

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR**

Ailton Ferreira de Paula

**Caracterização morfológica, molecular e reprodutiva de
híbridos interespecíficos de *Arachis* na busca de
resistência a pragas do amendoim**

**São Carlos
2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR**

Ailton Ferreira de Paula

**Caracterização morfológica, molecular e reprodutiva de
híbridos interespecíficos de *Arachis* na busca de
resistência a pragas do amendoim**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos para obtenção do título de mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

Orientação: Dra. Alessandra Pereira Fávero
Co-Orientação: Dra. Bianca Baccili Zanotto Vigna

**São Carlos
2015**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

P324cm

Paula, Ailton Ferreira de.

Caracterização morfológica, molecular e reprodutiva de híbridos interespecíficos de *Arachis* na busca de resistência a pragas do amendoim / Ailton Ferreira de Paula. -- São Carlos : UFSCar, 2015.
94 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2015.

1. Genética vegetal. 2. Amendoim. 3. Espécies silvestres. 4. Melhoramento genético. 5. *Enneothrips flavens*. 6. *Stegasta bosquella*. I. Título.

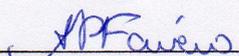
CDD: 581.15 (20^a)



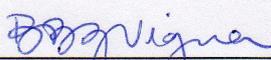
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia
Molecular

Folha de Aprovação

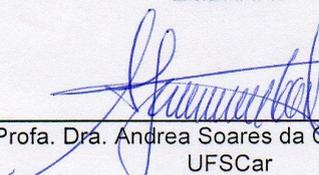
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Ailton Ferreira de Paula, realizada em 23/03/2015:



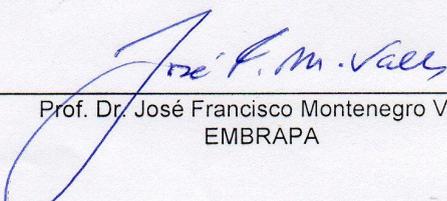
Profa. Dra. Alessandra Pereