está associada ao genoma B de *A. hypogaea* e apresenta alguns acessos morfologicamente próximos a *A. ipaënsis*. O estudo da variabilidade citogenética e morfológica em *A. magna*, torna-se extremamente importante, uma vez que sua proximidade a *A. ipaënsis* ampliaria o leque de opções do possível doador de genoma B do amendoim e, conseqüentemente, o número de vias para introgressão de genes de interesse de espécies silvestres para o amendoim cultivado. Neste estudo foram analisados 7 acessos brasileiros de *A. magna*. Todos apresentaram $2n=20$ cromossomos e ausência do par de cromossomos A. No acesso V 13748, foi possível identificar o cromossomo SAT do tipo 6. Este tipo de cromossomo satelitado é comum em outros acessos de *A. magna* e também aparece no único acesso conhecido de *A. ipaënsis* (Fernández & Krapovickas, 1994), o que fornece mais dados para hipótese de grande similaridade entre estas duas espécies.

Arachis gregoryi é uma das novas espécies do gênero. Apresenta $2n=20$ cromossomos sem a presença do par de cromossomos A (Peñaloza & Valls, 1999) e fórmula cariotípica $16m+4sm$. O acesso V14728 apresenta satélite do tipo 6 localizado no cromossomo 10, como observado por Fernández & Krapovickas (1994) em dois acessos de *A. magna*. Os cromossomos 9 e 10 de *A. gregoryi* V 6389 são submetacêntricos, sendo que o cromossomo 10 apresenta satélite do tipo 6.

Arachis glandulifera pode apresentar de 5 a 6 pares de cromossomos subtelocentricos, o que caracteriza o genoma D em *Arachis*. O acesso V 13738

apresentou bandas teloméricas DAPI+ nos cinco pares de cromossomos subtelo-cêntricos, comprovando as translocações cromossômicas. Observou-se, por coloração convencional, que um novo acesso de germoplasma desta mesma espécie, V 14730, recentemente coletado no Brasil, também apresenta cinco pares de cromossomos submetacêntricos.

Até agora, a análise do número e distribuição dos sítios de rDNA 5S e 45S para espécies do gênero *Arachis* só havia sido realizada por Raina & Mukay (1999). Entretanto, a inclusão de diferentes subespécies e variedades botânicas de *A. hypogaea* não foi levada em consideração por esses autores.

Neste trabalho, o número de sítios de rDNA 5S e 45S foi determinado para *A. hypogaea* subsp. *hypogaea* var. *hirsuta* Mf 1538 e *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* var. *vulgaris* cv. Tatuí. Para a primeira observaram-se 3 sítios de rDNA 5S e 6 sítios de rDNA 45S, enquanto para a segunda foram observados 4 sítios de rDNA 5S e 7 sítios de rDNA 45S.

Krapovickas & Gregory (1994) com base em caracteres morfológicos, associados aos resultados das análises citológicas realizadas por Fernández & Krapovickas (1994), que evidenciaram diferenças no tipo de cromossomo SAT entre as subespécies de *A. hypogaea*, não descartaram a possibilidade de origem polifilética para o amendoim, na qual poderiam ter participado diferentes espécies diplóides, associadas ao genoma A e/ou genoma B. A aplicação de marcadores microsátélites em 60 acessos, representantes das seis variedades botânicas de *A. hypogaea*, além de tipos indígenas, sugerem a possibilidade de o amendoim não ter tido uma origem única (Moretzsohn & Valls, 2001). Segundo esses autores, a hipótese de Gregory & Gregory (1976) justificaria a origem das quatro variedades de *A. hypogaea* subsp. *fastigiata*, com genoma AABB; enquanto, um segundo evento de hibridação e duplicação, envolvendo uma espécie diplóides de genoma AA, e outra de genoma A'A', teria ocorrido, originando as variedades de *A. hypogaea* subsp. *hypogaea*, além de alguns tipos indígenas.

A origem de *A. hypogaea*, um alotetraplóide segmentar, e a evolução das espécies do gênero ainda são controversas e tem sido motivo de muitos trabalhos envolvendo as mais diversas especialidades, como botânica e taxonomia, genética e citogenética, além de aspectos históricos, arqueológicos e etnobotânicos. Determinar a origem genética do amendoim seria de extrema importância para viabilizar a inclusão de novas espécies silvestres em programas de melhoramento, tanto em países desenvolvidos, nos quais essa cultura representa fonte de lucros financeiros, quanto em países em desenvolvimento, nos quais o incremento da produção e da produtividade do amendoim poderia significar maior disponibilização de alimento de alto valor nutritivo.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Marcelo Guerra (Laboratório de Citogenética da UFPE, Recife, PE Brasil) e sua equipe, pela gentil colaboração na execução das marcações com as sondas de rDNA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARVALHO, R.; GUERRA, M. *Hereditas*, v.136, p.159-168, 2001.
FERNÁNDEZ, A.; KRAPOVICKAS, A. *Bonplandia*, v. 8, n. 1-4, p. 187-220, 1994.
GREGORY, W. C.; GREGORY, M. P. Groundnut. In: SIMMONDS, N. W. (Eds). **Evolution of crop plants**. London: Longman Group, 1976. p.151-154.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos**: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Funpec: Ribeirão Preto. 131p. 2002.

KOCHERT, G; HALWARD, T.; BRANCH, W. D.; SIMPSON, C. E. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 81, p.565-570, 1991.

KRAPOVICKAS, A.; W.C. GREGORY. 1994. **Bonplandia**, v.8, n.1-4, p. 1-186, 1994.

LAVIA, G. I. **Caracterización cromosómica del germoplasma del maní**. 1999. 203p. Tesis (Doctorado en Ciencias Biológicas) - Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba.

MORETZSOHN, M. C., VALLS, J. F. M. **Boletim Técnico da EMBRAPA**. Brasília, v.13, 2001.

PEÑALOZA, A. P. S. **Caracterização citogenética de diferentes espécies do gênero *Arachis***. 2003. 174p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, Genética) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

PEÑALOZA, A. P. S.; VALLS, J. F. M. Número cromossômico em novas espécies de *Arachis* (Leguminosae). In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA A AMÉRICA LATINA E O CARIBE, 2., 1999, Brasília, DF. **Anais...**Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. 1 CD ROM.

RAINA, S. N.; MUKAI, Y. **Genome**, v. 42, p.52-59, 1999.

VALLS, J. F. M.; SIMPSON, C. E. 1997. Novas espécies de *Arachis* (Leguminosae). In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS, 1., 1997. **Programas e Resumos...**Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas, 1997, p. 27-28.

CONTENIDO DE ADN, CARIOTIPOS, DISTRIBUCIÓN DE HETEROCROMATINA Y ESTUDIOS MEIÓTICOS EN LA CARACTERIZACIÓN DEL GERMOPLASMA DE MANÍ

Lavia, G.I. & Seijo, J.G.

Instituto de Botánica del Nordeste, C.C. 209, 3400 Corrientes, Argentina, lavia@agr.unne.edu.ar

Varias especies diploides de *Arachis* están siendo utilizadas para la introducción de genes de interés agronómico al maní cultivado (Simpson 1991, 2001). El conocimiento citogenético de las especies, mediante estudios mitóticos y/o meióticos, constituye una herramienta útil para optimizar el manejo del germoplasma silvestre, debido a que diferentes números cromosómicos o cambios cromosómicos estructurales podrían actuar como barrera reproductiva impidiendo el intercambio génico entre las especies, ya sea en su ambiente natural o en cruzamientos controlados.

Además, el análisis cromosómico, tanto con técnicas clásicas como modernas, es una herramienta útil para determinar las afinidades entre las especies y facilita la planificación de cruzamientos interespecíficos. Por otra parte, el establecimiento de las relaciones genómicas entre las especies es relevante para esclarecer el origen genético del maní cultivado. Los cromosomas que brindan mayor información son los "A" y los SAT (Fernández 1994, Lavia 1996, 1998, 2000, 2001, Peñaloza 1996, 2001).

El objetivo general de nuestro trabajo es caracterizar cromosómicamente las especies de *Arachis* por medio de estudios mitóticos (convencionales, de bandeado e hibridación in situ) y meióticos. En esta presentación incluimos los siguientes temas: contenido de ADN, cariotipos en variedades de *A. hypogaea*, tinción argéntica y con fluorocromos en varias especies y estudios meióticos en especies parentales e híbridos.

Material y métodos

El material analizado proviene de la Texas Agricultural Experiment Station, USA (TAES), del Centro Nacional de Recursos Genéticos, Brasilia, Brasil (CENARGEN-EMBRAPA), del Instituto de Botánica del Nordeste, Corrientes, Argentina (IBONE) y de la Estación Experimental Agropecuaria de Manfredi, Córdoba, Argentina (EEA-INTA MANFREDI).

Para la determinación del contenido de ADN se utilizó la técnica propuesta por Seal y Rees (1982). Los estudios mitóticos convencionales se realizaron en ápices de raíces pretratados con 8-hidroxiquinoleína durante 3 h a temperatura ambiente y fijadas en 5:1 alcohol absoluto:ácido láctico (Fernández, 1973). La tinción se realizó por medio de la técnica de Feulgen y orceína acética.

Para las técnicas de bandeado se utilizaron ápices pretratados con 8-hidroxiquinoleína 8 mM y fijadas en 3:1 alcohol:ácido acético. Para la tinción argéntica (Ag-NOR) se siguió la técnica de Stack *et al.* (1991), mientras que la técnica utilizada en bandas Q fue la sugerida por Vosa (1970), en el caso de bandas DAPI los ápices fueron incubados en una solución enzimática de celulasa y pectinasa en buffer citrato, se aplastaron en ácido acético al 45% y los cubres se desprendieron con CO₂. Las preparaciones se colorearon con DAPI y se sellaron con solución de goma.

Los estudios meióticos fueron realizados en inflorescencias fijadas en 5:1 durante 24 h y conservadas en etanol 70 % a 4°C. Los sacos polínicos fueron aplastados en una gota de orceína acética al 3%. La viabilidad del polen fue estimada con la técnica de carmín acético-glicerina. Para cada especie se analizaron 500 granos considerando viables aquellos que presentan el citoplasma uniformemente teñido.

Resultados y discusión

Contenido de ADN. Estimaciones del contenido de ADN se realizaron en especies pertenecientes a las secciones *Erectoides*, *Heteranthes*, *Triseminatae*, *Extranervosae*, *Procumbentes* y *Arachis*. El contenido de ADN osciló entre 2,87 pg en *A. retusa* (Secc. *Extranervosae*) y 6,59 pg en *A. douradiana* (Secc. *Erectoides*), y se relaciona positivamente con el tamaño cromosómico, mayor contenido de ADN se corresponde con mayor tamaño cromosómico, sin que se produzcan cambios en la simetría del cariotipo. A pesar de la constancia del número cromosómico ($2n=20$), existe una variación de un poco más de dos veces –entre *A. retusa* y *A. douradiana*–, estas diferencias de contenido de ADN podrían tener valor adaptativo.

Cariotipos. El objetivo fue caracterizar cromosómicamente las subespecies y variedades de *A. hypogaea*. Hemos completado los cariotipos de las 6 variedades botánicas de *A. hypogaea*. Los cromosomas metacéntricos son los más frecuentes, las fórmulas cariotípicas más comunes fueron $38m+2sm$ y $36m+4sm$, observadas en la mayoría de las accesiones, salvo en la var. *hirsuta* que presentó $38m+2sm/st$. Los cariotipos son altamente simétricos. Un par de satélites fue observado en todas las accesiones, el cromosoma SAT tipo 5 fue observado en ambas subespecies, el cromosoma SAT tipo 3 fue sólo observado en subsp. *fastigiata* y el SAT tipo 6 fue exclusivo de la subsp. *hypogaea*. Los resultados obtenidos en cuanto a la longitud media por cromosoma mostraron que las vars. *aequatoriana*, *peruviana* y *vulgaris* (subsp. *fastigiata*) presentaron el mismo valor ($1.81 \mu m$), en tanto que la variedad *hirsuta* presenta los cromosomas más pequeños ($1,69 \mu m$). Los datos obtenidos sugieren que todas las accesiones de *A. hypogaea* presentan un complemento cromosómico similar y apoyan la hipótesis de que en origen del cultígeno habrían intervenido sólo dos especies diploides (Seijo & al. 2004).

Ag-NOR, bandas Q y DAPI. Estas técnicas fueron aplicadas con el objetivo de generar marcadores cromosómicos útiles para la caracterización genómica y estudios filogenéticos. Las observaciones de bandas realizadas en prometafase brindaron mayor información, ya que en esa fase los cromosomas se hallan menos condensados y las bandas son más evidentes.

Ag-NOR. El objetivo fue localizar cromosomas nucleolares para contribuir a la identificación de cromosomas homólogos. Comparando los cromosomas teñidos con nitrato de plata y los cariotipos realizados con tinciones convencionales se demuestra que existe correspondencia entre el número de NORs y las constricciones secundarias de los cromosomas SAT.

Tanto en especies diploides como tetraploides se han observado dos NORs. En *A. hypogaea* además de los NORs activos hemos observado en prometafase 3 ó 4 cromosomas adicionales teñidos con plata que corresponderían a NORs inactivos. Con hibridación in situ de ADN_r se ha comprobado la existencia en estas regiones de genes ribosomales (Seijo et al. 2004).

A. hypogaea es de origen híbrido involucrando dos especies que aportaron cada una de ellas un par de cromosomas SAT. Debido a un fenómeno denominado

anfiplastia diferencial, (Navashin 1934) las constricciones secundarias de alguno de los progenitores se suprimieron.

Bandas Q. El patrón de bandas en las especies analizadas es similar. La mayoría presentan bandas pericentroméricas, excepto *A. stenosperma* que tiene tres pares con bandas teloméricas y *A. Batizocoi* con un par telomérica. El par de cromosomas con satélite presentó bandas pericentroméricas en la mayoría de las especies, excepto en *A. Vallsii* y *A. praecox*.

El mayor porcentaje de heterocromatina lo presentan las especies de la sección *Arachis*, entre 7,96 en *A. palustris* y 12,29 en *A. stenosperma*, con un promedio de 10,76. En tanto que *A. appressipila* y *A. Vallsii* presentan alrededor del 6% de bandas.

Podemos observar que las especies de la sección *Arachis*, sección considerada más evolucionada dentro del género, son las que presentan mayor contenido de heterocromatina. En forma particular *A. Batizocoi*, anual, posee uno de los cariotipos más asimétricos dentro del género, y a su vez presenta uno de los mayores porcentajes de heterocromatina.

Bandas DAPI. Mediante la aplicación de la técnica de bandeado DAPI se observó que la mayoría de las especies analizadas presentan bandas centroméricas en todos o en casi todos los cromosomas, excepto *A. ipaensis* y *A. williamsii* que carecen completamente de estas bandas. *Arachis duranensis* presentó bandas en todos los pares al igual que *A. villosa* y *A. correntina*. *Arachis cardenasii* y *A. batizocoi* mostraron bandas en todos los pares, excepto en el par 4. Además, *A. batizocoi* presentó una banda adicional en el brazo corto del par 8, pero debido a que no se ha observado en todas las metafases no se la representa en los idiogramas.

En todas las especies con bandas, el porcentaje de heterocromatina comprendió entre el 14.1% (en *A. duranensis*) y el 16.56% (en *A. cardenasii*) de la longitud del complemento. Por su parte, el cromosoma "A", se distinguió claramente de los demás pares por presentar una gran banda heterocromática que alcanzó hasta el 45% de la longitud del cromosoma.

De acuerdo a los resultados expuestos las especies analizadas pueden agruparse de acuerdo a sus características cariotípicas. Todas las entidades que presentan el par "A" fueron tradicionalmente consideradas como pertenecientes al genoma A (Smartt & al., 1978; Stalker & Dalmacio, 1981). La aplicación de las técnicas de bandeado reveló, además, que las mismas también poseen bandas heterocromáticas en todos o en la mayoría de sus cromosomas, sugiriendo un cierto grado de homogeneidad en la estructura cromatínica de estos taxa. Por otra parte, las especies aquí estudiadas que carecen del cromosoma A (*A. batizocoi*, *A. ipaensis* y *A. williamsii*) fueron asignadas al grupo de entidades con genoma B. Tanto *A. ipaensis* como *A. williamsii* carecen de bandas heterocromáticas, mientras que *A. batizocoi* presenta bandas en la mayoría de sus pares. Este hecho indicaría que existe mayor variación cariotípica entre estas especies que en las que presentan el genoma A.

Análisis meióticos. Diversas especies e híbridos obtenidos por C. E. Simpson están siendo analizados en el IBONE con el objetivo de establecer las relaciones genómicas entre las especies. En algunos casos se observaron todas las fases de la meiosis y en otros no. Se ha analizado el comportamiento meiótico de especies pertenecientes a 4 secciones diferentes (*Triseminatae*, *Procumbentes*, *Caulorrhizae* y *Arachis*). La mayoría de las especies presentaron meiosis regular con 10 II en diacinesis-metafase I, excepto *A. stenosperma* y *A. benensis* que

presentaron 8 II + 1 IV en alrededor del 3% de las células madres del polen. La mayoría de los bivalentes fueron cerrados, y solo uno o dos por célula se presentaron abiertos. Los quiasmas se localizaron siempre en posición terminal o subterminal tanto en diplotene como en diacinesis. La segregación de los bivalentes fue normal y está de acuerdo con la alta fertilidad del polen registrada. En las profases y metafases sólo es posible reconocer el par de cromosomas "A", el cual puede ser utilizado para distinguir entre genoma A y B y como marcador genómico en híbridos. En *A. Pintoi*, existen dos citotipos, diploide y triploide, únicamente hemos podido observar meiosis en el diploide, el cual presentó 10 II en metafase I, mientras que al final de microsporogénesis además de tétradas se observaron tríadas y mónadas. Este hallazgo sugiere que el citotipo triploide (3x) podría haberse originado de la unión de una gameta normal reducida (x) y una gameta no reducida (2x).

Por otra parte, se analizó el comportamiento meiótico del híbrido entre *A. praecox* (6416-con ciclo de vida corto) x *A. batizocoi* (9484), de 18 (x=9) y 20 (x=10) cromosomas respectivamente, tratado con colchicina. Al analizar las meiosis observamos 19II en metafase I, lo que confirma que se trata de un alotetraploide y que se generó a partir de especies con diferentes números básicos. El número de cromosomas duplicado y la regularidad del comportamiento meiótico de este híbrido resulta de sumo interés para la incorporación de la característica de precocidad al maní cultivado.

Nuestros resultados proveen nueva información para la caracterización genómica de las especies de *Arachis* mediante el análisis de los patrones de heterocromatina y los análisis meióticos y sugiere que la constitución genómica de algunas entidades debería ser revisada. La variabilidad hallada en los patrones de bandeo DAPI en la sección *Arachis* abren nuevas posibilidades para el uso de estos datos citológicos en los análisis evolutivos y mejoramiento de plantas.

Apoyo financiero: COMUNIDAD EUROPEA, CONICET, SGC y T (UNNE), IICA.

Referencias bibliográficas

- FERNÁNDEZ, A. *Bol. Soc. Arg. Bot.*, v.15, p.287-290. 1973.
FERNÁNDEZ, A. *Bonplandia*, v.8, p.187-220. 1994.
LAVIA, G.I. *Bonplandia*, v.9, p.111-120. 1996.
LAVIA, G.I. *Cytologia*, v.63, p.177-181. 1998.
LAVIA, G.I. *Caryologia*, v.53, p.277-281. 2000.
LAVIA, G.I. *Caryologia*, v.54, p.115-119. 2001.
NAVASHIN, M.S. *Cytologia*, v.5, p.169-203. 1934.
PEÑALOZA, A.P.S. Congresso Nacional de Genética, 42, 1996. Abstracts. Caxambú, Brasil.
PEÑALOZA, A.P.S. Simpósio de Recursos Genéticos para a América Latina e Caribe, III, 2001. Abstracts. Londrina, Brasil.
SEAL, A.G. *Heredity*, v. 49, p.179-190. 1982.
SEIJO, J.G. *American Journal of Botany*. En prensa. 2004.
SIMPSON, C.E. Second ICRISAT Regional Groundnut Meeting for West Africa. 1991. Proceedings ICRISAT, India.
SIMPSON, C.E. *Peanut Science*, v.28, p.114-116. 2001.
SMART, J. *Euphytica*, v.27, p.665-675. 1978.
STACK, S. *Biotechnic and Histochemistry*, v.1, p.69-78. 1991.
STALKER, H. T. *J. Heredity*, v.72, p. 403-408. 1981.
VOSA, C.G. *Chromosoma* (Berl.), v.30, p.366-372. 1970.

QUE NOS CUENTAN LOS GENES RIBOSOMICOS SOBRE EL ORIGEN GENETICO DEL MANÍ

Seijo, J. G.¹ & Lavia, G. I.²

¹ Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal, Vélez Sarsfield 299, Córdoba.

² Instituto de Botánica del Nordeste, Sargento Cabral 2131, CC 209, 3400 Corrientes.

Arachis hypogaea (n.v. “maní” “amendoin” “peanut”) es un cultígeno que se ha convertido en una de las leguminosas de granos más importantes del mundo (Duke, 1981; Wynne & Halward, 1989). Sobre la base de caracteres morfológicos, cruzamientos experimentales y patrones electroforéticos, Krapovickas & Gregory (1994) han reconocido dos subespecies para el cultígeno, *hypogaea* y *fastigiata*. Además, se aceptan seis variedades botánicas, dos de ellas pertenecientes a la subsp. *hypogaea* (*hypogaea* y *hirsuta*) y cuatro a la subsp. *fastigiata* (*fastigiata*, *aequatoriana*, *peruviana*, y *vulgaris*). Las numerosas razas locales dentro de cada variedad también son muy diversas tanto en caracteres vegetativos como en los reproductivos (cf. Krapovickas & Rigoni, 1960; Grosso & al., 1994; Krapovickas & Gregory, 1994; Krapovickas & al., 2001).

Aunque *A. hypogaea* posee una gran variación morfológica, la variabilidad genética detectada es generalmente baja (Kochert & al., 1991; Paik-Ro & al., 1992; Stalker & Mozingo, 2001). A pesar de los esfuerzos realizados para crear bancos de germoplasma (Krapovickas & Rigoni, 1960; Valls & al., 1985; Holbrook, 2001; Upadhyaya & al., 2001); el acervo genético disponible no ha sido suficiente para resolver muchos problemas agronómicos tales como susceptibilidad a varias enfermedades y pestes. Por este motivo, se ha incrementado el interés por un grupo de especies silvestres supuestamente afines al cultígeno, las cuales presentan caracteres agronómicos que podrían ser de interés para el mejoramiento del maní (Johnson & al., 1977; Foster & al., 1981; Singh, 1986b; Burow & al., 2001; Simpson, 2001). En este sentido, muchos estudios se han centrado en el estudio del origen, organización y evolución del genoma de *A. hypogaea*, con particular interés en el establecimiento de sus posibles ancestros (cf. Singh & Smartt, 1998, y referencias allí incluidas).

Todas las especies de *Arachis* crecen en Sud América y se incluyeron en nueve secciones taxonómicas (Krapovickas & Gregory, 1994). El maní es considerado un alotetraploide ($2n = 4x = 40$) con una constitución genómica AABB (Smartt & al., 1978) y fue incluido dentro de la sección *Arachis*, junto con un alotetraploide silvestre, *A. monticola*, y 25 especies silvestres diploides (Krapovickas & Gregory, 1994). Se especula que dos especies diploides pertenecientes a la sección *Arachis* han originado a *A. monticola*, a partir del cual y a través de domesticación habría originado al cultígeno (Krapovickas & Rigoni, 1957; Krapovickas & Gregory, 1994). La estrecha relación entre estos dos taxa se evidencia por cruzamientos experimentales (Krapovickas & Rigoni, 1954, 1957; Hammons, 1970), por estudios citogenéticos clásicos (Fernández & Krapovickas, 1994) y análisis moleculares (Halward & al., 1991; Kochert & al., 1991). Por otra parte, la cuestión sobre los progenitores diploides de *A. monticola* y *A. hypogaea* permanece aún sin resolverse. Desde los años cincuenta, cuando se obtuvo el primer híbrido entre *A. hypogaea* y el diploide *A. correntina* (Krapovickas & Rigoni, 1954), muchas otras especies diploides, tanto pertenecientes al genoma A o B, han producido híbridos con el *A. hypogaea* y por lo tanto propuestas como progenitores

putativos de los tetraploides (Krapovickas & Rigoni, 1957; Raman, 1960; Smartt & Gregory, 1967; Krapovickas, 1973; Stalker & Wynne, 1979; Singh & Moss, 1984).

Entre las propuestas figuran, *A. duranensis* y *A. cardenasii* (Gregory & Gregory, 1976) aunque ahora se sabe que ambas portan el genoma A. Smartt & al. (1978) propuso *A. cardenasii* y *A. batizocoi*, con genomas A y B respectivamente, y luego Singh (1986b, 1988) considera la hipótesis de *A. duranensis* y *A. batizocoi* como los progenitores más probables del maní. Sin embargo, los resultados provenientes de los polimorfismos de fragmentos de restricción (RFLP) sugieren que *A. batizocoi* no estaría relacionado con el cultígeno, quedando *A. duranensis* y *A. ipaensis* como diploides cercanos a *A. hypogaea* y (Kochert & al., 1991). Este hecho fue demostrado por Fernández & Krapovickas (1994) quienes observaron que *A. ipaensis* carecía del par cromosómico "A", convirtiéndose así en una alternativa a *A. batizocoi*, como dador del genoma B. Una nueva revisión sobre el origen de *A. hypogaea* ha revalidado la candidatura de *A. batizocoi* como parental putativo del cultígeno basándose en la capacidad de obtener alotetraploides sintéticos (Singh & Smartt, 1998). Más recientemente, Raina & Mukai (1999a, b) propusieron a *A. villosa* como el donante más probable del genoma A de acuerdo a los patrones de pintado genómico y a la comparación del número de sitios de rDNA revelados por hibridación in situ fluorescente (FISH). Por otra parte, *A. trinitensis* y *A. williamsii*, con genoma A y B respectivamente, han sido incluidos como probables antecesores del cultígeno considerando la distribución geográfica de los mismos (Lavia, 1996).

En este contexto, es claro que la identidad de los progenitores de *A. hypogaea* es todavía incierta, y que el cultígeno podría haber tenido múltiples orígenes debido a la existencia de dos subespecies y a la existencia de varios candidatos como donantes de los genomas (cf. Singh, 1986a; Lavia, 1999). Para tratar de aclarar esta controversia y debido a que las especies de *Arachis* presentan variabilidad en lo que respecta al número de loci de DNA ribosómico 5S y 18-25S (Raina & Mukai, 1999a), hemos usado la técnica de FISH para mapear las secuencias de DNA 5S y 18S-25S rDNA en todas las variedades botánicas del maní cultivado, en *A. monticola*, y en siete de los ocho progenitores putativos de los tetraploides con los siguientes objetivos (1) probar si *A. hypogaea* se ha originado en un evento simple o múltiple de poliploidización analizando las diferentes variedades del cultígeno, (2) determinar las regiones cromosómicas homeólogas en especial entre *A. hypogaea* y *A. monticola*, para inferir si *A. monticola* es el tetraploide antecesor de *A. hypogaea*, (3) aclarar cuáles son los diploides donantes de los genomas de *A. hypogaea* por comparación de los patrones de loci de rDNA entre los progenitores putativos y *A. hypogaea*, y (4) encontrar marcadores citogenéticos para facilitar la construcción de un mapa basado en FISH del genoma de *Arachis*.

El material de *A. hypogaea* y de las especies silvestres fue obtenido del banco de germoplasma del INTA Manfredi, Córdoba, Argentina y del Instituto de Botánica del Nordeste, Corrientes, Argentina. Los preparados cromosómicos fueron obtenidos de acuerdo a Fernández & Krapovickas (1994) y Schwarzacher & al. (1980). Los loci de rDNA fueron localizados utilizando la sonda pXV1 de *Beta vulgaris*, para el 5S rRNA (Schmidt & al., 1994), y la R2 de *Arabidopsis thaliana*, para el 18S-5.8S-25S rDNA (Wanzenböck & al., 1997). La primera sonda fue marcada con digoxigenin-11-dUTP (Boehringer Mannheim, Germany) y la segunda con biotin-11-dUTP (Sigma, USA), ambas por nick translation.

La técnica de hibridación y detección se realizó de acuerdo a Moscone & al. (1996). Se realizó una contra tinción con DAPI que ha revelado un patrón de bandas heterocromáticas y que ayudó a la identificación de los cromosomas.

Características cariotípicas generales — los cromosomas de *Arachis* son relativamente pequeños y su tamaño varía de 2 a 5 μm . En *A. hypogaea*, todas las variedades presentaron cariotipos similares, con $2n = 4x = 40$, y una fórmula cromosómica haploide de $19m + 1sm$, y una longitud del cariotipo haploide de $67.28 \pm 4.02 \mu\text{m}$. Se observó un par cromosómico con una constricción secundaria en el brazo largo y un gran satélite [“cromosoma SAT” según Fernández & Krapovickas (1994)]. Usualmente, la constricción secundaria de este par se presenta extendida y el satélite aparece distante del segmento proximal del brazo correspondiente. En todas las accesiones de maní, el par más pequeño [“cromosomas A” según Husted (1936)] presentó una condensación cromatínica menor en comparación con el resto de los cromosomas del complemento. *Arachis monticola*, $2n = 4x = 40$, presentó un cariotipo muy similar al descrito para *A. hypogaea*.

Todas las especies diploides tienen $2n = 2x = 20$ con cariotipos compuestos principalmente por cromosomas metacéntricos (m) de tamaño similar, un par de “cromosomas SAT” (m or sm). La longitud del cariotipo haploide varía entre 28.37 μm en *A. cardenasii* y 41.97 μm en *A. duranensis*. *Arachis cardenasii*, *A. correntina*, *A. duranensis*, y *A. villosa* poseen un par de cromosomas “A”, el cual está ausente en *A. batizocoi*, *A. ipaensis* y *A. williamsii*.

Distribución de la heterocromatina — En los complementos de las especies tetraploides, *A. hypogaea* y *A. monticola*, la mitad de los cromosomas —aquellos que pertenecen al genoma A— tienen bandas centroméricas DAPI+, mientras que los restantes (con el genoma B) no presentan bandas. Las bandas presentan poca variación en tamaño, siendo la más conspicua aquella portada por el par A9. Todas las variedades de *A. hypogaea* y *A. monticola* tienen el mismo patrón de distribución y cantidades semejantes de heterocromatina, que ronda el 7% de la longitud cariotípica.

Entre las especies diploides, aquellas que presentan el genoma A, *A. correntina*, *A. duranensis* y *A. villosa* presentan bandas en todos los cromosomas, mientras que *A. cardenasii* carece de bandas en el par A4. Aquellas entidades consideradas como del genoma B, *A. ipaensis* y *A. williamsii*, no poseen bandas, mientras que en *A. batizocoi* todos los cromosomas están bandeados excepto el par 4.

Mapeo citológico de los loci 5S y 18S-25S rRNA por FISH — Todas las accesiones de *A. hypogaea* (seis) y *A. monticola* (tres) tienen dos pares de sitios 5S y cinco 18S-25S rDNA. En ambas especies, los loci 5S son intercalares en el brazo corto cerca del centrómero de los pares A3 y B3. Todos los sitios 18S-25S rDNA están intercaladamente posicionados, cuatro pares en brazos largos—tres cerca del centrómero (A2, A10 y B10) y otro en el medio del brazo (B3)— y el par restante en la región subteloamérica de los brazos cortos (B7). Un sitio 5S es sinténico con uno 18S-25S (B3).

En las especies diploides, solamente se observó un par de loci 5S rDNA, mientras que el número de sitios 18S-25S varió desde uno en *A. williamsii* a tres en *A. cardenasii*, *A. ipaensis* y *A. batizocoi*. El grupo génico 5S siempre se localiza

cerca del centrómero en los brazos cortos del par A3 (*A. correntina*, *A. villosa* y *A. duranensis*) y B3 (*A. ipaensis*), o en el brazo largo del par A3 (*A. cardenasii*), B3 (*A. williamsii*) y 3 (*A. batizocoi*). En *A. correntina*, *A. duranensis*, y *A. villosa* se observaron dos pares de loci paracentroméricos 18S-25S rRNA en los brazos largos de los cromosomas A2 y A10. *Arachis cardenasii* tiene un par de loci 18S-25S adicional en el brazo largo cerca del centrómero (A7). Entre las especies restantes, *A. williamsii* tiene un solo par de sitios 18S-25S en los brazos largos, situados cerca del centrómero (B10). *Arachis ipaensis* y *A. batizocoi* tienen dos pares de loci adicionales, uno de ellos es subterminal en brazos cortos (B7 y 7, respectivamente). El par restante de sitios 18S-25S es intercalar y ubicado en brazos largos en *A. ipaensis* (B3) y en brazos cortos en *A. batizocoi* (2). El cromosoma B3 de la primera especie tiene un sitio para cada familia génica.

Se ha observado un alto grado de homomorfía en los patrones de FISH entre los cromosomas homólogos. En general, el tamaño de los loci 5S es similar entre especies excepto aquellos del par A3 de *A. hypogaea* y *A. monticola*, que son mayores. Los sitios 18S-25S varían en longitud tanto dentro como entre especies. En todas las especies el sitio mayor se localiza en el par 10 y se corresponde con la única región organizadora del nucleolo activa.

Patrones cromosómicos de los loci 5S y 18S-25S rDNA y de heterocromatina — El mapeo de los sitios 5S y 18S-25S rDNA muestra que las dos subespecies y las seis variedades botánicas de *A. hypogaea* presentan el mismo número tamaño y distribución de las señales de FISH en los cromosomas. Además, se observó un alto grado de homogeneidad tanto en la cantidad como en la distribución de la heterocromatina, con la mitad del complemento con bandas centroméricas y la otra sin ellas. La constancia de estos marcadores concuerda con la baja variabilidad en marcadores genéticos que generalmente se destaca para *A. hypogaea* (Kochert & al., 1991; Paik-Ro & al., 1992), aunque contrasta con la variabilidad morfológica que presentan las variedades (Krapovickas, 1968; Krapovickas & Gregory, 1994). Por otra parte, el alto grado de homeología entre *A. monticola* y *A. hypogaea* inferida por los marcadores cromosómicos observados aquí sugiere que los dos tetraploides están estrechamente emparentados.

En base a nuestros resultados las especies diploides pueden ser agrupadas de acuerdo a sus características cariotípicas. En este sentido, las entidades con el par A9— el “par A” define al genoma A (Smartt & al., 1978) — también poseen bandas heterocromáticas en todos (o casi todos) los cromosomas, siendo de esta forma homogéneos en la estructura cariotípica mas grosera. Por otra parte, las especies sin el par A9, tradicionalmente consideradas como poseedoras del genoma B, son cariotípicamente más diversas, ya que algunas presentan bandas heterocromáticas y otras no. De acuerdo con los patrones de los genes rRNA en las especies diploides los loci 5S poseen poca variación, con solo un par por complemento, mientras que los sitios 18S-25S son más diversos en número, tamaño y posición. La variabilidad de los arreglos 18S-25S se nota principalmente en los taxa sin el par A9 permitiendo la distinción entre las especies. Por otra parte, entre las especies con genoma A, *A. cardenasii* es la única entidad que se diferencia claramente de las otras (*A. duranensis*, *A. correntina*, y *A. villosa*) que presentan un patrón de señales FISH muy semejante.

Origen del cultígeno — Nuestros datos confirman que *A. hypogaea* es un alotetraploide (cf. Husted, 1936) con la mitad de los cromosomas con bandas centroméricas y la mitad sin ellas, y con un solo par de cromosomas “A” (A9). El hecho que todas las variedades de *A. hypogaea* presenten el mismo número, tamaño y distribución de los sitios rDNA, junto con los datos morfológicos y geográficos (cf. infra), sugiere que el maní se ha originado por un evento único de poliploidización, o si múltiples siempre involucrando a las mismas especies. Además, se evidencia que durante el proceso de aloploidización no habrían ocurrido grandes rearrreglos cromosómicos. Este hecho podría explicar los bajos niveles de variabilidad genética hasta ahora encontrados entre las variedades (Halward & al., 1991; Kochert & al., 1991). Además, el alto grado de homología observado entre los cariotipos de *A. hypogaea* y *A. monticola* sugiere que el cultígeno se habría originado a partir de la domesticación del tetraploide silvestre.

La información sobre la distribución geográfica de *A. monticola* indica que esta especie vive en un área muy restringida del NW de Argentina. Por otro lado, la subespecie *hypogaea* del cultígeno, con los caracteres más primitivos de la especie (i.e., rastrera, frutos pequeños con una constricción bien marcada, retículo reducido, dos semillas con latencia), tiene su principal centro de variación en el SE de Bolivia, en las primeras estribaciones de la cordillera de los Andes (Krapovickas & Gregory, 1994; Simpson & al., 2001). Sobre esta base, se propone que ambos tetraploides deben haberse originado en algún lugar comprendido dentro del área citada (Krapovickas, 1968; Krapovickas & Gregory, 1994).

De acuerdo al razonamiento anterior, los ancestros diploides deberían buscarse entre las entidades actuales de la sección *Arachis* que crecen en el mismo área geográfica, i.e., *A. duranensis*, *A. batizocoi* y *A. ipaensis*. De estos candidatos, *A. duranensis* y *A. ipaensis* son los progenitores más probables de *A. hypogaea*/*A. monticola*, porque el primero es la única especie con genoma A y la segunda porque es la única que no presenta bandas centroméricas. Nuestros resultados de localización de sitios rDNA claramente señalan una gran afinidad entre *A. duranensis* y *A. ipaensis* con *A. hypogaea*, porque la suma de los sitios ribosómicos y las posiciones de los diploides son iguales a los que se encuentran en los tetraploides.

Entre las demás especies diploides estudiadas, *A. cardenasii* y *A. williamsii* pueden ser descartadas por tener patrones de sitios 18-25S rDNA diferentes de aquellos esperados para los parentales de los tetraploides. Por otra parte, *A. villosa* y la especie muy relacionada *A. correntina* tienen un cariotipo muy similar a *A. duranensis* pero son perennes, con raíz pivotante, caracteres que están ausentes en *A. hypogaea*. Además, ambas especies están separadas geográficamente del centro de origen propuesto por la región chaqueña — más de 1000 km de distancia— que carece de especies de *Arachis* en la mayor parte de su extensión. Esta distancia es muy significativa para las especies de *Arachis*, ya que, debido a la geocarpia, se ha calculado que la dispersión de semillas para una planta ronda un metro por año (i.e., 1000 km en un millón de años). Más aún, debido a que las especies de *Arachis* hasta ahora estudiadas son autógamas con un pequeño porcentaje de polinización cruzada, el flujo génico estimado es muy bajo, especialmente entre poblaciones alopátricas (cf. Krapovickas & Gregory, 1994; Simpson & al., 2001). Las dispersiones fortuitas de *A. villosa* y *A. correntina* por hidrocoria fluvial hacia la región de origen probable del maní también puede ser descartada porque sus hábitats actuales están corriente abajo en la cuenca del río de la Plata. Por tal motivo, aunque los patrones de sitios de rDNA obtenidos por FISH y los patrones de bandeo de *A. villosa* y *A.*

correntina son similares a los de *A. duranensis*, las dos primeras especies pueden ser descartadas como ancestros de *A. hypogaea* en base a los datos geográficos y morfológicos.

En resumen, se han mapeado los loci de genes rRNA loci y se ha establecido un patrón de distribución de heterocromatina en todas las variedades de *A. hypogaea* y las especies silvestres relacionados, generando marcadores cromosómicos para los estudios de genómica comparativa en desarrollo y para la caracterización fina del germoplasma de las especies de *Arachis*. Por otra parte, nuestros resultados, juntos con los de citogenética clásica (Fernández & Krapovickas, 1994), y los datos geográficos, morfológicos (Krapovickas & Gregory, 1994), y moleculares (Kochert & al., 1991), sustentan a *A. duranensis* y *A. ipaensis* como las especies que más probablemente participaron en el origen de *A. monticola* y del cultígeno *A. hypogaea*.

Agradecimientos

A los demás coautores de este trabajo A. Fernández (IBONE, Corrientes), A. Krapovickas (IBONE, Corrientes), E. Moscone (IMBIV, Córdoba), D. Ducasse (IFFIVE, INTA, Córdoba). Al CONICET (Beca posdoctoral de JGS) y SGCYT (PI-580) de la UNNE y a la Comunidad Europea (INCO-DEV contract no. ICA4-CT - 2001-10072) por el apoyo financiero brindado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BUROW, M. D.; SIMPSON, C. E.; STARR, J. L.; PATERSON, A. *Genetics*, v.159, p. 823–837. 2001.
- DUKE, J. A. Plenum Press, New York, New York, USA. 1981.
- FERNÁNDEZ, A., & A. KRAPOVICKAS. *Bonplandia*, v.8, p. 187–220. 1994.
- FOSTER, D. J.; STALKER, H. T.; WYNNE, J. C.; BENTE, M. K. *Oleagineux*, v.36, p. 139–143. 1981.
- GREGORY, W. C.; GREGORY, M. P. In N. W. Simmonds [ed.], *Evolution of crop plants*, 151–154. Longman Group Ltd., London, London, UK. 1976.
- GROSSO, N. R.; KRAPOVICKAS, A.; PIETRARELLI, J. R.; GUZMÁN, C. A.. *Bonplandia*, v.8, p. 221–233. 1994.
- HALWARD, T. M., H. T. STALKER, E. A. LARUE, & G. KOCHERT. *Genome*, v.34, p. 1013–1020. 1991.
- HAMMONS, R. O. *Crop Science*, v.10, p. 459–460. 1970.
- HOLBROOK, C. C. *Peanut Science*, v.28, p. 84–89. 2001.
- HUSTED, L. *Cytologia*, v.7, p. 396–423. 1936.
- JOHNSON, D. R.; WYNNE, J. C.; CAMPBELL, W. V. *Peanut Science*, v.4, p.9-11. 1977.
- KOCHERT, G.; HALWARD, T.; BRANCH, W. D.; SIMPSON, C. E.. *Theoretical and Applied Genetics*, v.81, p.565–570. 1991.
- KRAPOVICKAS, A. In R. Moav [ed.], *Agricultural genetics. Selected topics*, 135–151. National Council for Research and Development, Jerusalem, Israel. 1973.
- KRAPOVICKAS, A. 1968. In *Actas y Memorias XXXVII Congreso Internacional de Americanistas 2*, 517–534. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.
- KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, W. C. *Bonplandia*, v.8, p.1-186. 1994.
- KRAPOVICKAS, A.; RIGONI, V. A. In *Anais do 2º Congresso Panamericano de Agronomía*, 266–267. Piracicaba, Sao Paulo, Brazil. 1954.
- KRAPOVICKAS, A.; RIGONI, V. A. *Revista de Investigaciones Agrícolas*, v.14, p.197–228. 1960.
- KRAPOVICKAS, A.; RIGONI, V. A. *Darwiniana*, v.11, p.431–455. 1957.
- KRAPOVICKAS, A.; VANNI, R. O.; WILLIAMS, D. E.; WILLIAMS, K. A.; SÁNCHEZ, R. 2001. In: *Actas de la III Reunión Latino Americana de Especialistas en Arachis*, 56–62. Instituto Agronómico de Paraná, Londrina, Paraná, Brazil. 2001.
- LAVIA, G. I. Ph. D. Thesis, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. 1999.
- LAVIA, G. I. *Bonplandia*, v.9, p.111–120. 1996.

- MOSCONE, E. A.; MATZKE, M. A.; MATZKE, A. J. M.. *Chromosoma*, v.105, p.231-236. 1996.
- PAIK-RO, O. G.; SMITH, R. L.; KNAUFT, D. A. *Theoretical and Applied Genetics*, v.84, p.201–208. 1992.
- RAINA, S. N.; MUKAI, Y. *Genome*, v.42, p.52–59. 1999a.
- RAINA, S. N.; MUKAI, Y. *Plant Systematics and Evolution*, v.214, p.251–262. 1999b.
- RAMAN, V. S. *Indian Oilseeds Journal*, v.4, p.90–92. 1960.
- SCHMIDT, T., SCHWARZACHER, T.; HESLOP-HARRISON, J. S. *Theoretical and Applied Genetics*, v.88, p.629–636. 1994.
- SCHWARZACHER, T.; AMBROS, P.; SCHWEIZER, D. *Plant Systematics and Evolution*, v.134, p.293-297. 1980.
- SIMPSON, C. E. *Peanut Science*, v. 28, p.114-116. 2001.
- SIMPSON, C. E., KRAPOVICKAS, A.; VALLS, J. F. M. *Peanut Science*, v.28, p.78-80. 2001.
- SINGH, A. K. *Plant Systematics and Evolution*, v.160, p.143–151. 1988.
- SINGH, A. K. *Theoretical and Applied Genetics*, v.72, p.164–169. 1986a.
- SINGH, A. K. *Theoretical and Applied Genetics*, v.72, p.433–439. 1986b.
- SINGH, A. K., & J. P. MOSS. *Theoretical and Applied Genetics*, v.68, p.355–364. 1984.
- SINGH, A. K.; SMARTT, J. *Genetic Resources and Crop Evolution*, v.45, p.113-118. 1998.
- SMARTT, J.; GREGORY, W. C. 1967. *Oleagineux*, v.22, p.455–459. 1967.
- SMARTT, J.; GREGORY, W. C.; GREGORY, M. P. *Euphytica*, v.27, p.665–675. 1978.
- STALKER, H. T.; MOZINGO, L. G. *Peanut Science*, v.28, p.117–123. 2001.
- STALKER, H. T.; WYNNE, J. C. *Peanut Science*, v.6, p.110–114. 1979.
- UPADHYAYA, H. D.; FERGUSON, M. E.; BRAMEL, P. J. *Peanut Science*, v.28, p. 89–96. 2001.
- VALLS, J. F. M.; RAMANATHA RAO, V.; SIMPSON, C. E.; KRAPOVICKAS, A. 1985. *In Proceedings of an International Workshop on Cytogenetics of Arachis*, 15–35. International Crop Research Institute for the Semi-Arid Tropics, India.
- WANZENBÖCK, E. M.; SCHÖFER, C.; SCHWEIZER, D.; BACHMAIR, A. *The Plant Journal*,v.11, p. 1007-1016. 1997.
- WYNNE, J. C.; HALWARD, T. *Plant Science*, v.8, p.189–220. 1989.

BIOGEOGRAPHY OF WILD *Arachis* : IDENTIFICATION OF CONSERVATION GAPS

Jarvis, A.^{1,2} and Williams, D.³

¹International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI)

²International Centre for Tropical Agriculture (CIAT)

³United States Department of Agriculture – Foreign Agriculture Service (USDA – FAS)

Abstract

Here we present the results of biogeographic analyses of wild species of the cultivated peanut (*Arachis* spp.) using innovative techniques involving geographic information systems (GIS). The analyses are made to support the development of strategies for promoting the conservation and use of these important genetic resources. The analysis is made on a database of germplasm accessions and herbarium samples, and FloraMap is used to define the climatic adaptation of each species, and predict its potential geographic distribution. Geographic patterns of diversity are analysed using DIVA based on existing collections and are compared with the potential distribution of diversity from the FloraMap analyses. Based on these results priority areas are identified for *in situ* and *ex situ* conservation.

Resumen

Se presentan los resultados de unos análisis de la distribución biogeográfica de especies silvestres de maní (*Arachis* spp.) mediante algunas herramientas nuevas de Sistemas de Información Geográfica (SIG). Los análisis fueron realizados para apoyar el desarrollo de estrategias para promover la conservación y uso de estos importantes recursos fitogenéticos. Una base de datos georeferenciados, correspondientes a muestras de germoplasma y de herbario, fue analizada utilizando FloraMap para definir la adaptación climática de cada especie y sus distribuciones potenciales. Patrones de diversidad fueron analizados utilizando DIVA, incluyendo análisis de diversidad actual en las colecciones, además de diversidad potencial que se espera encontrar en el campo. Con base a esta información algunos áreas de prioridad para conservación *ex situ* o *in situ* fueron identificadas.

Introduction

The conservation of wild relatives of the world's crops is critical for crop improvement programs and the long-term sustainability of crop production in the face of a changing environment and novel biotic pests and diseases. This is especially the case in peanut, with compelling examples of wild relatives being used to improve cultivated peanut varieties, specifically in the area of disease resistance (Simpson and Starr, 2001). In this example, Simpson and Starr (2001) produced a new variety of peanut by combining the popular Florunner variety of peanut with two wild relative species, *Arachis batizocoi* and *Arachis cardenasii*, with the objective of increasing resistance to root-knot nematodes. The resultant new variety, named COAN, was found to have a population of root-knot nematodes of more than 90% less than the original Florunner variety that was used in the breeding program. This clearly shows

the importance of peanut wild relatives (68 currently described species in the genus *Arachis*) for future improvements of cultivars.

However, when the “Catalog of *Arachis* Germplasm Collections” compiled by Stalker et al. (2000) (available at <http://www.icrisat.org/text/research/grep/homepage/groundnut/arachis/start.htm>) is consulted, there are just 12 germplasm collections of *A. batizocoi* and 17 germplasm collections of *A. cardenasii*. Given the proven value of these genetic resources for crop improvement programs, scientists are having to rely on a very poor genetic base that is currently conserved in our genebanks. These collections are likely incomplete and unrepresentative of the full genetic diversity that is present in the wild. For these reasons, this paper makes a biogeographic analysis of the genus *Arachis* (68 species excluding *Arachis hypogaeae*) in order to understand the climatic adaptation of wild peanuts and to assess the conservation status of each species. The paper concludes by discussing the priorities (biological and geographic) for future conservation efforts.

This paper is based on the more detailed work presented in Jarvis *et al.* (2003) and Ferguson *et al.* (in press). Readers interested in finding greater detail on the methodology and results are urged to consult these papers.

Methodology

The data presented in this paper were derived from the “Catalog of *Arachis* Germplasm Collections” compiled by Stalker et al. (2000), available at <http://www.icrisat.org/text/research/grep/homepage/groundnut/arachis/start.htm>. The data are a compilation of collections of 2175 unique observations of wild *Arachis* germplasm accessions, herbarium specimens, and citations from Krapovickas and Gregory (1994), each collection with accurate geographic coordinates. Geographic analyses are performed using generic GIS software (Arcview), alongside two software products specifically designed for geographic analysis of plant collections: DIVA-GIS and FloraMap. DIVA-GIS (available for free from www.diva-gis.org) is used to analyse the geographic characteristics of the distribution of each species (the area and shape of distribution, density of collections), and also to map the geographic distribution of species richness in the collections. Two measures of geographic distribution are used; RCA_{50} which models the likely distributional area by drawing circles of 50km radii around each collection point and calculating the total area only including overlapping areas once, and MaxD which measures the maximum distance between collection points (Figure 1). These two indices (MaxD and RCA_{50}) are then plotted against each other to examine the shape of the geographic range and attempt to identify potentially incomplete collections in terms of geographic coverage. Species with a uniform, rounded and even distribution are likely to have a high RCA_{50} relative to their MaxD, whilst species with a disjunct or fragmented distribution will have a high MaxD relative to the CA_{50} statistic. Unless there is a clear biogeographic reason for a disjunct distribution (e.g. *A. stenosperma*), it can indicate incomplete geographic representativeness of the collection, with large geographic holes in sometimes an extensive but continuous distribution of the species. Further information about DIVA-GIS and its use in plant genetic resource conservation and use are available in Hijmans et al. (2001), Hijmans et al. (2002), and Guarino (2001).

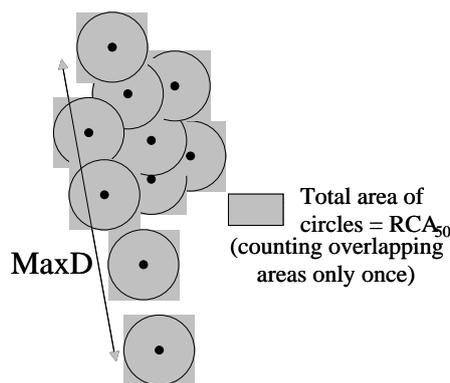


Figure 1 Graphic representation of geographic distributional statistics used to assess the geographic representativeness of collections. In this case the model species is fairly densely collected, though some attention should be directed towards populations in the southern range.

FloraMap is used specifically to predict the geographic distribution of each species using species distribution modeling based on their climatic adaptation. Firstly, the climate at each point of collection is extracted, and this data is subjected to a principal components analysis (PCA) in order to assess the climatic adaptation for each species. Species distribution modeling is also used, which in simple terms quantifies the multi-variate envelope of climatic adaptation that each species is found to have, and applies this to the whole continent to locate areas outside of the known range of the species which are climatically suitable to harbor the species. This was only possible for 52 of the 68 species where there were sufficient collections (more than 10) to build a model of the climatic adaptation of the species. The distribution of each species is then aggregated to produce a map of *potential* species richness, and is used to identify currently under collected regions where *ex situ* or *in situ* conservation projects should be focused. Detailed discussion of the FloraMap method is available in Jarvis et al. (2003), Jones et al (2002) and Jones and Gladkov (2000).

Results and Discussion

Most species have a narrow distributional range, with 15 species having a MaxD of less than or equal to 100 km and a further 12 species having a MaxD of less than 200 km. Thirteen species have a MaxD greater than 1000 km, with *A. repens* having the greatest MaxD of 3606 km. This is likely due to its spread through cultivation as a forage crop. *A. prostrata*, *A. sylvestris* and *A. glabrata* are also broadly distributed, with MaxD in excess of 1600km. Fifteen species have a RCA_{50} of less than or equal to 2 (i.e two complete circular areas), and 41 species have a RCA_{50} of less than 5, indicating very narrow geographical ranges for many *Arachis* species. When RCA_{50} is plotted against MaxD (Figure 2), it is possible to identify species that are regularly or irregularly geographically distributed, and also identify species with potentially low collection densities. Species such as *A. glabrata* and *A. burkartii* appear as being regularly distributed, and well collected, whilst *A. repens*, is highlighted as a clearly under-

collected species, with a large potential area of distribution, but a low density of collections. This may in part be a sampling error, with some cultivated collections appearing erroneously in the database. Also worthy of note are *A. diogoi* and *A. pusilla*, with low density in collections despite a potentially extensive geographic range.

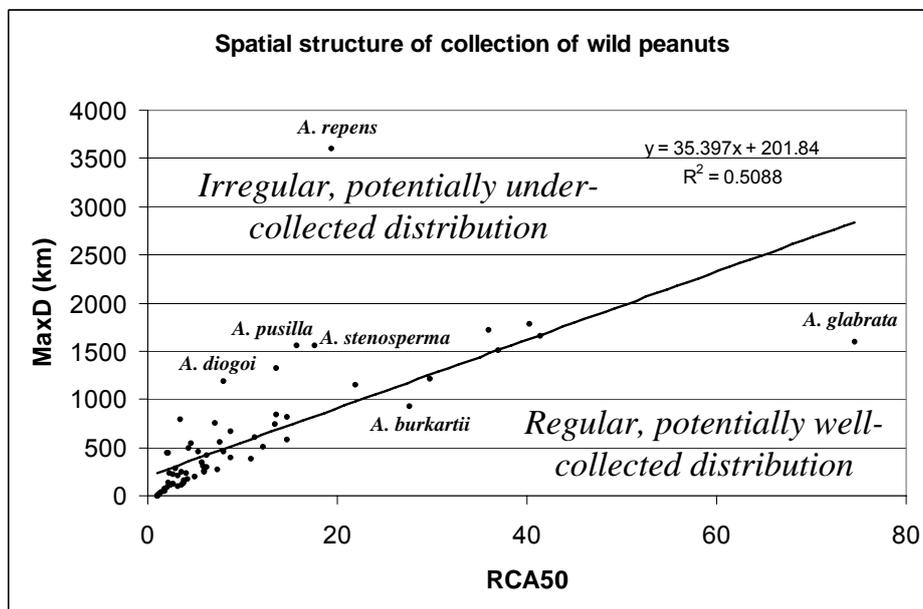


Figure 2: Geographic structure of wild *Arachis* collections for each species

Upon examination of species climatic adaptations (Figure 3), a large group of species are fairly similarly adapted, but some clear outliers are evident. *A. marginata*, *A. retusa* and *A. decora* are detached from this group and displaced in the positive direction of PC1, indicating adaptation to a relatively high winter rainfall and low summer rainfall. *Arachis villosa* and *A. burkartii* are displaced in the negative direction, indicating an adaptation to low winter rainfall and high summer rainfall. No species are particularly detached from the main group in the positive direction of PC2 indicating that many species are adapted to high temperatures, but *A. monticola* is isolated away from all other species in the negative direction indicating adaptation to lower temperatures. Indeed many of these species are likely to be adapted to higher temperatures still, as the limiting factor in these adaptations appears not to be the biological adaptation of the species, but the existence of land on continental Latin America with higher temperatures.

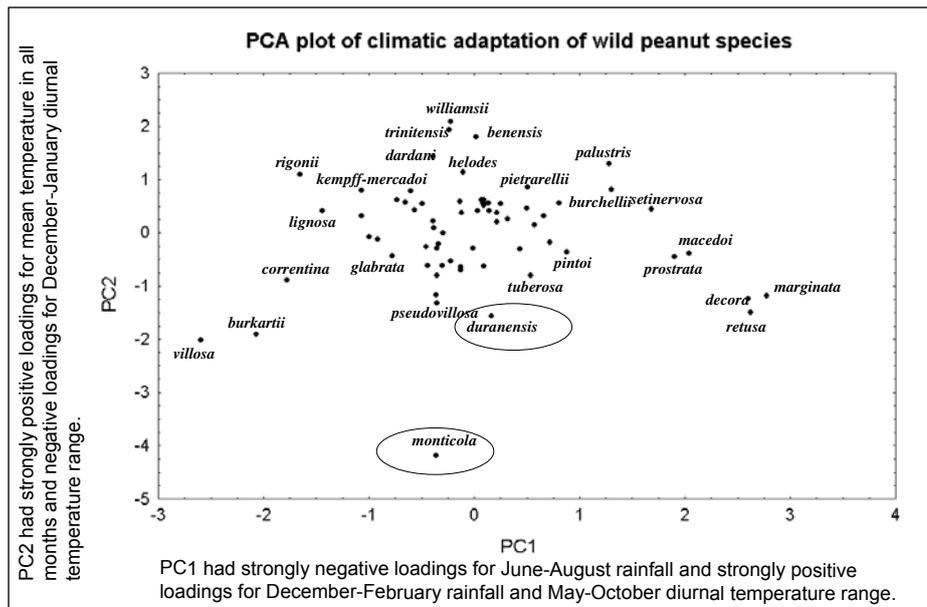


Figure 3 Multi-variate analysis of climatic adaptations for each species, with potential progenitor species highlighted

Finally, a geographic analysis of species richness is presented, examining both the species richness as measured by existing collections (Figure 4) and the predicted species richness derived from aggregating individual potential species distributions predicted using FloraMap (Figure 5). The general pattern of richness is similar in both cases, with a clear hotspot in Matto Grosso do Sul west of Campo Grande, with as many as 15 species found to exist sympatrically. Also of importance are the region of Serra Geral de Goias northeast of Brasília, and the region 170 km south of Cuiabá in Mato Grosso. A species richness of 10 is predicted for one area 300 km southeast of the city of Cuiabá near Pedro Gomes, where no collections registered in the database have been made. This is a clear priority area for *ex situ* or *in situ* conservation. It is important to note that none of the hotspots coincide with existing protected areas.

Neither of these maps take into account habitat availability for the species. Many of the collections date from many years ago, and there is high probability of significant habitat alterations since the date of collections, indicating likely local extinction of the species in areas under intensive cultivation. Likewise, the predicted distributions are based on climate alone, and fail to take into account habitat. Therefore it is likely that the maps of species richness presented here are likely overestimates, and the true state of this richness in the field is likely significantly lower. Jarvis et al. (2003) make a detailed analysis of the impact of habitat loss on wild *Arachis* distributions.

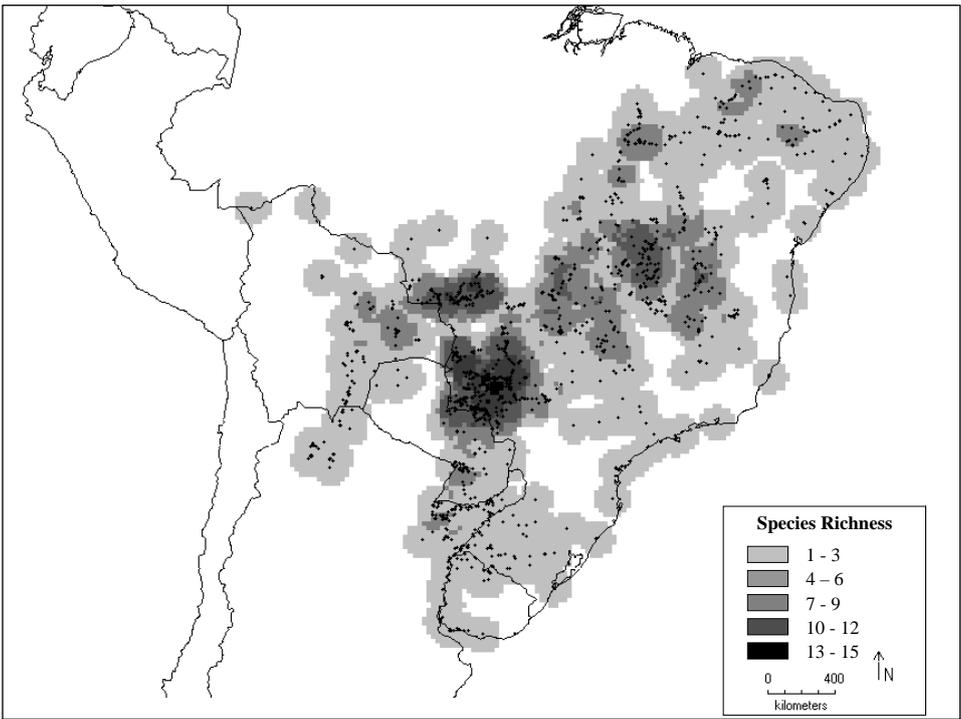


Figure 4 Actual distribution of species richness in wild *Arachis* collections

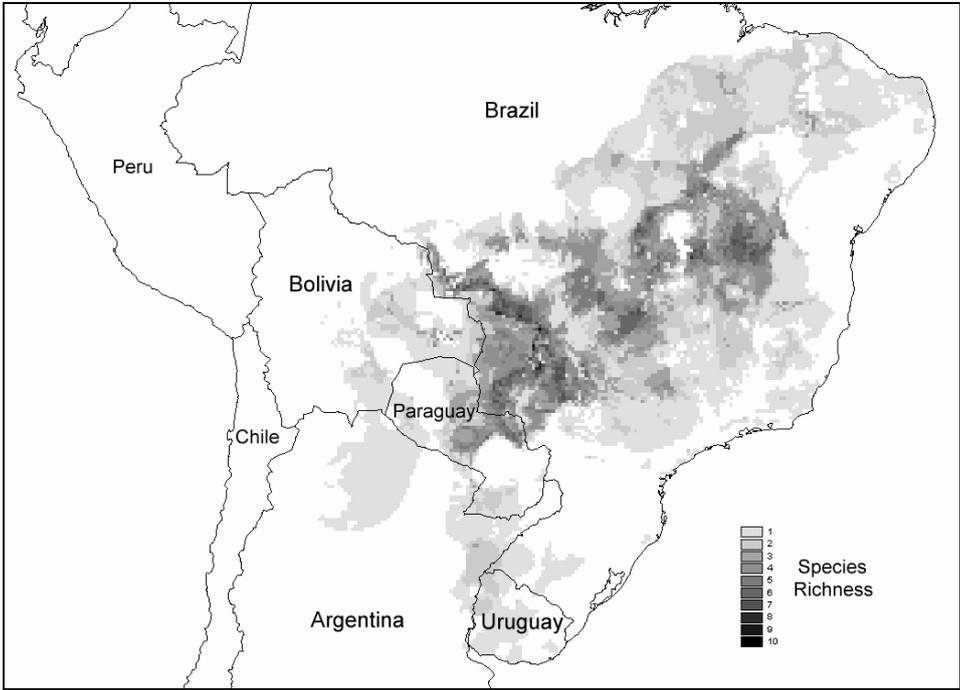


Figure 5 Predicted distribution of species richness in wild *Arachis*

Conclusions

This brief analysis has quantified the geographic distribution of wild *Arachis* species and richness of the genepool as a whole. Despite the proven value of these genetic resources, and the clear holes in our germplasm collections of wild *Arachis*, limited funding for *ex situ* and *in situ* conservation of these resources and restrictive access policies to genetic resources are hurting the conservation status of many of these species. More *ex situ* collections are required for a number of species and regions, and greater *in situ* conservation would greatly enhance the long-term status of these species both in the wild and in our genebanks.

This is just a brief presentation of some results discussed in far greater detail in Jarvis et al. (2003) and Ferguson (in press), and interested readers are referred to these for more complete analysis of wild *Arachis* biogeography.

References

- FERGUSON, M.E., A. JARVIS, H.T. STALKER, J.F.M. VALLS, R.N. PITTMAN, C.E. SIMPSON, P. BRAMEL, D. WILLIAMS, L. GUARINO. In press. Biogeography of wild *Arachis*: Distribution and Environmental Characterisation. Biodiversity and Conservation.
- GUARINO L, A. JARVIS, R.J. HIJMANS, & N. MAXTED, 2001. Geographic Information Systems (GIS) and the conservation and use of plant genetic resources. In: ENGELS J. et al. (eds.), Managing Plant Genetic Diversity, p.p. 387-404, CAB International, Wallingford, UK.
- HIJMANS, R.J., M. CRUZ, E. ROJAS, and L. GUARINO. 2001. DIVA-GIS, Version 1.4. A geographic information system for the management and analysis of genetic resources data. Manual. International Potato Center, (CIP), Lima, Peru.
- HIJMANS, R., L. GUARINO, M. CRUZ, and E. Rojas. 2002. Plant Genet. Res. Newsl. 127:15-19.
- JARVIS A., M. FERGUSON, D. WILLIAMS, L. GUARINO, P. JONES, H. STALKER, J. VALLS, R. PITTMAN, C. SIMPSON & P. BRAMEL, 2003. Crop Sci. 43:1100-1108.
- JONES, P.G., and A. GLADKOV. 1999. FloraMap: A computer tool for the distribution of plants and other organisms in the wild. CIAT, Cali, Colombia.
- JONES, P., L. GUARINO, and A. JARVIS. 2002. Plant Genet. Res. Newsl. 130:1-6.
- SIMPSON, C., and J. STARR. 2001. Crop Sci. 41(3):918.
- STALKER, H.T., M.E. FERGUSON, J.F.M VALLS, R.N. PITTMAN, C.E. SIMPSON, and P. BRAMEL. 2000. Catalog of *Arachis* germplasm collections. Available at: <http://www.icrisat.org/text/research/grep/homepage/groundnut/arachis/start.htm>.

NUEVAS COLECCIONES DE *Arachis* DESDE LA PUBLICACIÓN DE LA BASES DE DATOS EN INTERNET

SEIJO, J.G.

Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal, e Instituto de Botánica del Nordeste. CC. 209 3400 Corrientes, Argentina. e-mail: seijo@agr.unne.edu.ar

Luego de la monografía de Krapovickas & Gregory (1994), de diversos tratamientos de las colecciones más recientes (Valls et al, 1995, Valls, 2001), los datos de las colecciones fueron compilados en una base de datos y publicados en Internet.

Desde ese evento se han realizado varias colecciones, principalmente en Brasil, Paraguay, Argentina y Uruguay, obedeciendo a diversos objetivos particulares, pero todos en general tendientes a ampliar la base de recursos genéticos de especies silvestres. Se han realizado 20 expediciones, con duración y equipos diferentes. El nuevo germoplasma coleccionado está siendo conservado en diversos bancos de germoplasma y los ejemplares de herbario testigo han sido distribuidos a diversos herbarios del mundo. Por otra parte, muchas accesiones ya han sido evaluadas abarcando diversos aspectos biosistemáticos, agronómicos así como biotecnológicos, y otras lo serán en el futuro.

VIAJES DE COLECCIÓN

BRASIL, Mato Grosso, Noviembre 2001, J.F.M.Valls - F.Oliveira Freitas & G.P.Silva.
PARAGUAY, Centronorte, Mayo 2002, P.J.Caballero, M.J. Williams, R.N. Pittman & E.A. Pizarro.

PARAGUAY, Centro norte, Mayo-Junio 2003, P.J.Caballero, L.E. Robledo, M.J. Williams, R.N. Pittman & E.A.Pizarro.

PARAGUAY, Oeste, D. Williams, C.Simpson, Vargas, Jarvis y Quintana

URUGUAY, Noviembre Diciembre 2001. J.G. Seijo, V.G. Solís Neffa, C. Peichoto & M. Sosa.

ARGENTINA, Noroeste, Enero 2002. J.G. Seijo, V.G. Solís Neffa, J. Chilian & D. Hojsgaard.

ARGENTINA, Noreste, Marzo 2002. J.G. Seijo, G. I. Lavia & V.G. Solís Neffa.

ARGENTINA, Noroeste, Mayo 2002. J.G. Seijo & V.G. Solís Neffa.

ARGENTINA, Noreste, Mayo 2002. J.G. Seijo & V. Solís Neffa.

LISTA DE ESPECIES POR SECCIONES

Extranervosae

A. lutescens Krapov. & Rigoni [=*A. prostrata* Benth. ?]

Erectoides

A. paraguariensis Chodat & Hassl. (o *A. stenophylla* Krapov & W. C. Gregory)

Caulorrhizae

A. repens Handro

Procumbentes

- A. subcoriacea* Krapov & W. C. Gregory
- A. matiensis* Krapov, W. C. Gregory & C. E. Simpson
- A. lignosa* (Chodat & Hassl.) Krapov & W. C. Gregory

Arachis

- A. glandulifera* Stalker
- A. helodes* Mart. ex Krapov. & Rigoni
- A. praecox* Krapov., W.C.Gregory & Valls
- A. kuhlmannii* Krapov. & W.C.Gregory
- A. gregoryi*
- A. simpsonii* Krapov. & W.C.Gregory
- A. magna* Krapov., W.C.Gregory & C.E.Simpson
- A. microsperma* Krapov., W.C.Gregory & Valls
- A. batizocoi* Krapov. & W.C.Gregory
- A. duranensis* Krapov. & W.C.Gregory
- A. correntina* (Burkart) Krapov. & W.C.Gregory
- A. monticola* Krapov. & Rigoni
- A. villosa* Benth.

Rhizomatosae

- A. glabrata* Benth. var. *glabrata*
- A. glabrata* Benth. var. *Hagenbekii*
- A. burkartii* Handro.

SECCIONES	ESPECIES Y ACCESIONES POR PAÍS				ESP./SECC.
	ARGENTINA	BRASIL	PARAGUAY	URUGUAY	
<i>Erectoides</i>			1 (6)		1
<i>Extranervosae</i>		1			1
<i>Caulorrhizae</i>		1	1		1
<i>Procumbentes</i>		2 (4)	1 (5)		3
<i>Rhizomatosae</i>	2 (25)		1 (47)	1 (9)	2
<i>Arachis</i>	4 (42)	7 (55)	4 (12)		12
sp			5		
TOTAL	6 (67)	11 (61)	8 (76)	1 (9)	20

COMENTARIOS

En las secciones *Extranervosae*, *Erectoides*, *Caulorrhizae* y *Procumbentes* las nuevas colecciones no han producido grandes cambios con respecto al conocimiento que se poseía sobre la variabilidad y distribución de las especies.

Los avances más significativos han ocurrido en las secciones *Arachis* y *Rhizomatosae*. Con respecto a la sección *Arachis*, las nuevas colecciones en Brasil ayudarán a esclarecer la circunscripción de *A. magna*, *A. ipaensis* y *A. gregoryi*, que debido a las escasas accesiones con que se contaba no se habían podido realizar estudios comprensivos de las mismas. El análisis de un mayor número de accesiones permitirá evaluar la variabilidad intraespecífica de cada taxón y de esta

forma poder establecer un criterio taxonómico más claro en lo que respecta a estas entidades.

Un hecho relevante corresponde al hallazgo de la segunda población de *A. praecox* (Valls et al 14682) al NW de Cuiaba. Esta especie es una de las pocas con $2n=18$ hasta ahora conocidas, por lo que la adición de este nuevo material resulta muy valioso para los estudios de evolución cariotípica de las especies con $x=9$. También en este viaje a Mato Grosso se ha confirmado la presencia de *A. glandulifera* en Brasil, habiéndose obtenido la segunda colección de esta especie para este país.

En los viajes realizados al Oeste de Paraguay se han coleccionado algunas poblaciones interesantes de *A. batizocoi* y una accesión considerada por los coleccionistas como *A. correntina*. Esta colección es interesante ya que el área de *A. correntina* en Paraguay es muy pequeña y restringida a la zona cercana a Asunción.

En los viajes por Argentina, se han realizado colecciones nuevas de muchos materiales que se encuentran en los bancos de germoplasma desde hace varias décadas. Dos razones principales condujeron a realizar estas colecciones, en primera instancia contar con material original de poblaciones naturales para realizar estudios biosistemáticos. Segundo, poder evaluar la variabilidad intrapoblacional, ya que no se cuenta con información de cuantas semillas habían sido coleccionadas originalmente y a partir de las cuales se establecieron las parcelas en los bancos. Además, se pretende coleccionar distintas poblaciones de cada especie, tratando de cubrir todo el área de distribución de las mismas. En general se ha observado que cuando se encuentran poblaciones más o menos grandes, los individuos que las componen presentan variabilidad en diversos caracteres, pero los más notorios a simple vista, son los grados y tipos de pubescencia así como el tamaño y la forma de los folíolos. Entre las poblaciones, la variación también es notoria, agregándose en este caso, la variación en porte de la planta y el color de las flores.

Probablemente el hecho más significativo de estas colecciones es una población de *A. monticola* en las proximidades de la ciudad de Salta, la que estaría en relación a la cuenca del río Juramento y al río Salado, y no a la cuenca del río Bermejo como las dos poblaciones de Jujuy que ya se conocían. La nueva población esta formada por unos pocos individuos (unas pocas decenas) y crece simpátricamente con *A. duranensis*. Presenta $2n=40$ cromosomas y los patrones de distribución de rDNA son muy semejantes con las poblaciones ya conocidas.

Con respecto a la la sección *Rhizomatosae*, en las dos expediciones realizadas a Paraguay las colecciones han sido muy importantes especialmente en lo que concierne a *A. glabrata*. Las colecciones estuvieron dirigidas hacia la incorporación de materiales para el mejoramiento de especies perennes de uso forrajero y el control de la erosión del suelo en USA. Además, la gran mayoría de los materiales coleccionados aparenta poseer gran potencial ornamental y como material de cobertura de bajo mantenimiento. Se han recopilado datos sobre el uso de *A. glabrata* por productores locales y coleccionado materiales muy diversos de esta especie, tanto de la variedad tipo como de la variedad *hagenbekii*.

En Uruguay se ha coleccionado un buen número de accesiones de *A. burkartii*, cubriendo casi toda la extensión de la especie en este país. Se ha observado un alto nivel de variabilidad tanto intra como interpoblacional. En varias de las poblaciones fue muy notoria la variabilidad en color de flores, donde generalmente el color naranja era más abundante que el amarillo.

Las colecciones de especies de esta sección en Argentina también fueron abundantes y presentaron como en los otros países una alta variabilidad. Estos materiales están siendo utilizados para el desarrollo de protocolos de cultivo in vitro, micropropagación y crioconservación.

Considerações sobre a utilização do germoplasma coletado

Tradicionalmente, la utilización experimental de las especies de *Arachis* se ha concentrado en un número pequeño de accesiones e inclusive en muchos casos solo se limitaron al análisis de un único individuo por taxón. Sin embargo, dadas las características reproductivas (poblaciones pequeñas, autogamia, geocarpia) y de distribución del género es probable que los resultados hasta ahora obtenidos se encuentren un tanto viciados por las muestras utilizadas. Resulta entonces de fundamental importancia, para alcanzar un conocimiento cabal de la diversidad del género la inclusión del máximo de poblaciones posibles en los ensayos experimentales. Para esto es clave la incorporación de nuevas colecciones a los bancos de germoplasma mediante el trabajo colaborativo de los diferentes países y el intercambio de materiales entre las partes involucradas en el estudio del género.

Agradecimientos: A los coleccionistas que me brindaron la información para hacer este resumen. Al CONICET (Beca posdoctoral de JGS) y SGCYT (PI-580) de la UNNE y a la Comunidad Europea (INCO-DEV contract no. ICA4-CT - 2001-10072) y a la Myndel Botanica Fundation por el apoyo financiero brindado.

BIBLIOGRAFÍA

- KRAPOVICKAS, A. Bonplandia, 1994.
VALLS, J.F.M. In: Collecting Plant Genetic Diversity. 1995. Chapter 35.
VALLS, JFM. SIRGEALC 2001.

VIAJE DE COLECTA DE GERMOPLASMA DE *ARACHIS* EN PARAGUAY

Pizarro, E.A.¹; Williams, M. J.²; Pittman, R.N.³; Caballero, P.J.⁴ y Robledo, L.E.⁵

¹ Universidad Federal do Paraná. Profesor Visitante - Bolsista da CAPES. Curitiba, Paraná, Brasil. ² USDA, Agricultural Research Service. Subtropical Agricultural Research Station. Brooksville, FL. EE.UU., ³ USDA, Agricultural Research Service. Plant Genetic Resources. Conservation Unit. Griffin, GA, EE.UU., ⁴ Instituto Agronómico Nacional. MAG. Caacupé, Paraguay., ⁵ Dirección de Investigación Agrícola. MGA. Asunción, Paraguay.

Prioridades de colecta

Género prioritario de colecta: *Arachis* spp., particularmente *A. glabrata* y *A. lignosa*.

Criterios de colecta

Criterios agronómicos específicos tomados en cuenta para la selección del germoplasma: Producción de semilla, capacidad de asociación, tolerancia al pastoreo, inundaciones, sequía y bajas temperaturas, así como baja sensibilidad a fotoperíodo

Uso potencial previsto

Uso previsto para el germoplasma colectado: Mejoramiento cooperativo en especies anuales y perennes de *Arachis* para uso forrajero, cobertura y control de la erosión en EE.UU., y mercados internacionales; así como estudios de modelación para mejorar la plasticidad al fotoperíodo en el crecimiento y desarrollo de nuevos materiales.

Participantes:

Dr. M. J. Williams (Wi)
Dr. R. N. Pittman (Pm)
Ing. Agr. L. E. Robledo (Rb)
Ing. Agr. P. J. Caballero (Cb)
Dr. E. A. Pizarro (Pz)

Principales resultados

Recursos fueron adjudicados por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos, Agricultural Research Service, Plant Exchange Office (USDA, ARS, PEO) para colecta y evaluación de germoplasma de *Arachis* en Paraguay, para uso como forraje y usos alternativos. El proyecto de colecta tuvo dos fases, que fueron ejecutadas durante 2002 (Fase 1) y 2003 (Fase 2).

Fase 1

Fueron recorridos más de 5000 km cubriendo parcialmente nueve Departamentos de la parte central, sur y norte del país.

Sesenta y siete accesiones de especies nativas y cultivadas del género *Arachis*, que en principio representan a seis especies, fueron colectadas (Cuadro 1).

Cuadro 1. Germoplasma de *Arachis* spp. colectado en Paraguay durante 2002

Especie	Número de accesos
<i>Arachis glabrata</i>	27
<i>Arachis hypogaea</i>	12
<i>Arachis repens</i>	1
<i>Arachis</i> spp.	27

Colectores 2002: CbWIPmPz

A pesar de haberse colectado algunas semillas en varias de las especies nativas, la mayoría del material era inmaduro.

La gran mayoría del material colectado aparenta poseer gran potencial como uso ornamental así como material para cobertura de bajo costo de mantenimiento. En particular, el material de *A. lignosa* colectado en el Departamento de Concepción y *A. glabrata* colectado en los Departamentos de Paraguari y Misiones pueden ser de gran importancia forrajera para zonas anegadas en zonas tropicales y subtropicales en varias zonas del mundo.

El presente trabajo de campo resalta la ocurrencia de áreas muy extensas (> 200 ha) de

A. glabrata y *A. lignosa* en poblaciones naturales bajo pastoreo.

Fue observado, así como ocurre en países en desarrollo, que la conversión del tapiz nativo en áreas con nuevas forrajeras y sistemas de producción pueden llegar a perjudicar las poblaciones nativas en varias regiones del país. El desarrollo y el esfuerzo realizado por el gobierno Paraguayo con el objetivo de mejorar la infraestructura del transporte parecen alterar la distribución de las especies nativas. En el caso de *A. glabrata*, la gran mayoría de las poblaciones colectadas estaban localizadas a lo largo del camino en zonas recientemente transportadas de su sitio original. Desafortunadamente, este hecho sugiere que la mayor parte de las poblaciones menos vigorosas pueden llegar a ser fatalmente perjudicadas, por efecto del movimiento del suelo así como por la competencia de nuevas especies de gramíneas forrajeras.

En este sentido, los miembros del presente grupo de colecta sugieren la realización de nuevas expediciones con el principal objetivo de realizar un esfuerzo en coleccionar, identificar y preparar un catálogo que describa el valor potencial que posee Paraguay en sus principales ecosistemas.

La colección fue dividida y una parte del material colectado fue entregado al Ing. Agr. Pedro Juan Caballero, participante del grupo de colecta y miembro del MAG.

Los números de identificación del material colectado y las muestras del herbario fueron procesadas con la siguiente característica: CbWIPmPz

Fase 2

Previo al segundo viaje, realizado en el año 2003, el grupo de colecta se reunió con el Ing. Agr. Victor Santander (perteneciente al Ministerio de Agricultura), y en primera instancia se presentó un informe sobre el comportamiento del germoplasma colectado previamente. Dicha discusión incluyó la cooperación y el apoyo realizado por el Prof. A. Krapovickas del Instituto de Botánica del Nordeste, Corrientes – Argentina, en la identificación del material colectado.

Se destacó el esfuerzo realizado en el Plant Genetic Resources Unit en Griffin, GA, por el Dr. Roy Pittman en la multiplicación del material colectado en el 2002. Luego, Dr. M. Williams describió los planes de trabajo realizados en la evaluación agronómica a nivel regional que se lleva a cabo en EE.UU.

El plan inicial fue el de continuar los esfuerzos realizados en la colecta anterior en la región NE del Departamento de Concepción, los cuales, fueron interrumpidos en el 2002 por exceso de lluvia.

Fue coordinada una visita con el propietario de la Estancia Bello Horizonte Ing. Agr. Máximo Codas. La Estancia, se encuentra localizada aproximadamente 100 km al NE de Concepción. Esta propiedad posee 14,000 ha, de las cuales 5000 ha se mantienen con vegetación nativa. La mayoría de los suelos son calcáreos. Nuestro principal interés era ver la población de *A. glabrata* (961). Previa entrevista con el administrador, pocos kilómetros al este del camino público, fue localizada la población 983, un *A. glabrata* similar al 961. Las plantas se encuentran en una zona de suelo negro - arenoso, entre rocas arredondeadas. La vegetación acompañante esta constituida en su mayoría por *Imperata braziliensis* y *Setaria geniculata* y otras leguminosas tales como *Tefrosia* sp. y dos especies de *Mimosa*. La población es extensa y ocupa aproximadamente 5 ha. En este sitio, la densidad de la población fue estimada en aproximadamente 30 plantas por metro cuadrado. Para ello fueron realizadas 7 estimaciones en cuadrados de 0.25 m².

Continuamos hacia el E dentro de la estancia y varias poblaciones similares de *A. glabrata* fueron localizadas en áreas donde la vegetación nativa esta presente. El administrador informó que ha visto el mismo tipo de *Arachis* en todas las zonas de campo nativo, y enfatizó que el ganado pastorea exclusivamente la leguminosa durante los meses del verano (Noviembre – Diciembre). Material similar fue hallado en localidades a 10 km al norte y sur del área visitada. Esta información sugiere que el presente material sería la mayor población de *Arachis* nativo reportada en el mundo.

Retornamos hacia el NE en la ruta a Vella Mi con el objetivo de documentar el rango de dispersión de *A. glabrata* en esta zona de suelos calcáreos. Aproximadamente a 3 km al norte de Colonia San Alfredo fue localizada una población extensa con material semejante a la localizada el día anterior. Es importante mencionar que el *A. glabrata*, presentaba un ataque severo de arañuela roja (red spider mites).

El viaje realizado al Departamento de Amambay, fue en parte realizado para conocer las poblaciones existentes y reportadas de varias poblaciones de *Arachis* spp., incluyendo *A. major*, *A. guaranítica*, y *A. tuberosa*. En esta parte del Departamento de Amambay la topografía varía mucho. Desde la Cordillera de Amambay en el borde E con la frontera con Brasil, al W en zona de montañosa y de valle del Cerro Cora, y al Oeste donde gradualmente se localiza la zona de sabana al E del Departamento de Concepción. Recientemente, la mayor parte de la vegetación nativa de Cerro Cora, ha sido transformada en una zona de cultivos y pasturas introducidas. Fue recorrida la ruta paralela al límite con Brasil en dirección a Colonia Estrella. La zona plana, se encuentra sembrada con trigo y maíz, mientras que en la zona mas ondulada ha sido plantada con nuevas especies de *Brachiaria*. En ninguna de las paradas realizadas fue encontrada una planta de *Arachis* spp. Mismo sufriendo el impacto de una agricultura intensiva sobre las poblaciones nativas de *Arachis*, el hecho requiere mayor investigación en otras épocas del año. *Arachis*, generalmente no es el principal componente de la población, por tanto viajes de

prospección en período de floración son sugeridos. El deterioro de los caminos, debido a las grandes lluvias redujo el plan de colecta en el mencionado Departamento.

En varias ocasiones, productores y estancieros hicieron mención a esta “nueva leguminosa” para alimentación animal y sistemas de producción de cultivos-pasturas. Esta inquietud debe ser tomada en cuenta para en viajes futuros destinar tiempo para presentaciones en lugares tales como (Cooperativas/Facultades de Agronomía), mostrando el esfuerzo hasta el momento realizado por la Cooperación entre Paraguay y EE.UU. en la colecta, preservación y uso potencial del género *Arachis*.

Nuevamente, más de 5000 kilómetros fueron recorridos recorriendo nuevas áreas de la parte central, sur y norte del país.

Material rizomatoso encontrado en este viaje es de especial interés pues muestra un amplio rango de adaptación entre tipos de suelos y acidez.

Veinte y tres accesiones fueron colectadas, y la accesión (930) colectada en 2002 fue recuperada (Cuadro 2).

Cuadro 2. Germoplasma de *Arachis* spp. colectado en Paraguay durante 2003

Especie	Número de accesos
<i>Arachis glabrata</i>	15
<i>Arachis lignosa</i>	1
<i>Arachis paraguariensis</i> - <i>A. stenophylla</i>	5
<i>Arachis</i> spp.	2

Colectores 2003: CbRbWiPmPz

Acidez y textura fue analizada en las muestras de suelo colectadas. Fue acordado que un análisis completo sería realizado en el Ministerio de Agricultura y Ganadería. El material colectado fue inspeccionado por personal del Ministerio con el objetivo de expedir el certificado fitosanitario. Al mismo tiempo, se preparó un duplicado del germoplasma colectado y fue entregado a los colegas Paraguayos.

El material colectado en el presente viaje está identificado con las iniciales de los participantes CbRbWiPmPz.

Una versión ilustrada está disponible en inglés y español en Pasturas de América, en la siguiente dirección: Fase 1: <http://www.pasturasdeamerica.com/relatos/paraguay1.asp> y Fase 2: <http://www.pasturasdeamerica.com/relatos/paraguay3.asp>

PROBLEMAS FITOPATOLÓGICOS NO AMENDOIM

Suassuna, N. D.

Embrapa Algodão, Campina Grande, PB, Brasil, e-mail: suassuna@cnpa.embrapa.br

Qualquer anormalidade em toda a planta de amendoim ou partes desta (folhas, raízes, vagens ou sementes) é considerada uma doença. Doenças são causadas por agentes vivos (bióticas) ou por condições ambientais adversas (abióticas). Os agentes bióticos (fungos, bactérias, nematóides, vírus, viróides e fitoplasmas) causam as doenças de maior importância. O maior grupo de patógenos do amendoim são os fungos. Várias doenças são incitadas por estes organismos. No Brasil e na maioria dos países produtores de amendoim as principais doenças são as manchas castanha e preta causadas pelos fungos *Cercospora arachidicola* e *Cercosporidium personatum*, respectivamente. Outras doenças de ocorrência comum são a ferrugem (*Puccinia arachidis*), verrugose (*Sphaceloma arachidis*) e mancha barrenta (*Phoma arachidicola*). Diversas outras doenças ocorrem na cultura do amendoim, tanto causadas por fungos, bactérias, vírus ou nematóides e são revisadas em outros documentos. Aqui enfatizaremos as manchas castanha e preta, a verrugose, a mancha barrenta e a ferrugem.

Algumas doenças do amendoim possuem uma abrangência geográfica limitada, todavia as duas principais doenças foliares (manchas castanha e preta) ocorrem independente de onde o amendoim seja cultivado. Quando não se faz uso de fungicidas é comum ocorrerem perdas em produtividade acima de 50 %, podendo ultrapassar 70 %, quando as condições de ambiente são favoráveis ao desenvolvimento do patógeno e quando se opta por cultivares mais suscetíveis à doença.

Os primeiros sintomas de ambas as manchas surgem de seis a 14 dias após a deposição de esporos dos fungos na folha sadia. Estes primeiros sintomas são pintas, a princípio de aspecto clorótico, que se tornam enegrescidas e aumentam de diâmetro podendo ultrapassar 10 mm. Cerca de 15 dias após a deposição dos esporos as lesões já produzem esporos. Na face adaxial da folha as lesões são bastante semelhantes, todavia a mancha castanha além da tonalidade mais clara sempre possui um halo amarelado bem característico. Na mancha preta o halo pode ocorrer, mas em geral é de menos patente. Apesar de, na maioria das cultivares, os sintomas serem suficientes para distinguir as duas doenças, em algumas cultivares a diferença em coloração das manchas e a presença e intensidade do halo clorótico ao redor da lesão não são suficientes. Nesses casos, para uma diagnose mais precisa é necessário uma análise microscópica dos conídios.

Esporos produzidos nos restos de cultura são a principal fonte inicial de inóculo para novos plantios. Estes esporos são carregados principalmente pelo ar e são depositados sobre folíolos saudáveis. Na presença de água livre na superfície da folha, os esporos germinam, formam um ou mais tubos germinativos que podem penetrar na via indireta (pelos estômatos) ou penetrando as células da epiderme de maneira direta. A infecção e subsequente colonização de células da folha são dependentes de algumas variáveis climáticas, principalmente a umidade relativa do ar e a temperatura. Seguindo a colonização, são produzidos esporos assexuais (conídios) na superfície da lesão que irão garantir novos pontos de infecção. A liberação de conídios de *C. arachidicola* é favorecida por temperaturas entre 20-24°

C quando a umidade relativa é maior que 90%, a produção de esporos é maior durante longos períodos de molhamento foliar e epidemias são favorecidas por temperaturas maiores que 19° C e a umidade relativa excede 95% por períodos prolongados. Sob tais condições lesões de mancha castanha se desenvolvem de seis a oito dias (período de incubação). A colonização de *C. arachidicola* é mais agressiva, o fungo lança enzimas que degradam as células e em seguida coloniza as células mortas, o que é visualizado pela presença mais acentuada do halo clorótico. Já *C. personatum* produz estruturas denominadas haútórios que colonizam o interior da célula, inicialmente sem causar sua morte. O máximo de infecções de mancha preta ocorre quando a temperatura está em torno de 20° C e a umidade relativa excede 93% por um período de mais de 12 horas. Poucas infecções ocorrem quando a temperatura excede 28° C se a umidade relativa for alta por menos de 12 horas. Sob condições ambientais ótimas ao seu desenvolvimento, lesões de mancha preta surgem de dez a 14 dias após a deposição de esporos na folha sadia. Apesar de o período de incubação da mancha preta ser mais longo que o da mancha castanha, a primeira pode causar maiores perdas em um curto período de tempo devido a sua capacidade de produzir mais esporos por lesão.

Dois estratégias de manejo são aplicadas para reduzir o risco de epidemias. A primeira estratégia é reduzir o inóculo inicial por meio de rotação de culturas e eliminação dos resíduos de plantas da safra anterior. Rotação de culturas por 2-3 anos é salutar e implica em um adiamento no início da epidemia de 2 a 3 semanas. Plantas voluntárias de amendoim também devem ser destruídas, pois funcionarão como um reservatório de inóculo. Todavia a principal estratégia de controle envolve táticas para reduzir o progresso da doença. A resistência genética e o controle químico são as principais táticas para este fim. Aplicações de fungicidas são necessárias para manter a severidade das manchas abaixo de níveis de danos econômicos. Fungicidas sistêmicos do grupo dos benzimidazóis (carbendazin, benomyl), triazóis (propiconazole, tebuconazole), estrobilurinas (azoxytrobin, tryfloxystrobin, piraclostrobin) ou de contato são usados em todo o mundo visando impedir o progresso da doença.

Sucessivas aplicações de fungicidas para o controle das manchas podem causar efeitos indesejáveis. Por exemplo, isolados resistentes podem surgir e em pouco tempo tornar o fungicida obsoleto, como o caso do Benomyl, que teve sua eficiência reduzida em muitos países. Fungicidas com sítio de ação muito específicos devem ser evitados em aplicações sucessivas, devendo-se intercalar as aplicações com fungicidas de contato ou de modo de ação diferente.

Uma das maneiras de se evitar aplicações desnecessárias de fungicidas é o uso de sistemas de previsão de epidemias. Um sistema de previsão foi desenvolvido na década de 60 nos Estados Unidos tendo como base apenas variáveis climáticas como temperatura e umidade relativa do ar vêm sendo adaptado para o Brasil em cultivares de amendoim suscetíveis às cercosporioses. Este modelo de previsão para essas doenças foi desenvolvido em 1966, levando em consideração a duração do período onde a umidade relativa é maior ou igual a 95% (medida indireta do molhamento foliar) e a temperatura mínima nesse período (tabelas 1 e 2). Todavia nem todos os agricultores dispõem com facilidade de dos dados meteorológicos necessários para a aplicação do sistema. Por isso, visando facilitar a aplicação do sistema foi validada uma simplificação do sistema utilizando-se apenas dados de precipitação como alternativa ao uso da temperatura e umidade relativa.

Valores de severidade da mancha-preta e a precipitação pluvial em diferentes limites mínimos diários foram correlacionados e dias com chuva excedendo o limite mínimo de 2,5 mm, consecutivos ou não, resultou na melhor estimativa de severidade da mancha-preta. Então o monitoramento dos dias consecutivos com chuva acima de 2,5mm pode ser utilizado como critério para a aplicação de fungicida na cultura do amendoim (tabela 3).

Um dos fatores que indicará sucesso no uso de sistemas de previsão é o Monitoramento do início da epidemia. Para o amendoim, devem-se iniciar amostragens a partir da 6ª semana após o plantio (42 dias após o plantio). Com esse objetivo, coleta-se de 10 a 20 folíolos da região média inferior das plantas, em cada ponto de amostragem com frequência de duas amostragens por semana. O tamanho da amostra para uma área equivalente a um ha deve ser de 200-250 folíolos, coletados em 10-20 pontos bem distribuídos na área da cultura (no mínimo 10 folíolos por ponto de amostragem). A primeira aplicação de fungicida deve ser realizada quando 5 a 15 % dos folíolos estiverem infectados (independentemente do número de manchas por folíolo). Considera-se infectado cada folíolo da amostra com pelo menos uma mancha visível e bem definida (com mais de 1mm de diâmetro). A partir da primeira aplicação, deve-se tomar a decisão com base nos dados meteorológicos: temperatura e umidade (tabela 1) ou precipitação (tabela 3).

A Verrugose do amendoim é outra doença de importância no Brasil. Seu primeiro relato foi em 1940 no Estado de São Paulo e durante muitos anos foi considerada de pequena importância por ocorrer somente em fim de ciclo. Todavia esta doença torna-se problemática quando há acúmulo de inóculo, e quando as condições ambientais são favoráveis ao patógeno durante os estágios iniciais de desenvolvimento da cultura. Os sintomas ocorrem em toda a parte aérea das plantas na forma de cancrios ou verrugas. Também ocorrem lesões nos folíolos pequenos, arredondadas ou irregulares, isoladas ou confluentes, com centro deprimido e margens salientes. Os sintomas são localizados mais frequentemente junto às nervuras. Nos pecíolos e hastes as lesões são salientes, ovaladas, maiores (até 3 mm) e mais numerosas que em folíolos. As lesões deformam os órgãos afetados, pelo desenvolvimento desigual dos tecidos

Plantas severamente afetadas amarelecem e secam prematuramente, com conseqüente redução na produtividade.

O fungo sobrevive, de uma estação de cultivo para outra, principalmente nos restos de cultura e em plantas voluntárias. Quando encontra condições favoráveis, o fungo esporula nestas fontes de inóculo e é disseminado para as novas plantas e de planta para planta pelos respingos de chuva. O controle pode ser implementado com rotação de culturas, incorporação de restos por aração profunda e destruição de plantas voluntárias e controle químico.

A Mancha Barrenta é comum em áreas produtoras de amendoim, todavia sem ocasionar grandes perdas. Os sintomas aparecem somente nos folíolos como pequenas manchas pardas com bordos difusos e irregulares que são numerosas e esparsas sobre a superfície superior do limbo. Posteriormente, essas manchas coalescem tomando grandes áreas foliares e tornam-se visíveis também na superfície inferior. Folíolos intensamente afetados parecem salpicados de barro, daí o nome da doença. O agente causal sobrevive de uma estação de cultivo para outra nos restos de cultura, e em plantas voluntárias e é disseminado pelo vento e por respingos de chuva. A doença é favorecida em condições de umidade alta por longos períodos de molhamento foliar e temperatura de 20°C.

Outra doença de comum ocorrência é a Ferrugem. São relatadas severas epidemias desta doença em todo o mundo. Todavia, no Brasil, sua ocorrência em níveis epidêmicos raramente é relatada. O aumento em área cultivada e o cultivo continuado de amendoim podem favorecer o incremento do inóculo inicial e assim agravar os problemas devido a esta doença. Os sintomas são pequenas pústulas (0,3 a 0,6 mm) visíveis ao olho nu que, ao romperem-se, liberam uma massa de esporos de cor alaranjada a avermelhada predominantemente na face inferior da folha. O tecido ao redor das pústulas sofre necrose e seca, formando-se manchas irregulares. Os folíolos afetados, eventualmente, se curvam e se desprendem, mas há uma tendência, diferente das cercosporioses, de permanecerem presos à planta. O agente causal é disseminado principalmente pelo vento. Alta umidade alta e temperatura em torno de 23°C são favoráveis à ocorrência da doença. Uso de cultivares com algum nível de resistência e controle químico com fungicidas do grupo dos triazóis são as táticas de manejo mais adequadas.

Tabela 1 - Determinação do índice de potencial climático para as cercosporioses do amendoim, em função da temperatura mínima (Tmin) e do número de horas com umidade relativa superior a 90% (NohUR>90).

Noh UR>90	Temperatura mínima -Tmin (°C)									Noh UR>90
	17°	18°	19°	20°	21°	22°	23°	24°	25°	
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
4	0	0	0	0	0	0	1	1	1,5	4
5	0	0	0	0	0	1	1	1,5	2	5
6	0	0	0	0	0	1	1,5	2	2,5	6
7	0	0	0	0	1	1,5	2	2,5	3	7
8	0	0	0	0	1	2	2,5	3	3	8
9	0	0	0	1	1,5	2	3	3	3	9
10	0	0	0	1	2	2,5	3	3	3	10
11	0	0	1	1,5	2	3	3	3	3	11
12	0	0	1	2	2,5	3	3	3	3	12
13	0	0	1	2	3	3	3	3	3	13
14	0	1	1,5	2	3	3	3	3	3	14
15	0	1	1,5	2,5	3	3	3	3	3	15
16	0	1	2	3	3	3	3	3	3	16
17	0	1	2	3	3	3	3	3	3	17
18	0	1	2	3	3	3	3	3	3	18
19	0	1,5	2,5	3	3	3	3	3	3	19
20	0	1,5	2,5	3	3	3	3	3	3	20
21	0	2	3	3	3	3	3	3	3	21
>22	0	3	3	3	3	3	3	3	3	>22
	17°	18°	19°	20°	21°	22°	23°	24°	25°	

Tabela 2 - Interpretação do índice de potencial climático de infecção das cercosporioses do amendoim e necessidade de pulverização com fungicida.

Soma dos índices de 2 dias (atual e anterior)	Potencial de Infecção	AVISO
6	Extremamente favorável	Pulverizar com urgência
5 ou 5,5	Muito favorável	Pulverizar dentro de 24 horas
4,5	Favorável	Pulverizar dentro de 48 horas
= ou <4	Desfavorável	Não pulverizar

Tabela 3. Exemplos de aviso de pulverização por precipitação. O aviso para aplicação é dado quando em um intervalo de 5 a 7 dias ocorrem 3 ou mais dias com chuvas acima de 2,5 mm.

DAP(1)	Chuva (mm)	Exemplo 1 Aviso	Chuva (mm)	Exemplo 2 Aviso	Chuva (mm)	Exemplo 3 Aviso
42	5,0	Não pulverizar	0	Não pulverizar	0	Não pulverizar
43	0	"	0	"	12,5	"
44	0	"	0	"	0	"
45	0	"	0	"	1,0	"
46	1,0	"	13,0	"	0	"
47	0	"	5,0	"	2,0	"
48	0	"	0	"	0	"
49	12,5	"	0	Não pulverizar	7,0	"
50	0,5	"	3,5	Pulverizar**	0	"
51	0	"	0		17,0	Não pulverizar
52	1,5	"	2,0		1,5	"
53	1,0	"	5,0		5,0	Pulverizar**
54	0	Não pulverizar*	0		1,0	

⁽¹⁾ DAP: dias após o plantio. No primeiro exemplo não ocorreram 3 dias chuvosos nos 5 a 7 dias anteriores. Ocorreram 3 dias chuvosos nos 5 a 7 dias anteriores, aos 46, 47 e 50 DAP (segundo exemplo) e aos 49, 52 e 53 DAP (terceiro exemplo).

MICOTOXINAS EM AMENDOIM

Fonseca, H.

ESALQ/USP, Fonseca & Cia S/C Ltda. - ME

Introdução

A história da aflatoxina começou a ser contada, quando STEVENS e cols. (1960), descreveram o aparecimento de uma nova doença em peruzinhos. As aves morriam geralmente dentro de uma semana, sendo, seus sintomas, a perda de apetite, diminuição da mobilidade, fraqueza das asas, das pernas etc.

Em 1960 o Dr. W.P. Blount batizou a doença com o nome de "Turkey X disease" ("Doença X dos perus") e foi responsabilizada pela morte de mais de 100.000 peruzinhos no período compreendido entre maio e agosto de 1960. Logo se isolou o princípio tóxico e verificou-se que o mesmo era produzido por um fungo identificado ainda em 1961 por SARGEANT e cols., como sendo o *Aspergillus flavus* Link ex Fries e a substância recebeu o nome de *A. flavus* toxina, posteriormente simplificada para Aflatoxina: A- (de *Aspergillus*) fla- (de *flavus*) toxina.

Em 1961, o Prof. Alcides Martinelli Filho, micologista da ESALQ/USP, pesquisou fungos no farelo trazido para o Brasil, pelo Dr. Blount, tendo encontrado alta concentração de *Aspergillus flavus*.

Hoje conhecemos mais de 300 espécies de fungos que podem produzir de 300 a 400 toxinas, muitas destas bastante prejudiciais.

Fungos produtores de toxinas no amendoim

Embora várias espécies de fungos possam colonizar o amendoim, os abaixo relacionados são produtores significativos de aflatoxinas e outras toxinas de menor importância:

- *Aspergillus flavus*: aflatoxinas B₁ e B₂
- *A. parasiticus*: B₁, B₂, G₁, G₂
- *A. nomius*
- *Penicillium citrinum*, *P. variable*, *P. frequentans*

HARTLEY e cols. (1963) denominaram de B₁, B₂, G₁ e G₂, por causa da cor de suas fluorescências sob luz ultravioleta

Outros metabólitos produzidos por *A. flavus* e *A. parasiticus*

Metabólitos secundários e derivados: M₁, M₂, B_{2A}, G_{2A}, aflatoxicol (R₀), parasiticol (B₃), GM₁, P₁ ácido ciclopiazônico, ácido aspergílico, ácido cójico, ácido β-nitro-propionico, esterigmatocistina, aspertoxina e substâncias tremorgênicas.

Fatores que influem no desenvolvimento de fungos

O crescimento de fungos e a contaminação com aflatoxinas são conseqüência da interação entre o fungo, o hospedeiro e o ambiente. A combinação apropriada destes fatores determina a infestação e a colonização do substrato, o tipo e a quantidade de aflatoxina produzida.

Contudo, é necessário um substrato adequado para o crescimento de fungos e subseqüente produção de toxinas, embora os fatores precisos que dão início a formação de toxinas ainda não é bem entendido.

A formação de micotoxinas é influenciada por fatores ambientais, incluindo UR, umidade do grão, temperatura, carga de insetos, práticas pré- e pós-colheita, sanidade da planta, condições da colheita, da secagem, das chuvas pós-colheita, do transporte, do armazenamento etc.

Contaminação pré-colheita do amendoim

Ataque de insetos

●Insetos de solo penetram na vagem e levam esporos de fungos para o interior da amêndoa e que, pelo microclima criado pela atividade metabólica do inseto, podem se desenvolver e produzir toxinas

Danos mecânicos

●Danos mecânicos por instrumentos de cultivo: porta de entrada para fungos e outros microrganismos

Práticas no pré- e no pós-colheita

●Inversão ou não do amendoim para secagem no campo, secagem incompleta e/ou demora na secagem, práticas tradicionais da região, e a própria suscetibilidade do amendoim.

●

Sanidade da planta

●Plantas saudias têm mais resistência ao ataque de fungos

●

Estresse hídrico:

●Predispõe a vagem ao ataque de fungos por provocar fissuras na casca
Sementes contaminadas e fungos do solo podem penetrar no sistema vascular da planta

Penetração de esporos através do ginóforo

Condições ambientais

●Atividade de água (Aa) / UR / temperatura

◆Umidade de equilíbrio

Chuvas na colheita: atrasam a secagem e aumentam as chances de contaminação

Secagem do amendoim

●Na leira: deitado ou invertido

●Secagem artificial

Substrato e competição microbiana

●Microrganismos têm diferentes afinidades para com diferentes substratos

Condições favoráveis

Temperaturas para crescimento e para produção de aflatoxinas por *A. flavus* e *A. parasiticus*

●Limites p/ crescimento: 12-42 °C; ótima: 25-32 °C

- Limites p/ produção de toxinas: 18-38 °C

Condições favoráveis

Principais gêneros de fungos toxigênicos no amendoim

- *Aspergillus e Penicillium*

→ Aa a partir de 0,8 ou menos

- Aa diferente para cada espécie e temperatura

ESTRATÉGIAS DE PREVENÇÃO: BOAS PRÁTICAS AGRÍCOLAS (BPA)

Recomendações pré-plantio

Fazer o preparo adequado do solo, com as operações de aração profunda, enterrio dos restos de culturas, para eliminar o reservatório de inóculos, e duas ou três gradeações, dependendo do tipo de solo. A aração deve ser feita com antecedência mínima de um mês da operação de plantio. Isto é importante para solos pesados ou compactos. Fazer rotação de cultura

Fazer a correção do solo conforme os resultados da análise de solo, para assegurar o adequado pH do solo e a nutrição da planta. Utilizar sementes fiscalizadas e ou certificadas e tratadas com produtos registrados. Realizar análises de micotoxinas e micológicas na semente de amendoim.

Recomendações no plantio

Usar variedades ou cultivares adaptados à região; utilizar o espaçamento recomendado entre as sementes. O plantio deve, se possível, ser ajustado de forma que a colheita aconteça ao término da estação chuvosa, de forma que a secagem pós-colheita no campo, possa ser feita em condições favoráveis. Já existem variedades e/ou cultivares que permitem isso. Controlar plantas invasoras as quais podem esgotar a umidade disponível no solo e competir pelos nutrientes.

Recomendações de práticas culturais

Controlar as pragas (inclusive do solo) e fungos com inseticidas e fungicidas adequados e registrados e adotar outras práticas apropriadas dentro de um programa de manejo integrado de pragas; evitar danos mecânicos às plantas e às vagens pelos instrumentos de cultivo.

Práticas pré-colheita

Em período de seca, se possível, irrigar a cultura, em torno de um mês antes da colheita, devendo assegurar uniformidade na aplicação, para que todas as plantas tenham suprimento adequado de água.

Recomendações na colheita

Colher o amendoim com baixo teor de umidade e maturidade ideal; evitar danos mecânicos às vagens, durante o processo manual ou mecânico de arranquio; regular bem a colhedeira e, se possível, diminuir a sua velocidade; após o arranquio, embandeirar ou inverter o amendoim para secagem das vagens no campo.

Deixar o amendoim secar até um nível seguro de umidade ou seja, 9-10 % de umidade (Aa = 0,7), sendo preferível abaixo desse valor) antes de colhê-lo, ensacá-lo e armazená-lo; não deixar o amendoim, já colhido e ensacado, pernoitar no

campo, em virtude da possível ocorrência de orvalho, de chuva e pela absorção de umidade do solo; evitar a reumidificação do produto durante o processo de secagem; caso não seja possível a secagem artificial, deixar o amendoim no campo, até secar bem, e só daí fazer a colheita

Evitar condições de elevada umidade induzida pelo uso de coberturas sob as quais o vapor condensa durante a noite.

Caso ocorra chuva sobre o amendoim ensacado, no campo, recomenda-se secá-lo em terreiro e armazená-lo separadamente. Ao chegar do campo, se ainda estiver úmido (>10 %) o amendoim ensacado deve, se possível, ser espalhado no terreiro ou outro local adequado, ou fazer secagem artificial. No caso de secagem artificial não ultrapassar a temperatura recomendada que é de 38 °C. Inicialmente pode ser um pouco mais alta, 50-55 °C mas, normalmente, não se empregam estas temperaturas e sim trabalha-se com ar com baixa UR. Só iniciar o processo de secagem artificial quando a umidade do amendoim chegue em torno de 20-18 %. Antes desse ponto a secagem artificial vai prejudicar o amendoim.

Prevenção no transporte

Proteger contra a chuva e o sol para evitar o reumedecimento, e o ataque de fungos; os recipientes utilizados para o transporte amendoim devem ser limpos e descontaminados; não transportar o amendoim úmido; não deixar o veículo estacionado ao sol ou desprotegido de chuvas, no pátio à espera de descarregar no cerealista ou na indústria.

Recomendações no armazenamento

Manter o armazém sempre limpo; fazer pré-limpeza do amendoim ao chegar ao armazém

Impedir a reabsorção de umidade por qualquer via colocando o produto sobre estrados, não encostando as pilhas nas paredes, evitando goteiras; utilizar sacaria apropriada e limpa

Influência da sacaria para cada produto:

- Amendoim em casca: juta ou polipropileno de trama larga

- Amendoim descascado: aniagem ou de polipropileno de trama estreita

Não fazer pilhas muito grandes; não superlotar o armazém e permitir ampla ventilação mantendo o espaçamento adequado entre as pilhas de forma a permitir a apropriada limpeza e fácil acesso; determinar a presença de micotoxinas na entrada e na saída do produto

Não deixar o produto em contato direto com o chão ou encostado nas paredes.

Controle das condições ambientais

- Monitoramento da UR e da temperatura

- ◆ Termômetro e termoigrógrafos analógicos ou digitais

- ◆ Termômetros de bulbos seco e úmido

- Tabelas psicrométricas simplificadas

Limpar todos os depósitos, silos e todos os equipamentos para manuseio do grão, especialmente dos restos, antes e depois do seu uso; verificar a existência de goteiras ou qualquer outro tipo de infiltração de água; não permitir a presença de pássaros

Não deixar acumular teias de aranha; recomendações no armazenamento; se possível, armazenar o amendoim em ambiente climatizado com controle da UR e da temperatura para evitar o desenvolvimento de fungos.

Isto impedirá a posterior produção de aflatoxinas

Inspecionar, regularmente, o armazém e fumigar se necessário.

USING WILD SPECIES AND GENOMIC TOOLS TO IMPROVE RESISTANCE IN PEANUT (*ARACHIS HYPOGAEA* L.).

Bertioli, D.J.⁽¹⁾, **Fávero, A.P.**⁽²⁾, **Gimenes, M.A.**⁽³⁾, **Guimarães, P.M.**⁽²⁾, **Krapovickas, A.**⁽⁴⁾, **Lavia, G.**⁽⁴⁾, **Leal-Bertioli, S.C.M.**⁽²⁾, **Leoi, L.C.T.**⁽¹⁾, **Madsen, L. H.**⁽⁵⁾, **Moretzsohn, M. C.**⁽²⁾, **Parniske, M.**⁽⁶⁾, **Proite, K.**⁽²⁾, **Sandal, N.**⁽⁵⁾, **Seijo, J.G.**⁽³⁾, **Stougaard, J.**⁽⁵⁾ and **Valls, J.F.M.**⁽²⁾.

⁽¹⁾ Universidade Católica de Brasília, Campus II, Biotecnologia e Ciências Genômicas - SGAN Quadra 916, Módulo B, Av. W5 Norte, Brasília - DF, 70790-160, Brazil.

⁽²⁾ EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica-pqEB, Final Av. W5 Norte, Brasília-DF, 70770-900, Brazil.

⁽³⁾ Universidade Estadual de São Paulo, Instituto de Biociências, Distrito de Rubião Júnior s/n, Botucatu, São Paulo 18618-000 Brazil.

⁽⁴⁾ Instituto de Botánica del Nordeste, Laboratorio de Citogenética Vegetal, Sargento Cabral 2131 Corrientes, 3400 Argentina.

⁽⁵⁾ Laboratory of Gene Expression, Department of Molecular and Structural Biology, Gustav Weides Vej 10 8000C, Aarhus, Denmark

⁽⁶⁾ Sainsbury Laboratory, John Innes Centre, Norwich Research Park, Colney, Norwich, NR4 7UH, England.

INTRODUCTION

The legume genus *Arachis* is native to South America, and contains 69 described species. One of these, peanut, is the fifth most important oilseed in the world, and is also widely consumed as peanut butter, salted nuts, sweets, bakery products, and animal feed, and is a key plant in tropical subsistence agriculture in South America, Africa, India and Asia.

Improvement of peanut by breeding achieved much in the last century, but has been fundamentally limited by an extreme genetic bottleneck at the origin of the crop. This origin was through the hybridisation of two diploid wild species of *Arachis* followed by a spontaneous duplication of chromosomes. The resultant plant, would have had hybrid vigor, but be reproductively isolated from its wild relatives. This has led to a lack of diversity for traits of agricultural interest, and to a lack of genetic diversity, which has made genetic characterization very difficult.

Wild diploid *Arachis* species are, on the other hand genetically very diverse and have been selected during evolution by distinct environments and biotic stresses. This presentation describes the progress of two projects which fund a consortium of 6 labs in 4 different countries. The research aims to unlock the genetic diversity of wild *Arachis*, identifying sources of resistances to biotic stress in wild *Arachis* germplasm and developing tools and a knowledge-base for the incorporation of these resistances in cultivated peanut by breeding.

The diseases and pests targeted are the fungal leaf spots *Cercospora arachidicola* and *Cercosporidium personatum*, the rust *Puccinia arachidis* and root-knot nematodes (*Meloidogyne* ssp.). The tools and knowledge base being developed consist of genetic and physical maps of *Arachis*, and analysis of orthologous genomic regions of *Arachis* and the model legume *Lotus japonicus*.

MATERIALS AND METHODS

Detached leaf bioassays (5) were done using mixed strains of *C. arachidicola*,

C. personatum and a pure strain of *P. arachidis* from São Paulo State, Brazil. Selected accessions were then tested with pure strains in detached leaf bioassays and field tested in Northeast Argentina.

M. arenaria race 1 from Texas, USA; and an unusual population of *M. javanica* from *A. pintoii* from Paraná, Brazil were used for bioassays as described by Hussey and Barker (3).

Fluorescent *in-situ* hybridization (FISH) was done as described by Pedrosa et al. (7)

Hybridisations of *Arachis* plants were as described by Nigam et al. (6).

Microsatellite containing sequences were obtained from: enriched genomic libraries as described by (8); ESTs of *A. stenosperma* produced by us, and *Arachis* spp. sequences available in Genbank. "Troll" was used for identification of microsatellites (2).

Isolation of resistance gene analogues (RGAs) was described by Bertoli et al. (1).

For anchor-marker development, legume EST sequences which had a single strong homologue in *Arabidopsis* were selected from *L. japonicus*, *Medicago truncatula* and *Glycine max*. Conserved regions flanking inferred introns were used for primer design.

RESULTS

Bioassays

Bioassays with the fungal diseases were done using 109 wild accessions of *Arachis* spp. and ten varieties of *A. hypogaea*. The *A. hypogaea* were more susceptible than any of the wild *Arachis* spp. tested. Numerous wild *Arachis* spp. showed no disease symptoms when inoculated with the fungi. The selected accessions tested in field conditions in Argentina showed the same resistance as against mixed and pure strains in detached leaf assays using Brazilian isolates.

Bioassays with *M. javanica* and *M. arenaria* also showed that *A. hypogaea* was more susceptible than any of the wild *Arachis* spp. tested. Several wild *Arachis* which supported no detectable nematode replication were identified (Fig.1).

Cytology

Only two pairs of *A. hypogaea* chromosomes can be distinguished based on morphology. The SAT pair, that has a submedian secondary constriction that bears the nucleolar organizer, and the "A" pair that is small. The presence of the A pair distinguishes wild diploid *Arachis* of the botanical section *Arachis* with A genome types. Silver staining allows the recognition of a further two pairs of chromosomes.

C-DAPI staining showed that the chromosomes of A type genomes have densely staining heterochromatic centromeric bands, whilst non-A (B) type genomes do not. In *A. hypogaea*, 20 chromosomes (half of the total) are of the former type, and 20 of the latter. Some of the chromosome pairs presented characteristic bands that provide further physical markers.

In the diploid species, the numbers of rDNA 45S and rDNA 5S signals were variable. However, in all varieties of *A. hypogaea* there were three pairs of sites of rDNA 45S and one pair of rDNA 5S on the B genome component; and two pairs of rDNA 45S and one pair of rDNA 5S on the A genome component.

Careful comparison of the morphology, staining and distribution of ribosomal sites in *Arachis* spp. supported the hypothesis that peanut arose by hybridization and polyploidization of individuals with genomes similar to *A. duranensis* (A genome) and *A. ipaensis* (B genome) (9).

Mapping populations

Two mapping populations of 93 F₂ plants derived from crosses between diploid *Arachis* have been obtained so far: One derived from *A. duranensis* K7988 and *A. stenosperma* V10309. The parents are respectively, susceptible and resistant to: Brazilian and Argentinan isolates of *C. arachidicola*, *C. personatum* and to *M. javanica*, and *M. arenaria*. The second mapping population is derived from a cross of *A. ipaensis* K30076 and *A. magna* K30097. The parents are respectively, susceptible and resistant to *C. personatum*.

Marker development

Microsatellite markers

Sequencing of genomic DNA libraries of *A. hypogaea* enriched for microsatellite repeats (mostly TC, AC, GA and TTG) allowed the design of 240 primer pairs; about 166 microsatellite markers for *Arachis* are available from the literature; a further c.60 primer pairs were designed using *A. stenosperma* ESTs; and c.60 primer pairs were designed using *Arachis* sequences in Genbank that were not annotated as microsatellite containing.

RGAs

A total of 78 DNA sequences encoding nucleotide-binding regions complete between P-loop and GLPL motifs were obtained. These sequences represented 61 non-redundant protein sequences. 45 of these are of the TIR-type and 16 of the non-TIR type.

Anchor-markers

867 pairs of conserved legume sequences flanking inferred intron sites were identified. Of 50 primer pairs tested in the parents of the A genome mapping population, 25 amplified the correct product. The degree of nucleotide polymorphism between the parents was, on average, 1 SNP per 88 bp and 1 indel per 1640 bp. So far 20 anchor-markers have been developed.

Genetic Mapping

About 45% of microsatellite markers tested were polymorphic between the A genome mapping parents, di-nucleotide microsatellites having slightly higher polymorphism than tri. So far 110 microsatellite markers have been scored for this population, of these the segregation of 50% is distorted. The parents of the B genome population have lower levels of polymorphism, of the 50 microsatellite markers tested so far 11 were polymorphic. Bioassays were done on the A genome mapping population with *C. arachidicola*, segregation of resistance to susceptibility was 53:18 (2.94:1).

Complex hybrids

Twelve A genome and 6 B genome wild *Arachis* spp. with high levels of disease resistance were selected for crossing. Of the 26 crosses attempted, 17 gave

sterile AB hybrids. Colchicine treatment to regain fertility was so far successful for 4 of these. To date three complex hybrids between wild *Arachis* species and peanut have been created (see Fig. 2):

A.hypogaea x (*A.hoehnei* x *A.cardenasii*)^c

A.hypogaea x (*A.aff. magna* x *A.villosa*)^c

A.hypogaea x (*A.ipaensis* x *A.duranensis*)^c

DISCUSSION

The c.80 described species of wild *Arachis* are divided into nine taxonomical accessions, based upon morphology and sexual compatibilities. This work was confined to species within the section *Arachis* that includes *A.hypogaea*.

Bioassays identified abundant sources of disease resistance in wild diploid *Arachis* to the most important fungal diseases in Latin America, the fungal leaf spots *C. arachidicola* and *C. personatum*, and the rust *Puccinia arachidis*; and to the very damaging and difficult to control root-knot nematodes (*Meloidogyne*).

Classical cytological methods underlined the substantial differences between the A and B component genomes of peanut. The use of FISH showed that the extant wild diploid species with genomes most similar to the component genomes of peanut are *A. ipaensis* and *A. duranensis*.

Because peanut is tetraploid and has very low levels of polymorphism, genetic mapping is very difficult. Therefore we decided to generate maps for the diploid A and B genomes separately. For this, we made two F2 populations, one representing the A genome; derived from a cross of *A. duranensis* with *A. stenosperma*, the other representing the B genome from a cross of *A. ipaensis* with *A. magna*. Taking into consideration the bioassays results, the parentals were chosen to enable the placing of disease resistances on the diploid maps. Bioassays done on the A genome mapping population with *C. arachidicola* show a segregation very close to 3:1 suggesting that a single gene may determine resistance against this fungal pathogen.

For the construction of genetic maps we developed three types of marker: microsatellites, because they are highly transferable between *Arachis* species; anchor-markers, to allow comparisons of the *Arachis* and *Lotus* genomes; and RGAs because they are more likely to be linked to disease resistances.

Results so far show that the A genome population has a level of polymorphism that is very favourable for marker development, however, segregation distortion will limit the use of this cross for the study of certain regions of the genome. Therefore, further inter-specific crosses have been made to develop another A genome mapping population. In addition, a tetraploid mapping population derived from the cross *A. hypogaea* x (*A. ipaensis* KG30076 x *A. duranensis* V14167)^c is under development.

For the incorporation of wild *Arachis* genes into peanut, we used the diploid tetraploid/pathway with two-way cross (10). In this way, so far, three complex hybrids between wild *Arachis* species and peanut have been created. These hybrids incorporate new disease resistance genes through both the A and B genomes. The usefulness of their resistances was further confirmed this season in our greenhouse during a severe combined attack by *C. personatum*, *P. arachidis*. All *A. hypogaea* were severely affected, many losing almost all of their leaves, whilst all complex hybrids showed high degrees of resistance.

The *Arachis* microsatellite markers, genetic maps, and complex hybrids will be used in marker-assisted breeding programs. One of the first aims of the breeding

program will be the selection for wild disease resistance genes on both the A and B genomes of peanut, we hope that this way the durability of disease resistance can be maximised. In addition we anticipate that new peanut varieties incorporating wild *Arachis* genes will have other characteristics and allelic combinations unavailable in peanut varieties developed only using lines of *A. hypogaea*.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by the European Union: INCO-DEV, Contract ICA4-CT-2001-10072 Project "ARAMAP" and by the World Bank and EMBRAPA "The Agricultural Technology Development Project for Brazil" (PRODETAB), project reference 004/01/01.

REFERENCES

- (1) Bertioli DJ., Leal-Bertioli SCM., Lion MB., Santos VL., Pappas Jr. G., Cannon SB. and Guimarães, PM. (2003) Mol. Genet. Genom. 270, 34-45.
- (2) Castelo A., Martins WS. and Gai G. (2002) Bioinformatics 18, 634-636.
- (3) Hussey RS. and Barker KR. (1973) Plant Dis. Rep. 57, 1025-1028.
- (4) Kochert G., Halward T. and Stalker HT. 1996. In Pickersgill B. and Lock JM. (eds). Advances in Legume Systematics 8: Legumes of Economic Importance, pp 11-17. Royal Botanic Gardens, Kew.
- (5) Moraes SA. and Salgado CL. (1982) Sum. Phytopath. 8, 39-55.
- (6) Nigam SN., Rao MJV. and Gibbons RW. 1990 ICRISAT (Information Bulletin, 29).
- (7) Pedrosa A., Sandal N., Stougaard J., Schweizera D. and Bachmaira A. (2002) Genetics 161, 1661-1672.
- (8) Rafalski JA., Morgante M., Powell W., Vogel JM. and Tingey SV. 1996. In: Birren B. and Lai, E. (eds). Analysis of Non-mammalian Genomes - A Practical Guide, pp. 75-134. Academic Press, New York.
- (9) Seijo JG, Lavia GI, Fernández A, Krapovickas A, Ducasse D and Moscone EA. American Journal of Botany (In press).
- (10) Simpson CE. (2001) Peanut science 28, 114-116.

AVANÇOS RECENTES NA CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E MAPEAMENTO GENÉTICO EM *ARACHIS*

Gimenes, M.A¹. & Moretzsohn, M.C²

¹Depto de Genética / IB, UNESP, Rubião Jr. s/nº, Botucatu-SP, Brasil. E-mail: mgimenes@btu.flash.tv.br

²Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, C.P. 02372, 70.770-900, Brasília-DF, Brasil. E-mail: marciocm@cenargen.embrapa.br

O gênero *Arachis* compreende uma espécie de importância agrônômica e espécies de grande potencial, principalmente para uso forrageiro. A principal espécie do gênero é *A. hypogaea* L., o amendoim cultivado, a qual é amplamente cultivada em mais de 80 países e é utilizada para vários fins, como por exemplo, para produção de óleo e para consumo direto. Devido à importância de *A. hypogaea*, a maior parte dos estudos no gênero *Arachis*, até alguns anos atrás, concentrava-se na seção *Arachis*, uma das nove seções do gênero *Arachis*. Essa seção inclui o amendoim cultivado (*A. hypogaea* – genoma AABB), *A. monticola*, também alotetraplóide, e outras 25 espécies diplóides silvestres, que possuem genomas similares aos de *A. hypogaea*, segundo evidências citogenéticas (Fernandez & Krapovickas, 1994; Lavia, 1998), moleculares (Kochert *et al.*, 1996; Moretzsohn *et al.*, 2004) e de cruzabilidade (Krapovickas & Gregory, 1994). Essas espécies, portanto, podem ser utilizadas como fontes de genes em programas de melhoramento genético do amendoim, por meio de introgressão de genes de interesse, como por exemplo, genes de resistência a doenças e pragas.

A seção *Arachis* ainda é alvo da maioria dos estudos, mas não é mais o único foco de estudos no gênero. O número de estudos envolvendo outras seções tem aumentado bastante nos últimos anos (Galgaro *et al.*, 1998; Gimenes *et al.*, 2000; Palmieri *et al.*, 2002), em consequência do trabalho de coleta que tem sido realizado e que tem aumentado consideravelmente a quantidade de germoplasma disponível. Com isso, uma maior variabilidade torna-se disponível para ser utilizada em programas de melhoramento das espécies já cultivadas, elevando as chances de novos cultivares serem obtidos. As coletas realizadas tiveram ainda como consequência a identificação de novas espécies no gênero. Além disso, o aumento foi impulsionado pelo sucesso que algumas espécies de *Arachis* têm alcançado como plantas forrageiras, principalmente *A. pintoi* (seção *Caulorrhizae*) e *A. glabrata* (seção *Rhizomatosae*).

Uma grande parte dos estudos moleculares publicados sobre o gênero *Arachis* são referentes à caracterização da variabilidade genética do germoplasma, mas ultimamente tem aumentando o número de estudos visando a prospecção de genes de interesse nas espécies silvestres do gênero, que possam ser utilizados no melhoramento genético de *A. hypogaea* (Leal-Bertioli *et al.*, 2000; Pande & Rao, 2001).

A avaliação da variabilidade genética é um dos passos mais importantes para manutenção e uso do germoplasma de uma espécie. No gênero *Arachis*, a caracterização da variabilidade genética tem sido realizada entre e dentro de espécies, abrangendo praticamente todas as suas seções. Esses estudos têm mostrado que espécies silvestres de *Arachis* apresentam uma grande variabilidade

genética, mas pouca variabilidade tem sido detectada no amendoim cultivado, por meio de marcadores bioquímicos e moleculares. A falta de polimorfismo no amendoim tem limitado muitos estudos genéticos a partir do uso de marcadores moleculares, tais como a construção de mapas de ligação e a seleção assistida por marcadores. No entanto, tem se observado, nos últimos anos, uma grande evolução na análise da variação intra-específica em *A. hypogaea* e em outras espécies de *Arachis*. Os estudos iniciais geralmente envolveram um número bastante reduzido de acessos por espécie, e atualmente o número é muito maior em função do aumento de acessos, o que é consequência direta do esforço realizado para se aumentar o germoplasma disponível do gênero.

Com relação aos métodos utilizados para a avaliação de variabilidade, tem se observado que os métodos têm acompanhado a evolução dos marcadores genéticos, a qual tem ocorrido no sentido de desenvolvimento de marcadores mais informativos, isto é, marcadores que permitam a análise de regiões altamente polimórficas do genoma. Como aconteceu em outras espécies vegetais, os primeiros marcadores utilizados em *Arachis* foram as isoenzimas e proteínas (Cherry, 1975; Krishna & Mitra, 1988). Em seguida, vieram os polimorfismos de fragmentos de restrição ou RFLPs (Paik-Ro *et al.*, 1992; Kochert *et al.*, 1996; Galgaro *et al.*, 1998), os RAPDs (Halward *et al.*, 1991, 1992, Gimenes *et al.*, 2000), AFLPs (He & Prakash, 1997, 2001; Gimenes *et al.*, 2002) e os marcadores do tipo microssatélites (Hopkins *et al.*, 1999, He *et al.*, 2003; Ferguson *et al.*, 2004; Moretzsohn *et al.*, 2004). Nos últimos anos, um grande esforço tem sido feito para desenvolvimento de marcadores microssatélites para *Arachis* spp. Marcadores microssatélites ou SSR ("Simple Sequence Repeats") constituem a ferramenta ideal para diversos estudos em plantas, incluindo a análise da variabilidade genética de coleções de germoplasma e a construção de mapas de ligação (revisado por Gupta & Varshney, 2000), por serem multialélicos, codominantes e baseados em PCR. Atualmente, existem mais de 500 marcadores microssatélites descritos ou sendo caracterizados para o amendoim.

A avaliação da variabilidade genética no germoplasma das espécies de *Arachis*, além de contribuir com informações importantes para a manutenção do germoplasma de *Arachis*, tem também sido útil para responder a várias questões e para levantar várias outras, principalmente sobre relações entre as espécies e taxa de fecundação cruzada em algumas delas. As perguntas que surgiram fizeram com que fossem utilizados outros tipos de análises moleculares, como por exemplo, a de seqüências de espaçadores de genes ribossomais (ITS - Internal Transcribed Spacers) do rDNA, as quais têm se demonstrado muito úteis no estabelecimento de relações filogenéticas entre espécies de diversos gêneros. As análises de ITSs das espécies de *Arachis* têm permitido a resposta a várias questões, como por exemplo, a origem comum das espécies de 18 cromossomos da seção *Arachis* (*A. decora*, *A. praecox*, *A. palustris*), a partir de uma espécie de genoma B.

As dúvidas sobre a taxa de fecundação cruzada entre espécies foram um dos motivos para o desenvolvimento de marcadores microssatélites para três espécies (*A. hypogaea*, *A. glabrata* e *A. pintoii*). Este tipo de marcador, por ser codominante e multialélico, tem fornecido dados importantes sobre o tipo de sistema de cruzamento nas espécies de *Arachis*. Por exemplo, a análise do germoplasma de *A. glabrata* com microssatélites revelou uma heterozigosidade observada muito alta para uma espécie considerada autógama, de acordo com evidências morfológicas. Marcadores do tipo microssatélite certamente ainda contribuirão muito na avaliação de germoplasma de *Arachis*, pois além das vantagens citadas acima, estes têm se

mostrado altamente transferíveis entre espécies e, devido ao modo de detecção, facilitam a integração e comparação entre dados obtidos a partir da análise de materiais diferentes. Outros marcadores como RAPD e RFLP têm se mostrado inadequados neste sentido, devido à falta de repetibilidade e por dificuldades na interpretação dos resultados, uma vez que é detectado um grande número de locos ao mesmo tempo em uma única análise.

Marcadores microssatélites têm ainda contribuído enormemente na prospecção de genes em *Arachis*, pois estão sendo utilizados para obtenção de mapas genéticos, que estão sendo construídos, utilizando-se populações resultantes de cruzamentos intra-específicos (*A. stenosperma* x *A. stenosperma*, *A. magna* x *A. magna*) e interespecíficos (*A. ipaënsis* x *A. magna*, *A. duranensis* x *A. stenosperma*). Microssatélites facilitarão a comparação entre os mapas e a integração com marcadores derivados de RGAs (resistance gene analogs) e marcadores desenvolvidos a partir de ESTs ("Expressed Sequence Tags"), selecionados em experimentos nos quais pretende-se identificar genes diferencialmente expressos em função da infecção aos nematóides das galhas (*Meloidogyne* spp.) e fungos, como *Cercosporidium personatum*, causador da mancha preta e *Cercospora arachidicola*, causador da mancha parda. O mapeamento de marcadores associados a locos que conferem resistência a esses nematóides e fungos irá acelerar sobremaneira o processo de introgressão dos genes de resistência para o amendoim cultivado, pelo método de retrocruzamento. A integração de todos esses marcadores moleculares em um mapa facilitará a identificação dos genes envolvidos na resistência e futuramente a clonagem dos mesmos, uma vez que os ESTs e RGAs que forem mapeados nas regiões onde os QTLs são encontrados podem ser considerados fortes candidatos a genes envolvidos na característica em estudo e têm sido uma excelente alternativa para a clonagem posicional. Esta estratégia tem se demonstrado bastante promissora para identificação de genes de diversas características em diferentes espécies (Zheng *et al.*, 2003; Flandez-Galvez *et al.*, 2003). Além disso, estudos demonstraram que QTLs para a mesmas características podem ser conservados em relação à constituição e posição entre espécies relacionadas (Changé *et al.*, 2003), o que sugere que os dados obtidos podem contribuir para identificação de QTLs em outras espécies do gênero.

REFERÊNCIAS

- CHAGNÉ, D. *Molecular Breeding* v.12, p. 185-195, 2003.
- CHERRY, J.P. *Peanut Science* v.2, p. 57-65, 1975.
- FERGUSON, M.E. *Theor. Appl. Genet.*, v.108, p.1064-1070, 2004.
- FERNANDEZ, A. & KRAPOVICKAS, A., *Bonplandia*, v.8, p.187-220, 1994.
- FLANDEZ-GALVEZ, H. *Theor. Appl. Genet.*, v. 107, p. 1257-1265, 2003
- GALGARO, L., *Genome*, v.41, p.445-454, 1998.
- GIMENES, M.A., *Euphytica*, v.116, p.187-195, 2000.
- GIMENES, M.A., *Genet. Mol. Biol.*, v.25, p.349-353, 2002.
- GUPTA, P.K. & VARSHNEY, R.K. *Euphytica*, v.113, p.163-185, 2000.
- HALWARD, T.M., *Genome*, v.34, p.1013-1020, 1991.
- HALWARD, T.M., *Plant Mol Biology*, v.18, p.315-325, 1992.
- HE, G., *BMC Plant Biology*, v.3, 2003 [<http://www.biomedcentral.com/1471-2229/3/3>].
- HE, G. & PRAKASH, C.S. *Euphytica* v.97, p.143-149, 1997.
- HE, G. & PRAKASH, C.S. *Gen. Resour. Crop Evol.*, v.48, p.347-352, 2001.
- HOPKINS, M.S., *Crop Sci.*, v.39, p.1243-1247, 1999.
- KOCHERT, G., *Am. J. Bot.* v.83, p.1282-1291, 1996.
- KRAPOVICKAS, A & Gregory, W. *Bonplandia* v.8, p.1-186, 1994.

KRISHNA, T.G. & MITRA R. *Euphytica*, v.37, p.47-42, 1988.
LAVIA, G.I., *Cytologia*, v.63, p.177-181, 1998.
LEAL-BERTIOLI, S.C.M., Boletim de Pesquisa n° 20. EMBRAPA, 2000.
MORETZSOHN, M.C., *BMC Plant Biology*, 4:11, 2004.
PAIK-RO, *Theor. Appl. Genet.*, v.84, p.201-208, 1992.
PALMIERI, D.A., *Mol. Ecol. Notes*, v.2, p.551-553, 2002
PANDE, S. & RAO, J.N., *Plant Disease*, v.85, p.851-855, 2001.
ZHENG, B.S. *Theor Appl Genet*, v. 107, 1505-1515, 2003

DIVERSITY IN SECTION *ARACHIS* AND ITS POTENTIAL FOR PEANUT BREEDING

Simpson, C.E., Professor Emeritus.

Texas Agricultural Experiment Station, Texas A&M University System, Stephenville, TX 76401, USA
<c-simpson@tamu.edu>

Peanut (*Arachis hypogaea* L.) is cultivated mostly in tropical and sub-tropical climates. India and China are the largest peanut producers in the world; 13.5 million ha are grown in Asia, 5.3 million ha in Africa, 1.2 million ha in the Americas, and 0.1 million ha in other parts of the world (Carley and Fletcher, 1995).

Peanut is an economically important crop that is grown as a major oilseed and also for human consumption. Additionally, the foliage is an important fodder crop and the meal remaining after oil extraction is an important source of animal feed. Peanut is susceptible to numerous foliar and soil-borne pathogens. The most global peanut diseases are early and late leaf spots and rust caused by *Cercospora arachidicola* Hori, *Cercosporidium personatum* Deighton, and *Puccinia arachidis* Speg. respectively. In addition, *Sclerotium rolfsii*, which causes stem rot, *Sclerotinia minor* Jagger, which causes sclerotinia blight, several *Pythium* spp., and *Rhizoctonia solina* are soil-borne pathogens that cause important peanut diseases. Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) are the most important nematode pathogens of peanut (*Arachis hypogaea* L.)

Because of the wide use of peanut and peanut products from the production mentioned above, it is important that peanut breeding programs around the world have significant diversity for improvement through breeding the crop. The genus *Arachis* is divided into nine taxonomic sections (Krapovickas and Gregory, 1994). The cultivated peanut belongs to the section *Arachis*, along with thirty other species, all of which are cross compatible with each other to varying degrees, and producing hybrids that range from zero percent fertile up to 92 % fertility. It is the diversity of the 31 species of the section *Arachis* that is the subject of this paper.

The *Arachis* section species have diversity of characteristics which can be seen with the unaided eye, which include leaflet size, mainstem height, growth habit (often referred to as plant type), axonomorphic root, varying pod size and shape, pod types and shell thickness, seed coat colors and seed size.

Leaflet size ranges from the 12 mm long x 4 mm wide leaflets of *Arachis linearifolia* to the 60 mm long x 52 mm wide leaflets of *A. batizocoi*. Cultivated varieties generally range in the 65 mm x 32 mm category, but it is apparent that significant changes could be made in this trait if the desire or need to do so arose because the length ranges from 38 to 96 mm and the width from 15.5 to 45.1 mm (Simpson et al., 1992).

Mainstem height is another trait that can vary greatly. Some of the species in Section *Arachis* have a central axis of about 15 mm. Others extent to more than two meters if allowed to continue growth throughout the season. Cultivated varieties are generally selected to achieve a mainstem height at harvest of less than half a meter so harvesting is easier. In some areas of developing countries where harvesting is done by hand the taller mainstem might be desirable. Again, it is apparent that significant changes in mainstem height could be accomplished through breeding.

Growth habit is generally less diverse in the wild species than in the cultivated *A. hypogaea* materials. The wild species tend to be low growing and abundantly

branched from the lower nodes of the base of the plants. The varieties of the *fastigiata* sub-species are more upright in growth habit than the varieties of the *hypogaea* sub-species. Some materials of the *fastigiata* sub-species are what is known as star type, that is, the plants have a mainstem and four lateral (n+1) branches, all of equal length in mature plants. Generally, these star types are avoided for cultivated varieties because of harvesting difficulties, but because of the desirability of limited plant cover around the base of plants, using the star types to obtain intermediate segregates for selecting new cultivars is common among peanut breeders.

The axonomorphic root (tap root) has significant variability in its appearance and whether it is on a perennial plant or an annual plant. The root of the perennial plant will always have a more bold appearance vs. the annual plants after about 40 days of age.

The pod sizes and shapes vary greatly in the section *Arachis* (see page 11 in Krapovickas and Gregory, 1994). However, the variability within *A. hypogaea* is greater than all others in the genus. The length of the wild species pods ranges from 8 mm to 21 mm (Krapovickas and Gregory, 1994), but the *A. hypogaea* materials measured to date range from 20 mm to 69.9 mm (Simpson et al., 1992). Pod shapes vary greatly, as well.

The seed coat color in wild *Arachis* has only been observed to date as tan or white. Various shades of brown or black can be seen in some seed coats that have been lying dormant inside the shell and in the moist soil for several months past maturity, but these are not normal, natural colors of the mature seed coat. Seed coat colors within the cultivated peanut vary widely and encompass approximately 35 distinct colors or color combinations (Wynne and Coffelt, 1982).

The species of section *Arachis* also have characters that can only be seen with a microscope, by molecular analyses, or by a screening technique developed for resistance to a disease or nematodes. Such traits as nematode resistance, leafspot resistance, sclerotinia blight resistance, potential for apomixis, high oleic acid:low linoleic acid (high O/L ratio), early maturity and resistance to tomato spotted wilt virus are some of these traits. Simpson and Starr (2001), and Simpson et al. (2003) released two new peanut cultivars that are resistant to root-knot nematode (*Meloidogyne arenaria*), Smith and Simpson (Tamrun 96), released a cultivar resistant to tomato spotted wilt virus, Smith and Simpson, (Tamsan 90), and Simpson and Smith (Tamrun 98), released sclerotinia resistance. Simpson et al., (1994) demonstrated a potential for apomixis in *Arachis*, and Burow et al. (2001) published a molecular genetic map (RFLP) of *A. hypogaea* and a tri-species hybrid of *Arachis* section species.

Other characters observed but not demonstrated in the section *Arachis* include drought tolerance, higher oil content, rust resistance, and early maturity.

Literature cited

- CARLEY, D. H., and S. M. FLETCHER. 1995. An overview of world peanut markets. Pp. 554-557 in H. E. PATTEE and H. T. STALKER, eds. *Advances in Peanut Science*. Stillwater, OK: Am. Peanut Res. and Educ. Soc., Inc..
- BUROW, M.D., C.E. SIMPSON, J.L. STARR, and A.H. PATERSON. 2001. *Genetics*:159:823-837.
- KRAPOVICKAS, A. and W.C. GREGORY. 1994. *BONPLANDIA* 8: 1-4: 186.
- SIMPSON, C.E., J.L. STARR, M.D. BUROW, A.H. PATERSON 2003. *Crop Sci.* 43: 1561.
- SIMPSON, C.E. and J.L. STARR. 2001. *Crop Sci.* 41. 918.

SIMPSON, C.E., VALLS, J.F.M., and MILES, J.W. 1994. Reproductive Biology and potential for genetic recombination in *Arachis*. Chapter 4. IN: P.C. KERRIDGE and B. HARDY (eds.). Biology and Agronomy of Forage *Arachis*. CIAT Publ. No. 240. ISBN 958-9183-96-4. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Columbia. pp. 43-52.

Simpson, C.E., D.L. Higgins, G.D. Thomas, and E.R. Howard. 1992. Catalog of Passport Data and Minimum Descriptors of *Arachis Hypogaea L.* Germplasm Collected in South America 1977 – 1986. Texas Agricultural Experiment Station, Texas A&M University System MP – 1737. pp. 247.

Wynne, J.C. and T.A. Coffelt. 1982. Genetics of *Arachis hypogaea L.* Chapter 3. in Peanut Science and Technology. Ed. H.E. Pattee and C.T. Young. Pp. 50 - 94. Am. Peanut Res. And Educ. Soc. Inc. USA. Yoakum, TX 77995.

PRÉ-MELHORAMENTO EM AMENDOIM UTILIZANDO ESPÉCIES SILVESTRES

Fávero, A. P.¹, Simpson, C. E.²

¹ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – SAIN Parque Estação Biológica – CP 02372, 70.770-900, Brasília - DF, Brazil. E-mail: favero@cenargen.embrapa.br

² Texas A&M University – 1229 US Hwy 281 North, 76401, Stephenville, Texas, USA.
E-mail: c-simpson@tamu.edu

O amendoim (*Arachis hypogaea*) é considerado como a quarta oleaginosa mais consumida no mundo. O Brasil produziu em 2002, cerca de 190 mil toneladas, sendo que 80% da área plantada se situa no Estado de São Paulo (CONAB, 2003). O principal problema da cultura neste Estado e no mundo são as doenças fúngicas de parte aérea. Diversas espécies do gênero *Arachis* são consideradas resistentes a várias pragas e doenças (Stalker & Moss, 1987; Pande, 2001; Fávero et al. 2001). Os objetivos deste trabalho foram: 1) identificar espécies silvestres pertencentes à Secção *Arachis* resistentes à mancha castanha (*Cercospora arachidicola*), mancha preta (*Cercosporidium personatum*) e ferrugem (*Puccinia arachidis*); 2) realizar cruzamentos entre espécies de genoma “A” e “B” resistentes à pelo menos uma doença fúngica; 3) duplicar os cromossomos dos híbridos interespecíficos estéreis; 4) realizar cruzamentos entre *Arachis hypogaea* e os anfidiplóides sintéticos; 5) obter a geração F₁ que tivesse 50% do genoma do amendoim cultivado, 25% do genoma da espécie silvestre de genoma “A” e 25% do genoma da espécie de genoma “B”. 6) realizar a caracterização citogenética dos indivíduos das progênes F₁ quanto ao número de cromossomos. 7) realizar retrocruzamentos e novos cruzamentos interespecíficos.

Os experimentos foram conduzidos em condições de telado, no Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” / USP e na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Para a identificação de genótipos resistentes às doenças fúngicas, utilizou-se a técnica de folhas destacadas, segundo Moraes & Salgado (1982), em laboratório, com inoculação artificial, condições controladas de temperatura a 25°C e luz alternada (10h luz). Os cruzamentos entre espécies silvestres, de genoma “B” com as de genoma “A”, resistentes a pelo menos uma doença foram realizados em condições de telado, com emasculação realizada ao final da tarde e polinização na manhã do dia seguinte. A duplicação de cromossomos, de células somáticas de híbridos interespecíficos com genoma “AB”, foi obtida mediante o tratamento de estacas com colchicina a 0,2% por aproximadamente 12h, em condições de luz e temperatura entre 25-30°C. Os cruzamentos entre *Arachis hypogaea* e os anfidiplóides sintéticos foram realizados em condições de telado, na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Observou-se que várias espécies silvestres foram altamente resistentes à pelo menos uma das três doenças estudadas. Foi possível selecionar, como genitores masculinos, 12 acessos de espécies de genoma “A” e, como femininos, 6 acessos de genoma “B”, listados na Tabela 1.

Tabela 1. Número de polinizações, número de plantas da progênie, número de híbridos e porcentagem de sucesso para cada combinação de acessos de espécies diplóides de *Arachis* analisada.

Cruzamentos (Espécies e acessos de germoplasma)	número de híbridos	% de sucesso
<i>A. batizocoi</i> 9484 x <i>A. cardenasii</i> 10017	12	30,77
<i>A. batizocoi</i> 9484 x <i>A. kempff-mercadoi</i> 13250	21	28,00
<i>A. batizocoi</i> 9484 x <i>A. helodes</i> 6325	8	22,86
<i>A. aff. magna</i> 6389 x <i>A. duranensis</i> 14167	2	22,22
<i>A. batizocoi</i> 9484 x <i>A. duranensis</i> 14167	4	21,05
<i>A. ipaënsis</i> 30076 x <i>A. duranensis</i> 14167	5	20,83
<i>A. ipaënsis</i> 30076 x <i>A. villosa</i> 12812	17	19,32
<i>A. magna</i> 13751 x <i>A. stenosperma</i> 3	6	9,84
<i>A. aff. magna</i> 6389 x <i>A. aff. diogoi</i> 9401	2	7,69
<i>A. magna</i> 13751 x <i>A. aff. diogoi</i> 9401	3	4,29
<i>A. magna</i> 13751 x <i>A. cardenasii</i> 10017	2	3,70
<i>A. aff. magna</i> 6389 x <i>A. stenosperma</i> 12488	3	1,32
<i>A. hoehnei</i> 30006 x <i>A. helodes</i> 6325	1	0,38
<i>A. aff. magna</i> 6389 x <i>A. villosa</i> 12812	2	0,92
<i>A. hoehnei</i> 30006 x <i>A. simpsonii</i> 13710	1	0,44
<i>A. aff. magna</i> 6389 x <i>A. kuhlmannii</i> 13721	1	0,39
<i>A. hoehnei</i> 30006 x <i>A. cardenasii</i> 10017	1	0,38
<i>A. magna</i> 30097 x <i>A. simpsonii</i> 13710	0	0,00
<i>A. magna</i> 30097 x <i>A. kuhlmannii</i> 10506	0	0,00
<i>A. magna</i> 30097 x <i>A. kempff-mercadoi</i> 13250	0	0,00
<i>A. magna</i> 30097 x <i>A. diogoi</i> 10602	0	0,00
<i>A. aff. magna</i> 6389 x <i>A. diogoi</i> 10602	0	0,00
<i>A. hoehnei</i> 30006 x <i>A. stenosperma</i> 12488	0	0,00
<i>A. batizocoi</i> 9484 x <i>A. stenosperma</i> 3	0	0,00
<i>A. batizocoi</i> 9484 x <i>A. villosa</i> 12812	0	0,00
<i>A. aff. magna</i> 6389 x <i>A. cardenasii</i> 10017	0	0,00
Total	91	

A partir de 26 tipos de cruzamentos diferentes, foi possível obter 17 híbridos interespecíficos diferentes com genoma "AB". Após o tratamento com colchicina de todos os 17 tipos de híbridos, foram obtidas cinco combinações híbridas que produziram flores tetraplóides (*A. hoehnei* x *A. helodes*, *A. ipaënsis* x *A. duranensis*, *A. hoehnei* x *A. cardenasii*, *A. aff. magna* x *A. villosa*, *A. aff. magna* x *A. aff. diogoi*), observados na Tabela 2.

Tabela 2. Viabilidade de pólen por coloração em híbridos diplóides e tetraplóides.

Híbridos	Viabilidade de pólen em híbridos diplóides	Viabilidade de pólen em híbridos
K 9484 x GKP 10017	0,13	-
K 9484 x V 13250	0,40	-
K 9484 x V 6325	0,79	-
V 6389 x V 14167	4,25	-
K 9484 x V 14167	0,38	-
KG 30076 x V 14167	0,98	97,74
KG 30076 x V 12812	0,84	-
V 13751 x Lm 3	2,86	-
V 6389 x V 9401	22,99	73,78
V 13751 x GKP 10017	4,76	-
V 6389 x V 12488	4,90	-
KG 30006 x V 6325	12,61	96,57
V 6389 x V 12812	16,25	49,25
KG 30006 x V 13710	14,01	-
V 6389 x V 13721	24,36	-
KG 30006 x GKP 10017	18,97	82,17

Foram realizados 21 tipos de cruzamentos diferentes entre *Arachis hypogaea* e os anfidiplóides sintéticos e realizada a caracterização citogenética dos indivíduos híbridos das progênes baseada em contagem de cromossomos em metáfase mitótica (Tabela 3).

Tabela 3. Combinações efetuadas para os cruzamentos entre acessos de *Arachis hypogaea* e os aniplóides sintéticos obtidos, número de polinizações realizadas (NP), número de plantas híbridas (NPH), porcentagem de sucesso (realização de polinizações em relação à obtenção de híbridos) e contagem de cromossomos dos híbridos (CCH).

Acessos de <i>A. hypogaea</i>		Acessos	NP	% de sucesso	NPH	CCH
BR 1	X	V 6389 x V 12812	19	5,26	1	40
IAC-Caiapó	X		22	0,00	0	-
IAC-Runner	X		27	0,00	0	-
IAC-Tatu-ST	X		41	0,00	0	-
BR 1	X	KG 30076 x V 14167	290	11,72	34	40
IAC-Caiapó	X		53	30,19	16	40
IAC-Runner	X		62	33,87	21	40
IAC-Tatu-ST	X		251	5,18	13	40
Mdi 1560	X		21	4,76	1	40
Mdi 1538	X		68	16,18	11	40
Mdi 1678	X		15	0,00	0	-
V 12548	X		77	5,19	4	40
V 12549	X		51	3,92	2	40
BR 1	X	KG 30006 x V 9401	5	0,00	0	-
IAC-Caiapó	X		1	0,00	0	-
IAC-Runner	X		4	0,00	0	-
IAC-Tatu-ST	X		15	0,00	0	-
BR 1	X	KG 30006 x GKP 10017	56	1,79	1	30
IAC-Caiapó	X		93	1,08	1	40
IAC-Runner	X		89	1,12	1	30
IAC-Tatu-ST	X		56	1,79	1	-
BR 1	X	KG 30006 x V 6325	18	0,00	0	-
IAC-Caiapó	X		5	0,00	0	-
IAC-Runner	X		2	0,00	0	-
IAC-Tatu-ST	X		18	0,00	0	-

Através de caracterização molecular (tipo microssatélites), foi possível confirmar a natureza híbrida de diversos indivíduos das progênies. Foram obtidos 13 tipos de híbridos: *Arachis hypogaea* (cvs. IAC-Tatu-ST, Br-1, IAC-Caiapó, IAC-Runner) x [*A. hoehnei* x *A. cardenasii*]; *Arachis hypogaea* cv. Br-1 x [*A. aff. magna* x *A. villosa*]; *Arachis hypogaea* (acessos V 12548, V 12549, Mdi 1560, Mdi 1538, cvs. Br-1, IAC-Tatu-ST, IAC-Caiapó, IAC-Runner) x [*A. ipaënsis* x *A. duranensis*]. Segundo a tabela 3, foi possível observar que a maioria dos indivíduos híbridos possui 40 cromossomos, permitindo assim a realização de retrocruzamentos.

Novos cruzamentos têm sido realizados para ampliar a variabilidade genética do amendoim cultivado (Tabela 4). A colheita foi realizada em abril de 2004, não sendo possível determinar até o presente momento, se as hibridações foram atingidas com sucesso.

Tabela 4. Cruzamentos realizados na safra 2003/2004.

Populações F₁ (50% <i>A. hypogaea</i> + 50% genoma silvestre)	
Tatu	x [<i>A. aff. magna</i> V 6389 x <i>A. aff. diogoi</i> V 9401]
Caiapó	x [<i>A. aff. magna</i> V 6389 x <i>A. aff. diogoi</i> V 9401]
Runner	x [<i>A. aff. magna</i> V 6389 x <i>A. aff. diogoi</i> V 9401]
BR 1	x [<i>A. aff. magna</i> V 6389 x <i>A. aff. diogoi</i> V 9401]
Tatu	x [<i>A. hoehnei</i> KG 30006 x <i>A. cardenasii</i> GKP 10017]
Caiapó	x [<i>A. hoehnei</i> KG 30006 x <i>A. cardenasii</i> GKP 10017]
Runner	x [<i>A. hoehnei</i> KG 30006 x <i>A. cardenasii</i> GKP 10017]
BR 1	x [<i>A. hoehnei</i> KG 30006 x <i>A. cardenasii</i> GKP 10017]
Tatu	x [<i>A. hoehnei</i> KG 30006 x <i>A. helodes</i> V 6325]
Caiapó	x [<i>A. hoehnei</i> KG 30006 x <i>A. helodes</i> V 6325]
Runner	x [<i>A. hoehnei</i> KG 30006 x <i>A. helodes</i> V 6325]
BR 1	x [<i>A. hoehnei</i> KG 30006 x <i>A. helodes</i> V 6325]
Tatuí	x [<i>A. ipaënsis</i> KG 30076 x <i>A. duranensis</i> V 14167]
Mdi 1678	x [<i>A. ipaënsis</i> KG 30076 x <i>A. duranensis</i> V 14167]
Populações RC₁ (75% <i>A. hypogaea</i> + 25% genoma silvestre)	
Caiapó	x Caiapó x [<i>A. hoehnei</i> KG 30006 x <i>A. cardenasii</i> GKP 10017]
Caiapó	x Caiapó x [<i>A. ipaënsis</i> KG 30076 x <i>A. duranensis</i> V 14167]
BR 1	x BR 1 x [<i>A. ipaënsis</i> KG 30076 x <i>A. duranensis</i> V 14167]
Runner	x Runner x [<i>A. ipaënsis</i> KG 30076 x <i>A. duranensis</i> V 14167]
Tatu	x Tatu x [<i>A. ipaënsis</i> KG 30076 x <i>A. duranensis</i> V 14167]
BR 1	x BR 1 x [<i>A. aff. magna</i> V 6389 x <i>A. villosa</i> V 12812]
Populações AB silvestre (50% genoma A + 50% genoma B)	
<i>A. cruziana</i> Wi 1302-3	x <i>A. stenosperma</i> V 10309
<i>A. williamsii</i> Wi 1118	x <i>A. helodes</i> V10470
<i>A. batizocoi</i> K 9484	x <i>A. microsperma</i> V 14042
<i>A. hoehnei</i> V 9094	x <i>A. diogoi</i> Vp 5000

Portanto, os resultados obtidos mostram que é possível a introgressão de genes de resistência a partir de espécies silvestres no amendoim cultivado via cruzamentos. Desta forma, é possível ampliar a variabilidade genética existente nos programas brasileiros de melhoramento de amendoim.

Referências bibliográficas:

- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, site consultado em 23/09/03. <http://www.conab.gov.br/download/safra/safra20022003Lev06.pdf>,
 FÁVERO, A. P.; MORAES, S. A. de ; VELLO, N. A.; VALLS, J. F. M. Anais do I Congresso de Melhoramento de Plantas, 03 a 06 de abril de 2001 - Goiânia, GO
 MORAES, S. A. de; SALGADO, C. L. Summa Phytopathologica, v.8, p.39-55, 1982.
 STALKER, H. T.; MOSS, J. P. Advances in agronomy, v.41, p.1-40, 1987.
 PANDE, S. Plant Disease, v.85, n.8, p.851-855, 2001.

PEANUT GERMPLASM COLLECTION, DIVERSITY AND ITS USE IN THE IMPROVEMENT PROGRAMS

Upadhyaya, H. D.; Pundir, R.P.S.

Genetic Resources, Crop Improvement, International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT), Patancheru 502 324, Andhra Pradesh, India

Crop genetic resources have been used since man first started cultivating the plants, but their importance was not realized until the beginning of 20th century. With expansion of crop improvement programs, breeders realized that they could achieve greater success with the use of wider genetic variability. Globally over 81,000 peanut germplasm accessions have been conserved, of which 27% is conserved in USA, and 18% in R.S. Paroda ICRISAT gene bank in India. The International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT) has the global responsibility for collection, characterization, conservation, distribution, and utilization of peanut (*Arachis hypogaea* L.) and other related *Arachis* species.

Peanut germplasm in ICRISAT genebank: The ICRISAT germplasm collection currently consists of 14,966 accessions of peanut and 453 representing 46 taxa of wild *Arachis* species (origin: 93 countries). The collection is consisted of all the six botanical varieties and includes 45.4% of var. *hypogaea*, 36.7% var. *vulgaris*, 15.7% var. *fastigiata*, 1.7% var. *peruviana*, 0.1% each of var. *hirsuta* and *aequitoriana*. The entire collection consists of landraces (42.6%), breeding lines (31.3%), cultivars (6.9%), and others including genetic stocks (19.2%).

The acquisition and collection of peanut germplasm resources in ICRISAT genebank was started in 1976. Since that time, the genebank has acquired 12,660 accessions by donation and/or contribution from 87 organizations in 41 countries. In addition, 2759 accessions have been collected through 67 expeditions in 29 countries. India contributed maximum number (5,282) as donation by 21 institutions, and 1,041 accessions through 25 collection missions.

Germplasm conservation and distribution: In the ICRISAT genebank, the seeds of entire collection are stored in medium-term storage (MTS: 5⁰C; 20% RH) in aluminum cans. Recently conducted seed health monitoring on seeds conserved from 10-25 years in MTS indicated >75% seed viability for majority of the accessions. Accessions with declining seed viability (<75% seed germination) are regenerated on priority and the old seeds are replenished with fresh stock. Germplasm accessions are also conserved in long-term storage (LTS: -20⁰C) after packing in the vacuum-sealed aluminum foil pouches. Before packing, the seeds are dried to about 5% moisture content in the walk-in-drying room (100 m³ size; 15⁰C and 15%RH) facility. To date seeds of 6,820 accessions of *A. hypogaea* have been transferred to long-term storage. Wild *Arachis* from Section *Rhizomatosae* are maintained as vegetative material in concrete ring containers in glasshouses. Germplasm is supplied to users following a Material Transfer Agreement. We have supplied 92,347 samples including 2,157 of wild species representing 14,399 unique accessions worldwide, together with relevant passport information.

Characterization and evaluation: The majority of the peanut germplasm collection held in the genebank has been characterized at ICRISAT, Patancheru,

Andhra Pradesh, India (18° N, 78° E). Accessions are characterized during both the rainy (June to October) and post-rainy (November to April) seasons for 29 quantitative and 17 qualitative traits. Based on the evaluations, diversity for morphological and agronomic traits has been assessed (Upadhyaya et al., 2002a).

A large portion of the peanut collection has been screened for resistance to major biotic and abiotic stresses. Late leaf spot (LLS) [*Phaeosariopsis personata* (Berk. & Curt.) V. Arx.], rust (*Puccinia arachidis* Speg.), and early leaf spot (ELS) (*Cercospora arachidicola* Hori) are the most widely distributed and economically important diseases of peanut. Field screening of over 12,000 accessions revealed 143 rust resistant lines. Aflatoxin contamination of peanut is a serious problem and several sources of resistance have been identified. We also identified seven wild species accessions (ICG 8131, 11551, 11557, 11560, 13212, 13261 and 14875) with low aflatoxin contamination (Thakur et al. 2000). Rosette virus disease in Africa, and peanut bud necrosis disease (PBND) and peanut stripe virus (PStV) disease in Asia cause substantial damage to the peanut crop. Several lines with low PBND (< 20%) in field have been identified. Of the 9,000 accessions screened for PStV in Indonesia, none was found resistant. However, seven accessions of wild species showed high level of resistance to PStV (Prasad Rao et al. 1991). Germplasm sources resistant to various insect-pests were identified at ICRISAT. They include six accessions resistant to jassids (*Empoasca kerri* Pruthi), 11 to thrips (*Thrips palmi* Karny.), 10 to termites (*Odontotermes* spp.), two to leaf miner (*Aproaerema modicella* Deventer), and one to aphids (*Aphis craccivora* Koch.) (Ranga Rao and Wightman 1999).

Oil and protein contents are important quality attributes of peanut. Nearly 8,000 accessions have been screened for oil content and 5,501 accessions for protein content. Sixty-six lines with >50% oil and 125 lines with >30% protein, have been identified.

Geographical pattern of diversity: Data on 13,342 accessions for 16 morphological and 10 agronomic traits in two seasons were analyzed to study geographical patterns of variation. Principal component analysis using the 36 traits and clustering on first seven principal component scores delineated three regional clusters, consisting of North America, Middle East, and East Asia in the first cluster; South America in the second cluster; and West Africa, Europe, Central Africa, South Asia, Oceania, South Africa, East Africa, Southeast Asia, Central Asia and the Caribbean Islands in the third cluster (Upadhyaya et al 2002a).

Low utilization of germplasm resources: An analysis of peanut germplasm supplied to users from the ICRISAT genebank indicated that 92,347 (2,157 wild) seed samples of 14,399 accessions were supplied during 1976-2003. This figure is considered as inadequate use of germplasm resources. The use of germplasm in ICRISAT's crop improvement programs is also low. For example, the summary of parental lines used in the ICRISAT groundnut improvement program (1986-2002) revealed that 986 parents were used in making crosses to develop 8279 breeding lines, but this included only 132 unique germplasm accessions of groundnut and 10 of wild *Arachis* species. In USA and China also very few germplasm lines have been used in the breeding programs.

Forming subsets of germplasm to enhance its utilization: The peanut improvement programs have made significant progress in last two decades but exploitation of the available genetic variability is still limited and as a result most

peanut cultivars have a narrow genetic base. This base needs to be broadened, which could be achieved by developing manageable sample or “core collection” (Frankel 1984). A core collection contains a subset of accessions from entire collection that captures most of the available genetic diversity of species (Brown 1989a). The core subset can be evaluated extensively and the information derived could be used to provide a targeted entry point into the collection and thus more efficient utilization of entire collection. At ICRISAT, we have accomplished this by making subsets at following three levels:

i) Global Core collection: Brown (1989 a) using sampling theory of selectively neutral alleles argued that the entries in a core subset should be about 10% of total collection, with a ceiling of 3000 per species. This level of sampling is effective in retaining 70% alleles of the entire collection. At ICRISAT, a total of 14,310 accessions from 92 countries on which data was available for a minimum set of 14 qualitative traits has been used in selecting the core collection. This consisted of 1,704 accessions: 784 accessions of var. *hypogaea*, 584 of *vulgaris*, 299 of *fastigiata*, 27 of *peruviana*, 6 of *aequatoriana*, and 4 of *hirsuta*. Different statistical tests revealed that the core collection has captured >85% diversity of the entire collection (Upadhyaya et al., 2003). This core collection provides an effective mechanism for the proper exploitation of groundnut germplasm resources for the genetic improvement of this crop and simplifies the genebank management.

ii) Mini-core collection: In many crops the number of accessions contained in genebanks are several thousands, and a core subset consisting of 10% of entire accessions would be again large and unwieldy to access traits of economic importance. Consequently, the main issue is to reduce the size of subset further without losing species diversity. Upadhyaya and Ortiz (2001) suggested the strategy for sampling the entire and core collections for developing a mini core collection, which contains about 1% of the entire collection but captures the most of the useful variation of the crop. The peanut core subset consisting of 1,704 accessions was evaluated in an augmented design with four control cultivars during 1999 rainy and 1999/2000 post-rainy seasons at Patancheru, Andhra Pradesh, India. Data on 13 morphological and 16 agronomic traits was recorded. The same strategy, which was used in formation of core collection, was followed to develop the mini subset consisting of 184 (11.03% of core and 1.37% of entire collection) accessions (Upadhyaya et al., 2002b).

i) Regional core collection (Asian region): To enhance the utilization of peanut genetic resources in Asia region, where productivity is rather low, a groundnut core collection for Asia region, consisting of 504 (10.6% of entire) accessions was developed using 15 morphological descriptors (Upadhyaya et al., 2001a).

Uses of core collections in crop improvement: From the groundnut core collection consisting of 1,704 accessions (Upadhyaya et al. 2003), we selected 21 early maturing landraces (similar to Chico) and evaluated them at 1240⁰ Cd (equivalent to 75 days after sowing (DAS) and 1470⁰ Cd (equivalent to 90 DAS) in rainy season at Patancheru along with early maturing cv. Chico. ICGs 4558, 4729 and 9930 (1.97-2.15 t ha⁻¹) produced 25-36% more pod yields than the early maturing cv. JL 24 at 1240⁰ Cd in the 2001/02 post rainy season.

We have been able to select promising accessions for low temperature tolerance using core collection of groundnut. The set of 1,704 core accessions was screened for low temperature tolerance at germination under laboratory conditions. 343 accessions were found promising, which included 25 cultivars, 93 breeding lines, 164 landraces, and 61 others. The landraces were further characterized for yield and related traits. Twenty-four accessions were found most promising (Upadhyaya et al 2001b).

In USA, the peanut core collection of 831 accessions (Holbrook et al. 1993) was tested against various stresses and a number of resistant sources were identified. They included 36 core accessions resistant to root knot nematode (Holbrook et al. 1997), 14 tolerant to pre-harvest aflatoxin contamination (Holbrook et al 1998), and six with high level of resistance to *Rhizoctonia* limb rot (Franke et al. 1999).

The 184 mini-core accessions (Upadhyaya et al. 2002b) were evaluated for traits related to drought tolerance, specific leaf area (SLA) and soil plant analysis development (SPAD) chlorophyll meter reading (SCMR), and 180 accessions were identified with high water use efficiency (WUE) at ICRISAT. Likewise, the Asian groundnut core collection (Upadhyaya et al. 2001a) consisting of 504 accessions was evaluated in multi-environments to select diverse and superior germplasm accessions for use as parents in improvement programs. On the basis of performance compared to control cultivars in different environments, 15 *fastigiata*, 20 *vulgaris*, and 25 *hypogaea* accessions from 14 countries were selected at ICRISAT.

Gaps in the germplasm collection: In the initial years, we concentrated on assembling germplasm that existed with other institutes in India and abroad followed by germplasm collecting missions in areas that were poorly represented. The analysis of the currently available passport data on the germplasm collection revealed that the countries of primary and secondary centers of diversity were poorly represented. Also the number of botanical vars. *aequitoriana* and *hirsuta* is less in the collection. Efforts should be made to secure new germplasm representing these regions/taxa to enrich the germplasm collection.

References

- BROWN, A.H.D. 1989a. Genome 31:818-824.
- FRANKE, M.D., T.B. BRENNEMAN, and C.C. HOLBROOK. 1999. Plant Dis. 83:944-948.
- FRANKEL, O.H. 1984. Genetic perspective of germplasm conservation. p. 161-170. *In*: Genetic Manipulations: Impact on Man and Society (W. ARBER et. al. ed.). Cambridge University Press, Cambridge, England.
- HOLBROOK, C.C., D.W. WILSON and M.E. MATHERON. 1998. Proc. Am. Peanut Res. & Educ. Soc. 30:21.
- HOLBROOK, C.C., M.G. STEPHENSON and A.W. JOHNSON. 1997. Agron. Abstr.:157.
- HOLBROOK, C.C., W.F. Anderson and R.N. Pittman. 1993. Crop Science 33: 859-861.
- PRASAD RAO, R.D.V.J., A.S. REDDY, S.K. CHAKRABARTY, D.V.R. REDDY, V.R. RAO, and J.P. MOSS. 1991. Peanut Sci. 18:1-2.
- RANGA RAO, G.V., and J.A. WIGHTMAN. 1999. Status of the integrated management of groundnut pests in India. Pages 435-459. *In*: IPM System in Agriculture (UPADHYAYA, R.K., K.G. MUKERJI, and R.L. RAJAK eds.). Aditya Books Pvt. Ltd., New Delhi.
- THAKUR, R.P., V.P. RAO, S.V. REDDY, and M. FERGUSON. 2000. International *Arachis* Newsletter, No. 20:44-46.
- UPADHYAYA, H.D. and R. ORTIZ 2001. Theoretical and Applied Genetics 102:1292-1298.
- UPADHYAYA, H.D., R. ORTIZ, P.J. BRAMEL, and S. SINGH. 2001a. Development of groundnut core collection for Asia region. pp. 43. *In*: Hundred Years of Post-Mendelian Genetics and Plant breeding-

Retrospect and prospects. Diamond Jubilee Symposium of Indian Society of Genetics and Plant breeding (KHARKWAL, M.C. and R.B. MEHRA, eds.). New Delhi, India.

UPADHYAYA, H.D., S. N. NIGAM, and SUBE SINGH. 2001b. *Indian J. Plant Genet. Resources* 14:165-167.

UPADHYAYA, H.D., P.J. BRAMEL, R. ORTIZ, and SUBE SINGH. 2002a. *Euphytica* 128:191-204.

UPADHYAYA, H.D., P.J. BRAMEL, R. ORTIZ, and SUBE SINGH. 2002b. *Crop Science* 42: 2150-2156.

UPADHYAYA, H.D., R. ORTIZ, P.J. BRAMEL, and SUBE SINGH 2003. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 50:139-148.

DESARROLLO DE PROTOCOLOS PARA LA CONSERVACIÓN *IN VITRO* DE *ARACHIS* EN ARGENTINA

Rey, H. Y.

¹⁾Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales. Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE) CC 209 - Facultad de Ciencias Agrarias UNNE. Sargento Cabral 2131; (3400) Corrientes. Argentina. heberey@agr.unne.edu.ar

La necesidad de mantener la diversidad genética, o bien, clones seleccionados de "materiales elites" ha estimulado desde hace algunos años el desarrollo de estudios sobre el mantenimiento *in vitro* del germoplasma de especies vegetales (Roca et al., 1991).

Tanto Morel (1975) como Henshaw (1975) demostraron y defendieron la importancia que podían tener las técnicas de cultivo *in vitro* en la conservación de los recursos fitogenéticos como una alternativa en el mantenimiento de colecciones para su uso en el mejoramiento de plantas. Recién en la década de 1980, merced a los trabajos de Withers y Williams (1985), se reconoció el potencial de los métodos de cultivo *in vitro* para la conservación de especies de plantas "difíciles", abarcando las denominadas especies "recalcitrantes", designando así a aquellas especies propagadas vegetativamente cuyas semillas no se podían conservar a temperaturas bajas y reduciendo el contenido de agua.

Desde entonces, la conservación *in vitro* es considerada como parte de la estrategia general de preservación de una especie vegetal, siendo un auxiliar valioso y un suplemento de la conservación de recursos genéticos (Roca et al, 1991, Engelmann 2000).

Entre las técnicas de cultivo *in vitro* para la conservación de germoplasma de plantas, se ha usado el crecimiento lento como una opción de almacenamiento a corto y mediano plazo, con intervalos de subcultivos extendiéndose entre 12 meses y 4 años. Actualmente se conservan grandes colecciones a crecimiento lento como mandioca, batata, *Musa spp.* y ñame (Ashmore, 1997), modificando las condiciones físicas de incubación y/o modificaciones en la constitución del medio de cultivo con el fin de reducir la proporción de crecimiento de los tejidos conservados *in vitro*. Aunque los procedimientos más exitosos y ampliamente usados están basados en la reducción de la temperatura de incubación o en la reducción de los componentes químicos de los medios de cultivo (Roca et al, 1991), también han sido útiles aquellos procedimientos que combinan reducción de temperatura e incubación en oscuridad (Withers and Engelmann, 1998; Negri et al, 2000; Roca et al, 1989).

El germoplasma de la mayoría de las especies de *Arachis* puede ser conservado en bancos de semillas, usando técnicas convencionales. En este sentido, estas especies podrían ser incluidas dentro del grupo de las "semillas ortodoxas" que pueden ser deshidratadas a 5% o menos, sin sufrir mayores daños. Una vez secas, la viabilidad de estas semillas puede prolongarse mediante el empleo de bajas temperaturas y humedad (Roberts, 1973). Con este método se están conservando semillas de casi 50.000 accesiones de *Arachis hypogaea* en varios lugares del mundo – India, USA, Argentina (Manfredi, Cba.), Indonesia, Brasil y Senegal (Williams, 1989).

En tal sentido, el cultivo de tejidos ofrece varios procedimientos para resolver problemas en la conservación de germoplasma de *Arachis spp.* especialmente en los

materiales que son propagados en forma vegetativa. Este es el caso de *A. Pintoi* ($2n=3x=30$), *A. glabrata* y *A. Burkartii*. Para que ello sea posible deben desarrollarse sistemas de multiplicación y conservación *in vitro* que permitan la obtención de plantas.

En el presente trabajo se informa acerca de 1) el desarrollo de sistemas de regeneración de plantas y 2) desarrollo de protocolos para conservación a mediano plazo.

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal: El material utilizado provino de plantas adultas de *Arachis Pintoi* (citotipo diploide) que crecen en el jardín del IBONE. Estas semillas fueron colectadas por A. Krapovickas y W.C. Gregory en Cruz das Almas, Bahía, Brasil (ejemplar de herbario Gregory y Krapovickas 12787, depositado en CTES). Las plantas del citotipo triploide fueron proporcionadas por F.M. Valls de Embrapa/Cenargen, Brasília, Brasil a A. Krapovickas (ejemplar de herbario Lavia 90, depositado en CTES).

Origen de los explantes: Se tomaron como fuente de explante ápices caulinares de 2 mm de plantas adultas crecidas en el jardín. Los explantes fueron desinfestados mediante inmersión en etanol 70% por 30 segundos seguido de inmersión en una solución comercial de lavandina (0,9% de hipoclorito de sodio, concentración final) con una gota de Tween[®] por 10 min y enjuagadas 3 veces con agua destilada estéril. Como la contaminación con hongos y bacterias fue elevada, los experimentos que se describen a continuación fueron realizados con plantas establecidas *in vitro*.

En el presente trabajo fue evaluado el potencial de regeneración de plantas *in vitro* de ápices (2-3 mm de longitud), meristemas apicales de (0,3-0,5 mm de longitud) y de segmentos nodales de 4-7 mm de longitud con una yema axilar de dos citotipos de *Arachis Pintoi*, uno diploide ($2n=2x=20$) y otro triploide ($2n=3x=30$).

Condiciones de incubación: Se incubó en un cuarto climatizado a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ bajo 14 hs de fotoperíodo con una irradiación de $116 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ provista por lámparas fluorescentes Philips TLD 36W/840.

En un experimento los tubos fueron incubados a 4°C en oscuridad. Los explantes fueron mantenidos en estas condiciones durante un período de 360 días; cada 90 días, los explantes fueron recultivados a medios frescos (a los mismos medios) y transferidos a un cuarto climatizado a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ con un fotoperíodo de 14 hs ($116 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), con el fin de evaluar porcentaje de sobrevivientes.

Medio de cultivo. Consistió en las sales y vitaminas de Murashige & Skoog (1962) (MS) con 3% de sacarosa, suplementado con diversos reguladores del crecimiento.

Para el cultivo de meristemas, ápices y segmentos nodales se empleó el MS adicionado de diferentes concentraciones y combinaciones de ANA (0,01; 0,05; 0,1 mg/L) y BA (0,01; 0,1 y 1 mg/L).

En los experimentos que involucraron medios subóptimos, se cultivaron *in vitro* ápices y segmentos nodales en el medio de Murashige y Skoog (MS) completo y reducido a 1/2, 1/4 y 1/8 de su concentración, solo o suplementado con ácido naftalenacético (ANA) 0,01 mg/L. El medio fue solidificado con 0,65% de agar (Sigma A-1296, St. Louis, Mo). El pH de los medios fue ajustado a 5,8 con KOH o HCl antes del agregado de agar. Los tubos fueron obturados con papel de aluminio y

esterilizados a 1,46 Kg cm² (121 °C) durante 20 min. La incubación fue realizada a 27 ± 2 °C con un fotoperíodo de 14 hs (116 μmol m⁻² s⁻¹).

RESULTADOS

Regeneración de plantas a partir de ápices, meristemas y segmentos nodales.

Ápices y segmentos nodales cultivados del citotipo diploide.

En la Fig. 1 se representa el efecto de la suplementación al medio de MS con 10 combinaciones de ANA y BA en la regeneración de plantas a partir de ápices y segmentos nodales. Aunque ambos explantes permitieron la regeneración de plantas, los segmentos nodales parecían ser ligeramente mejores que los ápices. El mejor medio de cultivo resultó ser el MS suplementado con 0,01 mg/L de ANA y 0,01 mg/L de BA. Concentraciones de ANA superiores a 0,05 mg/L en combinación con 0,01 mg/L ó 0,1 mg/L BA no resultaron ser eficaces en la inducción de plantas. Un resultado similar se obtuvo en la combinación de MS + 0,01 mg/L de ANA + 1 mg/L BA. Alrededor del 90% de los segmentos nodales cultivados en MS + 0,01 mg/L ANA + 0,01 mg/L de BAP a los 30 días regeneró directamente plantas enteras de los ápices sin la formación de callos. Gagliardi *et al.* (2002) trabajando con *Arachis retusa*, Krapov., W.C. Gregory y Valls, *A. macedoi* Krapov. y W.C. Gregory, y *A. burchelli* Krapov. y W.C. Gregory recomiendan el cultivo de segmentos nodales en MS suplementado con 0,5 mg/L ANA como único regulador de crecimiento.

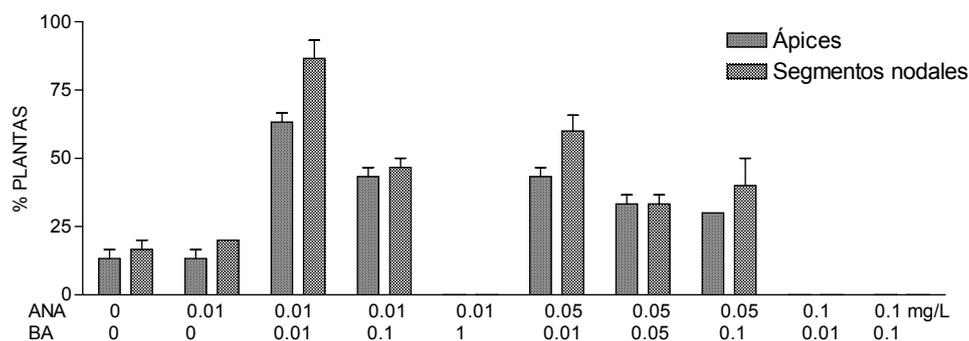


Figura 1. Efecto de 10 combinaciones de ANA y BA en la regeneración *in vitro* de plantas por cultivo de ápices y segmentos nodales de *Arachis Pintoi* (2n=2x=20). (La barra vertical representa ± SE).

Cultivo de meristemas del citotipo diploide.

Transcurridos 30 días de cultivo los meristemas mostraron cuatro tipos de respuestas: 1) la continuación del crecimiento de estructuras preexistentes, llegando a observarse ápices (sin hojas expandidas) de menos de 3 mm de longitud 2) la regeneración de brotes (con hojas expandidas) de menos de 3 mm de longitud; 3) la regeneración de vástagos con hojas expandidas de más de 5 mm de longitud y 4) regeneración de plantas completas. La proporción relativa de estas respuestas fue fuertemente influenciada por el medio de cultivo empleado. La regeneración de

plantas sólo se obtiene con combinaciones específicas de ANA y BA (Fig.2). Aunque se obtuvo regeneración de plantas y vástagos de 5 mm de longitud en varios medios de cultivo, la combinación de MS + 0,01 mg/L de ANA + 0,01 mg/L BA resultó ser la más eficiente. Bajo estas condiciones, se obtuvo el 17% de plantas a partir del cultivo de meristemas (Fig. 2). Los demás explantes fueron transferidos al medio antes mencionado y luego de transcurridos 60 días el 55% de los explantes diferenció plantas, mientras el 45% produjo vástagos mayores a 3 mm (con expansión de hojas). Los vástagos fueron enraizados exitosamente al ser cultivados a medios para inducir rizogénesis.

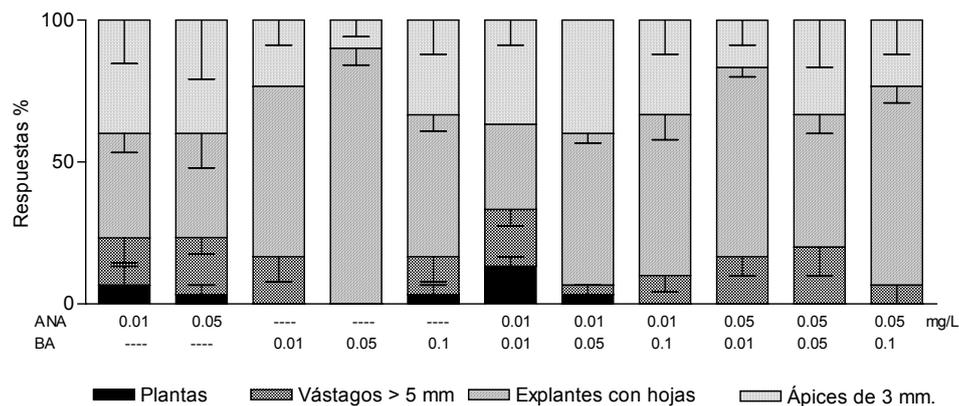


Figura 2. Efecto de varias combinaciones de ANA y BA en las respuestas morfogénicas de meristemas de *Arachis Pinto* ($2n=2x=20$) cultivadas *in vitro* (La barra vertical representa en error standard).

Basado en las respuestas morfogénicas del cultivo de meristemas de *A. Pinto* incluidas en el presente trabajo, es posible concluir que la concentración y combinación de reguladores de crecimiento gobiernan la regeneración de plantas. El efecto benéfico de la presencia de ANA y BA en el medio de cultivo para caulogénesis o regeneración de plantas a partir del cultivo de meristemas de *A. hypogaea* fue demostrada previamente por (Karthan *et al.*, 1981; Morris *et al.*, 1997; Radhakrishnan *et al.*, 1999). Sin embargo, las concentraciones de ANA y BA recomendadas como óptimas por estos autores son ligeramente diferentes a las obtenidas en este estudio. Karthan *et al.*, (1981) informaron que la regeneración de plantas ocurre cuando se emplea 0,1 μ M (0,02 mg/L) de BA en combinación con 10 μ M (1,86 mg/L) de ANA. Sin embargo, Morris *et al.*, (1997), y Radhakrishnan *et al* (1999) recomendaron utilizar 1 mg/L de ANA y BA. Asimismo, Bajaj (1983) empleando 2 mg/L de AIA + 0,2 mg/L de BA informa que el 70-80% de los meristemas cultivados desarrollan vástagos en 4-6 semanas.

Cultivo de ápices, meristemas y segmentos nodales del citotipo triploide.

Del mismo modo que con el citotipo diploide, los tres tipos de explantes del citotipo triploide fueron cultivados *in vitro* en MS + 0,01 mg/L de ANA y de BA respectivamente, permitiendo la regeneración de vástagos y plantas (Tabla 1). Se indujo el enraizamiento en aproximadamente el 80% de los vástagos mediante su

cultivo en un medio conteniendo MS+ 0,01 mg/L de ANA. Las plantas fueron transferidas exitosamente a suelo.

Tabla 1. Regeneración de vástagos y plantas a partir de ápices, meristemas y segmentos nodales de *Arachis Pintoi* triploide ($2n= 3x= 30$) a los 30 días de cultivo en medios conteniendo MS + 0.01 mg/L de ANA + 0.01 mg/L de BA.

Explantes	% explantes que diferencian	
	vástagos*	plantas
ápices	29 (± 5)**	12(± 5)
meristemas	26 (± 5)	6(± 5)
segmentos nodales	37(± 7)	60(± 8)

* Únicamente vástagos con 5 mm o más de longitud fueron contabilizados

** \pm SE.

Medios subóptimos

Transcurridos 12 meses pudo observarse respuestas parecidas en ambos citotipos (diploide y triploide), razón por la cual se representan únicamente las respuestas del citotipo triploide. En la Fig.3 donde se representan los resultados del cultivo de ápices se observa que en todos los medios se regeneran plantas en porcentajes del 18 al 20%, excepto en aquellos donde la concentración salina del MS fue de 1/8. Es importante señalar que todos los explantes que permanecieron verdes, cuando fueron subcultivados a medios frescos conteniendo MS + 0,01 mg/L de ANA + 0,01 mg/L BA , brindaron entre el 70 y 90% de plantas.

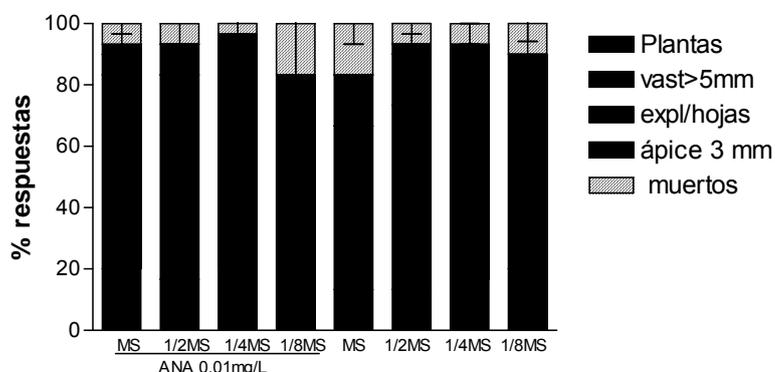


Fig. 3 Efecto de ocho medios de cultivo en las respuestas morfogénicas de ápices de *A. Pintoi* ($2n=3x=30$), conservados durante 12 meses en un cuarto climatizado a $27 \pm 2^\circ\text{C}$.

Al analizar las respuestas obtenidas con segmentos nodales, que se representan en la Fig .4 se aprecia que en todos los medios hubo regeneración de plantas en porcentajes que oscilaron entre el 35 al 43% y entre el 55 y 75% de explantes muertos. Comparativamente entre ambos tipos de explantes, resulta ser más eficiente para conservar germoplasma, el cultivo de ápices por presentar menor mortandad de explantes transcurridos 12 meses.

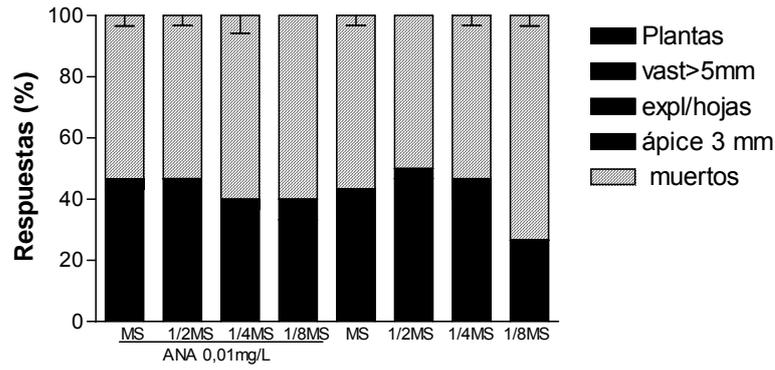


Fig. 4 Efecto de ocho medios de cultivo en las respuestas morfológicas de segmentos nodales de *A. Pintoi* ($2n=3x=30$), conservados durante 12 meses en un cuarto climatizado a $27 \pm 2^\circ\text{C}$.

Conservación de germoplasma a baja temperatura (4°C)

Transcurridos 3 meses se observó que todos los meristemas habían muerto en ambos citotipos, mientras que los ápices del citotipo diploide brindaron entre el 20 y 30% de plantas y entre el 30 y 40% de explantes vivos (Fig. 5). Los segmentos nodales posibilitaron entre el 60 y 80% de plantas y entre 10 y 40 % de explantes vivos (Fig. 6), dependiendo del medio de cultivo en que se encuentren.

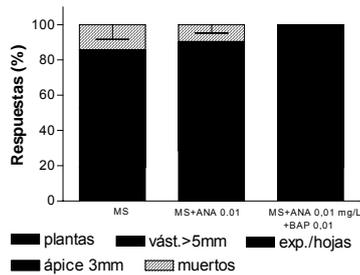


Fig. 5 Efecto de la conservación de ápices de *A. Pintoi* ($2n=2x=20$) a 4°C , en tres medios de cultivo durante 3 meses.

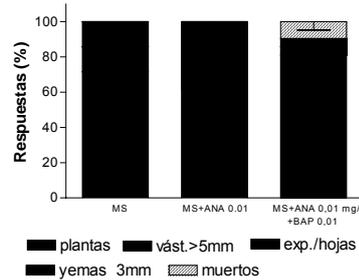


Fig. 6 Efecto de la conservación de segmentos nodales de *A. Pintoi* ($2n=2x=20$) a 4°C , en tres medios de cultivo durante 3 meses.

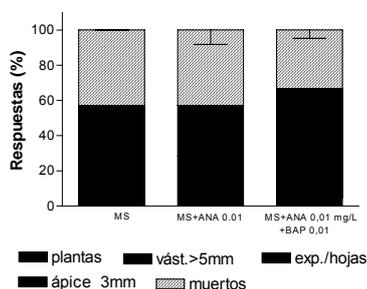


Fig. 7 Efecto de la conservación de ápices de *A. Pintoi* ($2n=2x=20$) a 4°C , en tres medios de cultivo durante 9 meses.

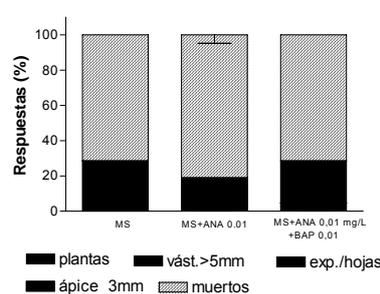


Fig. 8 Efecto de la conservación de segmentos nodales de *A. Pintoi* ($2n=2x=20$) a 4°C , en tres medios de cultivo durante 9 meses.

Estas respuestas fueron variando sensiblemente con el transcurso del tiempo, observando que a los 9 meses únicamente se obtuvo el 3% de plantas tanto para

ápices (Fig.7) como para segmentos nodales (Fig.8); mientras aumentó la proporción de explantes muertos (ápices 30 -40% y segmentos nodales 70-80%). El citotipo triploide es más sensible a 4°C, ya que a los 9 meses no se observan explantes vivos, mientras que con el citotipo diploide recién se observan idénticos resultados a los 12 meses.

Conclusiones:

Los resultados informados sugieren que la regeneración de plantas de *Arachis Pinto* de los citotipos diploide y triploide pueden ser logrado rápidamente a través del cultivo de ápices, meristemas y de segmentos nodales en MS + 0,01 mg/l de ANA + 0,01 mg/L de BA. Pueden regenerarse plantas en una sola fase de cultivo en 30 días o en dos fases, involucrando 1) la regeneración de vástagos 2) el enraizamiento de los mismos en MS + 0,01 mg/L de ANA.

Es factible conservar ápices de *Arachis Pinto* por el termino de 1 año en un medio subóptimo como por ej. MS 1/4 con 0,01 mg/L de ANA, sin necesidad de subcultivos.

Actualmente también en el IBONE, se están desarrollando sistemas que permiten la crioconservación de meristemas y embriones somáticos en nitrógeno líquido (-196 °C). El porcentaje de regeneración de plantas está alrededor del 35 - 40%.

Apoyo financiero: Estos trabajos fueron financiados parcialmente por el CABBIO, CONICET, SGCyT (UNNE) y por USDA/FAS/RSED/Scientific Cooperation Program.

Referencias bibliográficas

- ASHMORE SE. In Status report on the development and application of *in vitro* techniques for the conservation and use of plant genetic resources, ed. F. ENGELMANN, pp 5-18. IPGRI. Rome.1997.
- BAJAJ YPS. Euphytica 32: 425-430; 1983.
- ENGELMANN F. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. En: Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application. ENGELMANN F; TAKAGI H (eds.). IPGRI JIRCAS International Agriculture Series No. 8 Rome. pp. 8-20, 2000.
- GAGLIARDI RF, PACHECO GP, VALLS FM, & MANSUR E. Biologia Plantarum 45: 353-357. 2002.
- HENSHAW GG. Technical aspects of tissue culture storage for genetic conservation. En: FRANKEL, OH y HAWKS JG (eds.). Crop genetic resources for today and tomorrow. Cambridge University Press, Cambridge, Inglaterra. p. 349-358. 1975.
- KARTHA KK, PAHL K, LEUNG NL & MROGINSKI LA.. Can. J. Bot. 59:1671-1679. 1981.
- MOREL, G Meristem culture techniques for the long-term storage of cultivated plants. En: FRANKEL, OH y HAWKS, JG (eds.). Crop genetic resources for today and tomorrow. Cambridge University Press, Cambridge, Inglaterra. p. 327-332, 1975.
- MORRIS JB, DUNN S, PINNOW DL, HOPKINS MS & PITTMAN RN. Crop Sci. 37:591-594. 1997.
- MURASHIGE T & SKOOG F. Physiol. Plant. 15:473-497,1962.
- NEGRI V, TOSTI N & STANDARDI A. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 62: 159-162, 2000.
- RADHAKRISHNAN T, MURTY TKG, DESAI S & BANDYOPADHTAY A. Biologia Plantarum 42: 309-312, 1999.
- ROBERTS EH. Predicting the viability of seeds. Seed Science Technology 1: 499-514. 1973.
- ROCA WM, ARIAS DI & CHÁVEZ R. Métodos de conservación *in vitro* del germoplasma. En: ROCA WM y MROGINSKI LA (eds.). Cultivo de tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. CIAT, Cali. Colombia. pp 697-713, 1991.
- ROCA WM, CHÁVEZ R, MARTIN ML, ARIAS DI, MAFLA G, REYES R,. *In vitro* Genome. 31: 813-817, 1989.

WILLIAMS JT. Plant germplasm preservation: a global perspective. En: KNUDSON, L, STONER AK (eds.) Biotic diversity and germplasm preservation, global imperatives. Kluwer Acad. Publ. The Netherlands. pp. 81–96, 1989.

WITHERS LA & WILLIAMS JT. In vitro conservation. IBPGR Research Highlights. Roma, Italia. 1985.

WITHERS LA & ENGELMANN F. In Agricultural Biotechnology, ed. A. ALTMAN, pp. 57-88. Marcel Dekker, Inc. New York. 1998.

DEVELOPMENT OF PROTOCOLS FOR *IN VITRO* CONSERVATION OF *Arachis* IN BRAZIL

Mansur, E.

Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Rua São Francisco Xavier 524, CEP 20550-013, Rio de Janeiro – RJ, e-mail: mansur@uerj.br

Introduction

Cultivated varieties and wild species of *Arachis* are usually preserved by means of seedbanks, requiring periodical renewal for germplasm maintenance and distribution. Although *Arachis* seeds have been classified as orthodox (Hanson *et al.*, 1984), viability losses may occur even under optimal storage conditions. Hence, *Arachis* seeds may be more adequately classified as sub-orthodox according to the concept applied to seeds that can be stored under the same conditions as true orthodox ones but for shorter periods. This behavior may result from the high fat content of the storage tissues, which can undergo auto-oxidation and originate free radicals that damage proteins and nucleic acids. In addition, storage longevity depends on several factors such as moisture content, oil content, genotype, storage conditions and contamination that may lead to a number of detrimental changes resulting in cytological and metabolic abnormalities of the seeds (Gagliardi *et al.*, 2000).

In view of these problems, it is highly desirable to develop appropriate *in vitro* conservation techniques as alternative strategies to complement conservation and utilization of *Arachis* germplasm. Considering that these methodologies rely on micropropagation methods, the initial goal of our work was to develop *in vitro* regeneration protocols from explants derived from seeds stored at the EMBRAPA/CENARGEN seed bank. In the past few years, several accessions from six Sections were rescued through culture of seed explants (Gagliardi *et al.*, 2000), the resulting plants were multiplied by nodal segments culture (Gagliardi *et al.*, 2002a) and a successful protocol for acclimatization to *ex vitro* conditions was established. Methodologies for *in vitro* preservation through slow growth and cryopreservation of embryo axes and shoot apices of *in vitro* plants were developed and the genetic stability of these materials is being monitored (Gagliardi *et al.*, 2002b; 2003).

***In vitro* regeneration from seed explants and multiplication of *in vitro* plants**

In vitro regeneration studies were conducted by using cotyledon, leaflets and embryo axes explants, excised from seeds of accessions from Sections *Extranervosae*, *Heteranthae*, *Caulorrhizae*, *Procumbentes*, *Erectoides* and *Arachis*. While most seeds had lost germination capacity, plant recovery from embryo axes occurred at high frequencies and was not correlated to seed age. On the contrary, regeneration from cotyledon explants occurred at significantly lower frequencies (Table I). In spite of the low regeneration frequencies, adventitious shoot induction from cotyledons may be considered an additional tool for plant regeneration, maximizing the number of plants which can be produced from a single seed. Leaflets originated plants via indirect organogenesis or embryogenesis and because of this

such explants were not considered as a suitable material for conservation purposes. *In vitro* regeneration from seed explants suggests that whole seeds failure to germinate may be a consequence of factors others than tissue death.

The studies carried out on the morphogenetic potential of nodal segments from *in vitro* plants determined the effects of explant position and age of the donor plant in the process of plant regeneration in response to different growth regulators from shoot apices and axillary buds derived of primary cultures. The production of multiple shoots from nodal segments was also studied with the objective of enhancing the rate of multiplication (Gagliardi *et al.*, 2002a). The culture of nodal segments from the primary *in vitro*-grown plants can be used to further amplify *in vitro* collections thus allowing both germplasm maintenance and distribution. This methodology is currently being used as means of short-term maintenance and multiplication of 23 species, summing up 32 accessions.

Taken together, these approaches provided efficient procedures for the recovery and multiplication of *Arachis* germplasm. As the regeneration processes chosen for this purpose do not involve a callus phase, occurring either by direct organogenesis (cotyledons) or through the development and multiplication of preexisting meristems (embryo axes and nodal segments), this can be achieved with reduced risk of somaclonal variation.

Table 1. Plant recovery from seed explants of wild *Arachis* species after 60 days of culture

Species	Accession	Section	Seed Age (years)	Responsive explants frequency*	
				Cotyledons ^a	Embryo axes ^b
<i>A. aff. prostrata</i>	V 5913	<i>Extranervosae</i>	18	0	0
<i>A. burchellii</i>	V 6556	<i>Extranervosae</i>	3	30	82
	V 7805	<i>Extranervosae</i>	14	9	83
	V 7863	<i>Extranervosae</i>	13	0	66
	V 14119	<i>Extranervosae</i>	1	23	89
	V 7533	<i>Extranervosae</i>	4	9	90
<i>A. macedoi</i>	V 7821	<i>Extranervosae</i>	3	14	100
	V 13472	<i>Extranervosae</i>	5	29	100
	V 7861	<i>Extranervosae</i>	3	26	88
<i>A. pietrarelli</i>	V 7861	<i>Extranervosae</i>	3	26	88
<i>A. prostrata</i>	V 6638	<i>Extranervosae</i>	4	50	25
<i>A. retusa</i>	V 9950	<i>Extranervosae</i>	8	18	90
	V 12939	<i>Extranervosae</i>	3	15	100
<i>Arachis</i> sp. nov	V 7784	<i>Extranervosae</i>	13	0	91
<i>A. villosulicarpa</i>	Md 1022	<i>Extranervosae</i>	2	50	100
	Pd 2804	<i>Extranervosae</i>	11	5	100
<i>A. dardanii</i>	V 13383	<i>Heteranthes</i>	1	0	60
<i>A. pusilla</i>	V 10833	<i>Heteranthes</i>	1	0	80
<i>A. seridoensis</i>	V 10969	<i>Heteranthes</i>	1	0	29
<i>A. sylvestris</i>	V 6001	<i>Heteranthes</i>	0.5	30	70
<i>A. pintoii</i>	V 6791-wf	<i>Caulorrhizae</i>	6	10	70
	W 647	<i>Caulorrhizae</i>	6	20	70
<i>A. porphyralix</i>	V 7303	<i>Erectoides</i>	12	10	100
<i>A. paraguariensis</i>	V 13556	<i>Erectoides</i>	6	0	78
	V 14204	<i>Erectoides</i>	6	25	100
<i>A. appressipila</i>	GKP 10002	<i>Procumbentes</i>	6	0	70
<i>A. decora</i>	Sv 4533	<i>Arachis</i>	6	50	80
<i>A. palustris</i>	V 13023	<i>Arachis</i>	6	10	90
<i>A. praecox</i>	V 14682	<i>Arachis</i>	6	45	80
<i>A. schininii</i>	V 9923	<i>Arachis</i>	6	20	90
<i>A. gregoryi</i>	V 6389	<i>Arachis</i>	12	7	86
<i>A. magna</i>	V 14750	<i>Arachis</i>	6	75	100
<i>A. glandulifera</i>	V 14730	<i>Arachis</i>	6	70	80

^a MS plus 110 μ M BAP; ^b MS plus 8.8 μ M BAP ; ND – Not determined

Acclimatization

In vitro-grown plants display a culture-induced phenotype due to the growth conditions that induce abnormal morphology and physiology. These features may cause transplantation stress and mortality as a result of poor control of water loss and reduced photosynthetic competence. Thus, the final step of micropropagation protocols consists on the acclimatization of *in vitro* plants to *ex vitro* conditions. This is a critical process in the establishment of a successful *in vitro* preservation program

in order to provide suitable plant material for future utilization. However, no investigation had yet been carried out to determine the factors involved in the adaptation of *in vitro* plants of *Arachis*.

The efficient adaptation of plants to *ex vitro* conditions is determined by the type of substrate, *in vitro* pre-treatments and genotype, among others. Our initial work was performed with *A. retusa* plants by evaluating the effect of different substrates and the influence of *in vitro* treatments with different sucrose concentrations on the subsequent acclimatization process. Highest survival rates after transplantation were achieved by submitting *in vitro* plants to a preconditioning phase in MS medium supplemented with sucrose 1.5% during the last micropropagation phase and by using sand without fertilizers as substrate. Acclimatized plants showed flower and fruit development after periods of high temperatures.

***In vitro* conservation through slow growth and cryopreservation**

Slow growth storage for short and medium term conservation has been applied with varying degrees of success to several plant species. Growth reduction procedures include incubation at low temperatures, low light intensity and use of growth inhibitors with the objective of extending the normal subculturing intervals to much longer periods. We are currently studying this aspect of *Arachis* conservation in order to characterize the effects of abscisic acid (ABA), light intensity and storage temperature on plant growth and subsequent demand for subcultures, which are normally performed at monthly intervals. So far, shoots of *A. burchellii* V7805 were maintained in MS0 supplemented with 1mg/L ABA at 20°C and 1/3 of the commonly used light intensity for three months without sub-cultures, showing reduced growth and keeping the recovery capacity of shoot apices.

Cryogenic storage is the only viable option for prolonged storage due to the blockage of cell metabolism, which also contributes to the genetic stability of preserved germplasm. In addition, cryopreservation requires a minimum of space for long-term storage and maintenance, requiring less periodic testing for viability. In the last decade, new techniques of rapid freezing in liquid nitrogen LN have been established, without the use of controlled cooling devices. The vitrification technique, in which explants are pre-treated with high concentrations of cryoprotectors has been successfully applied to plant protoplasts, cells, shoots tips, somatic embryos and embryonic axes of various genera. The desiccation technique is based on the exposure of tissues to air current, compressed air stream or silica gel before rapid freezing by direct immersion in LN.

We demonstrated the possibility of cryopreserving embryonic axes of wild *Arachis* species using desiccation and one-step cooling in LN (Gagliardi *et al.*, 2002b). This methodology is advantageous as compared to previously described methods for cryopreservation of *A. hypogaea*, providing significantly higher recovery rates than those obtained by other authors, without the use of cryoprotectors or programmable freezers.

However, the application of methodologies based on the use of embryo axes can be seriously limited for those accessions with a reduced number of seeds. In those cases, cryopreservation of vegetative tissues such as nodal segments or shoot tips obtained from the multiplication of *in vitro* plants derived from primary cultures of seed explants provide an alternative means for *in vitro* preservation. Because of this, we have developed a protocol for cryopreservation of shoot tips through vitrification,

by studying the effect of pre-treatment of donor-plants with abscisic acid and of different substances in the post-thaw regeneration medium (Gagliardi *et al.*, 2003).

Genetic stability

In vitro multiplication and storage may lead to somaclonal variation, which is considered as a serious drawback in conservation programs. Thus, the risks of genetic alterations induced by the processes of tissue culture and the importance of assessing the genetic stability of the biological material before, during and after storage must be considered in the context of conservation.

Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting has proven to be a very suitable method for detecting molecular alterations in plants regenerated and stored *in vitro* by different processes. In our work, five arbitrary 10-mer primers were chosen out of ten primers previously used to establish phylogenetic relationships in *Arachis* and *Stylosanthes*, allowing discrimination between different species. No polymorphism in the fragments amplified from the clonal material originated from both micropropagated and cryopreserved material was detected (Gagliardi *et al.*, 2003; 2004).

From this perspective, the recovered shoots evaluated in this work seem to be genetically stable at the genomic regions tested, indicating that the *in vitro* processes studied can be used for *in vitro* preservation of *Arachis* germplasm. Nevertheless, considering that the absence of *in vitro*-induced polymorphism does not exclude the possibility that chromosomal alterations occurred in the regenerated plants, additional analysis by cytogenetics, AFLP (Amplified Fragments Length Polymorphism) and SSR (Simple Sequence Repeats) is currently being undertaken in order to further evaluate the genetic fidelity of the material.

Supported by Faperj and CNPq

References

- GAGLIARDI *et al.*, Biodiv. Conserv. 9: 943-951, 2000.
- GAGLIARDI *et al.*, Biol. Plantarum 45:353-357, 2002^a.
- GAGLIARDI *et al.*, CryoLet. 23: 61-68, 2002b.
- GAGLIARDI *et al.*, CryoLet. 24: 103-110, 2003.
- GAGLIARDI *et al.*, P.A.B. (in press), 2004.
- HANSON *et al.*, IBPGR Global Network of Genebanks. Rome, 1984.

QUE NÃO SABÍAMOS SOBRE *ARACHIS* E O QUE AINDA CONTINUAMOS SEM COMPREENDER: NOVAS METAS DE PESQUISA.

Valls, J. F. M.

Bolsista PP/CNPq. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. C.P. 02372, CEP 70770-900, Brasília, DF, Brasil. e-mail: valls@cenargen.embrapa.br

Ao longo do IV Encontro Latino-americano de Especialistas em *Arachis*, as várias palestras, mesas-redondas e painéis cobriram aspectos históricos da pesquisa do gênero, a evolução e domesticação de suas espécies na América do Sul, a variabilidade apresentada pelo amendoim em áreas indígenas, taxonomia das espécies silvestres, citogenética, fitogeografia (neste tema incluindo dados derivados da utilização dos modernos Sistemas de Informação Geográfica), aspectos fitopatológicos e de contaminação por toxinas importantes para o melhoramento genético do amendoim, a busca de genes de resistência e seqüências análogas em espécies silvestres, mapas genéticos, caracterização dos genomas dos distintos grupos de espécies, trabalhos de pré-melhoramento em andamento, abrangência da caracterização molecular, desenvolvimento de protocolos de conservação *in vitro* e pela criopreservação, diagnósticos da adoção nacional, regional e mundial de cultivares forrageiras de *Arachis* e oportunidades de treinamento informal e formal, em serviço e acadêmico, em aspectos variados dos recursos genéticos de *Arachis*.

No entanto, as interessantes discussões de cada item deixaram questões pendentes, algumas das quais certamente suportarão a continuidade das distintas linhas de pesquisa e, talvez, venham a gerar novas linhas, especialmente aquelas voltadas à interação dos conhecimentos multidisciplinares, cujo potencial mostrou-se evidente pela oportunidade da reunião de tantos atores fundamentais da pesquisa do gênero em mais um momento de crescimento integrado. Comentam-se, a seguir, algumas das questões mais pertinentes:

Será que já colhemos todas as espécies? Quantas ainda faltam? Onde estão?

Após mais de 50 anos de intensa coleta sob responsabilidade de vários dos participantes do evento, tanto para herbário, como para bancos de germoplasma, nos cinco países da América do Sul que tem espécies nativas de *Arachis*, surge esta inquietação: O material coletado, mesmo que eventualmente sem germoplasma, representa adequadamente a diversidade do gênero na natureza? Estão por surgir novas espécies, além daquelas já conhecidas, mesmo que ainda não descritas?

A análise da cronologia e velocidade de encontro de novas espécies, baseada na data de coleta do primeiro exemplar representativo de cada uma delas (Ver Krapovickas & Gregory, 1994 - *Historia de las colecciones*), mostra uma curva com dois nítidos patamares e um segmento quase contínuo, fortemente ascendente (Fig.1) A curva reflete o acúmulo de novas espécies encontradas na natureza, considerando intervalos de dez anos, que iniciam na década de 1810 a 1819. Os dados são acumulados a partir da primeira coleta de uma espécie silvestre (*Arachis prostrata*) por Johann E. Pohl, em 1819, nas proximidades da então vila de Trahiras, hoje Niquelândia, em Goiás.

Após o encontro de uma dúzia de espécies distintas, ao longo das duas décadas seguintes, segue-se um período de 60 anos de lento crescimento. Ao início do século XX, a intensificação da exploração botânica do antigo Mato Grosso, do

Paraguai e da Bolívia desencadeia uma fase ascendente, cuja intensidade é apenas reduzida durante a Segunda Guerra Mundial, pela óbvia retração dos recursos para a realização de missões de pesquisa botânica. Porém, ao final do conflito, a coleta ressurgiu com intensidade na Argentina, Bolívia, Paraguai, Brasil e Uruguai.

A consciência da importância dos recursos genéticos, novas iniciativas com suporte internacional, a abertura de estradas para o interior do Brasil desencadeada pela construção de Brasília e um pequeno aumento do número de pesquisadores e instituições envolvidos no esforço conduzem esta fase em direção ascendente até a década de 1990 a 1999.

A definição de novas prioridades por área, a partir da análise de lacunas geográficas (IBPGR, 1990) e o crescimento rápido do interesse por espécies de *Arachis* com potencial forrageiro (Kerridge & Hardy, 1994) direcionam novas expedições, nas quais, de tempos em tempos, são encontradas novas espécies, mesmo em locais já percorridos no passado, obviamente não com a maior fluidez de deslocamento dos dias atuais, associada à maior facilidade de procura das espécies nos ambientes hoje muito mais abertos, além das possibilidades de re-localização precisa e até de projeção de sítios de ocorrência com a tecnologia GPS, disponíveis para os atuais coletores (Jarvis *et al.*, 2003).

No entanto, este quadro foi drasticamente revertido, a partir da virada do século XXI, quando a crescente preocupação com o controle e posse dos recursos genéticos determinou o surgimento de barreiras legais para a coleta em alguns dos países, mais nitidamente no Brasil, berço da maioria das espécies.

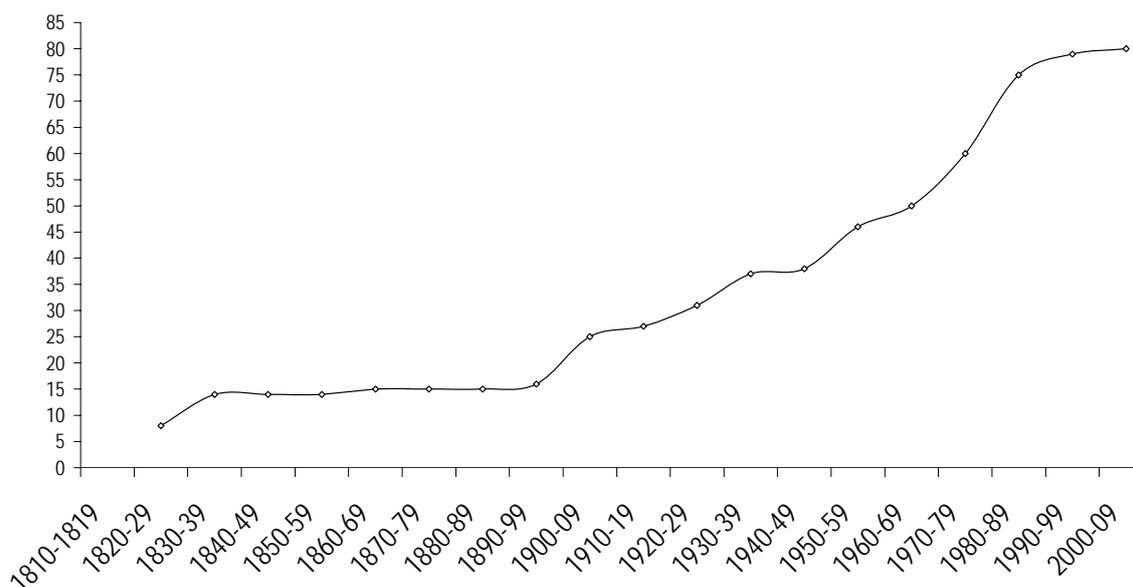


Figura 1. Cronologia e velocidade de encontro de novas espécies de *Arachis*, baseada na data de coleta do primeiro exemplar representativo de cada uma delas (Eixo vertical: Número acumulado de espécies; eixo horizontal: Décadas)

A redução das perspectivas de coleta, na década de 2000 a 2009, cria um aparente patamar. Embora tal patamar possa induzir à conclusão de saturação das coletas, é preciso considerar que a década ainda se encontra em sua metade, e que o cumprimento das metas de investigação de áreas não cobertas no passado vem

sendo postergado, pela indefinição legal, que engessa a ação de coletores das próprias instituições criadas pelos países para resguardarem sua diversidade biológica. A reabertura, que seria de esperar, das ações de coleta, ou até o empreendimento de ações de monitoramento a campo, mesmo que restritas a observações visuais e somente à documentação fotográfica, certamente mostrarão a artificialidade do patamar surgido no século XXI.

Porém, mais preocupante que a detecção da presença de novas espécies nas regiões ainda não percorridas, a partir da implementação das metas geográficas traçadas em 1990, é a necessidade de resgate de seu germoplasma, assim como daquele representativo de espécies já conhecidas, uma vez que a destruição ambiental pela agricultura mecanizada no centro geográfico da ocorrência do gênero *Arachis* (Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Paraguai oriental e leste da Bolívia avança de forma avassaladora, devastando-se hectare após hectare, paradoxalmente à revelia das restrições legais exacerbadas vigentes para a eventual retirada de uns poucos indivíduos para herbário e de alguns propágulos para a conservação efetiva *ex situ* das espécies de *Arachis*, por parte de especialistas pertencentes aos quadros governamentais.

Cabe ressaltar, neste ponto, a urgência da educação de novos coletores, que sejam capazes de continuar a exploração científica do gênero *Arachis*, à medida que aqueles mais bem treinados e com longos anos de experiência têm sua ação de coleta bloqueada por vários anos consecutivos, em que se aproximam, paulatinamente, da conclusão de suas carreiras profissionais.

As secções taxonômicas abrigam toda a variabilidade conhecida?

Embora seja indiscutivelmente correta a organização sistemática do gênero, de acordo com as secções taxonômicas consagradas na monografia (Krapovickas & Gregory, 1994), dados mais recentes sobre algumas espécies vem indicando a necessidade de revisão da alocação de algumas espécies. A realização de cruzamentos continuará liderando as abordagens multidisciplinares com este propósito, mas as novas técnicas moleculares, em especial as adaptadas à pesquisa citogenética, fundamentarão grandes avanços.

Dados ainda inéditos da cruzabilidade de *Arachis paraguariensis* e de *A. vallsii* com espécies de várias secções, no que tange à segunda associados a recentes informações citogenéticas (Lavia, 1999) poderão trazer surpresas sobre sua posição mais lógica na estrutura sistemática do gênero.

Por outro lado, parece oportuno questionar a circunscrição da secção *Arachis*, a partir de um exercício de exclusão da espécie cultígena *A. hypogaea* e de *A. monticola*, tetraplóides que agregam dois complementos cromossômicos bastante distintos. Se usados os mesmos critérios para o estabelecimento das demais secções, seria bastante lógico atentar para o isolamento e esterilidade entre as espécies diplóides com o par pequeno de cromossomos (par A) (Husted, 1933, 1936; Fernández & Krapovickas, 1994) e aquelas diplóides, com $2n=20$ que não o apresentam. Não fossem tais grupos agregados pela participação de representantes de ambos na origem de *A. hypogaea* e *A. monticola*, talvez seriam bem aceitos como duas secções distintas e de origem diferenciada.

E onde foram parar os outros dois cromossomos das espécies com $2n=18$?

Este é um aspecto que desafia os pesquisadores do gênero. Tendo em vista a precocidade das três espécies da secção *Arachis* com $2n=18$ (Lavia, 1996, 1998, 1999; Peñaloza & Valls, 1997), um caráter de interesse potencial para o melhoramento de *A. hypogaea*, seria muito importante incluí-las em estudos citogenético-moleculares, que possam traçar a eventual translocação de segmentos cromossômicos do que seriam, em realidade, dez e não apenas nove pares.

Qual é a origem e quais têm sido as maiores dificuldades para a detecção de polimorfismo molecular em *Arachis hypogaea*?

Os resultados de trabalhos com FISH apresentados no evento por J.G. Seijo apóiam, com muita força, a proposta da origem do amendoim cultivado a partir de um cruzamento eventual inicial entre *Arachis duranensis* e *A. ipaënsis* (Seijo *et al.*, 2004) e são respaldados pelos resultados de cruzamento e duplicação de cromossomos com colchicina e cruzamentos férteis (Fávero, 2004) do anfidiplóide construído a partir dessas duas espécies *versus* distintas variedades de *A. hypogaea*, reportados por A.P. Fávero. Todavia, a análise molecular de acessos de amendoim do Parque Indígena do Xingu e seus arredores, descrita por F.O. Freitas, situa dois tipos discrepantes, cada um representado por vários acessos, completamente fora do ramo do dendrograma que aloja as variedades já descritas de *A. hypogaea*. Terá, então, o material do Xingu a mesma origem, com maior divergência subsequente, ou será, esse material, resultante de um processo evolutivo paralelo (Freitas & Valls, 2001), talvez baseado em espécies distintas?

Novamente, acredita-se que a intensificação de estudos moleculares, com os marcadores cada vez mais discriminantes, hoje capazes de detectar diversidade genética ao início não aparente em trabalhos de caracterização molecular, poderá confirmar a origem monofilética de *A. hypogaea*, unicamente a partir do cruzamento *A. duranensis* x *A. ipaënsis*, ou descartá-la, consagrando a origem polifilética e obrigando à busca de um novo par de progenitores para parte dos tipos conhecidos de amendoim.

De qualquer modo, seja o amendoim derivado de um único evento de cruzamento, duplicação e seleção, ou de mais de uma situação deste tipo, é difícil acreditar que tal evento (ou eventos) (Simpson *et al.*, 2001) tenha ocorrido ao azar e apenas sido percebido pelo homem após a restauração da fertilidade de raríssimos indivíduos, no nível tetraplóide. Seja o amendoim monofilético ou polifilético, seu surgimento e seleção como nova opção para uso humano deve ter ocorrido em locais de cultivo dos progenitores diplóides, posteriormente negligenciados, diante do impacto positivo da nova alternativa surgida.

Neste ponto, também parece interessante refletir sobre as causas da dificuldade inicial de detecção de variabilidade genética em *A. hypogaea*, que ao menos fosse compatível com suas subespécies e variedades formais. Além da menor capacidade de discriminação dos primeiros marcadores utilizados, é oportuno lembrar que as cultivares modernas, liberadas por instituições de pesquisa, mostram alto grau de parentesco (Knauff & Gorbet, 1989; Isleib *et al.* 2001) e em geral são classificadas primordialmente conforme os tipos "Spanish", "Valencia" ou "Virginia". Tais cultivares tem sido utilizadas, às vezes impropriamente, como representantes de variedades botânicas, em análises de diversidade genética. No entanto, é comum

que derivem de germoplasma de mais de uma variedade ou subespécie (Isleib et al. 2001; Moretzsohn, 2004), o que compromete a representatividade taxonômica pretendida.

Que fazer para tornar-se um especialista em *Arachis*, com treinamento formal?

Com tantos problemas a resolver, tantos achados científicos fascinantes e tanta pressão antrópica sobre as populações de *Arachis* remanescentes na natureza, considera-se muito importante o crescimento da massa crítica, com reforço das equipes de especialistas, nos cinco países com espécies de *Arachis* em sua flora. Os resultados da integração da pesquisa do gênero ao processo formativo, apresentados por C.R. Lopes, evidenciam que há boas oportunidades para realização de pesquisa de boa qualidade e obtenção de treinamento adequado na pós-graduação formal de alguns dos cinco países com espécies nativas de *Arachis*. Também é interessante destacar que vários mestres e doutores oriundos dos cursos citados continuam atuando na pesquisa do gênero, alguns em posições funcionais estáveis e, inclusive, propondo (e tendo aprovados por órgãos financiadores) seus próprios projetos.

No entanto, ainda não tem sido explorada uma oportunidade muito interessante, fornecida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq, as chamadas Bolsas PEC/PG, oferecidas a pesquisadores estrangeiros para treinamento pós-graduado no Brasil. Candidatos a tais bolsas dos países que compartilham, com o Brasil, espécies de *Arachis*, poderiam ser agregados de imediato aos cursos de pós-graduação da UNESP, Campus de Botucatu, SP, UERJ, Rio de Janeiro, RJ, UFSC, Florianópolis, SC e UCB e UnB, Brasília, DF, contribuindo para ampliar e difundir o conhecimento, adquirido em conjunto, pelos cinco países que detêm a diversidade do gênero.

Diante desta disponibilidade de variabilidade local em um gênero de alto interesse agrícola, é de esperar que a comunidade científica regional, com esforços organizados e colaborativos, possa contribuir para a demonstração de seu valor intrínseco e para o aproveitamento racional e sustentável dos recursos genéticos de espécies de *Arachis*. A tomada de decisões harmônicas sobre seu estudo colaborativo e eventual compartilhamento, que garantam a manutenção desta riqueza regional para o futuro, seria muito estimulada pela maior integração no treinamento dos atores do futuro.

Referências bibliográficas

- FÁVERO, A.P. Tese Doutorado, ESALQ-USP. 2004.
FERNÁNDEZ, A.; KRAPOVICKAS, A. Bonplandia, v.8, p.187-220, 1994.
FREITAS, F.O.; VALLS, J.F.M. Anais SIRGEALC, 3. p.303-304, 2001.
HUSTED, L. Cytologia, v. 5, p.109-117, 1933.
HUSTED, L. Cytologia, v.7, p.396-423, 1936.
IBPGR. Report of a Workshop on the Genetic Resources of Wild *Arachis* Species. 1990.
ISLEIB, T.G.; HOLBROOK, C.C.; GORBET, D.W. Peanut Science., v.28, p.96-113, 2001.
JARVIS, A.; FERGUSON, M.E.; WILLIAMS, D.E.; GUARINO, L.; JONES, P.G.; STALKER, H.T.; VALLS, J.F.M.; PITTMAN, R.N.; SIMPSON, C.E.; BRAMEL, P. Crop Science, v.43, p.1100-1108, 2003.
KERRIDGE, P.C.; HARDY, B. (ed.) Biology and Agronomy of Forage *Arachis*. 1994.
KNAUFT, D.A.; GORBET, D.W. Crop Science, v.29, p.1417-1422, 1989.
KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, W. C. Bonplandia, v.8, p.1-186, 1994.
LAVIA, G.I. Bonplandia, v.9, p.111-120. 1996.

LAVIA, G.I. *Cytologia*, v.63, p.177-181, 1998

LAVIA, G.I. Tesis Doctorado, Universidad Nacional de Córdoba, 1999.

MORETZSOHN, M.C.; HOPKINS, M.S.; MITCHELL, S.E.; KRESOVICH, S.; VALLS, J.F.M.; FERREIRA, M.E. *BMC Plant Biology*, v.4, n.11, 2004

PEÑALOZA, A.P.S.; VALLS J.F.M. Simpósio Latino-americano de Recursos Genéticos Vegetais, 1, 1997. p.39.

SEIJO, J.G.; LAVIA, G.I.; FERNÁNDEZ, A.; KRAPOVICKAS, A.; DUCASSE, D.; MOSCONE, E.A. *American Journal of Botany*, v.91, p.1294–1303, 2004.

SIMPSON, C.E.; KRAPOVICKAS, A.; VALLS, J.F.M. *Peanut Science*, v.28, p.78-80, 2001.

Mesas Redondas

APRESENTAÇÃO DA MESA REDONDA: NOVAS PRIORIDADES PARA A COLETA DE GERMOPLASMA DO GÊNERO *ARACHIS*

Veiga, R. F. A.

Av. Barão de Itapura, 1481, Cx.P. 28, CEP 13001-970, Instituto Agronômico (IAC). Campinas, SP, Brasil. E-mail: veiga@iac.sp.gov.br

A coleta de germoplasma é uma atividade básica, na área de recursos genéticos, através da qual se viabilizam outras como: intercâmbio, quarentena, sistemática, taxonomia, caracterização (agronômica – morfológica – genética – citológica - histoquímica), conservação *ex situ*: (in vitro - criopreservação - câmaras-frias – a campo), educação ambiental agrícola, valoração e de uso de recursos fitogenéticos. O inverso também é verdadeiro, isto é, qualquer uma dessas demais atividades pode servir de priorização para uma nova coleta.

Ao se tratar de prioridades de coleta para o gênero *Arachis*, duas especificidades podem ser distinguidas: 1. Monoespecífica: quando se trata de coleta do amendoim comum (*A. hypogaea* L.), em que se procura plantas, com potencial de resistência a doenças ou outras características, de interesse aos programas de melhoramento, espalhadas por todos os continentes; 2. Multiespecífica: quando se trata de coleta de espécies silvestres, em que se busca por espécies nativas (*Arachis* spp.) para conservação e uso em pesquisas botânicas, genéticas e agronômicas (forragem e ornamental), na América do Sul, especialmente no Brasil (centro de origem e dispersão do gênero).

Da mesma forma, quando se trata de priorizar a localidade da expedição de coleta, pode-se separar em dois itens: 1. Nas comunidades: quando se trata de *A. hypogaea*, pode-se dizer que a coleta ocorre em lavouras, roças, hortas e pomares caseiros, mercados e feiras; localidades em que se busca por germoplasma do amendoim comum, seus cultivares em desuso, raças locais e espécies cultígens; 2. Na natureza: para as espécies silvestres do gênero, como a busca no campo de propriedades agrícolas particulares, beira de estrada, em meio às áreas de campos experimentais de instituições de pesquisa e em áreas de preservação, etc.

Logicamente, para elaborar novas prioridades de coleta de germoplasma, torna-se necessária uma adequada planificação anterior. Tal ação deve ser iniciada através da elaboração de um projeto, principalmente para viabilização dos recursos necessários na sua execução. Neste, define-se a base da coleta, isto é, a coordenação e a equipe, o trajeto da coleta, a viabilização segundo a legislação do país, a documentação necessária para o acesso aos recursos genéticos e a necessidade ou não de realização da pré-coleta. O mesmo grupo, de coordenação da expedição científica, define o meio de transporte e a época de coleta (dependente do período da frutificação e florescimento, bem como do ambiente e clima da região). Providencia o equipamento e material necessário, inclusive, faz o estudo das exsiccatas de herbário, para retorno ao local de coletas anteriores que estejam no percurso da expedição, ou até mesmo o auxilie na elaboração deste. Na execução da coleta, deve-se prever que ocorrerá o preparo de exsiccatas, de frutos e sementes, bem como de *Rhizobium*, para maximizar os resultados científicos da expedição.

Na organização de priorização para a coleta deve-se levar em conta que uma expedição não se encerra no dia final da viagem, pois, existe a pós-coleta, tão trabalhosa quanto à própria coleta em si, pois, aí se finalizam as cadernetas,

passando os dados para o computador. Continua, com o trabalho de preparo das exsiccatas, identificação taxonômica, prosseguindo com o preparo do germoplasma para sua distribuição, conservação, caracterização e uso, bem como se realiza a elaboração de relatórios para a instituição executora e instituições financiadoras.

Em priorização de expedições, algumas perguntas devem ser respondidas com antecedência: 1. No caso do amendoim comum: Os programas de melhoramento estão carentes de novos acessos regionais ou internacionais? O Banco Ativo de Germoplasma (BAG) necessita de mais acessos para ser realmente ser representativo da espécie? São necessárias mais coletas para a conclusão de estudos científicos? A necessidade não pode ser suprida pelo germoplasma conservado em outros BAGs nacionais ou internacionais? É necessário o resgate de cultivares primitivas? É necessário o resgate de cultivares que se encontram no mercado? Existem raças locais por serem coletadas? A legislação do país permite que se efetue a coleta? Em quanto tempo é possível obter a autorização? A região possui pessoal capacitado para efetivar a coleta?; 2. No caso de espécies silvestres: existe germoplasma disponível nos bancos de germoplasma? A espécie está em risco de extinção, ou de erosão genética? A conservação in vivo do germoplasma ex situ é difícil? Existem estudos científicos regionais que dependam do germoplasma procurado? A espécie tem potencial de uso direto como ornamental, forrageiro, ou mesmo para o melhoramento genético do amendoim comum? No caso de não se conhecer a região da coleta, a mesma apresenta altitudes, acidentes geográficos, vegetação, solo e clima com potencialidade de ocorrência de novas espécies? A região possui equipe de especialistas auto-suficientes para a execução da coleta? A legislação do país permite coletas ou somente prospecção ou pré-coleta? Há recursos disponíveis para priorizar também estas ações?

Muitos pesquisadores nacionais e estrangeiros, passaram pelo trabalhoso sistema de priorização de coletas para o amendoim. Na história do gênero *Arachis*, a primeira espécie descrita foi *Arachis hypogaea* L., em 1753. A partir daí, foi um longo período de 88 anos, até que Bentham descrevesse as primeiras espécies silvestres do gênero. Desde então, muita coisa mudou, o número de espécies conhecidas se alterou radicalmente depois de três expedições científicas de coleta de germoplasma executadas na década de 30, onde se destacaram o brasileiro J.Ramos de Otero e o americano W.A. Archer, duas na década de 40, com J.L. Stephens (USA) e W.Hartley (Austrália) e V.A. Rigoni e J.R. Báez (Argentina), cinco na década de 50, três na década de 60 e seis na década de 70, onde se destacaram A.Krapovickas e R.Pietrarelly (Argentina) e W.Gregory (USA). Com o advento do Centro Nacional de Recursos Genéticos (CENARGEN), hoje Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, sob o comando de J.F.M.Valls (Brasil) e o apoio dos coletores das três últimas décadas, acrescida de novos especialistas como C. E. Simpson e D. Williams (USA), E. Pizarro (Uruguai), V. R. Rao (Índia) e G. P. Da Silva (Brasil), entre outros, o incremento foi visível, sendo vinte e sete na década de 80 e mais vinte e seis até 2004, (Krapovickas & Gregory, 1994 ; Valls, 2001), foram aproximadamente 70 coletores até o presente.

Todo este esforço tem sido plenamente recompensado, pois, resultou em, aproximadamente, 81 espécies, organizadas em 9 seções taxonômicas do gênero. Concluiu-se que as espécies silvestres se encontram restritas à América do Sul, distribuídas pelos territórios da Argentina (6), Bolívia (15), Brasil (64), Paraguai (15) e Uruguai (2). Assim, os últimos 24 anos de intensivas expedições científicas de coleta de germoplasma refizeram, e continuam alterando, o mapa de dispersão das

espécies do gênero *Arachis*. Ao mesmo tempo, existe uma equipe de especialistas que, integradamente num plano mundial, vem trazendo à tona novos conhecimentos taxonômicos, morfológicos, citogenéticos, histoquímicos, genéticos, agrônômicos, entre outros, fornecendo inúmeros novos subsídios para que neste evento se elabore um texto atualizado de prioridades de coleta para o amendoim e suas espécies silvestres.

Numa mesa redonda como esta: “Novas prioridades para a coleta de germoplasma”, a qual tenho a honra de moderar, está presente a nata dos especialistas em amendoim que é a principal responsável pelo grande avanço nos conhecimentos científicos e pelo alto número de novos acessos disponibilizados para a pesquisa científica mundial. Aqui estão os ídolos de uma nova geração de especialistas no gênero *Arachis*, que cresce a cada dia, graças a esses mesmos abnegados especialistas mundiais, merecendo aqui uma menção especial, não desmerecendo os demais: Os Engenheiros Agrônomos Antonio Krapovickas e José Francisco Montenegro Valls.

ESTRATÉGIAS COMPLEMENTARES E INTEGRADAS DE CONSERVAÇÃO DOS RECURSOS GENÉTICOS DE ESPÉCIES DE *ARACHIS*.

Valois, A.C.C.

Embrapa Sede, e-mail: valois@sede.embrapa.br

Apontamentos

- 1- Necessidade do desenvolvimento de novos métodos para a conservação de germoplasma de amendoim.
- 2- Necessidade da capacitação de pessoal sobre as novas tecnologias não-convencionais de conservação de germoplasma de amendoim.
- 3- Necessidade de instruir o processo de propriedade intelectual sobre a cessão de germoplasma e cultivares de amendoim, especialmente para empresas privadas. Aproveitar as experiências existentes em alguns países. Avançar nos estudos de rastreabilidade.
- 4- Aproveitamento de eventos sobre recursos genéticos para apresentação de trabalhos sobre conservação de recursos genéticos, em sessões específicas.
- 5- Desenvolver a conservação ON FARM de recursos genéticos.
- 6- Uso de mecanismos como redução de ITR, para promover a conservação "in situ" de recursos genéticos ao nível de áreas de produtores.
- 7- Promover o fortalecimento do processo de informação e divulgação entre instituições e pesquisadores e demais técnicos envolvidos em conservação de germoplasma de amendoim em nível nacional e internacional.
- 8- Aproveitar as redes de informação já existentes para o fortalecimento do intercâmbio de conhecimentos e tecnologias entre os pesquisadores envolvidos na conservação de germoplasma de amendoim.
- 9- Promover os meios para o intercâmbio livre de germoplasma entre instituições e pesquisadores localizados nos diversos países que atuam na conservação de germoplasma de amendoim.
- 10- Promover a troca de informações entre países quanto ao acesso ao germoplasma e repartição justa e equitativa dos benefícios oriundos do uso dos recursos genéticos e dos conhecimentos tradicionais associados.
- 11- Identificar e definir na região locais em que possam ser conservadas duplicatas de acessos de germoplasma de amendoim.
- 12- Desenvolver pesquisas quanto à estabilidade genética do germoplasma conservado e detecção e mitigação do processo de erosão genética em acessos conservados.

13- Priorizar o desenvolvimento de coleções nucleares de germoplasma de amendoim.

14- Promover a conservação de cepas de "Rhizobium".

15- Levantamento no nível nacional e internacional sobre a situação atual do processo de conservação e uso das coleções de germoplasma de amendoim.

16- Buscar meios para o estabelecimento de testes de acesso de germoplasma de amendoim em diferentes locais e países em trabalhos de pré-melhoramento.

17- Desenvolver metodologia para a produção de sementes sintéticas de amendoim e para condições de conservação.

DESENVOLVIMENTO E ADOÇÃO DE CULTIVARES DE AMENDOINS FORRAGEIROS

Pizarro, E. A

Universidade Federal do Paraná - Rua XV de Novembro, 1299 CEP: 80.060-000, Curitiba, PR.
Bolsista CAPES
E-mail: esteban@ufpr.br

Expositores: José Marques Pereira (Bahia – CEPLAC, Brasil); Claudio Karia (EMBRAPA-Cerrados, Brasil); Judson Ferreira Valentim (EMBRAPA – ACRE, Brasil); Naylor Pérez (Productor particular – Fazenda Alqueire - Rio Pardo - Rio Grande do Sul, Brasil) y Gastón Sauma (SEFO – SAM, Bolivia).

El Cuadro 1, resume la producción y venta de material sexual y vegetativo, de *Arachis pintoi* en América.

Cuadro 1. Venta de semilla sexual y asexuada de *Arachis pintoi*

Institución	Responsable	Región/País	Cultivar	BRA No.	Material vegetativo toneladas	Semilla Toneladas
EMBRAPA ACRE	Judson Ferreira Valentim	Río Branco Acre – Brasil	Belmonte	031828	200	-
CEPLAC CEPEC	José Marques Pereira	Itabuna, Bahía Brasil	Belmonte	031828	23	-
Fazenda Alqueire	Naylor B. Perez	Río Pardo RS – Brasil	Alqueire	037036	170	-
SEFO - SAM	Gastón Sauma	Cochabamba Bolivia	3 cultivares	***	-	125
					393	125

*** cv. Amarillo, cv. Porvenir y un material no liberado oficialmente que es (CIAT 22160/BRA-031143, que fue el seleccionado en el Cerrado brasileño por tolerancia a stress hídrico). A éste último, localmente le llaman cultivar “Salvador”

Los comentarios más relevantes para cada uno de los conferencistas son los siguientes:

José Marques Pereira

Desde que fue liberado *A. pintoi* como cultivar Belmonte por CEPLAC en 1999, se han distribuido más de 23 toneladas de mudas entre 2000 productores rurales y la demanda es creciente.

Se ha dado respuesta a 3100 consultas recibidas por correo y hubo un momento de que hasta 1000 llamadas diarias fueron recibidas en la central de CEPLAC en Itabuna, Bahía.

Una de las áreas bajo pastoreo con *A. pintoi* cultivar Belmonte, lleva 13 años de pastoreo continuo, comprobando así su persistencia.

Cladio Karia

En el centro de EMBRAPA – Cerrados se está evaluando una colección de materiales de

A. pinto pre-seleccionados en condiciones de suelos de baja fertilidad y alta acidez.

Al mismo tiempo se están llevando a cabo experimentos para estimar el efecto del sombreado en la producción y persistencia de esta leguminosa. Los resultados preliminares presentados hasta el momento muestran que, aún con 70% de sombreado, la leguminosa *A. pinto* persiste y mantiene el suelo cubierto.

Judson Ferreira Valentim

El impacto, difusión y adopción de *A. pinto* en la región de Acre ha sido significativa. Al momento se estima que cerca de 1000 productores tengan sembradas 65.000 hectáreas de *A. pinto* cultivar Belmonte, asociado con varias especies y géneros de gramíneas tropicales en la región.

Se han distribuido más de 200 toneladas de material vegetativo entre los años de 1999 a mayo del 2004.

Experimentos en escala comercial han mostrado un incremento en la producción de leche que varía entre 3 a 6 kilogramos de leche por día y por vaca, una vez que la leguminosa es incorporada en la dieta de vacas lecheras.

A pesar de la crítica a la siembra de material vegetativo, el conferencista manifestó varias veces que no es barrera para su adopción y que los costos son significativamente más bajos que cuando comparados con la siembra por semilla. Los costos estimados son de 300 Reales (aproximadamente U\$S 100 dólares americanos por hectárea).

Naylor Pérez

El *A. pinto* cultivar Alquiére se encuentra distribuido en 7 estados brasileños y en 54 municipios del estado de Río Grande do Sul.

Se han distribuido más de 170 toneladas de material vegetativo y los resultados a nivel de establecimiento rural muestran una producción de 500 kilogramos de carne por hectárea y una ganancia diaria de hasta un kilogramo por animal por día. Valores semejantes a los obtenidos a nivel de confinamiento.

Gastón Sauma

La labor e impacto social que SEFO desarrolla es digno de destacar. Agricultores que pocos años atrás eran marginados hoy día tienen una renta anual de 1000 dólares por familia, ocupando al momento mil familias bolivianas, que suman más de 5000 campesinos. Sumado a ello, ha desarrollado una industria de producción de semillas de plantas forrajeras a nivel artesanal con excelente control de calidad, que es ejemplo en toda América.

SEFO ha exportado desde sus inicios un total de 450 toneladas de semillas de plantas forrajeras. Dentro de ese total, 125 toneladas, es decir el 30 %, corresponde a la venta exclusiva de *A. pinto*, especialmente el cultivar Amarillo.

Datos regionales muestran su adaptación hasta 3000 metros sobre el nivel del mar.

Si consideramos los valores recomendados por la empresa SEFO, la cual sugiere una densidad de siembra de 10 kilogramos por hectárea, podríamos considerar que existirían sembradas 12500 hectáreas de *A. pinto*. Para el caso de

material vegetativo, la recomendación es de 200 kilogramos de mudas por cada hectárea, dando así un área sembrada de aproximadamente 2000 hectáreas, dando un total de 14500 hectáreas de *A. pinto* sembradas para multiplicación, siembra asociada y/o cultivo puro.

Esteban A. Pizarro

Los resultados presentados en este IV Encuentro Latinoamericano de especialistas en *Arachis*, muestran el impacto social, económico y de desarrollo que pueden aportar las especies del género *Arachis* en la dieta humana y en los sistemas de producción animal.

Sin lugar a dudas, este es el inicio de un nuevo capítulo de la historia del género *Arachis* en nuestra América. Es oportuno, trasmitir a los lectores de estas memorias las conclusiones del filósofo e historiador inglés Arnold Toynbee, una vez analizadas las causas del fracaso en 21 de las civilizaciones estudiadas. En primer lugar, la concentración del poder en pocas manos y luego la incapacidad de promover las mudanzas necesarias en el tiempo adecuado. Estas dos básicas conclusiones se aplican a nuestro caso.

Debemos aprovechar esta ola de conquista, éxito, crecimiento, consolidación y logros que esta nueva generación con excelente nivel académico, dedicación y fundamentalmente compromiso nos mostró durante el correr de esta semana; inolvidable para mucho de los asistentes.

Nos da la oportunidad de actuar con perspectiva, tenemos a mano nuevos métodos, tecnologías y conocimiento. No debemos cometer errores ya perpetrados por generaciones anteriores y no caer nuevamente en la trampa de decir:

No tenemos recursos,

No podemos contratar gente para los nuevos desafíos,

No tenemos suficiente información o lo que sería peor, decir **No** es el momento.

Debemos si preguntarnos porque nuestros **NO** fueron un **TREMENDO SI**, para esta juventud. Este IV encuentro latinoamericano, nos permitió ver *in vivo* y *en directo*, lo que han construido estos jóvenes emprendedores.

No demos la espalda a esta inspirada y entusiasta generación. Sigamos aportando germoplasma y apoyemos esta oportunidad, para que esta nueva generación de plantas forrajeras llegue a nuestro principal cliente: El productor rural.

Posters: Artigos completos

CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA A *Puccinia arachidis* Speg. EM 42 ACESSOS DE *Arachis stenosperma* KRAPOV. & GREGORY.

Custodio, A.R.^{1,5}; Ramos, V. R.²; Ribeiro, V. S.³; Valls, J.F.M.^{4,5}.

¹ Mestranda em Botânica – UnB; ² Doutoranda em Genética – Unesp/Botucatu; ³ Ensino Médio – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia; ⁴ Pesquisador Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia; ⁵ CNPq. custodio@cenargen.embrapa.br

INTRODUÇÃO

A ferrugem causada pelo fungo *Puccinia arachidis* Speg. é uma importante doença foliar, que atinge as lavouras do amendoim cultivado, *Arachis hypogaea* L.. O controle da ferrugem, bem como de outras doenças foliares, com a aplicação de fungicidas, apesar de ser eficiente torna-se muito caro e inviável economicamente aos pequenos produtores (Moraes, 1985). A rotação de culturas ou o uso de variedades resistentes a essas doenças propiciaria melhor rendimento na produção e a custos mais baixos (Moraes, 1979). A espécie *A. stenosperma* mostra uma distribuição disjunta entre o Planalto Central do Brasil e o Litoral Atlântico, resultante de migração antrópica, e apresenta fortes indícios de ter sofrido um processo de seleção etnobotânica positivo, resultando na concentração de indivíduos resistentes às manchas foliares nas populações litorâneas.

MATERIAL E MÉTODOS

O bioensaio para *P. arachidis* foi realizado no Laboratório de Patologia de Sementes/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Brasília – DF. Foram utilizados 42 acessos de *A. stenosperma* (tabela 1), provenientes do Banco de Germoplasma de *Arachis* do Cenargen, que foram cultivados em casa de vegetação. A coleta e acondicionamento das folhas destacadas de amendoim seguiu a metodologia desenvolvida por (Moraes, 1982). O delineamento do experimento foi em blocos casualizados com 4 repetições, mantidos numa câmara adaptada, contendo 4 lâmpadas fluorescentes de 20 W, colocadas a 40 cm acima das placas, com fotoperíodo de 10 horas no claro e 14 horas no escuro e temperatura variável entre 25 – 27°C. As folhas utilizadas no experimento foram coletadas de plantas cultivadas em vasos em casa de vegetação, selecionando-se folhas saudáveis, jovens, porém completamente expandidas. As folhas foram acondicionadas em placas de Petri, contendo uma fina camada de algodão e um papel de filtro umedecido com água destilada. Sob cada folha, foi colocada uma lâmina de vidro, para evitar que a mesma ficasse em contato direto com o papel de filtro. A extremidade de cada pecíolo foi envolvida com algodão umedecido. O inóculo de *P. arachidis*, foi obtido junto ao Instituto Agrônomo de Campinas – IAC. O isolamento do fungo foi feito através da raspagem das lesões. Os inóculos foram padronizados através da contagem de esporos contidos, na câmara de Neubauer. A diluição da solução foi feita com Tween 20 a 0.5% para alcançar a concentração de 50.000 esporos/ml. A inoculação do patógeno nas folhas foi realizada por pincelamento. Após a inoculação, as placas foram fechadas, recebendo um plástico transparente sob a tampa durante 48 horas, a fim de manter uma alta umidade relativa em seu interior.

A avaliação foi feita no 28° e no 40° dia após a inoculação, calculando-se a área foliar em mm² e o número médio de lesões nos folíolos. O material analisado foi classificado em três grupos, segundo as características das lesões: grupo 1- sem lesões; grupo 2- com lesões sem esporulação (reação de hipersensibilidade); grupo 3- com lesões e esporulação. A análise dos dados foi feita pelo programa SAS, onde se obteve a análise de variância e a comparação de médias através do Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 1 – Acessos de *Arachis stenosperma* submetidos ao teste de resistência a *Puccinia arachidis*.

Acesso	BRA	Região	Grupo
HLK 408	013366	L	2
Lm 1	035998	L	1
Lm 2	036005	L	2
Lm 3	036005	L	2
Lm 5	036013	L	2
Lm 6	036625	L	2
Lm 7	036633	L	2
V 7377	016055	L	2
V 7382	016071	L	2
V 10229	023001	L	1
V 13258	016128	L	2
V 13262	030856	L	2
V 14453	035998	L	3
V 14454	037486	L	2
V 14455	037486	L	2
V 14457	037494	L	2
Jt 2	020052	CO	2
Sv 2411	033367	CO	3
Sv 3042	034118	CO	2
Sv 3712	035254	CO	3
V 7762	018091	CO	2
V 7805-AR	032476	CO	2
V 9010	020176	CO	2
V 9017	020389	CO	2
V 10309	024830	CO	2
V 12488	030651	CO	2
V 12575	030767	CO	2
V 12646	030805	CO	2
V 13670	018104	CO	1
V 13672	033596	CO	2
V 13693	033642	CO	2
V 13796	033898	CO	2
V 13824	033936	CO	3
V 13828	033944	CO	3
V 13832	033961	CO	2
V 13844	033987	CO	3
V 14090	035246	CO	2
V 14091	035254	CO	3
V 14092	036056	CO	2
V 14095	035530	CO	2
W 421	033511	CO	2
W 422	033529	CO	3

Região: L= Litoral Atlântico e CO= Centro-Oeste

RESULTADOS

Todas as repetições do acesso Jt2 foram desconsideradas, pelo apodrecimento de suas folhas. Na análise de variância, o teste F indicou diferenças significativas ao nível de 5% de probabilidade entre os genótipos estudados. Os acessos Lm1 e V10229 do litoral e V13670, do Centro-Oeste foram classificados no grupo 1, por não apresentarem nenhum tipo de lesão foliar nas duas análises realizadas. Oito acessos Sv2411, Sv3712, V13824, V13828, V14091 e W422 do Centro-Oeste e V14453 do litoral mostraram lesões, sendo que algumas delas esporulavam, sendo classificadas no grupo 3. Os demais acessos apenas apresentaram número variável de lesões sem esporulação, sendo classificadas no grupo 2. O controle usado no experimento foi *A. hypogaea* cultivar Tatu, que teve um comportamento atípico, não apresentando a susceptibilidade esperado. Isso pode ter acontecido devido a resíduos de tratamento com fungicida ao qual a planta foi submetida na casa de vegetação onde estava alocada. As demais plantas não receberam pulverizações com fungicidas e mostraram reações de um a outro extremo. O bioensaio está sendo repetido, para que se possa fazer nova comparação com padrão tradicional *A. hypogaea*.

CONCLUSÕES

Nas condições deste experimento foi constatado que, aparentemente, os acessos do Litoral Atlântico, apresentaram maior resistência à *P. arachidis*, e que os acessos da região Centro-Oeste foram os mais susceptíveis à ferrugem. Sugere-se que novas análises sejam realizadas para que seu real potencial seja verificado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- MORAES, S. A.; GODOY, I. J. Diferentes níveis de resistência a *Cercosporidium personatum* em genótipos de *Arachis hypogaea*. **Summa Phytopathologica**, v.11, p.74-86, 1985.
- MORAES, S. A.; SALGADO, C. L. Avaliação da resistência a *Cercospora arachidicola* Hori em amendoim (*Arachis hypogaea* L.). **Fitopatologia Brasileira**, v.14 (2), p.65-72, 1979.
- MORAES, S. A.; SALGADO, C. L. Utilização da Técnica de Folhas Destacadas de Amendoim (*Arachis hypogaea* L.) para inoculação de *Cercospora arachidicola* Hori e *Cercospora personata* (Berk & Curt.) Ell. & E. V.. **Summa Phytopathologica**, v.8, p.39-55, 1982.

DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES ÂNCORA PARA GENÔMICA COMPARATIVA ENTRE *ARACHIS* SPP. E *LOTUS* JAPONICUS.

José, A.C.V.F.; Madsen, L.⁽¹⁾; Leal-Bertioli, S.C.M.⁽²⁾; Guimarães, P.M.⁽²⁾; Bertioli, D.J.

Universidade Católica de Brasília. Pós Graduação Campus II, SGAN 916, Brasília - DF. CEP 70.790-160. ⁽¹⁾ Laboratório de Expressão Gênica, Universidade de Aarhus, Nordre Ringgade 1, DK-8000, Dinamarca. ⁽²⁾ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. PqEB - Parque Estação Biológica W5 Norte Final - Brasília - DF. CEP 70.770-900. email: anav@pos.ucb.br

O gênero *Arachis* possui uma grande variedade de espécies, entre elas o *Arachis hypogaea* (amendoim cultivado) que possui estreita base genética e genoma muito grande, cerca de $1,74 \times 10^9$ pb, o que torna difícil a identificação e o mapeamento direto de genes de interesse. Nesta espécie também têm sido encontradas poucas fontes de resistência a doenças, em contraste com algumas espécies silvestres de *Arachis*, onde altos níveis de resistência têm sido descritos (Company *et al.*, 1982). Em consequência, a utilização de parentes silvestres do amendoim cultivado na construção de um mapa genético se apresenta como importante ferramenta no isolamento de genes de resistência e sua análise genética.

Uma outra planta da família das leguminosas, *Lotus japonicus*, possui um genoma bem menor, de aproximadamente 500 Mb, um mapa genético de alta resolução já disponível e os projetos de sequenciamento de EST's (Expressed Sequenced Tags) e do genoma estrutural quase completos (Sato *et al.*, 2001). Visto que genomas de espécies diferentes podem ter regiões conservadas, e que o gênero *Lotus* já tem boa parte do seu genoma sequenciado, parece possível fazer uma comparação entre genes em *Lotus* e *Arachis*. A comparação entre estes dois gêneros e a análise da ordem dos genes nos cromossomos possibilitará a identificação de regiões correlatas entre os dois genomas (sintenia), ou seja, o mapeamento comparativo. Neste processo de comparação serão identificados marcadores moleculares comuns aos diversos genomas chamados marcadores-âncora.

O objetivo do presente trabalho é utilizar primers produzidos para genes de cópia única em *Lotus* em acessos selvagens de *Arachis*, visando identificar polimorfismos entre as espécies de amendoim utilizadas na construção do mapa genético. Isto propiciará: (a) a saturação do mapa de *Arachis* e (b) a avaliação da sintenia entre os genomas de *Arachis* e *Lotus japonicus*.

MATERIAIS E MÉTODOS

População de mapeamento

A população F2 foi obtida através de autofecundação da planta híbrida resultante do cruzamento entre *A. duranensis* acesso K7988 e *A. stenosperma* acesso V10309. Estes dois parentais foram escolhidos por apresentarem contraste quanto à resistência a fungos foliares e nematóides das galhas. Cem plantas foram escolhidas e tiveram seus DNAs extraídos através do método CTAB.

Desenvolvimento dos primers

Para o desenho dos primers, foi utilizado um programa computacional que: Seleciona seqüências de cópia única em *Arabidopsis thaliana* e compara com ESTs

de *Lotus japonicus* e *Arachis stenosperma* (Proite et al., 2002). As seqüências são alinhadas e motivos são buscados. Primers com temperaturas compatíveis são desenhados e testados em DNA de *L. japonicus*, *A. stenosperma* e *A. duranensis*. Os primers, que foram produzidos para *Lotus japonicus*, foram inicialmente testados em *Arachis* em trabalhos anteriores.

Análise dos primers na população F2

Os primers que apresentaram polimorfismo (amplificação de fragmentos de tamanhos diferentes) nos parentais foram, então, utilizados neste trabalho para a análise da população segregante. Foram testados nove pares de primers que amplificaram fragmentos distintos em cada um dos parentais.

RESULTADOS E CONCLUSÕES

Os produtos resultantes foram observados em gel de agarose a 0,8%, corado com Brometo de etídeo. Para cada par de primers foram feitas três repetições contendo todas as plantas F2s. Para cada reação (com um primer diferente) observou-se o número de amostras que apresentaram bandas iguais às da planta K7988, às da planta V10309, assim como às da planta híbrida (Tabela 1). Para a maioria dos primers foi observada a presença ou ausência de bandas na proporção 3:1.

Tabela 1- Resultados obtidos nas reações de PCR com a população segregante de *Arachis stenosperma* V10309 (S4) e *A duranensis* K7988 (D7)

Primer	Temperatura de ligação	Tamanho do Fragmento	Resultado	Gene original
Leg 2 K	55°C	D7: 272 pb	71 sim	Protochlorophyllide reductase
		S4: Sem banda	29 Não	
Leg 2V	55°C	S4: 273 pb	76 sim	Protochlorophyllide reductase
		D7: Sem banda	24 Não	
Leg 31	50°C	D7: < 800 pb	41 H 25 S4	GAPDH
		S4: > 800 pb	33 D7	
Leg 34K	55°C	D7: ~306 pb	66 sim	Asparagine synthase
		S4: Sem banda	33 não	
Leg 34 V	55°C	S4: ~306 pb	74 sim	Asparagine synthase
		D7: Sem banda	26 não	
Leg 36 K	55°C	D7: ~186 pb	76 sim	Sorbitol dehydrogenase
		S4: Sem banda	24 não	
Leg 36 V	53°C	S4: ~186 pb	57 sim	Sorbitol dehydrogenase
		D7: Sem banda	43 não	
Leg 44 K	62°C	D7: ~417 pb	51 sim	COO1227 histidinol dehydrogenase
		S4: Sem banda	49 não	
Leg 44 V	62°C	S4: ~417 pb	76 sim	COO1227 histidinol dehydrogenase
		D7: Sem banda	24 Não	

Dos nove primers testados, cinco foram totalmente avaliados na população F2. Os outros quatro primers eram altamente redundantes, não sendo possível obter produtos de tamanho esperado em *Arachis*. Este trabalho demonstra a possibilidade de se obterem marcadores moleculares do tipo âncora para o mapeamento

comparativo entre *Lotus* e *Arachis*. O desenvolvimento de novos primers-âncora (já feito pelo grupo da Universidade de Aarhus), assim como sua utilização como marcadores moleculares no mapa ora em construção, colocará *Arachis* em um sistema único de leguminosas, tornando mais viável o isolamento de genes tomando como base, homólogos presentes em outras espécies com o genoma melhor caracterizado.

APOIO FINANCEIRO

União Européia (INCO-DEV), PRODETAB, EMBRAPA e UCB.

BIBLIOGRAFIA CITADA

ASAMIZU, E.; NAKAMARA, Y.; SATO, E. & TABATA, S. (2000) Generation of 7137 nonredundant expressed sequence tags from a legume, *Lotus japonicus*. DNA research 7 127-130.

COMPANY, M.; STALKER, H. T. & WYNNE, J. C. (1982) Cytology and leafspot resistance in *Arachis hypogaea* x wild species hybrids. Euphytica, V.31, P.885-893, 1982.

PROITE, K.; SÁ, S.V.; Leal-BERTIOLI, S.C.M.; BERTIOLI, D.J. & GUIMARÃES, P.M. (2002) A primeira geração de ESTs de *Arachis*. Anais do VII encontro Talento Estudantil. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 04 a 05 de dezembro de 2002.

SATO, S., KANERKO, T., NAKAMURA, Y., ASAMIZU, E., KATO, T. & TABATA, S. (2001) Structural analysis of a *Lotus japonicus* genome. I. Sequence features and mapping of fifty-six TAC clones which cover the 5.4Mb region of the genome. DNA Research 8:311-318.

UTILIZAÇÃO DE MARCADORES RAPD NA CONSTRUÇÃO DE UM MAPA GENÉTICO DE *Arachis stenosperma* X *A. duranensis*

José, A.C.V.F., Guimarães, P.M.⁽¹⁾, Bertoli, D.J. & Leal-Bertoli, S.C.M⁽¹⁾.

Universidade Católica de Brasília. Pós Graduação Campus II, SGAN 916, Brasília - DF. CEP 70.790-160. ⁽¹⁾ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. PqEB - Parque Estação Biológica W5 Norte Final - Brasília - DF. CEP 70.770-900. email: anav@pos.ucb.br

INTRODUÇÃO

Parentes silvestres de plantas cultivadas são uma fonte em potencial de resistência a fatores bióticos (pragas e patógenos) e abióticos (stress hídrico, toxidez do solo). A EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia possui o maior banco de germoplasma de amendoim silvestre do mundo, o qual pode ser explorado principalmente visando o melhoramento do amendoim cultivado *Arachis hypogaea* para resistência a fungos foliares e ao nematóide das galhas (Simpson, 2001). Várias espécies de *Arachis* spp. foram testadas, sendo que dois acessos contrastantes foram encontrados (*A. stenosperma* e *A. duranensis*), sendo o primeiro resistente aos nematóides das galhas *Meloidogyne arenaria* raça 2 e *Meloidogyne javanica* (Leal-Bertoli et al., 2000) e aos fungos de mancha foliar *Cercospora arachidicola* e *Cercosporidium personatum* (Proite et al., 2002). Uma população segregante, derivada da planta híbrida (*A. stenosperma* x *A. duranensis*) foi produzida (Costa et al., 2002) e marcadores moleculares de diferentes tipos (SSR, AFLP, RGAs, RAPD) estão sendo desenvolvidos visando à construção de um mapa genético para a espécie resistente.

O grande avanço na área de marcadores moleculares baseados em PCR ocorreu em 1990, com a idéia de se utilizar “primers” mais curtos e de seqüência arbitrária (RAPD) para dirigir a reação de amplificação, eliminando-se assim a necessidade do conhecimento prévio de seqüência (Williams et al., 1990). A utilização de primers randômicos (RAPD) na amplificação de regiões de seqüência previamente desconhecidas tem possibilitado a identificação de polimorfismos entre organismos próximos e o desenvolvimento de mapas genéticos de alta cobertura genômica e a localização de genes de interesse econômico (Williams et al., 1993).

OBJETIVOS:

Selecionar primers aleatórios (do tipo RAPD); avaliar polimorfismo entre os parentais da população de mapeamento; utilizar estes primers na população de mapeamento. Este procedimento objetiva aumentar o número de marcadores no mapa genético em construção, a partir de uma população de *A. stenosperma* V 10309 x *A. duranensis* K 7988.

MATERIAIS E MÉTODOS:

Foram feitas reações de PCR utilizando-se DNAs extraídos através do método do CTAB (Wang et al., 1993) e primers de seqüência aleatória (OPERON). Foram testados 240 primers, observando-se seu polimorfismo entre os parentais e planta híbrida:

- *A. stenosperma* V 10309 (S4);

- *A. duranensis* K 7988 (D7);
- Híbrida (S4 x D7).

A reação foi preparada em um volume final de 15 µl com os seguintes reagentes: 1,2U de Taq polimerase da marca Pht em uma concentração de 5u/µl, Tampão (10x), 0,8mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTPs, 1pmol/µl de Primer, DNA (2.5 ng), H₂O Milli Q. Foram testados os seguintes primers da série “operon” : OPC, OPF, OPL, OPM, OPN, OPO, OPP, OPQ, OPR, OPS, OPT e OPV. Todas as reações foram feitas em duplicata para garantir que as bandas polimórficas não eram resultado de artefatos. O resultado de PCR foi aplicado em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio. A observação foi feita em luz ultravioleta.

RESULTADOS:

Dos 240 primers testados 58 apresentaram-se polimórficos para os parentais testados, como pode ser observado (Fig. 1), o que representa cerca de 25% dos primers RAPD testados. Além disso, observou-se que os resultados encontrados para a planta híbrida, foram condizentes com o esperado. Dos 58 primers polimórficos, até a presente data, 11 foram totalmente analisados na F2.

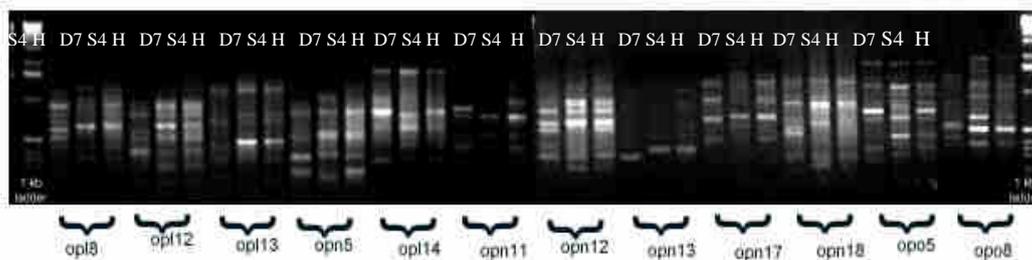


Fig. 1: Exemplo de gel de produtos de RAPD-PCR com os primers OPL8, OPL12, OPL13, OPN5, OPL14, OPN11, OPN12, OPN13, OPN17, OPN18, OPO5, OPO8, utilizando DNA de *A. stenosperma* V 10309 (S4), *A. duranensis* K 7988 (D7) e planta híbrida (S4 x D7).

CONCLUSÕES

Os primers polimórficos estão sendo utilizados para fazer uma varredura na população segregante F2. Esta população, por sua vez, está sendo testada quanto à susceptibilidade e resistência aos patógenos testados para os parentais: os nematóides das galhas *Meloidogyne arenaria* raça 2 e *Meloidogyne javanica* e os fungos de mancha foliar *Cercospora arachidicola* e *Cercosporidium personatum*. Desta forma, os primers aqui selecionados, uma vez testados em toda população F2, serão utilizados para saturar o mapa genético de *A. stenosperma* x *A. duranensis*, baseado principalmente em microssatélites, que está em construção. Este mapa tem como objetivo facilitar o melhoramento assistido por marcadores (MAS), para a introgressão de resistências no amendoim cultivado a partir de parentes silvestres.

APOIO FINANCEIRO

União Européia (INCO-DEV), PRODETAB, EMBRAPA e UCB.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- COSTA, G. R. T., DIAS, J. G. O., VALLS, J. F. M., LEAL-BERTIOLI, S. C. M. & BERTIOLI, D J & GUIMARÃES, P. M. 2002. Obtenção de populações segregantes de acessos selvagens de amendoim para a prospecção de genes de resistência a fungos e nematóides, VI Encontro Talento Estudantil, 04 a 05 de dezembro de 2002.
- LEAL-BERTIOLI, S.C.M.; GUIMÃES, P. M. ; BRUZZI, M.; CARNEIRO, R. G.; VALLS, J. F. M. & BERTIOLI, D. J. Busca de resistência ao nematóide das galhas *Meloidogyne* spp. 2000. Em seqüências análogas a genes de resistência em acessos silvestres de *Arachis*. Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 17 p. (Boletim de pesquisa, 20)
- PROITE, K., DIAS, J.G.O., GUIMARÃES, P.M., BERTIOLI, D.J., CARNEIRO, R.G., J.F.M. VALLS & LEAL-BERTIOLI, S.C.M. 2002. Avaliação de resistência a Fitonematoides e a fungos em diversas espécies de *Arachis* silvestres, VI Encontro Talento Estudantil, 04 a 05 de dezembro de 2002.
- SIMPSON, C. E. 2001. Use of Wild *Arachis* Species/Introgression of Genes into *A. hypogaea*. *Peanut Science*, 28:114-116.
- WANG, H., QI, M.Q., CUTLER, A.J. 1993. A simple method of preparing plant samples for PCR. *Nucleic Acids Research* 21: 4153-4154.
- WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A. & TINGEY, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.
- WILLIAMS, J. G. K., RAFALSKI, J.A., TINGEY, S.V. 1993. Genetic analysis using RAPD markers. *Methods in Enzimology* 218:704-740.

ESTUDOS CITOLÓGICOS EM ESPÉCIES DE *Arachis*: SECÇÕES *Caulorrhizae*, *Procumbentes*, *Erectoides*, *Heteranthae* E *Arachis*

Lima, J. G. A.¹; Peñaloza, A. P. S.¹; Santos, S.¹; Souza, C. A.³; Valls, J. F. M.¹

¹ Universidade Católica de Brasília, Ciências Biológicas, bolsista IC–CNPq; ² Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Pq. EB, Av. W5 Norte (Final), Brasília, DF. CEP: 70.770-900; ³ Faculdades da Terra de Brasília, Ciências Biológicas, bolsista IC–CNPq.

e-mail : andrea@cenargen.embrapa.br

Apoio Financeiro: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico – CNPq

Introdução

As espécies do gênero *Arachis* são nativas da América do Sul, ocorrem naturalmente na Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai e Uruguai. Em sua maioria são diplóides com $2n=20$ cromossomos, havendo ainda diplóides com $2n=18$ e tetraplóides com $2n=40$ cromossomos. Grande parte das espécies de *Arachis* ocorre, naturalmente, no Brasil. Das 81 espécies conhecidas, 64 podem ser encontradas em território brasileiro, sendo que destas, 46 são exclusivas do país, representando uma grande fonte de diversidade genética. Quatro secções são endêmicas, fazendo com que o país seja a única fonte de germoplasma dessas espécies. As secções endêmicas incluem espécies de grande potencial agrícola e comercial, como *A. pintoi*, *A. repens*, e *A. villosulicarpa*. A caracterização citogenética de acessos de germoplasma de *Arachis* tem-se mostrado ferramenta útil para um melhor entendimento da variabilidade do gênero, além de dar suporte a programas de melhoramento e de esclarecer identificações incorretas, onde a caracterização morfológica, por si só, não tem se mostrado suficiente para a confirmação desses resultados.

Material e Métodos

O trabalho consistiu na análise citogenética de 63 acessos de germoplasma de *Arachis*, incluindo 14 espécies das secções *Caulorrhizae*, *Heteranthae* e *Arachis*, mantidas em vasos na casa de vegetação da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. Para a determinação do número cromossômico meristema radicular, as raízes foram coletadas e pré-tratadas em α -bromonaftaleno por 2 ½ horas, à temperatura ambiente. Posteriormente, foram fixadas em solução Carnoy (etanol absoluto: ácido acético glacial, 3:1, v/v) por 24 horas, à temperatura ambiente. A hidrólise foi realizada em HCl 5N por 20 minutos, à temperatura ambiente. As raízes foram então coradas em solução Schiff e o tecido meristemático, macerado em carmim acético 2%. Alguns acessos foram analisados quanto ao padrão de distribuição de bandas CMA/DAPI e quanto a distribuição dos sítios de rDNA 45S (pTA 71 de *T. aestivum* L.) e 5S (*P. edulis* Sims), com as sondas e . As melhores células foram fotografadas em filme PB Ilford Pan F Plus ASA 50, ou tiveram sua imagem capturada em microscópio Axiophot, da Carl Zeiss, através do programa Kontron KS 300.

Resultados e Discussão

Secção *Caulorrhizae*

O sucesso do lançamento da primeira cultivar de *A. pintoi* para fins forrageiros, na Austrália, no início da década de 1990, fez com que diversos países

dos trópicos, principalmente da América Central e do Sul, importassem sementes e lançassem suas próprias cultivares. Com isso, a identificação das populações originais, que resultaram nessas cultivares, em muitos casos, tornou-se duvidosa. A variabilidade observada entre os acessos de *Arachis pintoii*, quanto ao florescimento, importantes para a produção de sementes e conseqüente manutenção da espécie a campo quando consorciada com gramíneas, e quanto a caracteres agrônômicos, importantes para o aumento da produção de carne e leite pelos animais mantidos nessas pastagens, torna importante o rastreamento dessas cultivares. Para os acessos e cultivares de *Arachis pintoii* analisados observou-se apenas $2n=20$ cromossomos, número previamente determinado para outros dezesseis acessos da espécie, não tendo sido encontrado nenhum outro triplóide, conforme observado para o acesso *A. pintoii* Ag2.

Secção Procumbentes

Acessos duas novas espécies da secção *Procumbentes* foram analisadas quanto ao tipo de satélite. Tanto *A. hassleri* Sv 3818, quanto *A. pfluggae* V 13589, apresentam satélite do tipo 9.

Secção Erectoides

Arachis porphyralyx V 7303 apresenta satélite do tipo 8. Este tipo de satélite ainda não havia sido observado em espécies desta secção, mas aparece em *A. tuberosa*, espécie da secção *Trirectoides*, bastante relacionada à secção *Erectoides*. Também observou-se, para esta nova espécie, a fórmula cariotípica $14m + 4sm$, que já foi observada em um acesso de *A. stenophylla*, a espécie considerada mais evoluída, sob o aspecto citogenético, na secção *Erectoides*.

Secção Heteranthae

A secção *Heteranthae* é composta por seis espécies, todas de ciclo bastante curto e que, em sua maioria, produzem sementes em abundância. Embora não tenha seu uso muito difundido, muitas dessas espécies apresentam um grande potencial para uso forrageiro. Essas espécies apresentam os menores cromossomos já observados para as espécies do gênero, o que dificulta muito sua análise e interpretação dos resultados. Três espécies da secção *Heteranthae* foram estudadas. Tanto para *A. seridoënsis* V 10969, quanto para *A. pussilla* V 6677, foram encontrados $2n=20$ cromossomos e o satélite do tipo 10. Quatro acessos de *A. sylvestris* apresentaram $2n=20$. Para *A. seridoënsis* V 10969 foi possível identificar bandas CMA^+ no par de cromossomos satelitado.

Secção Arachis

Os acessos de *A. decora* analisados apresentaram $2n=18$, conforme relatos para outros acessos (Peñaloza & Valls, 1997). No entanto, uma planta do acesso V 9955, multiplicado em casa de vegetação, apresentou 27 cromossomos. A causa mais provável para este tipo de ocorrência é a provável fecundação, de um dos óvulos por um gameta não reduzido, com $n=20$. Alguns fatores abióticos, atuantes durante a fase reprodutiva da planta, podem provocar essa não redução gamética, ocasionando tal anomalia. Não é a primeira vez que se observa esse fenômeno em *Arachis*. O padrão de distribuição das bandas DAPI observado para *A. decora* V 9955, *A. palustris* V 13023 e *A. praecox* V 14682 foi o mesmo, com bandas DAPI centroméricas em todos os cromossomos. Entretanto, para *A. decora* W648, apenas

8 pares de cromossomos apresentaram bandas DAPI+, evidenciando ainda mais a variação já observada para esta espécie.

Por muito tempo *A. batizocoi* foi a única espécie conhecida da secção *Arachis*, sem o par de cromossomos A. Por isso, foi tida, por muitos anos, como doadora do genoma B do amendoim. Porém, em coletas recentes, ampliou-se o número de espécies da secção *Arachis* que não apresentavam o par de cromossomos A. Em estudos conduzidos por Kochert et al. (1991) e por Fernández & Krapovickas (1994), foi sugerido que os genitores do amendoim teriam sido *A. ipaënsis* (sem par "A") e *A. duranensis* (com o par "A"), descartando, assim, a antiga hipótese de que *A. batizocoi* teria sido o doador do genoma B. Observou-se que *A. batizocoi* K 9484 apresenta apenas 9 pares dos 10 pares de cromossomos com bandas pericentroméricas DAPI+. Entre as demais espécies ligadas ao genoma B encontra-se *A. magna*. Os acessos desta espécie são morfológicamente semelhantes a *A. ipaënsis*. Neste estudo foram analisados 7 acessos brasileiros de *A. magna*. Todos apresentaram $2n=20$ cromossomos e ausência do par de cromossomos A. No acesso V 13748, foi possível identificar o cromossomo SAT do tipo 6. Este tipo de cromossomo satelitado é comum em outros acessos de *A. magna* e também aparece no único acesso conhecido de *A. ipaënsis* (Fernández & Krapovickas, 1994), o que fornece mais dados para hipótese de grande similaridade entre estas duas espécies. *Arachis gregoryi* é uma das novas espécies do gênero. Apresenta $2n=20$ cromossomos sem a presença do par de cromossomos A (Peñaloza & Valls, 1999). O acesso V14728 apresenta satélite do tipo 6 localizado no cromossomo 10, como observado por Fernández & Krapovickas (1994) em dois acessos de *A. magna*. Os cromossomos 9 e 10 de *A. gregoryi* V 6389 são submetacêntricos, sendo que o cromossomo 10 apresenta satélite do tipo 6. *Arachis glandulifera* pode apresentar de 5 a 6 pares de cromossomos subteloentéricos, o que caracteriza o genoma D em *Arachis*. O acesso V 13738 apresentou bandas teloméricas DAPI+ nos cinco pares de cromossomos subteloentéricos, comprovando as translocações cromossômicas. Observou-se, por coloração convencional, que um novo acesso de germoplasma desta mesma espécie, V 14730, recentemente coletado no Brasil, também apresenta cinco pares de cromossomos submetacêntricos.

O número de sítios de rDNA 5S e 45S foi determinado para *A. hypogaea* subsp. *hypogaea* var. *hirsuta* Mf 1538 e *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* var. *vulgaris* cv. Tatuí. Para a cultivar Tatuí observaram-se 2 sítios com forte marcação para a sonda de rDNA 5S e 2 sítios com marcação menos intensa para a mesma sonda; 6 sítios fortemente marcados de rDNA 45S além de outros 4 com marcação muito fraca para rDNA 45S. Para *A. hypogaea* subsp. *hypogaea* var. *hirsuta* Mf 1538, observaram-se 4 sítios bem marcados para rDNA 5S, além de 6 sítios fortemente marcados e 4 com marcação muito débil, para rDNA45S.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Marcelo Guerra, do Laboratório de Citogenética da UFPE, Recife, Brasil, e sua equipe pela gentil colaboração na execução das marcações com as sondas de rDNA.

Bibliografia

- CARVALHO, R.; GUERRA, M. *Hereditas*, 136:159-168, 2001.
FERNÁNDEZ, A.; KRAPOVICKAS, A. *Bonplandia*, 8: 187-220, 1994.

KOCHERT, G; HALWARD, T.; BRANCH, W. D.; SIMPSON, C. E.. Theor. App. Gen., 81:565-570, 1991.

LAVIA, G. I. Tesis (Doctorado), Universidad Nacional de Córdoba, 1999. 203p.

LAVIA, G. I. Bonplandia, 9: 111-120, 1996.

LAVIA, G. I. Cytologia, 63: 177-181. 1998.

PEÑALOZA, A. P. S.; VALLS, J. F. M. In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS, 1. Programas e Resumos...Campinas: Instituto Agronômico de Campinas, 1997, p.39.

PEÑALOZA, A. P. S.; VALLS, J. F. M. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA A AMÉRICA LATINA E O CARIBE, 2. Anais...Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. 1 CD ROM.

RAINA, S. N.; MUKAI, Y. Genome, 42:52-59, 1999.

SINGH, A. K.; MOSS, J. P. Theor. App. Gen., 61: 305-314, 1982.

VALLS, J. F. M.; SIMPSON, C. E. 1997. In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS, 1. Programas e Resumos...Campinas: Instituto Agronômico de Campinas, 1997, p. 27-28.

COMPORTAMENTO DE CARACTERES MORFOLÓGICOS COM POTENCIAL DE USO COMO DESCRITORES VARIETAIS EM *Arachis pintoi*

CASTRO, C. M.¹; WAGNER, C. M.²; VALLS, J. F.³; KARIA, C. T.⁴

¹Pesquisadora, Embrapa Clima Temperado, BR 392, Km 078, C. P. 403, Pelotas / RS, CEP. 96001-970, e-mail: caroline@cpact.embrapa.br

²Pesquisadora assistente SVS do Brasil, Rua municipal, PLN 212, Km 1, C. P. 102, Paulínia/SP, CEP. 13140-000, e-mail: caroline.moore@seminis.com.br

³Pesquisador, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB, Av. W5 Norte (final), C. P. 02372, Brasília/DF, CEP. 70770-900, e-mail: valls@cenargen.embrapa.br – Bolsista de produtividade em pesquisa do CNPq

⁴Pesquisador, Embrapa Cerrados, BR 020, Km 18, Rod. Brasília-Fortaleza, C. P. 08223, Planaltina/DF, CEP. 73301-970, e-mail: karia@cpac.embrapa.br

Introdução

A espécie *Arachis pintoi* tem tido destaque no cenário agrícola, principalmente devido a sua adaptação a diferentes ambientes, e oferta de forragem de excelente qualidade. Mais de dez cultivares foram lançadas nos últimos 13 anos. Essas, apresentam na sua descrição referências quanto ao tamanho dos folíolos e a densidade de cerdas na planta (PAGANELLA & VALLS, 2001). Com o objetivo de identificar caracteres morfológicos com potencial de uso como descritores varietais, progênies F₂ de *Arachis pintoi* foram caracterizadas quanto ao número de cerdas no pecíolo, folíolos basal e distal, comprimento e espessura do entrenó, comprimento e largura dos folíolos basal e distal.

Em dezembro de 2001 progênies F₂ de cruzamentos intra-específicos de *A. pintoi* (Tabela 1) foram transplantadas para o campo experimental na Embrapa Cerrados, em Planaltina, DF. Aos 78 dias após o plantio, foi mensurada a espessura do estolho e o comprimento do entrenó, de três estolhos por planta, entre o terceiro e o quarto nó, sentido ápice do estolho/base. Na quarta folha, sentido ápice do estolho/base, foi mensurado o comprimento e a largura dos folíolos basal e apical da metade interna da folha. Os estolhos foram herborizados e, com o auxílio de uma lupa, contados o número de cerdas.

Tabela 1. Caracterização morfológica dos pais envolvidos nos cruzamentos que originaram as populações segregantes F₂ de *Arachis pintoi* avaliadas em campo experimental, em Planaltina, DF. Caracteres: número de cerdas no pecíolo (NCP) e nos folíolos basal (NCB) e distal (NCD), comprimento do folíolo basal (CFB) e distal (CFD), largura do folíolo basal (LFB) e distal (LFD), comprimento do entrenó (CE) e espessura do entrenó (EE).

Cruzamento: 13338 x 12787									
Número de plantas F ₂ avaliadas: 56									
Coletor ¹	NCP	NCB	NCD	CE	EE	CFB	CFD	LFB	LFD
V 13338	6,7	10,3	0	1,6	0,23	1,67	2,17	1,03	1,20
GKP 12787	66,3	44,3	10,3	1,7	0,26	1,48	1,82	1,12	1,35
Cruzamento: 13167 x 12787									
Número de plantas F ₂ avaliadas: 76									
Coletor	NCP	NCB	NCD	CE	EE	CFB	CFD	LFB	LFD
V 13167	0	0	0	1,02	0,22	1,32	2,05	0,98	1,20
GKP 12787	66,3	44,33	10,33	1,76	0,26	1,48	1,82	1,12	1,35
Cruzamento: 13167 x 6791-wf									
Número de plantas F ₂ avaliadas: 36									
Coletor	NCP	NCB	NCD	CE	EE	CFB	CFD	LFB	LFD
V 13167	0	0	0	1,02	0,22	1,32	2,05	0,98	1,20
V 6791-wf	3	2,33	2,67	1,29	0,24	3,47	3,60	1,60	2,0

¹V = J. F. M. Valls; G = W. C. Gregory; K = A. Krapovickas

Os dados experimentais foram submetidos a uma análise de variância com o objetivo de obter as estimativas dos componentes de variância, herdabilidade e ganho genético com seleção para os caracteres acima mencionados. Para a realização das análises foi utilizado o programa de análise estatística SAS (SAS INSTITUTE INC., 1990). Foram adotadas pressões de seleção de 5% e 20% no sentido de aumentar e diminuir cada caráter avaliado.

A análise de variância foi significativa para todos os caracteres, nas três progênes, exceto na F₂ 13167 x 6791-wf para o número de cerdas no folíolo distal e largura dos folíolos basal e distal. As estimativas das herdabilidades no sentido amplo mostram valores acima de 0,80 para todos os caracteres nas três F₂ avaliadas, salvo aqueles em que a análise de variância não foi significativa, onde as estimativas foram menores (Tabela 2).

Tabela 2. Estimativas das herdabilidades no sentido amplo (h^2_a) dos caracteres número de cerdas no pecíolo (NCP) e nos folíolos basal (NCB) e distal (NCD), comprimento do folíolo basal (CFB) e distal (CFD), largura do folíolo basal (LFB) e distal (LFD), comprimento do entrenó (CE) e espessura do entrenó (EE), em progênies F_2 dos cruzamentos intraespecíficos de *Arachis pintoi*, 13338 x 12787 (1), 13167 x 12787 (2) e 13167 x 6791-wf (3).

Caráter	h^2_a		
	1	2	3
NCP	0,92	0,93	0,86
NCB	0,87	0,89	0,89
NCD	0,82	0,94	0,97
CE	0,95	0,95	0,89
EE	0,93	0,92	0,83
CFB	0,94	0,93	0,85
CFD	0,84	0,94	0,86
LFB	0,88	0,92	0,67
LFD	0,87	0,93	0,72

As médias das populações selecionadas da F_2 13167 x 12787 mostra essa progênie como fonte de genes para aumentar o número de cerdas no pecíolo e nos folíolos basal e distal, a espessura do entrenó e o tamanho dos folíolos basal e distal, e também para diminuir o número de cerdas no pecíolo e o comprimento do folíolo distal. Já a F_2 13338 x 12787 se destaca como doadora de genes para diminuir o comprimento e a espessura do entrenó, o comprimento do folíolo basal e a largura dos folíolos basal e distal. E, a F_2 13167 x 6791-wf mostra grande potencial para aumentar o comprimento do entrenó e diminuir o número de cerdas no folíolo basal (Tabela 3 e 4).

Tabela 3. Médias das populações F_2 originais (\bar{Y}_o), dos genótipos selecionados (\bar{Y}_s) e ganho genético com seleção (G_s) para aumentar os caracteres número de cerdas no pecíolo (NCP) e nos folíolos basal (NCB) e distal (NCD), comprimento do folíolo basal (CFB) e distal (CFD), largura do folíolo basal (LFB) e distal (LFD), comprimento do entrenó (CE) e espessura do entrenó (EE), sob pressão de seleção de 5% e 20% em progênies F_2 dos cruzamentos intraespecíficos de *Arachis pintoi*, 13338 x 12787 (1), 13167 x 12787 (2) e 13167 x 6791-wf (3).

Caráter	\bar{Y}_o			5%						20%					
				\bar{Y}_s			G_s			\bar{Y}_s			G_s		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
NCP	63,4	46,2	37,0	85,8	87,0	50,8	20,5	37,9	11,9	79,2	74,7	43,3	14,5	26,5	5,4
NCB	19,2	15,7	1,6	32,7	33,8	7,5	11,8	16,1	5,2	26,4	26,4	2,8	6,3	9,5	1,1
NCD	1,5	1,6	0,02	6,6	8,6	0,16	4,1	6,6	0,09	4,0	5,4	0,04	2,0	3,6	0,01
CE	2,2	2,5	3,1	3,5	3,8	4,2	1,2	1,2	0,9	3,0	3,5	3,8	0,7	0,9	0,6
EE	0,26	0,28	0,28	0,33	0,35	0,33	0,07	0,07	0,04	0,3	0,33	0,31	0,04	0,05	0,02
CFB	1,95	1,98	2,27	2,51	2,60	2,73	0,53	0,58	0,39	2,3	2,4	2,6	0,3	0,4	0,2
CFD	2,2	2,19	2,46	2,69	2,87	2,84	0,41	0,64	0,33	2,51	2,67	2,74	0,26	0,45	0,24
LFB	1,27	1,38	1,31	1,64	1,9	1,65	0,3	0,48	0,23	1,55	1,71	1,53	0,39	0,3	0,15
LFD	1,53	1,63	1,60	1,97	2,26	1,9	0,4	0,59	0,28	1,84	2,09	1,80	0,27	0,43	0,19

Tabela 4. Médias das populações F₂ originais (\bar{Y}_o), dos genótipos selecionados (\bar{Y}_s) e ganho genético com seleção (G_s) para diminuir os caracteres número de cerdas no pecíolo (NCP) e nos folíolos basal (NCB) e distal (NCD), comprimento do folíolo basal (CFB) e distal (CFD), largura do folíolo basal (LFB) e distal (LFD), comprimento do entrenó (CE) e espessura do entrenó (EE), sob pressão de seleção de 5% e 20% em progênes F₂ dos cruzamentos intraespecíficos de *Arachis pinto*, 13338 x 12787 (1), 13167 x 12787 (2) e 13167 x 6791-wf (3).

	\bar{Y}_o			5%						20%					
				\bar{Y}_s			G _s			\bar{Y}_s			G _s		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
NCP	63,4	46,2	37,0	36,3	2,03	25,7	-	-	-	45,9	8,4	29,7	-	-35,1	-6,2
							24,9	41,1	9,7				16,0		
NCB	19,2	15,7	1,6	8,2	16,2	0	-9,5	0,4	-	12,0	14,6	0,13	-6,2	-1,01	-1,3
									1,4						
NCD	1,5	1,6	0,02	0	0	0	-1,3	-1,5	-	0	0	0	-1,3	-1,5	-0,1
									0,1						
CE	2,2	2,5	3,1	0,7	1,1	2,2	-1,3	-1,3	-	1,05	1,4	2,5	-	-0,97	-0,5
									0,7				1,08		
EE	0,26	0,28	0,28	0,16	0,20	0,21	-0,1	-0,1	-	0,19	0,22	0,23	-	-0,06	-
									0,1				0,07		0,04
CFB	1,95	1,98	2,27	1,0	1,03	1,83	-	-	-	1,36	1,38	1,93	-	-0,56	-
							0,89	0,88	0,4				0,55		0,29
CFD	2,2	2,19	2,46	1,34	0,91	2,04	-	-	-	1,66	1,55	2,18	-	-0,60	-
							0,72	1,20	0,4				0,45		0,24
LFB	1,27	1,38	1,31	0,6	0,66	1,12	-	-	-	0,81	0,95	1,15	-0,4	-0,39	-
							0,59	0,66	0,1						0,13
LFD	1,53	1,63	1,60	0,65	0,67	1,32	-	-	-	0,98	1,03	1,4	-	-0,56	-
							0,76	0,89	0,3				0,48		0,19

Os ganhos genéticos com seleção foram altos para todos os caracteres avaliados, tanto para aumentar, quanto para diminuir o caráter. Resultados que permitem que rápidos avanços sejam atingidos na seleção em ambas direções. Da mesma forma, a alta herdabilidade encontrada para todos os caracteres avaliados mostra que, parte relevante da variação observada entre os genótipos das progênes F₂ é genética, o que sustenta a atividade de melhoramento genético nessas progênes e suporta a adoção dessas características como descritores varietais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- PAGANELLA, M. B.; VALLS, J. F. M. Caracterização morfo-agronômica de cultivares e acessos selecionados de *Arachis pinto* Krapov. & W. C. Gregory (*LEGUMINOSAE*). Pasturas Tropicales, v. 24, p. 23-30, 2002.
- SAS INSTITUTE. Sas Statistical User's Guide: version 6, 4 ed. Cary, Sas Institute Inc., 1990. p. 1686.

ENCONTRO DE *ARACHIS VILLOSULICARPA* HOEHNE SOB CULTIVO ENTRE OS ÍNDIOS YAWALAPITI E WAURÁ, DO PARQUE INDÍGENA DO XINGU, NORDESTE DO ESTADO DO MATO GROSSO – BRASIL

Freitas, F.O.

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – PqEB – Parque Estação Biológica W5 Norte Final. Brasília – DF, Caixa Postal 02372, Brasil

Introdução

Arachis villosulicarpa Hoehne é uma das três espécies do gênero *Arachis* domesticas pelo homem. Encontrada primeiramente sob cultivo entre os índios Nambiquara (família lingüística Nambiquare) e Menki (língua Irântxe), é uma espécie não encontrada em estado silvestre, sendo que se considera que a espécie mais relacionada a ela seja *Arachis Piatrarellii* Krapov. & W.C. Gregory (Krapovickas & Gregory, 1994).

A distribuição geográfica desta espécie cultivada é definida, até o presente, como sendo limitada à parte centro-oeste do estado do Mato Grosso, Brasil, nas proximidades do rio Juruema e no extremo leste do estado de Rondônia (Krapovickas & Gregory, 1994). Já no caso do parente selvagem, sua distribuição se localiza na parte centro sul do estado do Mato Grosso, se expandindo até o leste, incluindo o vale do Rio Araguaia, sendo, portanto, as duas espécies não simpátricas hoje em dia, salientando a influência do homem no processo evolutivo e de difusão da espécie cultivada.

A. villosulicarpa é uma espécie perene, diplóide ($2n = 20$), pertencente a seção *Extranervosa*, distinta da seção *Arachis*, a qual pertence o amendoim cultivado. A seção *Extranervosa* é exclusiva do Brasil, perfazendo 9 espécies, todas diplóides, sendo considerada uma das seções mais primitivas do gênero.

Objetivo

Neste trabalho apresentamos o relato do encontro de *A. villosulicarpa* sob cultivo entre os índios do Alto Xingu, na parte nordeste do estado do Mato Grosso, ampliando assim não apenas o limite geográfico de ocorrência comprovada da espécie, mas também, a ampliação cultural de uso desta espécie por distintas etnias indígenas.

Resultados e Discussão

A espécie *A. villosulicarpa* foi encontrada sob cultivo entre os índios Waurá e Yawalapiti, ambos da região do Alto Xingu (figura 1). Estas duas tribos pertencem a família lingüística Aruak, assim como também os índios Mehinako, residente no Xingu, e índios Pereci e Enawene-Nawe, sendo que todas estas cinco etnias são classificadas/ reunidas como sendo os Mairupe Centrais, devido a proximidade lingüística entre elas (Franchetto, 2001). As duas últimas habitam na região oeste do estado do Mato Grosso, próximo a região habitada pelos Nambiquara e Menki, de onde as primeiras plantas de *A. villosulicarpa* foram coletadas.

O Parque Indígena do Xingu, situado na região Norte-Nordeste do estado do Mato Grosso, foi oficialmente criado no dia 14 de abril de 1961, através do Decreto 50.455, durante o efêmero governo do presidente Jânio Quadros, após mais de 10

anos de trabalho intenso dos irmãos Villas Boas, do Marechal Rondon, de Darcy Ribeiro, Noel Nutels, Café Filho dentre outros, possuindo uma área de cerca de 30.000 km² (Novaes, 1985).

Em termos florísticos, o Parque se encontra em uma zona de transição entre os biomas Cerrado, ao sul, e a Floresta Amazônica, ao norte. Os rios Kuluene, Ronuro e Batoví se encontram dentro do Parque para formar o rio Xingu, cujo destino final é o rio Amazonas. Outros importantes rios desta bacia que cortam o parque são: Suiá-Missu, Maritsauá-Misú, Jarina, e Tatuari.

A região foi primeiramente visitada e documentada em 1884, por Karl von den Steinen, que descreveu diversas tribos da área, e que, ainda hoje permanecem ali, como os Kamaiurá, Suiá, Yawalapití, Waurá, registrando a sua localização geográfica e os seus costumes (Steinen, 1942).

Atualmente, no Parque, vivem mais de 4.000 índios de 14 etnias distintas, pertencentes a seis troncos lingüísticos, demonstrando a grande diversidade cultural ali concentrada, algumas delas moradoras antigas do local, como os Yawalapiti e Waurá, sendo que outras etnias foram remanejadas para o parque após sua criação oficial, em virtude dos conflitos de terra com fazendeiros, como é o caso dos Kayabí (Villas Boas, 1976; Ferreira, 1994).

Registros arqueológicos demonstram que os Waurá são moradores antigos da região do Parque, já se estabelecendo ali entre os anos 1000 e 1600 D.C. (Depois de Cristo). Os registros arqueológicos ainda apontam que esta etnia anteriormente vivia, entre os anos 800 e 900 D.C., na região oeste do estado do Mato Grosso (região sudoeste da Amazônia), próximo onde hoje vivem os Nambiquara e, posteriormente, migraram para leste. Deste modo, historicamente esta etnia pode ter tido um contato antigo com esta espécie cultivada e trazido consigo para o Xingu em sua mudança/ migração. Relatos de membros desta etnia indicam o uso desta espécie como historicamente antiga. Ou seja, os registros arqueológicos mostram que os Waurá viviam mais a oeste, dentro da área geográfica atualmente considerada de ocorrência de *A. villosulcarpa* (Neto, 2004). Estes mesmos vestígios arqueológicos apontam que a área de abrangência desta cultura em tempos antigos chegava até a Bolívia e o estado do Acre, abrangendo a borda sul amazônica, reforçando a possibilidade de contato, troca e difusão de amostras de *A. villosulcarpa* entre os diversos povos que viviam nesta extensa área.

Deste modo, este trabalho propõe uma ampliação da área de ocorrência de *A. villosulcarpa*, atingindo a parte nordeste do estado do Mato Grosso, Brasil, na região conhecida como Alto Xingu. É também proposto a ampliação dos grupos indígenas que utilizam tradicionalmente esta planta.

Referências bibliográficas

- FERREIRA, M.K.L. 1994. **Histórias do Xingu**. NHII/USP e FAPESP. São Paulo, 239p.
- FRANCHETTO, B. Línguas e história no Alto Xingu. In: FRANCHETTO, B.; HECKENBERGER, M. (Orgs.). **Os povos do Alto Xingu**. Rio de Janeiro: UFRJ, 2001. p. 111-56.
- KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, W.C. Taxonomía del género *Arachis* (Leguminosae). **Bonplandia** v.8, p.1-186, 1994.
- NETO, A.B. 2004. **Wauja**. In: <http://www.socioambiental.org>. Acessado em 22 de abril de 2004.
- NOVAES, W. 1985. **Xingu – uma flecha no coração**. Editora Brasiliense S.A. São Paulo, 311p.
- STEINEN, K. 1942. **O Brasil Central: expedição em 1884 para a exploração do rio Xingu**. Tradução. São Paulo: Campanha Editora nacional (Brasiliense, série extra, 3).
- VILAS BOAS, O & VILAS BOAS, C. 1976. **Xingu – os índios, seus mitos**. Zahar editores. Rio de Janeiro, 211p.

USO DE TÉCNICAS DE GERMINAÇÃO *IN VITRO* NO RESGATE DE ACESSOS DE AMENDOIM - *Arachis hypogaea*, SUBMETIDOS A ESTRESSE DURANTE A CONSERVAÇÃO

Fortes, G. R. de L.¹; Freitas, F. de O.¹; Fortes, M. A.²; Valls, J. F. M.¹

¹ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – PqEB – Parque Estação Biológica W5 Norte Final. Brasília – DF, Caixa Postal 02372, Brasil

² Pós Graduando da Universidade Federal de Pelotas

Introdução

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é uma leguminosa herbácea anual, de grande importância econômica no país. O gênero *Arachis* possui sua origem em território brasileiro, sendo que a distribuição natural das espécies que a compõe se encontram todas em países da América do Sul, incluindo a espécie domesticada, cujo local de origem mais aceito atualmente é na região sul da Bolívia/ Norte da Argentina (Krapovickas & Gregory, 1994).

Sendo uma espécie tipicamente sul-americana, a coleta e conservação de amostras dessas espécies se fazem não apenas necessária, como também estratégica. A Embrapa possui acessos de amendoim conservados em câmaras de baixa temperatura em diversos centros, cujas sementes ficam disponibilizadas para uso em programas de melhoramento e caracterização desta espécie.

Devido a problemas técnicos, durante alguns meses no ano de 1998, perdeu-se o controle da umidade interna de uma das câmaras de conservação de germoplasma de médio prazo, localizada na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, onde se encontravam ao redor de 800 acessos desta espécie de diferentes procedências e datas de coleta.

Sem o controle efetivo da umidade, esta chegou ao nível de 70% no interior da câmara, fazendo com que as amostras que normalmente se encontram com umidade ao redor de 10%, tivessem seu teor de umidade interno elevado. Associado a isto, picos de falta de energia fizeram com que a temperatura interna da câmara se elevasse, estimulando fisiologicamente as sementes a germinarem, e ativando também a ação de fungos e bactérias. Ambos processos foram inibidos com o retorno da temperatura aos níveis de conservação adequados.

Este choque de umidade e temperatura, durante aquele período, acarretou perdas do poder germinativo para os acessos conservados. Muitos deles, ao serem colocados para germinar, através de procedimentos padrões via papel umedecido em câmaras de germinação, ou não germinaram ou iniciavam a germinação mas eram drasticamente atacados por fungos e bactérias, matando as sementes.

Desta forma, este trabalho apresenta uma metodologia, através de técnicas de cultura de tecidos, com o intuito de resgatar parte daqueles acessos que não estavam germinando pelos métodos convencionais, assim como a apresentação dos resultados do trabalho de resgate e regeneração deste material.

Materiais e Métodos

Trabalhou-se com 29 acessos de sementes de *Arachis hypogaea* provenientes da câmara de conservação de médio prazo, localizada no Centro de Recursos Genéticos e Biotecnologia, da Embrapa. Estas sementes são, originalmente, provenientes de quatro países (Brasil, Bolívia, Colômbia e Peru) e

foram coletadas num período de abrangência de 19 anos (1980 à 1998). As sementes provenientes do Brasil foram coletadas das mais diversas regiões abrangendo os estados do Rio Grande do Sul até o Acre.

Estas sementes foram submetidas a uma desinfestação onde se utilizou uma solução de sacarose 10% por 16 horas (overnight) sob agitação. Em seguida processou-se a desinfestação destes acessos com o emprego de hipoclorito de sódio 2% por 20 minutos e após fez-se um tríplice enxágüe em água esterilizada e autoclavada. Cada acesso foi representado por dez sementes.

Em câmara de fluxo laminar procedeu-se a extração dos embriões que, em seguida, foram inoculados em tubos de ensaio (150 x 20 mm), com 5 ml do meio de cultura contendo sais de MS (Murashige & Skoog, 1962) adicionados das vitaminas B5 (Gamborg et al, 1968), além de mio - inositol (100 mg/l), benzilamino purina (BAP) (2,0 mg/l), sacarose (20g/l) e ágar (7g/l).

Após inoculação, todo o material permaneceu em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e luminância de aproximadamente 2000 lux.

As variáveis observadas foram: percentagem (%) de contaminação por fungos; percentagem de contaminação por bactérias; percentagem de germinação (desenvolvimento dos embriões).

Resultados e Discussão

Pôde-se observar que a contaminação por fungo foi praticamente inexpressiva. Apenas três acessos, o que corresponde a cerca de 3% do total de acessos estudados, apresentaram uma contaminação de 10% na avaliação final. Este valor não variou desde a primeira observação. Danby and Leifert (1994) mostraram que em cultivo *in vitro*, este tipo de agente contaminante, apesar de presente e causar danos, não é tão importante como as bactérias. Fortes (1992) mostrou também que o emprego de hipoclorito de sódio no processo de desinfestação tem mostrado ser eficiente no controle de fungos no cultivo *in vitro*.

A contaminação bacteriana foi bem mais intensa. Vinte e sete acessos (cerca de 93% dos acessos estudados) apresentaram algum nível de contaminação, sendo que na maioria do material estudado, a contaminação variou de 10-90%. Alguns dos acessos estavam 100% contaminados já na primeira avaliação, que ocorreu cinco dias após a inoculação. De um modo geral este tipo de contaminação é a que mais ocorre nos cultivos *in vitro*. Isto foi também observado por Danby et al (1994) onde eles mencionam que a grande incidência de contaminação no processo de cultivo *in vitro* se deve às bactérias.

Nestes casos, a evolução do nível da contaminação entre a primeira até a última avaliação foi pouco expressiva para a maioria dos acessos estudados. Ficou nítido que a contaminação, tanto por fungo, quanto por bactéria, se expressa nos primeiros dias de cultivo. Lengeler et al (1999) mostraram que o desenvolvimento de culturas bacterianas pode ser detectado de 15 horas à 1(um) dia após início do estabelecimento do cultivo.

Alguns dos acessos apresentaram nítida evolução dos embriões com crescimento e desenvolvimento da parte aérea e sistema radicular. Houve casos onde, mesmo o acesso apresentando certo nível de contaminação bacteriana (20%), este conseguiu desenvolver-se.

Cinco dos acessos não apresentaram desenvolvimento algum. O tempo de armazenagem teve certa influência para o resgate dos acessos, mas mesmos alguns

dos acessos mais antigos conseguiram responder bem à metodologia, demonstrando de forma clara que a conservação de *Arachis* é função também do genótipo.

Desta forma, alguns acessos que estão sendo conservados necessitam de maiores cuidados ou de um período menor de permanência em câmaras de conservação conforme as informações deste ensaio experimental. Conclui-se que a idade, associada ao problema na câmara pode estar influenciando na regeneração do material e indicando que as sementes de amendoim cultivado podem apresentar problemas naturais de preservação por períodos tão longos neste tipo de câmara de médio prazo (5° C positivo).

Referências Bibliográficas

- DANBY, S.; BERGER, F.; HOWITT, D.J.; WILSON, A.R.; DAWSON, S.; LEIFERT, C. 1994. Physiology, Growth and development of Plants in Culture. (Lumsden, P.J.; Nicholas, J.R.; Davies, W.J. eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p.397-403.
- DANBY, S.; LEIFERT, C. 1994. Physiology, growth and development of plants in culture. (Lumsden, P.J. ; Nicholas, J.R.; Davies, W.J. eds). Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, p.379-385.
- FORTES, G.R.de L. Calogênese e organogênese *in vitro* de macieira (*Malus* spp.) afetadas por fatores físicos, químicos e biológicos. Viçosa, UFV, Tese de doutorado. 1992. 163p. ilustr.
- GAMBORG, O. L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research.*, v.50, p.151-158.
- KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, W.C. Taxonomía del género *Arachis* (Leguminosae). *Bonplandia* v.8, p.1-186, 1994.
- LENGELER, J.W.; DREWS, G.; SCHLEGER, H.G. *Biology of the procaryotes*. Thieme. London. 955p, 1995.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* .,v.15, p.473-497, 1962.

PROSPECCIÓN DE LAS ENFERMEDADES FUNGOSAS EN EL CULTIVO DEL MANÍ (*Arachis hypogaeae* L) EN LA VI REGIÓN DE CHILE

MALDONADO, G; VALENZUELA, A; **URBINA, C**¹; CRINO, B¹; ARANCIBIA, R².

Comuna de Malloa y San Vicente de Tagua-Tagua. VI Región ⁽¹⁾, ⁽²⁾ Universidad del Mar, Valparaíso, Chile. E-mail www.claurbina@yahoo.com, www.rarancib@udelmar.cl.

En Chile, el cultivo del maní ha sido realizado por muchos años, por los pequeños agricultores para su propio consumo. La agricultura familiar campesina en la VI región se lleva a cabo, principalmente en la zona comprendida entre las provincias de Colchagua y Cachapoal.

En forma oficial se registra una superficie aproximada de 120 ha a nivel nacional. El uso del suelo para este cultivo se concentra durante el período seco estival o bien dentro de una serie de rotaciones de largo plazo.

La variedad de maní cultivado corresponde a un ecotipo que se ha adaptado a las condiciones edafoclimáticas de las localidades, por medio de selección masal realizada por los agricultores. En términos generales, se manejan densidades poblacionales de 200 a 250 mil plantas / ha, con lo cual se obtienen rendimientos del orden de 2.000 kilos.

Las condiciones agroclimáticas de la región de cultivo se caracteriza por un clima mediterráneo. El régimen térmico de esta zona se caracteriza por una temperatura media anual de 13.7°C, con una máxima media del mes más cálido (enero) de 28,1°C y una mínima media del mes más frío (julio), de 2,9°C. El período libre de heladas es de 5 meses, desde noviembre a abril inclusive. La suma anual de temperaturas, base 5°C, es de 3.160 grados - días y base 10°C, de 1.450 grados - días. Las horas de frío, de abril a noviembre, llegan a 884. La temperatura media mensual se mantiene sobre 8°C.

El régimen hídrico se caracteriza por una precipitación anual de 582 mm, siendo el mes de julio el más lluvioso, con 98 mm. La evaporación de bandeja es de 1.230 mm con una máxima en enero de 230 mm. La estación seca es de 4 meses y comprende el período de diciembre a marzo.

En relación con las condiciones edafológicas de las zonas de cultivo, corresponden a suelos de origen aluvial, con texturas livianas (Franco arenosa, Limosas y arenosas). En cuanto a las condiciones de fertilidad del suelo, estos presentan rangos disponibles para el Nitrógeno de 30 a 60 ppm de, Fósforo en niveles de 15 a 40 ppm y el Potasio 120 a 230 ppm .

En cuanto a los parámetros químicos del suelo, presenta rangos de pH al agua (1:2.5) de entre 6.5 a 7.5, con rangos de 1.0 a 3.5 % de materia orgánica y una Conductividad eléctrica media de 1,5 mmhos /cm.

Objetivo del estudio: Aislar e identificar los agentes causales de las enfermedades fungosas del maní en las zonas productivas de Malloa y San Vicente, VI Región de Chile.

Material y método

El trabajo consideró la realización de una serie de muestreos durante el ciclo productivo del cultivo, durante el período de octubre de 2003 a marzo de 2004, en los que seleccionaron plantas con sintomatología a nivel de cuello, raíces y en el

follaje para poder implementar un programa de control integrado de las patologías identificadas.

Se seleccionaron 10 predios representativos de las condiciones agroclimáticas y los manejos productivos de las zonas de Malloa y San Vicente, en los cuales se realizó un registro de datos de cada predio consistente en superficie, tipo de suelo, análisis de fertilidad, manejos agronómicos, caracterización del ecotipo cultivado.

El muestreo de plantas fue dirigido a aquellas que presentaban síntomas, tales como marchitez, manchas foliares, necrosis a nivel de cuello y en las ramificaciones. Cada muestra consistente en la planta completa, se dispuso en bolsas plásticas y se identificó con los datos del predio y fecha de recolección.

En laboratorio, a partir de cada muestra, después de un análisis visual, se procedió a seleccionar tejido de la zona de avance de las lesiones. Este tejido se desinfectó con Alcohol al 50% durante 2 minutos y posteriormente tres lavados con agua destilada estéril. Posteriormente se dispusieron 5 segmentos de tejido por placa petri con medio Agar papa dextrosa (PDA) las que fueron incubadas a una temperatura de $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Al cabo de 7 días se procedió a la identificación taxonómica de los principales géneros y especies de hongos fitopatógenos asociados a los diferentes tejidos.

Resultados

En el Cuadro 1 se resumen las principales características de los predios muestreados y el tipo de patógeno aislado en cada predio, de las localidades de la zona de cultivo de *Arachis hypogaea*, VI región, Chile.

La distribución porcentual de los hongos aislados e identificados a partir de 118 muestras colectadas, se resumen en el Gráfico 1, donde se representa la presencia de un 48% de *Fusarium* spp, *Rhizoctonia solani* 16%, 15% a *Sclerotium rolfsii*, 10% a *Aspergillus niger*, 8% a *Aspergillus flavus* y 1% de *Botrytis cinerea* y *Sclerotinia minor* respectivamente.

Conclusión

A partir de los resultados, se concluye que el cultivo de maní (*Arachis hypogaea*) en las zonas prospectadas son afectados por una serie de hongos fitopatógenos (*Fusarium* spp, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia minor*). Siendo el de mayor incidencia *Fusarium* spp, manifestando su daño a nivel de raíz y cuello de las plantas.

Los agentes fitopatógenos en el cultivo del maní, se presentan afectando en forma de un complejo fungoso, en el que actúan a lo menos dos géneros en forma complementaria.

Cuadro 1: Caracterización de los predios muestreados en los sectores de Malloa y agentes causales aislados en predios de San Vicente, VI región de Chile.

Parcela	Comuna	Superficie cultivada <i>A. hypoageae</i> (ha)	Textura de Suelo	Agentes causales aislados
1	Malloa	1,5	F-A	FU, RS,
2	Malloa	2,0	F-A	FU, RS, SR, AN
3	Malloa	1,2	F-A	FU, RS, AN,AF,
4	Malloa	0,8	F-A	FU, RS, SR, AN,AF
5	Malloa	0,8	F-A	FU,RS,SR, AN, AF
6	San Vicente	0,4	F	FU, RS, SR, AN, AF,
7	San Vicente	0,3	F	FU, RS, SR, AF
8	San Vicente	0,4	F	FU, RS, SR,
9	San Vicente	0,25	F	FU, RS, SR
10	San Vicente	0,3	F	FU, RS, SM

Textura dominante de suelo: F, Franco, A; Arenoso.

Hongos fitopatógenos: FU, *Fusarium* spp, RS, *Rhizoctonia solani*, SR, *Sclerotium rolfsii*, AN, *Aspergillus niger*, AF, *Aspergillus flavus*, BC, *Botrytis cinerea*, SM *Sclerotinia minor*.

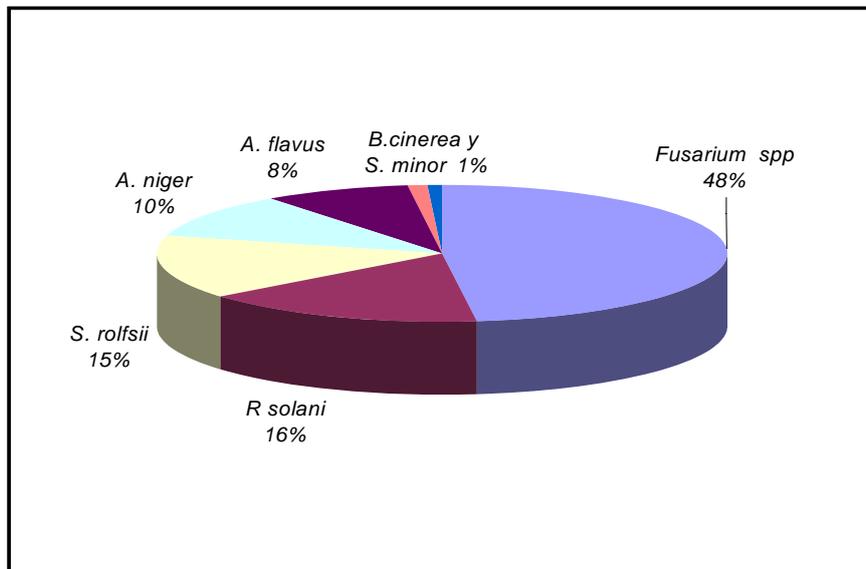


Gráfico 1: Porcentaje de presencia de patógenos totales a partir del material vegetal recolectado en predios de Malloa y San Vicente, VI región de Chile.

Literatura consultada.

- AGRIOS G. 1991. Fitopatología. Limusa México. 756 p.
- SINGLETON.L, MIHAIL,J, RUSH, C.M. 1992. Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi. APS Press, 265 p
- SMITH, I.M. DUNEZ, J; LELLIOT, R; PHILLIPS, D. ARCHER, S. 1992. Manual de Enfermedades de las Plantas. Ed. Mundi Prensa. 671p
- STREETS, B.R. 1992. Diagnóstico de enfermedades de las plantas. Editorial Hemisferio Sur.231 p.

EMBRYO AXES CULTURE AND BAP-INDUCED SOMATIC EMBRYOGENESIS IN *Arachis* SPECIES FROM SECTIONS *ERECTOIDES* AND *PROCUMBENTES*

Pacheco, G.¹, Gagliardi, R.F.¹, Carneiro, L.A.¹, Callado, C. H.³, Valls, J.F.M.², & Mansur, E.^{1*}

¹Laboratório de Micropropagação e Transformação de Plantas DBCG/ IBRAG/ UERJ, Rua São Francisco Xavier, 524- HPLC sala 505 CEP: 20550-013 Rio de Janeiro, Brazil.; ²Embrapa / Cenargen - Caixa Postal 02372 CEP: 70770-900, Brasília, DF, Brazil. 3- Departamento de Biologia Animal e Vegetal, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brazil. * E-mail: mansur@uerj.br

Introduction

Seed bank conservation of wild species of *Arachis* is limited by seed deterioration that leads to frequent germplasm losses. *In vitro* propagation methods play an important role in germplasm multiplication and plant maintenance of species from different Sections. In the cultivated groundnut (*A. hypogaea*), extensive research has been carried out on *in vitro* regeneration through embryogenesis and organogenesis (Chengalrayan *et al.*, 2001). In wild species of *Arachis*, *in vitro* regeneration has been reported by several authors mainly through organogenesis. Plant regeneration via somatic embryogenesis is comparatively less reported and has been described for *A. paraguariensis* (Sellars *et al.*, 1990) and *A. pintoii* (Rey *et al.*, 2000). In addition, there are only a few reports on somatic embryogenesis in *Arachis* involving histological examination of somatic embryos at different developmental stages (Rey *et al.*, 2000; Chengalrayan *et al.*, 2001).

Most reports on somatic embryogenesis are based on the use of auxins either alone or in combinations with cytokinins. In contrast, the use of cytokinins as the sole growth regulator is rarely adopted in protocols aiming at the development of somatic embryos. The effectiveness of this response depends on the type and concentration of the cytokinin used and the species employed.

The present investigation was directed towards multiplication of accessions of *A. archeri*, *A. porphyralix* (Section *Erectoides*) and *A. appressipila* (Section *Procumbentes*, previously also included in Section *Erectoides*) through *in vitro* culture of seed explants. Somatic embryogenesis was induced in response to BAP as the sole growth regulator and the conversion process of somatic embryos into plants was investigated.

Material and methods:

Seeds of *A. archeri* V 13494, *A. porphyralix* (V7303) and *A. appressipila* (GKP10002) were provided by EMBRAPA/CENARGEN (Brasília - DF, Brazil) after different storage periods in seed bank (10°C and 25% relative humidity). Seeds were surface sterilized with 0.2% (w/v) HgCl₂ for 45 minutes under agitation, washed three times with sterile de-ionized water and peeled. Embryonic axes and leaflets were aseptically excised and cultured on MS medium solidified with 0.7% agar plus 3% sucrose and supplemented with 8.8 or 25 µM BAP, respectively.

The pH of the media was adjusted to 5.8 prior to addition of agar. Cultures were maintained in a growth chamber at 28°C±2°C with 16h light/8h darkness and a total irradiance of 46 µM.m⁻².s⁻¹ provided by cool-white fluorescent lamps.

Embryogenic calluses were transferred to fresh basal medium at 4 week-intervals. In order to study embryo-to-plant conversion, isolated or fused somatic embryos at different developmental stages were detached from the calluses using a

stereomicroscope and then transferred to media containing two different sucrose concentrations (1.5 and 3%) and solidified with either 0.7% agar or phytigel at different concentrations (0.2%; 0.5% and 1%). After 8 weeks shoots were transferred to MS supplemented with different IAA concentrations (0; 0.57; 2.85 and 5.7 μ M) for root induction.

For histological analysis, calluses and somatic embryos samples were fixed in 2.5% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde in 0.05M sodium phosphate buffer, pH 7.2 and stored at 4 °C. Samples were dehydrated in a graded ethanol series, followed by paraffin embedding. Serial 12 μ m thick sections were made with a rotary microtome and double-stained in astra blue–basic fuchsin. Photographs were obtained with the image capture system Image-Pro Plus for Windows using an Optronics video camera attached to an Olympus BX 40 microscope.

Results and discussion

Embryo axes from the three species developed single shoots through meristematic amplification, after 30 days of culture. After approximately 15 days of culture, the hypocotyl region gave rise to friable embryogenic calluses and production of somatic embryos occurred after 30 days. Highest and fastest responses were obtained from embryo axes of *A. archeri* as compared both to *A. porphyralix* and *A. appresipila* and to previous reports on somatic embryogenesis in other wild species of *Arachis* (Sellars *et al.*, 1990; Rey *et al.*, 2000). Leaflets from the three species also developed friable calluses but the production of somatic embryos was only evident in calluses derived from explants of *A. archeri*. Although somatic embryogenesis induced by cytokinins is not a common event, it has been reported for a number of species both from embryonic tissues or differentiated explants (Lakshmanan *et al.*, 2000).

The histological analysis of embryogenic calluses with 60 days of culture revealed the presence of torpedo and cotyledonary-stages embryos, with both root and stem apical meristems. Abnormalities such as fasciation of cotyledons and occurrence as fused structures were detected in several embryos.

Table 1- *In vitro* regeneration from seeds explants from wild *Arachis* species after 60 days of culture

Species	Acession	Section	Seed age (months)	Regeneration (%)		Embryos/explant	
				Embryo axes	Leaflets	Embryo axes	Leaflets
<i>A. archeri</i>	V13494	<i>Erectoides</i>	12	43	100	260 \pm 15	243 \pm 10
<i>A. porphyralix</i>	V7303	<i>Erectoides</i>	12	100	90	54 \pm 0.2	0
<i>A. appresipila</i>	GKP10002	<i>Procumbentes</i>	6	70	100	37 \pm 0.8	0

Complete germination of somatic embryos, with the development of both roots and shoots was observed at very low frequency in the induction medium. In order to improve the conversion process, embryos at distinct developmental stages were cultured on MS medium supplemented with two different sucrose concentrations and solidified with 0.7% agar or different phytigel concentrations. After 60 days of culture, both single embryos and embryo clusters showed an incomplete conversion process, developing only shoots. Cotyledonary-stage embryos showed the highest shoot pole development rates (90%) in media supplemented with 1.5% sucrose and solidified

0.5% phytigel (Table 2). Low conversion rates were obtained from heart-shaped and torpedo-stage embryos, both as isolated structures or as part of clusters, in response to all treatments (approximately 20%) (Table 2). Considering the presence of both root and stem apical meristems in the somatic embryos, it seems likely that the incomplete conversion process was a consequence of cytokinin-supplemented media used at the induction phase.

Table2 – Shoot pole development from somatic embryos of *A. archeri* at different developmental stages, after 60 days of culture

Medium	Shoot development frequency (%)		
	Heart-shaped and torpedo- stage embryos	Cotyledonary-stage embryos	Heart-shaped and torpedo-clusters
MS0	0	11.1	0
MS + 0.2% phytigel*	0	12.5	0
MS + 0.5% phytigel*	20	40.0	10.0
MS + 1.0% phytigel*	0	30.0	0
MS + 0.2% phytigel**	0	70.0	0
MS + 0.5% phytigel**	0	90.0	22.2
MS + 1.0% phytigel**	20	47.6	0

*Media supplemented with 3% sucrose - **Media supplemented with 1.5% sucrose

In order to induce root development, the shoots were transferred to MS medium supplemented with different IAA concentrations. Rooting frequencies were significantly influenced by the growth regulator concentration and by the developmental stage of the embryo when transferred to the conversion medium. The highest root formation frequency (55,5%) was achieved in response to 2,85 μ M IAA, in shoots originated from embryos at the cotyledonary-stage (Table 3).

Table 3 – Effect of IAA on root development from shoots obtained from embryos of *A. archeri* at different developmental stages

Developmental stage	Rooting frequency (%)			
	IAA (μ M)			
	0	0.57	2.85	5.7
Isolated heart-shaped and torpedo stage	0	12.5	0	0
Isolated cotyledonary-stage	0	14.3	55.5	44.4
Heart-shaped and torpedo clusters	0	0	20	0

In conclusion, we have described *in vitro* regeneration of *A. archeri*, *A. porphyralix* and *A. appressipila* for the first time. Plants obtained from embryo axes through meristematic amplification are currently being used for germplasm multiplication through culture of nodal segments. In addition to meristematic amplification, the three species showed indirect somatic embryogenesis from embryo axes cultured on MS medium supplemented with BAP as the sole growth regulator, at concentrations that are known to induce multiple shoot formation and indirect organogenesis in species from other *Arachis* Sections (Gagliardi *et al.*, 2000). It seems likely that the embryogenic response induced by BAP is genotype dependent, as the three species studied in this work are closely related.

Supported by: CNPq e FAPERJ.

References

- REY, H.Y. *et al.* Plant Cell. Rep. 19: 856-862, 2000.
SELLARS, R.M. *et al.* Crop Sci. 30: 408-414, 1990.
GAGLIARDI, R.F. *et al.* Biodiv. Conserv. 9: 943-951, 2000.
LAKSHMANAN, P. *et al.* Plant Biol. 2:136-148, 2000.
CHENGALRAYAN, K. *et al.* Plant Sci. 161: 415-421, 2001.

EX VITRO ACCLIMATIZATION OF *Arachis retusa* Krapov., W.C. Gregory & Valls

Pacheco, G.¹; Gagliardi, R.F.¹; Cogliatti, M.B.¹; Manhães, H.B.¹; Carneiro, L.A.¹; Valls, J.F.M.² & Mansur, E.¹

¹Laboratório de Micropropagação e Transformação de Plantas DBCG/ IBRAG/ UERJ, Rua São Francisco Xavier, 524- HPLC sala 505 CEP: 20550-013 Rio de Janeiro, Brazil. E-mail: mansur@uerj.br; ²Embrapa/Cenargen - Caixa Postal 02372 CEP: 70770-900, Brasília, DF, Brazil. E-mail: valls@cenargen.embrapa.br

Introduction

In vitro preservation methods require the previous establishment of efficient micropropagation systems. These systems include the recovery of whole plants from the preserved material and the acclimatization of plants to *ex vitro* conditions, since the *in vitro* environment induces anatomical, morphological and physiological modifications. Plants in the water-saturated atmosphere of culture vessels generally become susceptible to desiccation when exposed to lower relative humidity. This results from the reduced deposition of epicuticular wax on the leaf surface and malfunctioning of stomata, which do not close normally in response to water stress (Gribaudo *et al.*, 2001). In addition, low light intensity and high sucrose concentrations in the culture medium can lead to a limited photosynthetic competence. Therefore, different approaches have been employed in order to obtain high survival rates during acclimatization to *ex vitro* conditions (Premkumar *et al.*, 2002).

Arachis germplasm rescue, maintenance, multiplication and distribution have been successfully carried out through *in vitro* preservation methodologies (Gagliardi *et al.*, 2000; 2002a,b; 2003). This work evaluates the effect of different substrates and preconditioning treatments on the viability after transplantation of *in vitro*-grown plants of *A. retusa*.

Material and methods

In vitro shoots of *A. retusa* (V 9950 and V 12939) were obtained from culture of embryonic axes and cotyledons in MS medium supplemented with 8.8 and 110 μ M BAP (6-benzilaminopurine) respectively (Gagliardi *et al.*, 2000). Stem segments (3 - 4 nodes) from both accessions were regularly transferred to MS medium without growth regulators for multiplication. Cultures were maintained at 28°C \pm 2°C and a 16:8h photoperiod at a photon flux of 46 μ mol.m⁻².s⁻¹.

For acclimatization, rooted plants from accession V 9950 were transferred to tubes containing distilled water (10mL) two weeks before transplanting. Cap enclosures of test tubes were substituted by polythene sheets and humidity was decreased by gradually perforating the sheets. Plants were then transferred to test tubes containing Hoagland's nutrient solution (Hoagland & Arnon, 1938) with half salt concentration and definitely transplanted to substrate. Two types of substrate (Plantmax® and sand) were evaluated, alone or in association to two types of fertilizers (Bokashi® and Hoagland's nutrient solution). The pH of substrates was measured before and 30 days after transplanting. Cultured plants were evaluated for their survival, height and number of nodes and leaves at transplanting (day 0) and

after 15 and 30 days *ex vitro*. After substrate determination, the influence of *in vitro* treatments with different sucrose concentrations on the subsequent acclimatization process was investigated by transferring shoots from both accessions to MS medium supplemented with different sucrose concentrations (0%, 1.5%, 3% and 6%) three weeks before transplanting.

Results and discussion

In vitro-grown plants from accession V 9950 transplanted to sand without fertilizers showed the highest survival rates, associated to the highest heights and numbers of nodes and leaves after 30 days following transplantation. Plants transplanted to Plantmax® with or without fertilizers showed lower survival rates. The addition of Bokashi® to both substrates caused a reduction of survival (Table 1). The pHs of the tested substrates ranged around 5.0 at transplanting, with a small increase after 30 days, with the exception of sand fertilized with Bokashi®, which showed an increase from 5.3 to 8.4. These results can be correlated with the natural habitat of *A. retusa*, which is found at semi-arid regions, in sandy and dry soils (Krapovickas & Gregory, 1994).

Table 1- Influence of substrates and fertilizers on the acclimatization process of *in vitro*-grown plants of *A. retusa* V 9950 after 30 days *ex vitro*

Substrates	Survival (%)	Height (cm)	Number of nodes	Number of leaves
Sand without fertilizers	100	14.0 ± 0.7	6.4 ± 0.2	6.7 ± 0.2
Sand + Hoagland	90	13.3 ± 1.0	6.0 ± 0.4	5.4 ± 0.6
Sand + Bokashi®	0	-----	-----	-----
Plantamax without fertilizers	80	11.2 ± 1.5	4.8 ± 0.6	2.0 ± 0.6
Plantamax + Hoagland	20	10.2 ± 1.9	5.2 ± 0.7	2.2 ± 0.7
Plantamax + Bokashi®	0	-----	-----	-----

An efficient *ex vitro* establishment can be related both to suitable substrates and to *in vitro* preconditioning during the last micropropagation phase. Among these treatments, modifications in sucrose concentrations have been proven to be beneficial for some plants (Premkumar *et al.*, 2002). In this work, plants of *A. retusa* from both accessions (V 9950 and V 12939) obtained in MS medium supplemented with 1.5 and 3% sucrose showed the highest survival rates. Plants from both accessions displayed lowest survival rates when cultured on MS medium supplemented with 0% sucrose (Table 2). During *ex vitro* adaptation, growth features such as height, number of nodes and number of leaves from plants obtained with different sucrose concentrations showed slight variations between the genotypes.

Acclimatized plants of *A. retusa* V 12939 were evaluated for an additional period of five months. Although all the acclimatized plants remained alive, the production of new shoots occurred at a frequency of 50%, after 90 days *ex vitro*. Growth and leaf production were clearly influenced by the growing environment fluctuations, as height increase and new leaf formation were only observed after dry periods and temperatures between 30 and 38°C. Flower and peg development were also observed following these conditions.

From these results it can be concluded that efficient acclimatization of *in vitro* plants of *A. retusa* can be achieved by submitting *in vitro* plants to a preconditioning phase in MS medium supplemented with sucrose 1.5% and using sand without fertilizers as substrate. This procedure might be adopted for *in vitro* preserved germplasm of other species occurring at similar habitats.

Table 2- Influence of *in vitro* preconditioning with different sucrose concentrations on acclimatization process of *A. retusa* (V 9950 and V12939)

Culture medium	Survival (%)		Height (cm)		Number of nodes		Number of leaves	
	V9950	V12939	V9950	V12939	V9950	V12939	V9950	V12939
MS+Sucrose 0%	0	70	----	5.8±0.6	----	3.1±0.6	----	5.1±0.5
MS+Sucrose 1.5%	80	100	6.7±1.2	10.7±0.8	5.5±0.5	5.9±0.6	6.5±1.5	7.6±0.7
MS+Sucrose 3%	70	100	8.1±0.3	11.1±1.5	4.9±0.1	5.8±0.5	5.1±0.4	4±0.6
MS+Sucrose 6%	30	80	7.3±0.3	6.6±0.5	3.5±0.5	3.9±0.8	4.5±0.5	4.0±1.3

Acclimatized plants of *A. retusa* V 12939 were evaluated for an additional period of five months. Although all the acclimatized plants remained alive, the production of new shoots occurred at a frequency of 50%, after 90 days *ex vitro*. Growth and leaf production were clearly influenced by the growing environment fluctuations, as height increase and new leaf formation were only observed after dry periods and temperatures between 30 and 38°C. Flower and peg development were also observed following these conditions.

From these results it can be concluded that efficient acclimatization of *in vitro* plants of *A. retusa* can be achieved by submitting *in vitro* plants to a preconditioning phase in MS medium supplemented with sucrose 1.5% and using sand without fertilizers as substrate. This procedure might be adopted for *in vitro* preserved germplasm of other species occurring at similar habitats.

Supported by: FAPERJ and CNPq.

References

- GAGLIARDI, R.F., *et al.* Biodiv. Conserv., 9: 943-951, 2000.
 GAGLIARDI, R.F., *et al.* Biol. Plant., 45: 353-357, 2002a.
 GAGLIARDI, R.F., *et al.* CryoLett., 23: 61-68, 2002b.
 GAGLIARDI, R.F., *et al.* CryoLett., 24: 103-110, 2003.
 GRIBAUDO, I., *et al.*, Vitis, 40 (3): 137-140, 2001.
 HOAGLAND, D.R. & ARNON, D.I. The water culture method for growing plants without soil. California, 1938.
 KRAPOVICKAS, A. & GREGORY, W.C. Bomplandia., 8: 1-186, 1994.
 PREMKUMAR, A., *et al.* Trees, 16: 569-575, 2002.

MANEJO DE ALMACENAMIENTO POS COSECHA EN COCHABAMBA SOBRE LA GERMINACIÓN DE SEMILLA DEL MANÍ FORRAJERO

Sauma, G.¹; Escobar, A.; Meneses, R.

¹ Empresa de Semillas Forrajeras “La Violeta” SEFO-CIFUMSS; sefosam@supernet.com.bo
www.supernet.com.bo/sefo

Área temática: Información

Introducción

El maní forrajero (*Arachis pintoii*) se constituye en una opción adecuada para mejorar la calidad de las pasturas tropicales. Su excelente calidad proteica (13 a 18 % de proteína cruda) colocan a esta especie en un lugar promisorio para ser usada no solo como pastura sino también como cobertura viva. Se asocia con gramíneas forrajeras tales como las Braquiarias. Esta especie se multiplica vía vegetativa por estolones o por semilla.

En Bolivia esta última forma es la más adquirida, a la vez de práctica. La zona de Yapacaní en Santa Cruz es la mayor productora de semilla del *A. pintoii*, semilla que abastece la demanda nacional, pero principalmente sale para exportación hacia mercados de Colombia, Brasil, Perú y Costa Rica, mediante SEFO (Sauma, 1996). La semilla de esta especie presenta dormancia la cual, bajo condiciones de almacenamiento de Cochabamba, se rompe a los 5 meses de cosechada (Sauma, 1996).

Sin embargo varios son los aspectos que modifican este parámetro y también el tiempo de viabilidad de la semilla. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la influencia de las características del manejo de la pos cosecha, en términos de almacenamiento sobre factores relacionados a la germinación de la semilla del maní forrajero.

Materiales y métodos

La evaluación de la calidad de la semilla de *A. pintoii* se realizó en el laboratorio de SEFO, ubicado en “La Violeta”, en Tiquipaya, provincia Quillacollo de Cochabamba, lugar donde se almacena la semilla cosechada en Yapacaní (Santa Cruz). “La Violeta” se halla a 2680 msnm y con una temperatura media anual de 17 °C, de clima seco, predominantemente templado, la época lluviosa se concentra durante los meses de diciembre a marzo, con un promedio de 504 mm de precipitación anual. Tales aspectos hacen de este sitio un lugar bastante adecuado para almacenar semillas.

Por otra parte, el principal lugar de producción de semilla de esta especie es Yapacaní. El cuadro 1 presenta información sobre este sitio.

Se evaluó la germinación de la semilla a diversos meses pos cosecha para determinar en que momento se mantenía viable la semilla. Estas mediciones se las hicieron a partir de tres lotes diferentes de producción (todos provenientes de los productores de SEFO-SAM), cosechados durante los años 1990, 1991 y 1992.

Resultados y discusión

Se tienen los resultados en base a los tres lotes de producción con sus respectivos años de cosecha y tiempos (meses) de evaluación de germinación de semilla pos cosecha (Cuadro 2), los cuales no siempre son los mismos para los lotes. Las condiciones ambientales para el almacenamiento de semilla son determinantes para mantener la viabilidad de las mismas, es así que en ensayos realizados en lugares de condiciones húmedas, la semilla pierde su viabilidad a los 10 meses (Kerridge, 1995), todo lo contrario ocurrió bajo condiciones de este trabajo por cuanto se evidencia que después de 4 años se mantiene un alto valor de germinación.

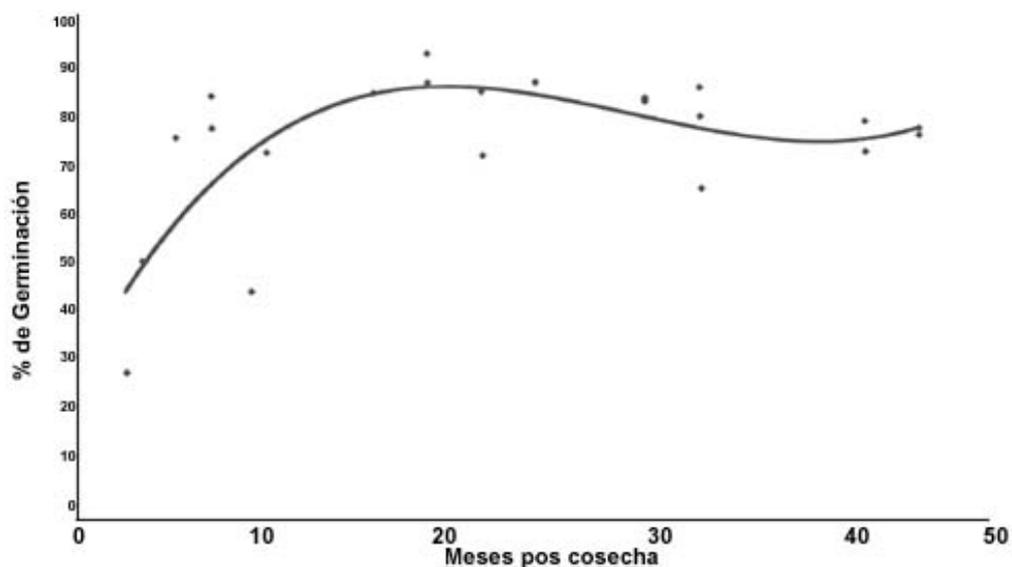
Se debe considerar también otros factores que inciden sobre la viabilidad de la semilla, tales como manejo de la cosecha, edad del cultivo, humedad de la semilla a la cosecha, etc. Sin duda otros factores incidirán sobre el tiempo de dormancia y la duración de la germinación en semilla almacenada.

Cuadro 2. Germinación (%) evaluada a diferentes meses pos cosecha para tres lotes de producción de semilla de *A. pintoii*.

Meses pos cosecha	N° de lote		
	1	2	3
2	-	-	27.0
3	-	-	50.0
5	-	-	75.5
7	-	77.3	84.0
9	63.3	-	-
10	-	-	72.0
16	84.0	-	-
19	86.0	92.0	-
22	70.7	84.0	-
25	85.7	-	-
31	82.0	-	81.3
34	63.0	84.0	78.0
43	70.0	76.3	-
46	74.6	73.2	-

Tomando todos los datos del cuadro anterior se puede establecer una gráfica de tendencias de la germinación de la semilla.

Gráfica 1. Tendencias de la germinación de semilla de *A. pinto* almacenada en Cochabamba.



Conclusiones

Las condiciones de almacenamiento en Cochabamba para la semilla de *A. pinto* son adecuadas, evitando la pérdida de viabilidad de la misma en el largo plazo (3 años pos cosecha), con valores germinativos adecuados para la venta de semilla comercial.

Entre el séptimo a octavo mes pos cosecha, la dormancia de la semilla se pierde y esta en condiciones para la venta.

Deben estudiarse otros factores inherentes a la producción y cosecha de semilla de *A. pinto* que ejercen un efecto acumulativo sobre la calidad de la semilla a producirse.

Referencias

KERRIDGE, P. (ed.). 1995. Biología y agronomía de especies forrajeras de *Arachis*. CIAT. Cali, Colombia. 227 p.

SAUMA, G. 1996. Maní forrajero (*Arachis pinto* Krap.& Greg., nom. nud.). pp. 135-147. En: MENESES, R. WAAIJENBERG, H. y PIEROLA, L. (eds.). Las leguminosas en la agricultura boliviana. Revisión de información. Proyecto Rhizobiología. Cochabamba, Bolivia. 434 p.

Efecto de la edad del campo de multiplicación en el rendimiento y calidad de semillas en *Arachis pinto* en Yapacaní, Bolivia

Sauma, G¹; Escobar, A.; Meneses, R.

¹ Empresa de Semillas Forrajeras "La Violeta" SEFO-CIFUMSS; sefosam@supernet.com.bo
www.supernet.com.bo/sefo

Introducción

Yapacaní está localizada en una zona de bosque tropical húmedo de la provincia Ichilo, a 130 km de la ciudad de Santa Cruz, desde hace 30 años están asentados unos 400 colonos provenientes de la zona minera (Potosí, Oruro). Las familias disponían en promedio de 20 ha de terreno y estaban orientadas inicialmente a la producción de arroz y maíz.

Posteriormente, estas actividades se complementaron con la explotación del ganado bovino. La Empresa de Semillas Forrajeras (SEFO-SAM) a partir de 1990, produce en esta zona semilla del maní forrajero (*Arachis pinto*) para cubrir la demanda del mercado nacional y destinar excedentes para la exportación de esta semilla, a países del área tropical del continente. Al momento, se estima un área de 20 ha que se debieran sembrar en función a las ventas de semilla por parte de SEFO. La figura 1 presenta datos sobre esta especie en cuanto a aspectos productivos.

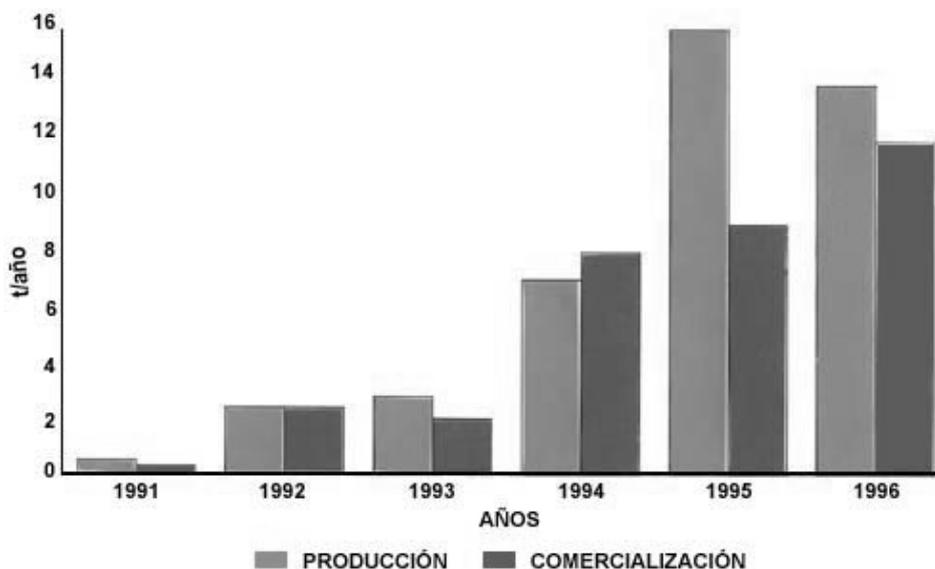


Figura 1. Producción y comercialización de semilla *A. pinto*, (tn/año) producida por SEFO en Yapacaní.

Los rendimientos en semilla son atractivos para el agricultor y la cosecha manual da empleo a toda la familia. Por otra parte es una actividad que se complementa con su trabajo pues por concentrarse en la época de invierno seco, no interfiere con otras labores.

El objetivo del presente trabajo descriptivo fue determinar el efecto de la edad del campo de producción de semilla del maní forrajero, sobre el rendimiento en semilla, pero principalmente sobre aspectos de calidad de la misma, en base a lotes de productores que trabajan en la zona de Yapacaní, Bolivia.

Materiales y métodos

En base a muestreos de nueve campos de producción de semilla de *A. pinto* (todos ubicados en Yapacaní), manejados por los agricultores propietarios, se determinó el rendimiento y calidad de la semilla obtenida. Estos campos se dividieron en grupos de a tres donde la característica común era la edad del lote en referencia al momento de la cosecha de la semilla de la leguminosa. El cuadro 1 presenta esa información.

Cuadro 1. Edad a cosecha de nueve lotes de producción de semilla de *A. pinto* en Yapacaní. Agrupación por edad.

Nombre productor	Meses a cosecha de semilla, pos siembra	Agrupación por edad
Nicolás Medina	12	GRUPO 1 (AL AÑO)
Juan Romero	12	
Mario Olmedo	12	
Félix Albarracín	21	GRUPO 2 (A DOS AÑOS)
Félix Huarachi	23	
Pedro Huarachi	23	
Ciprian Puña	24	GRUPO 3 (PRODUCCION A PARTIR DEL REBROTE)
Santiago Caba	25	
Andrés Heredia	24	

El grupo 1 implica a aquellos productores que obtuvieron la semilla a la primera cosecha, al año de implantado el cultivo. Los del grupo 2 son aquellos que dejan la semilla sin cosechar hasta los dos años provocando una especie de “conservación” de la misma en el suelo. Los del grupo 3 son aquellos que habiendo cosechado la semilla un año obtienen otra cosecha con el rebrote de aquella semilla remanente en el suelo, un año después; vale señalar que los rendimientos y calidad se refieren solo a la semilla proveniente del rebrote.

Resultados

El cuadro 2 presenta los datos de calidad y rendimiento de la semilla. Los rendimientos si bien difieren, a su vez se compensan cuando se ve la calidad de la semilla a ser cosechada, tal es el caso entre los grupos 2 con el 3. Al ser un trabajo tan solo descriptivo no se puede hacer demasiadas inferencias sobre el rendimiento y peso de la semilla. Sin embargo las tendencias mostradas dan una pauta de lo que estaría ocurriendo con el manejo que los agricultores dan a sus lotes de producción.

Cuadro 2. Peso de mil semillas, pureza, germinación y rendimiento de semilla de *A. pinto* para nueve productores de Yapacaní.

Productor	Grupo	Peso de 1000 semillas (g)	Semilla pura (%)	Germinación (%)	Rendimiento (kg/ha)
N. Medina	1	174.08	99.91	95.11	3850
J. Romero		149.52	98.40	78.44	4470
M. Olmedo		160.54	99.56	95.88	2850
Promedio		161.38	99.29	89.81	3723
F. Albarracín	2	139.82	97.55	74.55	3540
F. Huarachi		133.80	98.05	60.89	3020
P. Huarachi		107.40	94.92	79.33	2950
Promedio		126.89	96.84	71.59	3170
C. Puña	3	170.52	98.00	82.55	1990
S. Caba		125.76	95.30	80.00	2530
A. Heredia		157.84	99.05	89.33	3095
Promedio		151.37	97.45	83.96	2538

Considerando datos promedios de los grupos definidos en el cuadro 1 por edades pos siembra, se presenta la figura 2 don de se muestra la germinación, la proporción de semillas duras, y semillas anormales + muertas en función de la edad del campo.

Conclusiones

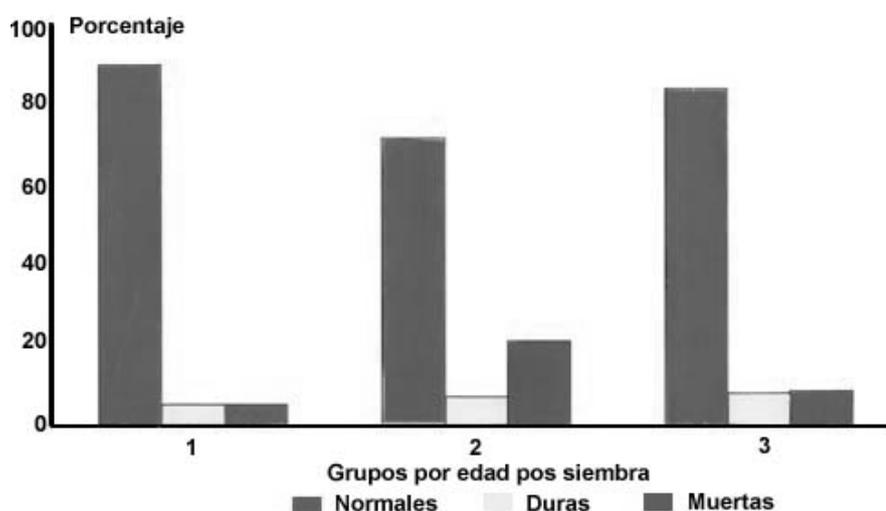


Figura 2. Promedio de germinación de semilla de *A. pinto* por grupos de edad a la pos siembra en Yapacaní.

- Después de 24 meses pos siembra, la semilla no cosechada se deteriora y la calidad de la siembra baja.

- La cosecha del campo de producción de semilla debe ser efectuada en su totalidad a los doce meses pos siembra.

Producción y rendimientos de semilla de *Arachis pinto* con pequeños agricultores en Yapacaní, Bolivia, 1989-1992.

Año	Agricultores productores de semilla (N°)		Edad del cultivo (meses)	Producción total de semilla (kg)	Rendimiento de semilla(kg/ha)	
	Total	cosechada			Rango	Media
1989	2	0	--	0	--	--
1990	17	2	12	234	200-800	500
1991	15	4	18	550	1000-3000	2000
1992	15	9	16-30	2750	1000-4000	2200

Referencias

KERRIDGE, P. (ed.). 1995. Biología y agronomía de especies forrajeras de *Arachis*. CIAT. Cali, Colombia. 227 p.

MARTÍNEZ, L. y SAUMA, G. 1996. Maní forrajero (*Arachis pinto* Krap.& Greg., nom. nud.). pp. 337-386. En: MENESES, R. WAAIJENBERG, H. y PIEROLA, L. (eds.). Las leguminosas en la agricultura boliviana. Revisión de información. Proyecto Rhizobiología. Cochabamba, Bolivia. 434 p.

ISOLAMENTO DE ANÁLOGOS A GENES DE RESISTÊNCIA DE UMA BIBLIOTECA GENÔMICA DE *Arachis stenosperma* PARA MAPEAMENTO FÍSICO

Proite, K, Leal-Bertioli, S.C.M.¹, Bertioli, D.², Fonseca, F.C.A, Guimarães, P.M.¹

¹ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. PqEB - Parque Estação Biológica W5 Norte Final, Brasília, DF. CEP 70.770-900. ² Universidade Católica de Brasília. Pós Graduação Campús II, SGAN 916, Brasília - DF. CEP 70.790-160. email: proite@cenargen.embrapa.br

Um dos principais objetivos do melhoramento genético é a incorporação de genes de resistência a doenças e pragas em cultivares de interesse. Neste projeto, as espécies silvestres de amendoim serão usadas como fonte natural de genes de resistência. A análise de seqüências de genes de resistência já clonados, revelou vários domínios conservados. Tem-se usado tal conservação para amplificar seqüências de diferentes genomas análogas a genes de resistência (RGAs) e em várias espécies, os genes de resistência têm sido descritos em famílias gênicas e ocorrem em grupos nos cromossomos. Desta forma, o isolamento de um RGA poderá permitir a identificação de *loci* de resistências a doenças. Estes RGAs podem então ser usados como marcadores genéticos ligados aos genes de resistência. As proteínas codificadas pela maioria dos genes de resistência, caracterizados, possuem motivos encontrados em outras proteínas receptoras e de transdução de sinal. O maior grupo de genes de resistência contém seqüências e motivos estruturais similares, seja a resistência a vírus, fungos ou bactérias. Grande parte possui repetições ricas em leucina no C-terminal, que codificam proteínas que geralmente estão associadas às interações proteína-proteína ou ligações ao ligante. Motivos de ligação a nucleotídeo também são conservados (NBS – *nucleotide binding site*). Sendo assim é proposto que similaridades entre os genes de resistência possam tornar possível a identificação de novos genes de resistência baseados nesta homologia destas seqüências (Kanazin *et al.*, 1996). A conservação de seqüência de aminoácidos observada dentro dos genes de resistência clonados são, assim, usadas para facilitar o isolamento de novos genes de resistência, os RGAs, regiões análogas de resistência. Estes RGAs são geneticamente ligados a *loci* de genes de resistência (Shen *et al.*, 1998).

Previamente, foram isoladas 79 regiões análogas a genes de resistência de quatro espécies silvestres de *Arachis* amplificadas através da técnica de PCR com *primers* degenerados (Bertioli *et al.*, 2003). Estes RGAs têm um tamanho de cerca de 500pb. O sequenciamento mostrou analogias com genes de resistência funcionais.

OBJETIVO:

O presente trabalho objetivou a construção de uma biblioteca genômica de uma espécie silvestre de *Arachis*, *A. stenosperma*, acesso V10309 para a obtenção de clones longos (cerca de 10kb) contendo RGAs para a utilização como sondas para mapeamento físico e genético. Este acesso apresentou em diversos bioensaios resistência aos fungos foliares, *Cercospora arachidicola*, *Cercosporidium personatum* e *Phoma arachidicola* e aos nematóides das galhas, *Meloidogyne*

javanica raça 4, *M. hapla*, *M. arenaria* raças 1 e 2 (Proite *et al.*, 2002, Leal-Bertioli *et al.*, 2003).

MATERIAIS E MÉTODOS

O DNA genômico de *A. stenosperma* (V10309) foi extraído pelo método CTAB e parcialmente digerido com a enzima de restrição *Sau3A*I. Os fragmentos foram clonados no bacteriófago λ através do Lambda Dash II kit. A biblioteca foi titulada utilizando a célula XL1-Blue MRA P2 (Stratagene). Em um primeiro *screening* parcial da biblioteca (200 000 clones), utilizou-se como sonda dois conjuntos, cada um com cinco seqüências de RGAs, isoladas de diferentes espécies de *Arachis*: identificados: Conjunto **A** (S5_A_384; S1S2_A_152; S5_A_375; S5C8_AXY_370 e S1_A_36). Conjunto **B** (S1_A_37; S4_A_164; C8_V_434; S5_V_378 e T_A_44).

RESULTADOS E CONCLUSÕES

O título da biblioteca genômica construída foi de $8,7 \times 10^4$ pfu. Através das hibridizações foram identificados e isolados 18 clones que hibridizaram com o conjunto de sondas **A** e 33 clones com o conjunto **B**. Foram isolados 69 clones positivos, que foram submetidos a um segundo *screening* para identificação da sonda específica. Destes, 26 se confirmaram como distintos clones de RGAs (Fig. 1).

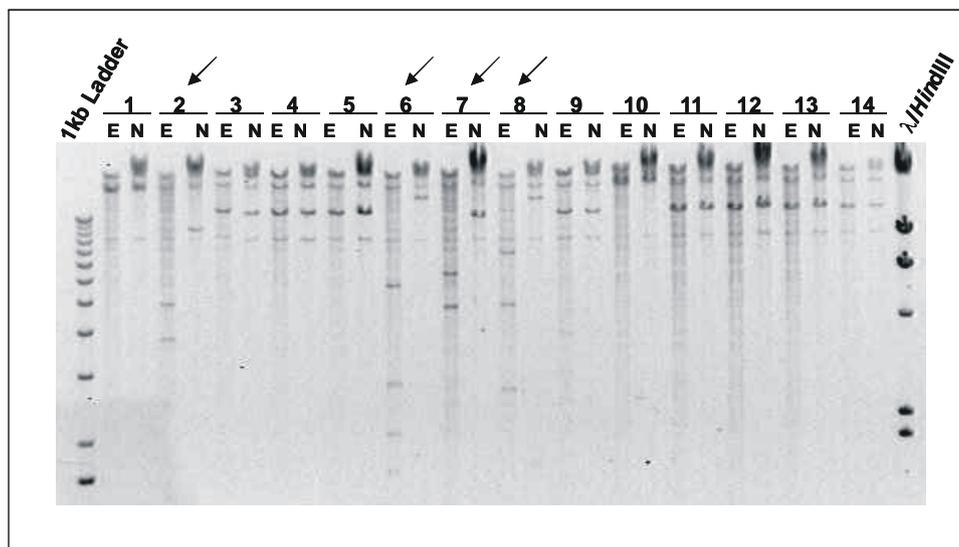


Figura 1. Gel de agarose mostrando diferentes clones digeridos com as enzimas *Eco*RI e *Not*I. Desta forma através do padrão de bandas pode-se observar os diferentes clones, tais como clones 2, 6, 7 e 8.

Os mesmos tiveram suas extremidades sequenciadas e confirmaram-se como sendo RGAs. Esta estratégia mostrou-se eficiente em isolar clones grandes contendo RGAs. Isto fornecerá sondas em experimentos de FISH (Fluorescence In Situ Hybridization). As sondas serão utilizadas para o mapeamento físico, assim como marcadores moleculares para o mapa genético que está em construção. O mapa físico identificará a posição dos RGAs nos cromossomos das espécies e o mapa genético identificará a posição dos marcadores RGA em grupos de ligação e sua possível ligação com as resistências já caracterizadas. Isto propiciará a união do

primeiro mapa físico com o primeiro mapa genético de espécies silvestres de *Arachis*.

APOIO FINANCEIRO

União Europeia (INCO-DEV), PRODETAB, EMBRAPA e UCB.

BIBLIOGRAFIA CITADA

BERTIOLI, DJ, LEAL-BERTIOLI, SCM, LION, MB, SANTOS, VL, PAPPAS Jr. G, CANNON, SB & GUIMARÃES, PM (2003). A large scale analysis of resistance gene homologues in *Arachis*. *Molecular Genetics and Genomics* 270, 34-45.

KANAZIN, V.; MAREK, L. e SHOEMAKER, R.C. (1996). Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. *PNAS (USA)* 93:11746-11750.

LEAL-BERTIOLI, S.C.M.; GUIMARÃES, P.M.; FÁVERO, A.P.; MORETZSOHN, M.C.; Proite, K. e BERTIOLI, D.J. (2003). Espécies silvestres de amendoim: uma fonte alternativa de genes de resistência. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento (Brazil)*. (dezembro).

PROITE, K.; DIAS, J.G.O.; GUIMARÃES, P.M.; BERTIOLI, D.J.; CARNEIRO, R.G.; J.F.M. VALLS e LEAL-BERTIOLI, S.C.M. (2002). Avaliação de resistência a fitonematóides e a fungos em diversas espécies de *Arachis* silvestres (Analysis of resistances of plant parasitic nematodes to several species of wild *Arachis*). VII Talento Estudantil. Anais.

SHEN, K.A.; MEYERS, B.C.; ISLAM-FARIDI, M.N. CHIN, D.B.; STELLY, D.M. e MICHELMORE, R.W. (1998). Resistance gene candidates identified by PCR with degenerate oligonucleotide primers map to clusters of resistance genes in lettuce. *MPMI* 11:815-823

MICROSSATÉLITES ISOLADOS A PARTIR DE BIBLIOTECA GENÔMICA ENRIQUECIDA (TC/AG) DE *Arachis hypogaea*.

Leoi, L¹; Bertoli, D.¹

Universidade Católica de Brasília, Brasil. llei@pos.ucb.br

Por volta de 10 mil anos atrás, após a mudança do homem nômade-caçador para a sociedade agrária, surgiram as primeiras atividades agrícolas, dando início às plantas cultivadas. A seleção contínua, geração após geração, de linhagens que continham características diferenciadas por tais agricultores resultaram em uma progressiva restrição da base genética na subsequente população.

Entre as plantas cultivadas com restrição na base genética, encontra-se o amendoim da espécie *Arachis hypogaea* L. (Leguminosae). Esta espécie é caracterizada por ser uma alelotetraplóide, provavelmente oriunda por domesticação da espécie também tetraplóide *A. monticola* e esta por sua vez do cruzamento entre duas espécies silvestres do gênero *Arachis*. Devido ao estreitamento genético, têm-se aumentado as preocupações por parte dos pesquisadores em relação às pragas em geral. Em escala global, as pragas podem causar perdas superiores a 70% da colheita no cultivado. O maior interesse pela prospecção, resgate e caracterização de germoplasma das espécies do gênero *Arachis* reside em seu potencial de fornecimento de genes úteis para o melhoramento do amendoim cultivado. O cultivo desta espécie está difundido nas áreas tropicais e subtropicais. Entre os seis maiores produtores mundiais está o Brasil, sendo os estados de São Paulo, Rio Grande do Sul e Paraná os principais produtores brasileiros. Uma das formas de aumentar a competitividade do produto brasileiro no mercado internacional e ao mesmo tempo incrementar o consumo interno desta oleaginosa é através do melhoramento genético, principalmente em genes de resistência contra pragas; qualidade da semente; plantas com ciclo extremamente curto e alta resistência ao estresse hídrico. O desenvolvimento de tecnologias de análise genômica na cultura do amendoim ainda é incipiente, porém já existem publicações de vários grupos de pesquisa envolvendo marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) e SSR (*Simple Sequence Repeats* ou microssatélites) na caracterização do germoplasma de *Arachis*.

Marcadores microssatélites são ideais para aplicações no melhoramento de plantas por sua natureza co-dominante, alto polimorfismo, riqueza em alelos, alta heterozigosidade e conteúdo informativo. Os microssatélites foram obtidos através de metodologias de enriquecimento de bibliotecas genômicas para seqüências repetitivas contendo dinucleotídeos AG/TC, não ocorrendo uma pré-seleção por hibridização ou PCR-ancorado (*Polymerase Chain Reaction*). Foram seqüenciados 598 clones a partir de uma única biblioteca genômica enriquecida. Estes clones foram processados com o auxílio de um *script Perl (Sort chromat for microsats)*, tendo como resultado a identificação total de 144 seqüências com microssatélites denominadas de *contigs (hits)*. Após análise de redundância o número de *contings* reduziu para 138 e destes, apenas 80 (58%) tinham condições de desenhar marcadores por apresentarem tamanho suficiente de repetição e suas posições na seqüência serem adequadas para os desenhos dos pares de primers flanqueadores. Dos 80 contigs supracitados, 56,25% (45 contigs) continham seqüências simples ou

compostas com 12 ou mais repetições e tamanho médio de 26 *motifs*. A distribuição do tamanho das repetições versus os números de contigs de um total de 45 são mostradas na figura 01. Todos os cromatogramas que continham as seqüências repetidas foram previamente analisados e visualizados com o auxílio do programa interativo Staden, cuja função foi a de organizar e verificar as sobreposições das amostras, além de realizar a inspeção e edição manual das seqüências. Os pares de primers flanqueadores das regiões repetidas foram desenhados com o auxílio do programa Primer3 e os parâmetros específicos adotados (Tabela 01).

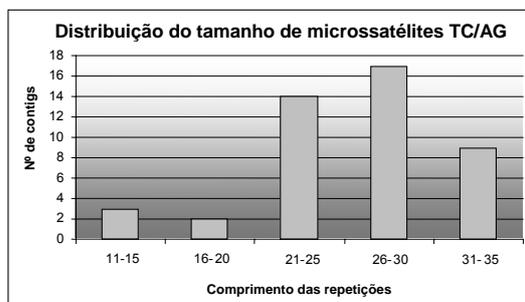


Figura 01. Distribuição dos loci de microssatélites desenvolvidos por método de captura por hibridização. Os loci foram agrupados pelos comprimentos de repetições. A média do comprimento das repetições foi de 26 *motifs*.

Tabela 01. Parâmetros específicos selecionados para os desenhos dos primers SSR no programa Primer 3.

Classes	Parâmetros		
	Mínimo	Ótimo	Máximo
Tamanho do Primer	17mer	20mer	25mer
Temperatura de Ligação	57°C	60°C	63°
Quantidade de GC no Primer	30%		70%
Tamanho do Produto	100 pb		300 pb

Todas as seqüências obtidas através do seqüenciamento foram analisadas posteriormente através do programa Blast-X para se verificar homologia com seqüências depositadas no banco de proteínas de *Arabidopsis thaliana*. Entre as 576 seqüências analisadas, 42 apresentaram homologia com algum gene, sendo destas, 13 oriundas de seqüências com regiões ricas em microssatélites (Figura 02). Entre as seqüências sem SSR foram encontradas homologias freqüentes com retrotransposons, sugerindo abundância destes elementos no genoma de *A. hypogaea* (Tabela 02 e 03).

Dos 80 pares de primers desenhados, 77 amplificaram os fragmentos com o tamanho esperado em *A. hypogaea*. Em adição, 80% dos primers otimizados apresentaram polimorfismos quando comparados com outras espécies do gênero

Arachis, entre elas, *A. cardenasi*, *A. duranensis*, *A. sternosperma*, *A. batizocoi*, *A. honey*, *A. ipaensis*, *A. magna*.

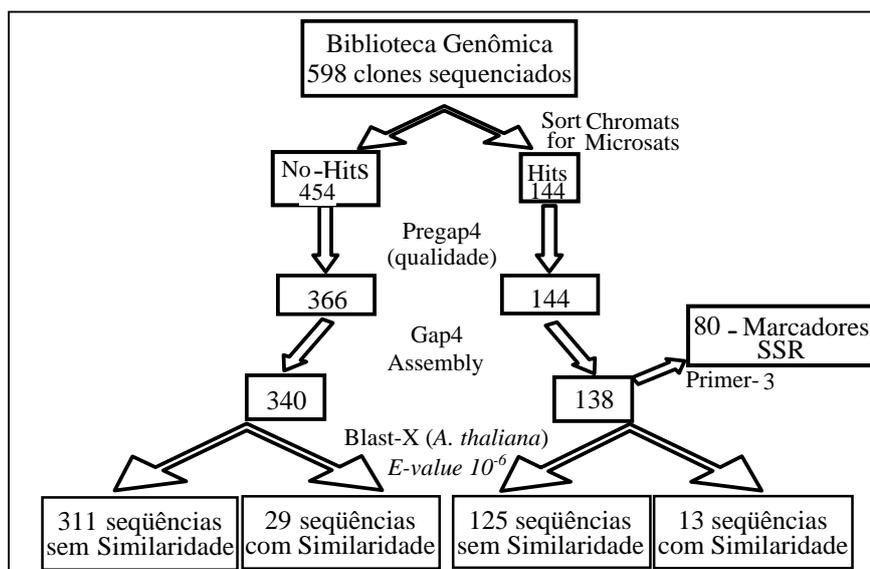


Figura 02. Fluxograma das etapas de análise computacional das seqüências de *A. hypogaea*.

Tabela 02. Resultado do Blast-X das seqüências presentes na Pasta NO-HITS para busca de similaridade contra um banco de dados local de gene de *Arabidopsis thaliana*.

Homologias das seqüências de <i>A. hypogaea</i> <u>sem</u> SSR	Frequência encontrada (E) < 10 ⁻⁶
<i>Retroelement</i>	20
<i>hypothetical protein</i>	4
<i>topoisomerase II</i>	1
<i>disease resistance protein, putative</i>	1
<i>Serine/threonine phosphatase PP7, putative</i>	1
<i>phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase isolog</i>	1
<i>putative auxin-induced protein</i>	1
Homologias de genes encontrados	29
Homologias das seqüências de <i>A. hypogaea</i> <u>com</u> SSR	Frequência encontrada (E) < 10 ⁻⁶
<i>putative protein</i>	6
<i>retroelement</i>	2
<i>alpha subunit of F-actin capping protein</i>	1
<i>ATP dependent copper transporter</i>	1
<i>auxin-independent growth promoter, putative</i>	1
<i>serine/threonine kinase, putative</i>	1
<i>Tic22, putative</i>	1
Homologias de genes encontrados	13

Apoio Financeiro: Universidade Católica de Brasília (UCB), Funarbe e Protetab.

ANÁLISE DAS RELAÇÕES DE CRUZABILIDADE EM UM RARO HÍBRIDO INTERSECCIONAL FÉRTIL DO GÊNERO *Arachis*

Rodrigues, L.S.¹ ; Valls, J.F.M²

¹Eng.Agr., doutoranda, UNESP-Botucatu/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Bolsista CAPES. leca@cenargen.embrapa.br, ²Eng.Agr., PhD, Pesquisador Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Bolsista CNPq. valls@cenargen.embrapa.br

Introdução

O gênero *Arachis* tem nove secções taxonômicas (Krapovickas, 1994). A compatibilidade em cruzamentos e a viabilidade do pólen de híbridos interseccionais orientam a distribuição das espécies pelas secções. Conforme a literatura, híbridos interseccionais são estéreis. As espécies da secção *Erectoides* despontam pela resistência a pragas (Subrahmanyam, 1985; Stalker, 1983), pela alta capacidade regenerativa de *A. paraguariensis* (Still, 1987), que contrasta com a baixa capacidade regenerativa de *A. hypogaea* (Mansur, 1995) e por sua cruzabilidade interseccional. Desde 1997 vem sendo realizado um programa de hibridações interespecíficas, na Embrapa Recursos Genéticos, incluindo a hibridação entre *A. paraguariensis* (acesso V 7677), da secção *Erectoides*, e *A. pflugeae*, nova espécie (V 13589), da secção *Procumbentes*. A eficiência neste cruzamento foi de 34,21% (Teixeira, 1999). A viabilidade de pólen dos híbridos variou de 10 a 68% e foram produzindo sementes F₂, documentando a primeira hibridação interseccional fértil no gênero. Na seqüência desses estudos, pretende-se (1) analisar as características morfológicas e citogenéticas dos híbridos F₂, incluindo indivíduos derivados de novas colheitas das plantas F₁, que são perenes e permanecem disponíveis em ambiente controlado. Além disto, pretende-se (2) verificar o comportamento de híbridos entre o acesso de *A. paraguariensis* utilizado (V 7677) e outros dois acessos, representando as subespécies *paraguariensis* e *capibarensis*, (3) de *A. pflugeae* com os mesmos representantes dessas duas subespécies e (4) do acesso de *A. paraguariensis* V 7677 com espécies da secção *Arachis* eventualmente vinculadas à origem do amendoim. Por fim, pretende-se estudar as relações de cruzabilidade de *A. paraguariensis* (V 7677) e de *A. pflugeae* (V 13589) com *A. vallsii*, espécie cuja localização original na secção *Procumbentes* vem sendo contestada por recentes resultados de análises citológicas e exomorfológicas (Lavia, 1999). Em suma, trata-se de investigar a possibilidade de estabelecimento de uma cadeia de espécies-ponte, que permitam, na seqüência de cruzamentos, a transferência de caracteres presentes em representantes das secções mais primitivas e distantes à secção *Arachis* e ao amendoim, ampliando as oportunidades de melhoramento por via sexual.

Material e Métodos

Para atender aos objetivos deste trabalho foram montados 2 experimentos e em outubro de 2004 será montado um terceiro. No experimento 1, analisou-se alguns caracteres morfológicos dos progenitores (Tabela 1), dos híbridos F₁ e de indivíduos da população F₂ colhidos nos anos de 2000 e 2001, na busca de informações quanto à dominância e à segregação. Analisou-se a presença de antocianina no cálice e no hipanto, a cor do cálice e das asas, a relação

comprimento/largura de folíolo e a presença de pêlos na folha. As observações e medições foram feitas de acordo com a natureza dos caracteres. O experimento 2 foi dividido em 2 etapas. Na primeira etapa, em 2002-2003, fez-se cruzamentos envolvendo as secções *Erectoides*, *Procumbentes* e *Arachis*, para análise do comportamento de híbridos entre o acesso usado de *A. paraguariensis* e outros dois acessos da espécie; de *A. pflugeae* com os mesmos representantes de *A. paraguariensis*, e do acesso inicial de *A. paraguariensis* com espécies da secção *Arachis*. Houve 19 combinações entre 15 espécies, sendo 4 de *Erectoides*, 2 de *Procumbentes* e 9 de *Arachis*. Espécies de *Erectoides* foram cruzadas entre si e com *A. pflugeae*, e o acesso V 7677 com todas as espécies envolvidas, sempre como planta mãe. *Arachis stenophylla* (*Erectoides*), *A. pflugeae* e as espécies da secção *Arachis* foram doadoras de pólen. Na segunda etapa, que encontra-se em fase de desenvolvimento, estão sendo realizados cruzamentos entre *A. vallsii*, acesso V 7635, da secção *Procumbentes*, e espécies das secções *Erectoides* e *Arachis* (Tabela 2). No experimento 3, que será montado no segundo semestre de 2004, serão analisadas a cruzabilidade das espécies envolvidas na 2ª etapa do experimento 2, através das possíveis plantas F₁, que serão analisadas quanto à morfologia e citogenética, além de testados quanto a viabilidade do pólen.

Tabela 1. Acessos envolvidos em cruzamentos, com população segregante disponível para avaliação

Espécie	BRA	Coletor	Município	Lat.	Long.	Alt. (m)
<i>A. paraguariensis</i> parag.	017621	V 7677	Bela Vista - MS	22°08' S	56°34' W	220
<i>A. pflugeae</i>	032875	V 13589	Porto Murtinho - MS	21°44' S	57°25' W	190

Tabela 2. Espécies e acessos envolvidos nos cruzamentos que estão sendo realizados na Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

Secção	Acesso	Espécie
Proc X Arac (A)	V 7635 X V 14309	<i>A. vallsii</i> X <i>A. villosa</i>
	V 7635 X V 14167	<i>A. vallsii</i> X <i>A. duranensis</i>
	V 7635 X V 10229	<i>A. vallsii</i> X <i>A. stenosperma</i>
	V 7635 X Vp 5000	<i>A. vallsii</i> X <i>A. diogoi</i>
	V 7635 X V 1302-3	<i>A. vallsii</i> X <i>A. cruziana</i>
Proc X Arac (B)	V 7635 X V 14707	<i>A. vallsii</i> X <i>A. magna</i>
	V 7635 X K 30076	<i>A. vallsii</i> X <i>A. ipaënsis</i>
	V 7635 X V 6389	<i>A. vallsii</i> X <i>A. gregoryi</i>
	V 7635 X K 9484	<i>A. vallsii</i> X <i>A. batzocoi</i>
	V 7635 X V 13514	<i>A. vallsii</i> X <i>A. valida</i>
	V 7635 X K 30006	<i>A. vallsii</i> X <i>A. hoehnei</i>
	V 7635 X V 9094	<i>A. vallsii</i> X <i>A. hoehnei</i> cf. aff.
	V 7635 X V 9140	<i>A. vallsii</i> X <i>A. hoehnei</i> cf. aff.
	V 7635 X V 9146	<i>A. vallsii</i> X <i>A. hoehnei</i> cf. aff.
	V 7635 X V 13985	<i>A. vallsii</i> X <i>A. hoehnei</i> cf. aff.
Proc X Arac 18	V 7635 X V 9955	<i>A. vallsii</i> X <i>A. decora</i>
	V 7635 X V 13023	<i>A. vallsii</i> X <i>A. palustris</i>
	V 7635 X V 14682	<i>A. vallsii</i> X <i>A. praecox</i>
Proc X Arac (A + B)	V 7635 X V 14165	<i>A. vallsii</i> X <i>A. monticula</i>
Proc X Erec 18	V 7635 X V 7303	<i>A. vallsii</i> X <i>A. porphyralix</i>
Proc X Erec	V 7635 X V 7677	<i>A. vallsii</i> X <i>A. paraguayensis</i> parag.
Proc X Proc	V 7635 X V 14050	<i>A. vallsii</i> X <i>A. pflugeae</i>

Resultados e Discussão

Experimento 1 - Observou-se, em F_1 , a dominância de presença de antocianina no cálice e no hipanto e presença de pêlos na folha, com segregação destas características na proporção de 3:1 em F_2 . A cor do estandarte em F_1 foi intermediária à dos progenitores e em F_2 houve segregação acima de 15:1, sugerindo a influência de mais de um gene. A relação comprimento/largura do folíolo mostrou-se próxima à média (4,50) dos progenitores, variando de 3,96 a 5,64 em F_1 e em F_2 de 3,44 a 8,60. Alguns indivíduos mostraram comprimento/largura do folíolo acima dos valores do progenitor de maior relação (*A. pflugeae*), sugerindo heterose para o caráter. No momento está sendo realizada a caracterização morfológica e a análise de viabilidade de pólen das 20 plantas resultantes de sementes F_2 colhidas nos anos 2002 e 2003. Experimento 2 – etapa 1 - A alta germinação do pólen, à exceção de *A. stenophylla* (5%), indica não haver impedimento para a fertilização. Foram 1616 polinizações, variando o número entre as combinações, conforme a floração dos genitores. Os primeiros resultados mostram que, à exceção da combinação que envolveu *A. stenophylla*, todas formaram frutos. Mas, dos 1012 segmentos de frutos, apenas 415 tinham sementes. A maioria dos frutos vazios foi observada nos cruzamentos com espécies da secção *Arachis*. Dentre as sementes F_1 que germinaram, encontram-se sendo analisadas quanto à morfologia e citogenética, além de testados quanto à viabilidade de pólen, 51 plantas dos cruzamentos entre os acessos V 7677 x V 14050 (24 plantas), V 7560 x V 13589 (13 plantas), Sv 3809 x V 13589 (12 plantas), V 7677 x Sv 3809 (1 planta) e V 7677 x V

13589 (1 planta). Após estas avaliações poderá ser constatada a cruzabilidade real entre estas espécies.

Referências Bibliográficas

- KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, W. C. Taxonomia del género *Arachis* (Leguminosae). Bonplandia, Corrientes, v. 8, p. 1-186, 1994.
- LAVIA, G.I. Evidencias cromosomicas para la reubicación taxonómica de *Arachis chiquitana* y *A. vallsii*. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 45, 1999, Gramado. Programa e Resumos ... Gramado: SBG, 1999. p.118. (Genetics and Molecular Biology, v.22, n.3, Supplement, p. 118).
- MANSUR, E.; LACIRTE, C.; KRUL, W.R. Peanut Transformation. In: Methods in Molecular Biology. v. 44: Agrobacterium Protocols. Edited by: K.M.A. Gartland & M.R. Davey Humana Prest Inc. Totowa, NJ. 1995. p. 87-100.
- STALKER, H. T. & CAMPBELL, W.V. Resistance of wild species of peanut to an insect complex. Peanut Sci. 10: 30-33. 1983.
- STILL, P.E.; PLATA, M.I.; CAMPBELL, R.J.; BUENO, L.C.; CHICHESTER, E.A.; NIBLETT, C.L. Regeneration of fertile *Arachis paraguariensis* plants from callus and suspension cultures. Plant Cell Tissue Organ. Cult. 9: 37-43. 1987.
- SUBRAHMANYAM, P.; GHANEKAR, A.M.; NOLT, B.L.; REDDY, D.V.R.; McDONALD, D. Resistance to groundnut diseases in wild *Arachis*. In: Proceedings of an International Workshop on Cytogenetics of *Arachis*. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT), Patancheru, India. P. 49-55. 1985.
- TEIXEIRA, C. C. Estudo da cruzabilidade de espécies das seções *Caulorrhizae*, *Erectoides* e *Procumbentes* do gênero *Arachis* (Leguminosae). Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 1999. 93p.

ADAPTABILIDADE E PRODUTIVIDADE DE *Arachis* SP. NO EXTREMO SUL DA BAHIA

Moreno-Ruiz M.A.; Santana J.C. de.

Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira/Centro de Pesquisas do Cacau, Caixa Postal 07, 45.600-970, Itabuna, Ba, Brasil.
e-mail mruiz@cepec.gov.br

O agrossistema Extremo Sul, com 30.420 km², tem um grande potencial para as atividades agropecuárias e silviculturais. A pecuária ocupa 68% (2.089.854 ha) com pastagens que sustentam aproximadamente 2.000.000 de cabeças de gado bovino. Todavia, considera-se que 50% dessas pastagens se encontram em processo de degradação. Isto é conseqüência do uso inadequada da tecnologia de manejo disponível para mantê-las em níveis de produtividade e sustentabilidade satisfatórios.

Está demonstrado que pastagens como essas podem ser melhoradas, quanto à produção e qualidade, com o uso de fertilizantes, principalmente os nitrogenados, pela introdução de espécies adaptadas com maior potencial de produção ou pela introdução de leguminosas forrageiras que estabelecendo efetiva associação simbiótica com as bactérias do gênero *Rhizobium*, adicionam quantidades expressivas de N ao sistema solo-planta-animal e, por outro lado, apresentam maior valor nutritivo e digestibilidade do que as gramíneas.

O amendoim forrageiro (*Arachis pintoii*) cv Belmonte é a leguminosa forrageira mais amplamente distribuída nos últimos anos nos Tabuleiros Costeiros do Sul da Bahia. No entanto o cultivar "Amarillo" comercial é o mais divulgado nas zonas tropicais das Américas e da Austrália. Embora a genética do amendoim forrageiro seja pouco conhecida, por ser ainda em sua maioria silvestre, sabe-se que sua base genética em monocultura é muito estreita, correndo sérios riscos potenciais de sofrer ataques devastadores por pragas, com as conseqüentes perdas de adaptação, produção, qualidade e erosão genética. Por tanto, é importante introduzir e selecionar germoplasma que se adapte às condições edafoclimáticas deste ecossistema, com o objetivo de ampliar a base genética e aumentar a produção e produtividade da pecuária regional.

Materiais e Métodos

Na Estação de Zootecnia do Extremo Sul - Essul - (16° 39' S, 39° 30' O), a 120 m.a.n.m., precipitação anual média de 1312 mm e temperatura média de 23°C, foram avaliados 27 acessos de *Arachis* sp provenientes da EMBRAPA/ CPAC, o acesso 00001 cv Belmonte da Ceplac/Cepec e o acesso 00002, coletado na Fazenda Ourocimbo. *A. pintoii*, cvs Belmonte e "Amarillo" (BRA 13251) foram as testemunhas local e experimental, respectivamente. Os 29 acessos (tratamentos) foram alocados em blocos ao acaso, com quatro repetições em arranjo fatorial (2 épocas x 29 acessos) sobre latosolos com pH 4,9; 1 ppm de P; 0,6; 0,5 e 0,1 meq/100g de Ca, K e Al respectivamente. Cada unidade experimental (parcela de 3m x 2,5m) esteve constituída por 5 linhas espaçadas de 0,5m. O solo foi arado a 0,20m, gradeado convenientemente e sulcado. No fundo do sulco foram aplicados 40 kg/ha de P₂O₅ (superfosfato simples). A semeadura foi feita com material vegetativo (estolões). Um ano após o início das amostragens para determinar produção de matéria seca (MS) foi feita adubação de reposição com 40 kg/ha de P₂O₅. As avaliações foram feitas a

cada 4 - 8 semanas até o estabelecimento em 09.11.2000, quando se deu início as avaliações das variáveis: altura das plantas (cm), deslocamento lateral (cm), número (n^0) de flores (marco de 0,25 x 0,25m) e corte a 3 cm de altura do relvado, para determinação da produção de MS a cada 6 semanas. Os resultados foram submetidos à análise univariada e multivariada para as épocas de mínima e de máxima precipitação pluvial.

Resultados:

Período de Estabelecimento: Foi muito lento e fez-se necessário replantio de vários acessos. Dos 29 acessos avaliados (Tabela 1), só dois não se estabeleceram satisfatoriamente (BRA 30325 e 30252) em duas das quatro repetições, apesar do tempo transcorrido (superior a 16 semanas) no momento do corte de nivelamento (09.11.2000) para dar início as amostragens de produção de MS. Nessa amostragem a cobertura variou entre 80 e 100% e altura das plantas entre 5 cm e 39 cm. (dados não apresentados). Observou-se também presença e ausência total de flores, assim como presença de antracnose (*Colletotrichum gloeosporoides*) e antracnose (*Cercospora* sp.).

Tabela 1. Acessos de *Arachis* sp.; médias da produção (kg/ha) de matéria seca total e nas épocas de máxima e mínima precipitação e classificação por grupos. Essul, Itabela, Ba.

Acesso BRA n°	Produção de MS Total	Grupo	Produção de Matéria Seca	
			Época de máxima	Época de mínima
00001 ¹	964,03 a ³	1 (0,60) ⁴	1.198,2 a	729,86 a
31534	849,58 ab	1 (0,60)	1.029,3 ab	669,89 ab
31828	821,30 abc	2 (1,00)	1.023,5 abc	619,06 abc
15121	729,33 abcd	3 (0,66)	1.032,7 ab	426,01 abcde
31496	718,82 abcd	3 (0,66)	973,9 abcd	463,72 abcde
00002	701,72 abcde	3 (0,66)	883,5 abcde	519,97 abcd
15598	667,66 bcdef	3 (0,66)	894,4 abcde	440,88 abcde
30945	637,75 bcdefg	3 (0,57)	930,8 abcde	344,75 bcde
32328	612,81 bcdefg	4 (0,55)	913,6 abcde	311,99 cde
30333	607,45 bcdefg	4 (1,00)	772,3 bcde	492,64 abcde
31135	596,56 bcdefg	4 (1,00)	766,3 abcde	426,86 abcde
22683	577,96 bcdefg	4 (1,00)	809,9 abcde	346,06 bcde
32409	574,30 bcdefg	4 (1,00)	737,8 abcde	410,82 abcde
30929	564,98 cdefg	4 (1,00)	769,8 abcde	360,18 bcde
30368	558,02 bdefg	5 (0,76)	826,6 abcde	289,39 cde
30899	554,71 cdefg	5 (0,76)	848,7 abcde	260,76 de
32107	527,01 defg	5 (0,76)	775,7 abcde	278,34 de
32310	487,79 defg	6 (0,52)	623,3 bcde	352,26 bcde
30597	478,50 defg	6 (0,52)	641,1 bcde	315,91 cde
30872	469,03 defg	6 (0,52)	620,4 bcde	317,65 cde
30252	460,53 defg	5 (1,00)	724,3 bcde	196,76 de
31127	450,45 defg	6 (0,52)	636,0 bcde	264,94 de
31801r	447,90 defg	6 (1,00)	570,0 bcde	325,84 cde
31861r	446,55 defg	6 (1,00)	566,5 bcde	326,58 cde
30988	423,64 efg	6 (0,52)	578,3 bcde	268,99 de
13251 ²	420,64 efg	6 (0,52)	591,4 bcde	249,92 de
31542	392,33 fg	6 (0,52)	505,5 e	279,20 de
30546	374,41 g	6 (1,00)	511,6 de	237,22 de
30325	363,45 g	6 (1,00)	556,8 cde	170,13 de
Média	568,25		767,65	368,85
CV	26,31		22,32	33,58

¹ Testemunha local, cv Belmonte;

² Testemunha experimental, cv "Amarillo";

³ Médias seguidas da mesma letra não diferem entre se (Tukey 5%);

⁴ Probabilidade de pertencer ao grupo; 'r' Repens.

Período de Produção:

Produção de Matéria Seca (MS) - A análise de variância da produção de MS total revelou que houve diferença ($P < 0,0001$) para: época e acesso e que a interação época x acesso não foi diferente ($P < 0,1663$). Para auxiliar a análise do teste de médias (Tukey 5%), classificaram-se os acessos dentro de grupos com base na variável produção (MS), utilizando-se da análise discriminante não paramétrica pelo método "K-nearest-neighbor" (Método do vizinho mais próximo, $K=3$) através do procedimento DISCRIM (SAS/STAT, p 360, 1987), onde a matriz da covariância conjunta é usada para calcular a distância de Mahalanobis. Na Tabela 1, pode-se

observar que os 29 acessos foram classificados em 6 grupos, definidos através da maior probabilidade de pertencer a um determinado grupo; a produção média global (produção nos períodos de máxima e de mínima precipitação) variou entre 964,03 kg/ha para o cv Belmonte testemunha local, classificada no grupo 1 com 0,60 de probabilidade, e 363,45 kg/ha do acesso BRA 30325 que apresentou a menor produção e foi classificada no grupo 6 com 1,0 de probabilidade.

Observa-se também que o cv “Amarillo” (BRA 13251), testemunha experimental, apresentou baixa produção e foi classificado no último grupo, o que não era esperado, já que este tanto quanto o acesso 00002 e a testemunha local o cv Belmonte, apresentam características morfológicas e hábitos de crescimento muito semelhantes e tem aproximadamente, a mesma região geográfica de origem, a foz do rio Jequitinhonha, no município de Belmonte. Por outro lado os acessos classificados nos grupos 1, 2 e 3 diferentes do cv Belmonte, apesar de também, morfológicamente serem difíceis de ser distinguidos e estatisticamente suas produções não serem diferentes, há alguma variabilidade, podendo-se constituir em novas opções de germoplasma para ampliar a base genética, (especialmente se levarmos em conta seu desempenho na época de mínima), desta leguminosa altamente promissora para melhorar a qualidade da dieta do animal e conseqüentemente a produtividade do rebanho bovino regional

Na Tabela 1, pode-se observar que durante a época de mínima quando a precipitação diminui e as temperaturas diurnas são menores, fatores estes que provocam menor desenvolvimento das plantas e por tanto menor produção de MS, destacou-se o cv Belmonte e os acessos BRA 31534, 31496, 15598, 30333 e o acesso 00002, por apresentar produção, mais ou menos igual aos 50% da época de máxima, o que indica um bom balanço na produção de MS durante as duas épocas do ano; essa sustentabilidade da produção, quando o rebanho precisa de maior disponibilidade de alimento volumoso no campo, representa uma vantagem comparativa sobre os demais acessos, constituindo-se em um fator de desempenho que deve ser levado em conta como critério de adaptação e seleção, pois, possivelmente esteja ligado à sua constituição genética.

Conclusões:

Há variabilidade entre acessos de *Arachis* sp.

Por sua adaptação e produtividade, recomenda-se para experimentos em parcelas maiores, com animais em pastoreio, em monocultura ou em consorciação, os acessos: BRA 31534, 31496, 15598, 30333 e, o acesso 00002 da Ceplac/Cepec, por seu desempenho durante as épocas de máxima e de mínima precipitação pluvial.

Bibliografia

SAS INSTITUTE INC. Proc. Discrim In: SAS/STAT **Guide for Personal Computers**, 6Th Edition.; SAS Institute Inc. Cary, NC. 1987. 1028p

CONSERVAÇÃO DE GERMOPLASMA SEMENTE DE AMENDOIM (*Arachis hypogaeae* L.) A LONGO PRAZO NO BRASIL

Wetzel, M. M. V.; Silva, D. B.; Valls, J. F. M.; Pais O. V.

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Caixa Postal 02372, CEP. 70.770-900, Brasília, DF, Brasil. magaly@cenargen.embrapa.br

Introdução

O amendoim (*Arachis hypogaeae* L), originário da América do Sul, é uma fonte importante de proteína para dieta do povo brasileiro. A ampla variabilidade genética é condição essencial para obtenção sistemática de novas cultivares com melhores produtividade, adaptadas às diversas condições ecológicas do país e com maior resistência a doenças e pragas. As atividades do manejo dos recursos genéticos, que visam a disponibilização do material genético para a criação de novas cultivares, dispõem as coleções de germoplasma em três categorias: a) Coleção de Trabalho – com variabilidade genética restrita; b) Coleção Ativa – com acessos para atender às exigências atuais do melhoramento; c) Coleção de Base – de ampla abrangências visando assegurar e atender os interesses futuros do melhoramento do amendoim, no país. O Banco Ativo de Germoplasma de Amendoim (BAG - Amendoim) esta localizado no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), responsável pela manutenção das Coleções de Trabalho e a Ativa, conservadas a curto e médio prazo. A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia é responsável pela conservação de Amendoim a longo prazo e pela documentação de seus dados no Sistema Brasileiro de Informação de Recursos Genéticos (SIBRARGEN). A conservação de germoplasma semente a longo prazo é um dos objetivos principais da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Esta atividade é desenvolvida através do armazenamento de coleções de sementes de acessos de várias espécies, constituindo-se na Coleção de Base de Germoplasma Semente, COLBASE, que junto com a coleção de germoplasma conservada *in vitro*, forma o Banco Base de Germoplasma do Sistema Embrapa, criado em 1976. A COLBASE tem como objetivo, garantir por muitas décadas, a sobrevivência das sementes de espécies ortodoxas de interesse socioeconômico, assegurando desta forma, a manutenção das fontes básicas para a alimentação e para agricultura. As sementes ortodoxas são aquelas que toleram o dessecamento a baixos teores de umidade (3% a 7%), sem danos a sua viabilidade, permitindo o seu armazenamento em câmaras frias com temperaturas subzero (-20° C). O objetivo deste trabalho foi avaliar a situação da Coleção de Base de amendoim conservada pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e apresentar o acervo de recursos genéticos desta espécie, conservados a longo prazo no Brasil.

Metodologia

Em 2003, realizou-se junto ao SIBRARGEN, um inventário dos processos de incorporação de germoplasma de amendoim na COLBASE no período de 1983 a 2003. Foram levantadas as informações referentes ao número de acessos incorporados, procedência e resultados da monitoração da viabilidade das sementes. A Coleção de Base da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia possui atualmente 93.845 acessos de 745 espécies vegetais. A coleção de Base tem sido composta e enriquecida por germoplasma semente provenientes de coletas, intercambio e dos Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs), integrantes do Sistema

Nacional de Pesquisa Agropecuária. Todas as amostras de germoplasma semente recebidas na Coleção de Base são registradas e identificadas por um código numérico de acesso (BRA), por gênero e espécie, usando o sistema de código de barra. Além disso, são adicionadas as informações referentes à data de armazenamento, teor de umidade, quantidade de sementes, percentagem de germinação, qualidade fitossanitária e localização nas câmaras (Faiad et al., 2001). A conservação de germoplasma semente na Coleção de Base, segue os padrões internacionais de qualidade estabelecidos pelo Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos - IPGRI (IPGRI, 1994) com pequenas adaptações (Faiad, et al., 1998). Após conferir a documentação dos acessos, são realizadas as seguintes operações: limpeza, homogeneização, amostragens para análises, teste de umidade, secagem, teste de germinação, teste de sanidade, embalagem hermética, identificação com etiqueta de código de barra e armazenamento em câmaras frias mantidas a -20° C. São armazenadas de 1500 a 2000 sementes/amostra com percentagem de germinação superior a 75%. Durante o armazenamento são realizadas monitorações periódicas para avaliar a qualidade fisiológica e sanitária das sementes.

Resultados

No período de 1983 a 2003, foram incorporados 681 acessos de germoplasma de amendoim na COLBASE. Destes, 527 foram procedentes do BAG – Amendoim/IAC e 154 de coletas realizadas pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia com a colaboração de outras instituições. Setenta e um por cento dos acessos possuem mais de 1000 sementes, atendendo os padrões pré-estabelecido para conservação a longo prazo. Cento e noventa e nove acessos, oriundos, principalmente de coletas devem ser multiplicados. As maiores taxas de incorporação de acessos, 39,35% e 43,02%, foram observadas nos anos de 1985 e 1986, respectivamente.

De acordo com a FAO (1988), existem 81.186 acessos de germoplasma do gênero *Arachis* conservados em vários países. Desses por cento destes acessos encontram-se conservados a longo prazo: 8.020 nos Estados Unidos da América; 2.991 na Índia/ICRISAT, 2.186 na China e 681 no Brasil. Apesar do Brasil não se colocar entre os sete maiores detentores de acessos conservados deste gênero, podemos considerar que o país ocupa uma posição de destaque em relação à conservação a longo prazo. Porém, maiores esforços devem ser colocados para aumentar o número atual de acessos da coleção, incluindo também, outras espécies, inclusive as nativas do Brasil.

Os resultados da monitoração da viabilidade das sementes de 487 acessos (Tabela 1), indicam que após 17 - 18 anos de armazenamento em câmara fria (-20° C), os acessos incorporados com poder de germinação entre 75% a 84%, (padrão aceitável) mostraram redução de viabilidade em torno de 13% e aqueles com poder de germinação entre 85% a 100% (padrão preferível), mostraram redução de 2,46% a 5,37%. Após dez anos de armazenamento, pode ser observada redução de 3,19% para dez acessos incorporados com poder de germinação entre 85% a 100%. Estes resultados mostram uma tendência de redução de viabilidade do germoplasma conservado a longo prazo, mesmo quando as sementes apresentam altas taxas de viabilidade inicial. Diversas razões podem estar envolvidas para explicar a perda da viabilidade das sementes, desde causas ocorridas durante a produção e colheita como também, no beneficiamento e pré-armazenamento, as quais não temos informações suficientes para discuti-las. Contudo, a redução do

poder de germinação ainda não atingiu o valor crítico (redução de 15% do poder de germinação inicial), para que estes acessos sejam enviados para a regeneração no BAG. Considerando que a esta discussão esta sendo embasada em resultados médios do poder de germinação de grupos de acessos, sugere-se que as monitorações para amendoim sejam realizadas a intervalos iguais ou inferiores à 10 anos. Apesar da redução no poder de germinação, esta coleção encontra-se bem armazenada e disponível para intercâmbio, em consonância com a lei de Acordo de Transferência de Material, vigente no país. Para ampliar a sua utilização, sugere-se a elaboração de coleções nucleares e estudos de caracterizações.

Tabela 1. Monitoração da viabilidade de acessos de amendoim conservados a longo prazo na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Viabilidade inicial (%)	Anos de armazenamento	No de acessos	Poder de germinação (%)		Redução da viabilidade (%)
			Inicial	Atual	
75-84	17	25	80,72	70,36	12,83
	18	17	80,77	70,06	13,25
85-100	10	92	93,99	90,99	3,19
	17	239	94,26	90,53	2,46
	18	114	93,90	88,88	5,37

Conclusões

1- No período de 1983 a 2003, foram incorporados pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia 681 acessos de amendoim para serem conservados a longo prazo.

2- A maioria dos acessos introduzidos (77%) foram procedente do Banco Ativo de Germoplasma do Instituto Agronômico de Campinas.

3- Após 17 - 18 anos de armazenamento, 42 acessos incorporados com poder de germinação entre 75% a 84%, (padrão aceitável) mostraram redução de viabilidade em torno de 13% e 445 acessos com poder de germinação entre 85% a 100% (padrão preferível), mostraram redução de 2,46% a 5,37%.

4- A redução do poder de germinação ainda não atingiu o valor crítico (redução de 15% do poder de germinação inicial), para que estes acessos sejam enviados para a regeneração no BAG, podendo-se assim, concluir que esta coleção encontra-se armazenada em condições adequadas.

Referências

FAIAD, M. G. R. ; GOEDERT, C. O.; WETZEL, M. M. V. S.; SILVA, D. B.; PEREIRA NETO, L. G. Banco de germoplasma de sementes da Embrapa. Brasília: Embrapa, 2001. 31p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos 71).

FAIAD, M. G. R. ; SALOMÃO, A. N. ; FERREIRA, F. R.; GONDIM, M. T. P; WETZEL, M. M. V. S.; MENDES, R. A. GOES, M; MIRANDA, A. R. de. Manual de Procedimentos para conservação de germoplasma semente a longo prazo na Embrapa. Brasília: Embrapa, 1998. 21p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documento 30).

FAO. The state of the world's plant genetic resources for food and agriculture. Rome: Food and Agriculture Organization of United Nations, 1998. 510p.

IPGRI. Genebanks standards. Rome. International Plant Genetic Resources Institute, 1994. 13 p.

VELOCIDADE DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *Arachis* NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

SOARES, P. G., FRANCO, A. A., RESENDE, A. S.

Embrapa Agrobiologia, BR465, KM 7, Seropédica, RJ; BRASIL. 23890-000. pablogtrs@globo.com

INTRODUÇÃO

Espécies perenes do gênero *Arachis*, vulgarmente conhecidas como amendoim forrageiro, têm merecido atenção especial nos últimos anos, devido a seu potencial como cobertura viva de solos e para um manejo adequado de pastagens tropicais. Embora esta cultura desperte grande interesse para pesquisadores e produtores rurais em geral, sua adoção em larga escala nos trópicos ainda é insipiente (Kerridge, 1994). Novos acessos de caráter selvagem merecem atenção especial, principalmente em relação a suas capacidades de adaptação em diferentes condições edafo-climáticas, além de direcionar prioridades de pesquisa no sentido de se verificar a contribuição real do gênero *Arachis spp.* para a melhoria do solo nos diferentes sistemas de produção agrícola.

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi comparar o desenvolvimento de 12 acessos de *Arachis spp.* nas condições ambientais do Rio de Janeiro, com base na velocidade de crescimento, na produção de matéria seca e no acúmulo de nitrogênio na biomassa da parte aérea.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi conduzido no campo experimental da Embrapa Agrobiologia (BR 465 - km 7), município de Seropédica (RJ). O clima local (Aw, na classificação de Köppen) é tropical quente e úmido, com precipitação e temperatura (média anual) de 1.226 mm e 22,6°C, respectivamente. Foram plantados 12 acessos de *Arachis spp.*, coletados desde a Bahia até a Argentina e gentilmente cedidos pela Embrapa Cerrados. As mudas foram plantadas no campo em março de 2000, em Argissolo cuja análise química de amostra de terra (profundidade de 0-20 cm) apresentou: pH em água (1:2,5): 4,9; concentração de Al^{3+} , Ca^{2+} e Mg^{2+} ($cmol_c/dm^3$): 0,1; 2,5 e 1,4 respectivamente; P e K (mg/kg): 3 e 95; N, C e M.O. (%): 0,12; 1,04 e 1,79 respectivamente. Na ocasião do plantio foram adicionados, por cova, 50g de fosfato de rocha de Patos de Minas, 10g de FTE BR12 e 25g de calcário dolomítico. As plantas não foram inoculadas com *Rhizobium* ou fungos micorrízicos e não receberam adubação de cobertura. O espaçamento foi de 1 x 1m entre covas, e o delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso com quatro repetições.

As plantas foram avaliadas quanto à velocidade de crescimento (cobertura do solo) medindo-se mensalmente os diâmetros (em dois sentidos) de ocupação de cada muda no solo, até que atingissem a área máxima disponível ($1 m^2$). Com o solo totalmente coberto e a cultura já estabelecida, amostras foram coletadas por meio de cortes na biomassa vegetal (parte aérea) em diferentes épocas. A partir do 4º corte

toda a biomassa cortada era retirada das parcelas experimentais, ao contrário dos 3 anteriores, quando o material era reincorporado ao sistema. Foi determinado o peso de matéria seca, de onde foram retiradas sub-amostras para determinação do teor total de nitrogênio. O N total foi determinado do extrato obtido pela digestão úmida, baseado na oxidação Kjeldahl (Bremner, 1965). O acúmulo de N foi estimado, para cada um dos 12 acessos, em função da quantidade de matéria seca produzida, em kg ha^{-1} .

RESULTADOS

Observou-se que *A. repens* (BRA 031861 e BRA 031801) e os acessos BRA 031828 e BRA 031496 fecharam a área com maior rapidez, levando de 6 a 7 meses. Um grupo apresentou comportamento intermediário, com padrões similares de crescimento, enquanto que os acessos BRA 030333, BRA 022863 e BRA 015121 tiveram um crescimento mais lento (Figura 1).

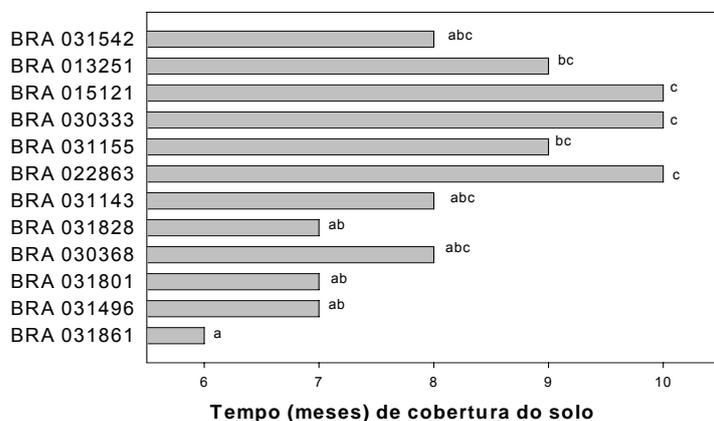


Figura 1. Tempo de cobertura (velocidade de ocupação) do solo.

O espaçamento adotado (1 x 1m) permitiu um melhor acompanhamento da velocidade de crescimento, porém apresentou desvantagens devido à quantidade elevada de manutenções necessárias até o fechamento da área. Durante o ano de 2002 o acesso BRA 031496 obteve a maior produção de biomassa, com 14 Mg ha^{-1} de matéria seca (MS), seguido por BRA 031861 e BRA 031828. Esses acessos sobressaíram-se também no ano seguinte, produzindo em torno de 9 Mg ha^{-1} . Com um acúmulo entre 8 e 10 Mg ha^{-1} em 2002 e de 6 a $7,5 \text{ Mg ha}^{-1}$ em 2003, os demais acessos ocuparam uma posição intermediária, com exceção de BRA 031542 (Figura 2).

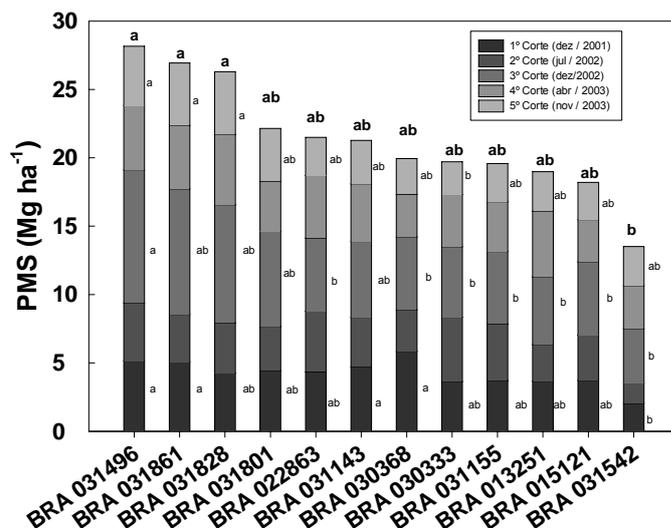


Figura 2. Produção de matéria seca de 12 acessos de *Arachis spp.* em 5 cortes no experimento (Média de 4 repetições). Valores com a mesma letra, ou quando esta é ausente, não diferem entre si pelo teste de Tukey – $P > 0,05$; letras no topo das barras indicam diferenças, para a produção acumulada).

As maiores concentrações de N na parte aérea foram de *A. repens* (acessos BRA 031861 e BRA 031801), contendo até 40 g de N por kg de MS em seus tecidos. Os demais acessos obtiveram em média 30 g kg⁻¹ de N. O acesso BRA 031861, juntamente com BRA 031496, foi o que mais acumulou N na biomassa, com mais de 400 kg ha⁻¹ no ano de 2002 e 300 kg ha⁻¹ no ano seguinte (Tabela 1). Os que menos produziram acumularam em torno de 200 kg ha⁻¹ ano⁻¹ de N. Em associação com gramíneas, *A. pintoi* chega a acumular mais de 100 kg ha⁻¹ ano⁻¹ de N, suficiente para suprir as perdas deste nutriente em áreas sob pastejo (Ibrahim & Mannetje, 1998).

Tabela 1. Acúmulo de Nitrogênio na parte aérea de 12 acessos de *Arachis spp.* em 5 cortes no experimento (Média de 4 repetições).

ACESSO	1º Corte	2º Corte	3º Corte	4º Corte	5º Corte
	(dez 2001)	(jul 2002)	(dez 2002)	(abr 2003)	(nov 2003)
	Acúmulo de N				
	(kg / ha)				
BRA 031861	181,43 a	109,82	352,14 a	147,72 a	189,15 a
BRA 031496	172,39 a	129,19	300,76 ab	134,69 a	174,93 ab
BRA 031828	142,87 a	113,77	267,84 abc	126,77 ab	173,65 abc
BRA 031801	160,88 a	99,81	230,26 abc	97,72 ab	151,9 abc
BRA 022863	131,88 ab	122,74	165,53 bc	127,01 ab	95,32 abc
BRA 031143	140,23 ab	106,41	151,83 c	100,60 ab	114,01 abc
BRA 031155	125,41 ab	116,66	147,74 c	93,94 ab	83,51 bc
BRA 030333	118,69 ab	125,88	140,50 c	98,44 ab	78,84 c
BRA 030368	155,20 a	84,35	138,45 c	91,87 ab	166,02 abc
BRA 015121	110,08 ab	97,73	159,49 bc	77,50 b	98,52 abc
BRA 013251	106,14 ab	82,32	133,72 c	106,22 ab	103,23 abc
BRA 031542	57,89 b	65,64	147,96 c	100,56 ab	105,92 abc
MÉDIA	133,59	104,53	194,69	108,59	127,92
CV (%)	24,9	30,6	30,1	20,8	29,9

Valores com a mesma letra, ou quando esta é ausente, não diferem entre si pelo teste de Tukey – $P > 0,05$.

A variação no acúmulo de N foi dependente da massa, devido à pouca variabilidade entre as concentrações. Parte deste N é derivado da fixação biológica, no entanto, as plantas devem estar reutilizando o nitrogênio via decomposição de seus resíduos. Dado o acúmulo elevado de matéria seca de alguns acessos, espera-se que parte do nitrogênio acumulado seja passível de mineralização e disponibilização para outras culturas.

CONCLUSÕES

Houve grande variação entre os acessos. A maior parte mostrou boa adaptação às condições locais, com destaque para BRA 031496, seguido por BRA 031861 e BRA 031828, pelo elevado acúmulo de material vegetal rico em N, aliado ao seu rápido estabelecimento. Estes acessos ainda se mostraram persistentes, suprimindo plantas invasoras e sem adubação de cobertura, sugerindo uma eficiência na ciclagem de N do material senescente e um potencial como suprimento à demanda nitrogenada de culturas agrícolas. Estudos mais detalhados merecem maior atenção, além da importância de se avaliar diferentes fontes de germoplasma para que seja possível obter resultados mais promissores.

Apoio financeiro: CNPq

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BREMER, J. M. Total Nitrogen. In: BLACK, C. A. et al., Eds. Methods of Soil Analysis, Part. 2. Agronomy series n° 9. ASA, Madison, Wisc. P. 1149-1178. 1965.
 IBRAHIM, M. A.; MANNETJE, L. Trop. Grasslands, v.32. p96-104. 1998.

KERRIDGE, P. C. Future prospects for utilization and research in forage Arachis. In: KERRIDGE, P. C. & HARDY, B. *Biology and Agronomy of Forage Arachis*.. Publ.: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia, 1994. p. 199-206.

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE GENITORES E INDIVÍDUOS DAS PROGÊNIES F₁ E F₂ ORIUNDAS DE CRUZAMENTOS ENTRE *Arachis stenosperma* E *Arachis duranensis*

Santos, R. F.¹; Palma, F.R. ¹, Irala, L.H. ¹, Almeida, C.O.S. ¹, Fávero, A.P.², Leonardecz-Neto, E.³, Valls, J.F.²

¹ Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília - DF – Brasil - CEP 70910-900 –rodrigo@cenargen.embrapa.br, orfeuss@hotmail.com, livia.hoffman@yahoo.com.br, kika.df@terra.com.br

² Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – SAIN Parque Estação Biológica – CP 02372, 70.770-900, Brasília - DF, Brasil. favero@cenargen.embrapa.br, valls@cenargen.embrapa.br

³ Universidade Católica de Brasília, SGAN 916, Modulo B, Asa Norte. CEP 70790-160, Brasília, DF, Brazil, leonardecz@pos.ucb.br

Espécies do gênero *Arachis* têm sido utilizadas mundialmente na produção de óleos, como forragens, na alimentação como confeitos ou in natura, como planta ornamental e como adubo verde. Pertencem à família Leguminosae e se diferencia dentro da mesma por possuir ginóforo ou “peg” com desenvolvimento geocárpico. A taxonomia do gênero agrupa as espécies em nove seções, segundo a morfologia, o modo de reprodução e a sua dispersão (Krapovickas e Gregory, 1994). O centro primário de origem do gênero é a região planaltina entre o Mato Grosso do Sul e o Paraguai (Gregory et al., 1980).

Arachis duranensis e *A. stenosperma* estão abrigados na seção *Arachis*, sendo que a primeira, acesso K 7988, foi coletada por Krapovickas em Campo Durán, Salta, Argentina e a segunda, acesso V10309, foi coletada por Valls e colaboradores, no município de Rondonópolis, BR – 364, oeste do rio Vermelho e 300m do acesso a Rondonópolis (Krapovickas & Gregory, 1994). Ambas são diplóides (2n = 20) e possuem genoma “A”, caracterizado pela presença de um par de cromossomos que apresenta coloração diferenciada e tamanho menor que os demais cromossomos na célula (Fávero, 2004).

O presente estudo tem por objetivo caracterizar morfologicamente genitores e indivíduos das progênies F₁ e F₂ resultantes do cruzamento de *Arachis duranensis* e *A. stenosperma*. Esta caracterização permite inferir a herdabilidade e correlação dos caracteres avaliados, servindo de base para a utilização das características como marcadores morfológicos em cruzamentos com tais características contrastantes.

O experimento de caracterização morfológica foi conduzido na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, nos meses de março a abril de 2004.

Os caracteres analisados foram: comprimento e largura dos folíolos basal e apical, comprimento do pecíolo, comprimento do peciólulo, comprimento da estipula adnata e livre e largura da estipula, comprimento do hipanto, comprimento do cálice (lábio superior e inferior), altura e largura do estandarte e da asa e a presença de antocianina no hipanto e no cálice, cor do estandarte e da asa. Quatro folhas foram medidas por planta sendo sempre considerada a terceira folha adulta e expandida, contando-se a partir do ápice do ramo. As cores do estandarte e da asa foram determinadas de acordo com a escala de cores do Royal Horticultural Society Colour Chart. Foi feita a análise de variância, para se obter os parâmetros genéticos e calculou-se também a correlação de Pearson entre as características avaliadas. Foi estimada a herdabilidade no sentido amplo.

De acordo com a Tabela 1, observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos e um coeficiente de variação de 13,3%. Observou-se também

(Tabela 2) que o coeficiente de variação para a maioria dos caracteres foi considerada baixa, o coeficiente de correlação de Pearson (R^2) considerado médio (0,5 a 0,7) a alto (0,7 a 0,9). Nos casos em que o R^2 foi determinado como alto, pode-se inferir que tais características possivelmente apresentarão o mesmo padrão aqui observado, quaisquer que sejam os conjuntos estudados. O mesmo não pode ser afirmado para dados com correlação de Pearson abaixo de 0,7. Na Tabela 2, também é possível observar a herdabilidade, sendo que a maioria dos caracteres estudados apresentou valores de herdabilidade superiores a 0,80.

Tabela 1. Análise de variância dos caracteres observados.

Caracter		P Valor	R^2	CV%	h^2	VarG
cor das asas		<0,0001	0,99	0,48	0,9979	1,7273
cor do estandarte		<0,0001	0,99	1,31	0,9979	22,4670
Comp. do hipanto		<0,0001	0,85	17,63	0,7903	112,9392
Cálice(comprimento)	l.sup.	<0,0001	0,60	10,29	0,5597	0,3258
	l.inf.	<0,0001	0,63	9,08	0,5823	0,3978
Estandarte (cm)	altura	<0,0001	0,67	8,72	0,6177	1,2307
	largura	<0,0001	0,68	8,84	0,6220	2,1243
Asas	comp.	<0,0001	0,64	6,29	0,5806	0,3635
	largura	<0,0001	0,65	9,16	0,5914	0,3683
Antocianina	hipanto	<0,0001	0,96	9,79	0,9452	0,5106
	cálice	<0,0001	0,88	17,13	0,8447	14,8072
Comp. de Pecíolo		<0,0001	0,63	19,31	0,8562	0,9412
Comp. de Pecíolulo		<0,0001	0,65	13,80	0,8470	4,2094
Folíolo basal	comp	<0,0001	0,65	10,39	0,8764	2,8786
	largura	<0,0001	0,69	10,62	0,8657	5,3520
Folíolo apical	comp	<0,0001	0,68	9,81	0,8701	3,8235
	largura	<0,0001	0,68	10,70	0,8195	0,7995
Comp. Das estípulas	adnata	<0,0001	0,56	15,72	0,8718	2,8848
	livre	<0,0001	0,67	12,34	0,8911	0,4084
Largura das estíp.1/2	adnata	<0,0001	0,73	13,30	0,8304	0,3575

Tabela 2. Valores de F, correlação de Pearson, coeficiente de variação, herdabilidade e variância genética para os caracteres avaliados.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamento	99	137,1718	1,3855	<0,0001
Erro	285	50,1993	0,1761	
Total	384	187,3711		

CV(%) = 13,3

Caracter	cor asa	cor estan	calsup	comhip	calinf	esalt	eslarg	asacomp	Asalarg	Anthip	antcal
cor estan	0,020										
calsup	0,097	-0,143									
comhip	-0,075	0,024	0,208								
calinf	0,014	-0,070	0,404	0,377							
esalt	0,086	0,013	0,306	0,279	0,471						
eslarg	0,118	0,020	0,348	0,415	0,388	0,605					
asacomp	-0,011	0,049	0,363	0,364	0,341	0,537	0,496				
asalarg	-0,027	0,050	0,200	0,303	0,276	0,531	0,464	0,452			
anthip	-0,036	-0,074	0,249	0,412	0,377	0,296	0,249	0,179	0,252		
antcal	-0,078	-0,108	0,232	0,230	0,288	0,265	0,188	0,158	0,232	0,714	
PecCom	-0,095	-0,144	-0,143	-0,141	-0,013	-0,223	-0,185	-0,110	-0,171	-0,015	
PelCom	-0,045	-0,017	-0,059	-0,032	0,023	0,020	-0,040	0,000	-0,021	0,071	0,078
FolCom	-0,050	-0,003	0,092	0,052	0,026	0,001	-0,004	0,064	0,061	0,046	0,125
FolLg	-0,057	0,117	0,109	0,088	0,013	0,069	0,019	0,078	0,056	0,108	0,134
FACom	-0,056	-0,085	0,088	0,020	0,051	-0,014	-0,037	0,065	0,041	0,018	0,116
FALg	-0,051	0,055	0,077	-0,045	0,009	-0,003	-0,046	0,021	0,024	0,085	0,174
CEAdn	0,034	-0,031	0,099	-0,090	0,020	-0,029	0,000	-0,018	0,074	0,106	0,151
CELiv	0,023	0,037	0,109	0,070	0,075	0,015	-0,014	0,012	0,060	-0,009	0,060
LgEAdn	0,020	-0,045	0,089	0,102	0,096	0,129	0,063	0,038	0,032	0,061	0,112

De acordo com a Tabela 3, pode-se observar que a maioria dos caracteres relacionados à flor está correlacionada positivamente. O mesmo pode ser observado para os caracteres relacionados às folhas. Contudo, observa-se que a maioria dos caracteres de flor não se correlaciona com os de folha. Características de cor de flor possuíram correlação significativa com poucos outros caracteres, indicando haver poucos locos controlando este caráter, e de maneira geral, segregando independentemente dos demais caracteres. Para os caracteres fortemente correlacionados, espera-se que haja ligação ou efeito pleiotrópico, mas é necessário aumentar a amostra para poder evidenciar tais eventos.

Tabela 3. Correlação de Pearson para todos os caracteres avaliados.

	PecCom	PelCom	FolCom	FolLg	FACom	FALg	CEAdn	CELiv
PelCom	0,619							
FolCom	0,455	0,558						
FolLg	0,243	0,507	0,776					
FACom	0,476	0,561	0,922	0,715				
FALg	0,247	0,507	0,729	0,823	0,760			
CEAdn	0,369	0,289	0,324	0,147	0,330	0,153		
CELiv	0,083	0,248	0,545	0,437	0,574	0,432	0,211	
LgEAdn	-0,194	0,115	0,322	0,415	0,345	0,441	-0,002	0,535

*valores em negrito apresentam correlação significativa a 5% de probabilidade.

Pode-se concluir que características de cor de flor possuíram correlação significativa com poucos outros caracteres, indicando que é possível haver poucos locos controlando este caráter, e de maneira geral, segrega independentemente dos demais caracteres. Para os caracteres fortemente correlacionados, espera-se que haja ligação ou efeito pleiotrópico. Também foi possível calcular a herdabilidade, sendo que a maioria dos caracteres estudados apresentou valores superiores a 0,80, indicando que o efeito ambiental pouco influenciou no experimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GODOY, I. J.; MORAES, S. A.; ZANOTTO, M. D.; SANTOS, R. C. Melhoria do amendoim. In: Borém, A. (ed.) Melhoria de espécies cultivadas, Viçosa, Editora UFV, p. 51-94, 1999.
- GREGORY, W.C.; KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, M.P. Structure, variation, evolution and classification in *Arachis*. In: SUMMERFIELD, R.J.; BUNTING, A.H. (Ed.). Advances in legume science. Proceedings of International Legume Conference, Kew, Royal Botanic Gardens, v. 1, p.469-481, 1980.
- FÁVERO, A. P.; Cruzabilidade entre espécies silvestres de *Arachis* visando à introgressão de genes de resistência a doenças no amendoim cultivado; Tese de Doutorado, ESALQ/USP, Piracicaba, 2004.
- KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, W. C. Taxonomia del género *Arachis* (Leguminosae). Bonplandia, v.8, n.1-4, p.1-186, 1994.

MICROPROPAGAÇÃO DE HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS DE *Arachis*

Santos, R. F.¹, Silva Filho, J. G.², Torres, A.C.², Fávero, A. P.³, Valls, J.F.M.³

¹ Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília - DF – Brasil - CEP 70910-900 – E-mail: rodrigo@cenargen.embrapa.br

² Embrapa Hortaliças – Km 09 da BR-060 Rod. Brasília/Anápolis, Brasília – DF, Brasil - CEP: 70359-970 E-mail: torres@cnph.embrapa.br, getulio@cnph.embrapa.br

³ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – SAIN Parque Estação Biológica – CP 02372, 70.770-900, Brasília - DF, Brasil. E-mail: favero@cenargen.embrapa.br, valls@cenargen.embrapa.br

O amendoim (*Arachis hypogaea*) é uma importante fonte de proteínas e óleo vegetal. Os grãos de amendoim contêm cerca de 20% de proteínas e 45% de óleo. Hoje, no Brasil, maior parte da produção é consumida como alimento, na forma de grãos *in natura* e confeitos. No Brasil na safra 2002/2003 foi plantada uma área de 84,5 mil hectares, onde foram colhidas 174,9 mil toneladas de grãos. O uso de espécies de amendoim forrageiro também tem aumentado, devido ao alto teor de proteínas e capacidade de consorciação com outras espécies forrageiras (Valentim, 2002).

O gênero *Arachis* possui 69 espécies, sendo *A. hypogaea* a espécie cultivada para a produção de grãos. O provável centro de origem primário do gênero *Arachis* é a região planáltina do Mato-Grosso do Sul e o Paraguai (Krapovickas & Gregory, 1994). O uso de espécies silvestres tem se mostrado uma importante alternativa como fonte de genes em programas de melhoramento genético.

No Brasil, dentre os principais problemas da cultura, estão as doenças fúngicas de parte aérea como: mancha preta (*Cercosporidium personatum*), mancha-castanha (*Cercospora arachidicola*) e ferrugem (*Puccinia arachidis*) (Godoy et al., 1999). Genes de resistência a estas doenças foram identificados em espécies silvestres de *Arachis* e introduzidos em *A. hypogaea* por meio de hibridações interespecíficas (Simpson & Starr, 2001 ; Fávero, 2004).

A pequena quantidade de sementes obtida de plantas cultivadas em telado, faz com que a multiplicação e preservação destes genótipos por meio de técnicas de micropropagação *in vitro* seja fundamental para a continuidade do programa de melhoramento genético.

O objetivo deste trabalho foi avaliar metodologias de micropropagação para os indivíduos híbridos estudados.

Indivíduos da progênie oriunda do cruzamento *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* var. *fastigiata* cv. BR-1 x [*A. ipaënsis* KGPScS 30076 x *A. duranensis* VNvEv 14167]^c, desenvolvidas em casa de vegetação, foram usadas como fonte de explante.

Cinco dias antes da retirada dos explantes, as plantas foram pulverizadas com Benlat (2g/L) e Distreptine (200mg/L). Os explantes constituídos dos ápices caulinares (5mm de comprimento) e de gemas laterais foram excisados e desinfestados em solução de 0,6% de NaClO, com 3 gotas de Tween 20 por 100ml de solução, por 20 minutos, seguida de três lavagens com água destilada autoclavada, e inoculados em meio de cultura. O meio básico de cultura usado foi composto de macro e micronutrientes MS (Murashige & Skoog, 1962), 3% de sacarose, 0,8% de ágar e em mg/L: i-inositol 100; tiamina.HCl 1,0; piridoxina.HCl 0,5; ácido nicotínico 0,5; glicina, 2,0; 6-benzilaminopurina 1; e zeatina 0,25. O pH foi ajustado a 5,7 ± 0,1. As culturas foram mantidas em câmara de crescimento a 27°C,

fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 62mmol.m⁻².s⁻¹. Após 30 dias da inoculação, brotações com 1 a 1,5 cm de comprimento desenvolveram-se em 80% dos explantes.

Como resultado, foi observada uma média de duas gemas por brotações. A transferência de cada uma dessas gemas para o mesmo meio de cultura propiciou a multiplicação rápida *in vitro* do referido genótipo. Pode-se observar que é possível a utilização tanto de ápices caulinares como de gemas laterais para a multiplicação *in vitro* de indivíduos híbridos de *Arachis*.

FINANCIAMENTO: EMBRAPA, CNPq

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- FÁVERO, A. P.; Cruzabilidade entre espécies silvestres de *Arachis* visando à introgressão de genes de resistência a doenças no amendoim cultivado; Tese de Doutorado, ESALQ/USP, Piracicaba, 2004.
- VALENTIM, J. F.; ANDRADE, C.M.S.; FEITOZA, J.E.; SALES, M.G.; VAZ, F. A. Métodos de Introdução do Amendoim Forrageiro em Pastagens já estabelecidas no Acre. Embrapa Acre, Comunicado Técnico n.152. 2002
- GODOY, I. J.; MORAES, S. A.; ZANOTTO, M. D.; SANTOS, R. C. Melhoramento do amendoim. In: Borém, A. (ed.) Melhoramento de espécies cultivadas, Viçosa, Editora UFV, 1999. cap. , p. 51-94.
- KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, W. C. Bonplandia, v.8, n.1-4, p.1-186, 1994.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. Physiologia Plantarum. 15 473-497, 1962.
- SIMPSON, C. E.; STARR, J. L. Crop Science v.41, p.918, 2001.

CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA À *Puccinia arachidis* EM HÍBRIDOS DE ESPÉCIES SILVESTRES DE *Arachis* COM *A. hypogaea*, PARA USO NO MELHORAMENTO GENÉTICO DO AMENDOIM.

Ramos, V. R.¹; Custodio, A. R.^{2,5}; Ribeiro, V. S.³; Fávero, A. P.⁴; Valls, J. F. M.^{4,5}

¹ Doutoranda - Unesp/Botucatu - Instituto de Biociências – Deptº de Genética; ² Mestranda - UnB - Deptº de Botânica; ³ Ensino Médio - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ⁴ Pesquisador - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica - Final W5 Norte - CEP 70770-900, Brasília, DF, ⁵Bolsista do CNPq. E-mail: valeria@cenargen.embrapa.br

INTRODUÇÃO

A ferrugem, doença foliar causada pelo fungo *Puccinia arachidis* Speg. é uma das barreiras ao aumento da produtividade da cultura do amendoim, que somada às manchas foliares causadas por *Cercospora arachidicola* Hori e *Cercosporidium personatum* (Berk.& Curt.) Deighton causam perdas estimadas entre 30-50%. Rotação de culturas e a pulverização com fungicidas podem proporcionar bons resultados em culturas comerciais. No entanto, o uso de germoplasma resistente seria o método mais eficiente e econômico para o controle da doença. Várias espécies silvestres de *Arachis*, que na maioria são brasileiras, possuem níveis de resistência a pragas e doenças superiores aos encontrados em acessos de *A. hypogaea*. Desta forma, visando a introgressão de genes de resistência a doenças foliares do amendoim, foram obtidos alguns híbridos por Fávero, 2004, que são avaliados neste trabalho, quanto à resistência a *Puccinia arachidis*. A técnica de folhas destacadas de plantas tem sido utilizada com sucesso na realização de testes de patogenicidade e para avaliar a resistência de genótipos de amendoim às doenças foliares (Moraes, 1982).

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em condições de laboratório na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. Reações de doze híbridos de espécies silvestres de *Arachis* com o amendoim cultivado, *A. hypogaea*, obtidos por Fávero (2004), foram avaliados quanto a resistência à *Puccinia arachidis*, fungo causador da ferrugem do amendoim. Os genótipos analisados neste experimento são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1- Material avaliado neste trabalho.

Híbridos
1 ⇒ BR1 x [KG 30006 x GKP 10017]
2 ⇒ BR1 x [V 6389 x V 12812]
3 ⇒ Caiapó x [KG 30006 x GKP 10017]
4 ⇒ V 12548 x [KG 30076 x V 14167]
5 ⇒ Runner 886 x [KG 30076 x V 14167]
6 ⇒ BR1 x [KG 30076 x V 14167]
7 ⇒ Tatu x [KG 30076 x V 14167]
8 ⇒ Caiapó x [KG 30076 x V 14167]
9 ⇒ Mdi 1560 x [KG 30076 x V 14167]
10 ⇒ Mdi 1538 x [KG 30076 x V 14167]
11 ⇒ V 12549 x [KG 30076 x V 14167]
12 ⇒ Runner 886 x [KG 30006 x GKP 10017]
Arachis hypogaea
13 ⇒ cv. Tatu
14 ⇒ cv. BR1
15 ⇒ cv. Runner 886
16 ⇒ cv. Caiapó

A listagem das espécies, seus respectivos acessos e código BRA são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Listagem das espécies, seus respectivos acessos e código BRA.

Espécie	Acesso	BRA
<i>A. hypogaea</i> subsp. <i>fastigiata</i> var. <i>fastigiata</i>	cv. BR1	033383
<i>A. hypogaea</i>	cv. Caiapó	037371
<i>A. hypogaea</i> subsp. <i>fastigiata</i> var. <i>fastigiata</i>	cv. Tatu	011606
<i>A. hypogaea</i> subsp. <i>hypogaea</i> var. <i>hypogaea</i>	Runner 886	037389
<i>A. hypogaea</i> subsp. <i>fastigiata</i> var. <i>peruviana</i>	Mdi 1560	037401
<i>A. hypogaea</i> subsp. <i>hypogaea</i> var. <i>hirsuta</i>	Mdi 1538	037397
<i>A. hypogaea</i> subsp. <i>hypogaea</i> var. <i>hypogaea</i>	V 12548	030708
<i>A. hypogaea</i> subsp. <i>hypogaea</i> var. <i>hypogaea</i>	V 12549	030716
<i>A. aff. magna</i>	V 6389	012696
<i>A. villosa</i>	V 12812	030813
<i>A. hoehnei</i>	KG 30006	036226
<i>A. cardenasii</i>	GKP 10017	013404
<i>A. ipaënsis</i>	KG 30076	036234
<i>A. duranensis</i>	V 14167	036200

A técnica utilizada foi a de folhas destacadas, descrita por Moraes (1982), onde estas são acondicionadas individualmente em placas de petri contendo uma fina camada de algodão e um papel de filtro umedecidos com água estéril. Sob cada folha, foi colocada uma lâmina de vidro, evitando o contato direto da mesma com o

papel de filtro, permanecendo a extremidade do pecíolo envolvida com algodão umidecido.

O inóculo de *Puccinia arachidis* foi obtido através da raspagem de lesões de folhas naturalmente infectadas de amendoim, provenientes do Instituto Agronômico de Campinas. A inoculação por pincelamento, foi feita na superfície abaxial dos folíolos, utilizando-se uma suspensão com concentração ajustada para 100.000 uredosporos por ml. As placas foram mantidas em ambiente controlado, no Laboratório de Patologia de Sementes da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, sob luz alternada (10 horas luz e 14 horas escuro) e temperatura entre 25-27°C.

O delineamento utilizado foi o de Bloco Inteiramente Casualizado, com quatro repetições e cada unidade experimental representada por uma folha destacada.

Quatro acessos de *A. hypogaea*, das cultivares Tatu, BR1, Runner 886 e Caiapó foram utilizados como testemunhas por serem considerados suscetíveis ao fungo. A avaliação foi realizada 28 dias após a inoculação, através da contagem do número de lesões na superfície abaxial dos folíolos. Como os genótipos avaliados apresentavam tamanhos de folíolo muito diferentes, foi feita uma relação entre número de lesões e área foliar em mm² para cada unidade experimental. A análise dos dados foi feita utilizando-se o programa SAS, onde obteve-se a análise de variância e comparação de médias através do Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias dos resultados obtidos através da inoculação de folhas destacadas são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Genótipos e médias da relação entre número de lesões provocadas pelo fungo *Puccinia arachidis* e área foliar em mm².

GENÓTIPOS	MÉDIAS *
16 ⇒ cv. Caiapó	0,88804 a
13 ⇒ cv. Tatu	0,70079 ab
14 ⇒ cv. BR1	0,64031 b
15 ⇒ cv. Runner 886	0,54834 b
12 ⇒ Runner 886 x [KG 30006 x GKP 10017]	0,52666 bc
7 ⇒ Tatu x [KG 30076 x V 14167]	0,31985 cd
8 ⇒ Caiapó x [KG 30076 x V 14167]	0,14330 de
9 ⇒ Mdi 1560 x [KG 30076 x V 14167]	0,13371 de
10 ⇒ Mdi 1538 x [KG 30076 x V 14167]	0,13361 de
3 ⇒ Caiapó x [KG 30006 x GKP 10017]	0,09776 e
6 ⇒ BR1 x [KG 30076 x V 14167]	0,09261 e
11 ⇒ V 12549 x [KG 30076 x V 14167]	0,07699 e
5 ⇒ Runner 886 x [KG 30076 x V 14167]	0,05316 e
4 ⇒ V 12548 x [KG 30076 x V 14167]	0,04082 e
1 ⇒ BR1 x [KG 30006 x GKP 10017]	0,04024 e
2 ⇒ BR1 x [V 6389 x V 12812]	0,00994 e
CV%	31,98199

* Médias com letras iguais não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Transformação utilizada $\Rightarrow \sqrt{\log(x+1)}$.

Na análise de variância, o teste F indicou diferenças significativas ao nível de 5% de probabilidade entre os genótipos estudados.

As comparações entre as médias mostraram que os genótipos de número 3, 6, 11, 5, 4, 1 e 2 foram os mais resistentes à infecção por *Puccinia arachidis*, apresentando menor número de lesões por área foliar.

As testemunhas comprovaram sua maior suscetibilidade.

As cultivares Caiapó e Tatu foram as mais suscetíveis, apresentando altíssimos níveis de infecção. Entre estas verificou-se alto número de lesões que esporulavam.

Os demais genótipos, 12, 7, 8, 9 e 10, apresentaram um comportamento intermediário, sendo que alguns desses genótipos também apresentaram lesões com esporulação (7, 10 e 12).

Nenhum dos genótipos estudados foi considerado imune, pois mesmo os mais resistentes apresentavam ao menos uma reação de hipersensibilidade (lesão sem esporulação).

CONCLUSÕES

Nas condições deste experimento foi comprovada satisfatoriamente a introgressão de genes de resistência à *Puccinia arachidis* ao amendoim cultivado, através do cruzamento deste com espécies silvestres consideradas resistentes. Sugere-se que este material seja também avaliado à campo para que seu real potencial seja verificado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FÁVERO, A.P. Cruzabilidade entre espécies silvestres de *Arachis* visando à introgressão de genes de resistência a doenças no amendoim cultivado. Piracicaba, ESALQ/USP, 2004. 165p. Tese de Doutorado.

MORAES, S. A. & SALGADO, C. L. Summa Phytopathologica, v.8, p 39-55, 1982.

SANIDADE DE SEMENTES NA CULTURA DO AMENDOIM

Ramos, V. R.¹; Faiad, M. G. R.²; Wetzel, M. M. V. da S.²; Ribeiro, V. S.³

¹Doutoranda - Unesp/Botucatu - Instituto de Biociências - Deptº de Genética; ² Pesquisador - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ³ Ensino Médio - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica - Final W5 Norte - CEP 70770-900, Brasília, DF; (E-mail: valeria@cenargen.embrapa.br)

INTRODUÇÃO

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é uma planta cultígena sul-americana, com sementes ricas em óleo e proteínas. Possui alto valor energético, podendo conter de 21 a 36% de proteína em seus grãos. O gênero é usado de várias maneiras, como consumo in natura, produção de óleo, como planta forrageira, ornamental, além do uso de seus subprodutos em rações animais. Ocorrendo apenas em cinco países, o gênero tem sua maior diversidade no Brasil, que apresenta 64 de suas 81 espécies conhecidas (Valls, 2000). O Estado de São Paulo é atualmente o maior produtor de amendoim do Brasil, com 60.000 hectares plantados, sendo responsável por 80% da produção nacional. Entre os componentes de custo que mais oneram a cultura destacam-se os gastos com: sementes, sendo necessários 100 a 200 kg de sementes para o plantio de um hectare (representando até 60% do custo de plantio), pulverizações para o controle de pragas e doenças e a mão-de-obra, principalmente na colheita. O amendoim difere significativamente dos cereais e outras leguminosas pelo fato de suas vagens se desenvolverem sob a superfície do solo e das sementes conterem fontes concentradas de nutrientes, prontamente utilizáveis por numerosos microrganismos. Assim, os fungos presentes no solo e no ar podem invadir as sementes antes da colheita e/ou durante a secagem e o armazenamento, numa sucessão ecológica de microrganismos, determinada pela umidade, temperatura, tempo, luz, movimento de ar e danos físicos e biológicos nas vagens. Desta forma, os fungos associados às sementes e vagens de amendoim podem ser considerados em dois grupos: fungos de campo e fungos de armazenamento. (Moraes, 1985). Durante o beneficiamento e o armazenamento, o teor de umidade e os ferimentos nas sementes, produzidos por ocasião do descascamento, são os principais fatores que afetam a germinação. Os ferimentos, em ambiente favorável, propiciam condições para o desenvolvimento de fungos e bactérias presentes no solo ou levados pelas próprias sementes (Dhingra, 1980).

Na Tabela 1 é apresentada uma relação de fungos detectados em sementes de *Arachis hypogaea*, procedentes de diversas regiões brasileiras, pelos métodos de papel de filtro, exame direto e plaqueamento em meio de cultura (BDA), referente aos anos de 1980 e 1982. Em vista da pouca informação sobre o comportamento do germoplasma de amendoim em condições de armazenamento em câmara fria, foram avaliados 85 acessos de *A. hypogaea* visando a detecção de fungos associados às sementes.

Tabela 1 – Relação de fungos detectados em sementes de *A. hypogaea*, procedentes de diversas regiões brasileiras, pelos métodos de papel de filtro, exame direto e plaqueamento em meio de cultura (BDA), referente ao ano de 1982.

LOCAL	FUNGOS
Rondônia	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Chaetomium</i> spp. <i>Macrophoma</i> sp. <i>Penicillium</i> sp. <i>Rhizopus arrhizus</i>
Acre	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus</i> spp. <i>Fusarium roseum</i> <i>Fusarium</i> sp. <i>Macrophoma</i> sp. <i>Penicillium</i> sp. <i>Rhizopus arrhizus</i>
Minas Gerais	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Rhizopus arrhizus</i>
Pernambuco	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus</i> spp. <i>Rhizopus arrhizus</i>
Goiás	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Dothiorella</i> sp. <i>Fusarium</i> sp. <i>Penicillium</i> sp. <i>Rhizoctonia solani</i>
Espírito Santo	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Fusarium</i> sp. <i>Penicillium</i> sp. <i>Rhizopus arrhizus</i> <i>Rhizopus</i> sp.
Mato Grosso	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Fusarium oxysporum</i> . <i>Nigrospora</i> sp. <i>Penicillium</i> sp. <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Rhizopus arrhizus</i>
Rio Grande do Sul	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Fusarium</i> sp. <i>Penicillium</i> sp. <i>Rhizopus arrhizus</i> <i>Trichoderma</i> sp.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Patologia de Sementes da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. O teste de sanidade foi feito pelo método de incubação em papel de filtro ("blotter test"). As sementes foram submetidas a um pré-tratamento com hipoclorito de sódio a 1% por 2 minutos. Depois, foram incubadas em caixas Gerbox, distribuindo-se 25 sementes em cada recipiente, contendo 2 folhas de papel de filtro, previamente umedecidas com água estéril. O experimento foi mantido em condições controladas à temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$, sob luz negra (radiação na faixa de 320-400nm) em turnos de 12 horas luz e 12 horas escuro. A avaliação foi realizada após 8 dias de incubação, examinando-se individualmente todas as sementes, através de um microscópio estereoscópico e um microscópio composto.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram detectados os fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Cladosporium* sp., *Chaetomium* sp., *Rhizopus* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium oxysporum*. Entre os fungos encontrados, verificou-se que houve uma altíssima incidência de *Fusarium oxysporum*, deteriorando totalmente as sementes nas quais foi detectado. Os demais fungos apareceram com baixa incidência, não causando grandes danos. Além dos fungos encontrados, também foi detectada alta incidência de bactéria não identificada, provavelmente saprófita, em quase todos os acessos. Possivelmente o fato das sementes terem sido submetidas a um pré-tratamento com hipoclorito de sódio, eliminando a alta incidência de fungos saprófitas e assim a concorrência, as bactérias puderam se estabelecer.

CONCLUSÕES

As observações obtidas neste trabalho indicam a necessidade de se desenvolver mais pesquisas visando o melhor conhecimento do comportamento de patógenos em germoplasma-semente de amendoim, principalmente no que diz respeito ao local do inóculo na semente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- VALLS, J.F.M. Diversidade genética no gênero *Arachis* e a origem do amendoim. In: BANDEL, G.; AGUIAR PERECIN, M.L.R.; OLIVEIRA, G.C.X. (eds.) ENCONTRO SOBRE TEMAS DE GENÉTICA E MELHORAMENTO, 17, 2000, Piracicaba. Anais... Piracicaba: ESALQ/Depto de Genética, 2000. p19-23.
- MORAES, S.A. & MARIOTTO, P.R. Diagnóstico da patologia de sementes de amendoim no Brasil. Revista Brasileira de Sementes, Brasília, 7(1), 1985. p41-43.
- DHINGRA, O.D.; HUCHOVEJ, J.J. & CRUZ FILHO, J. Tratamento de sementes (controle de patógenos). Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa, 1980. 121p.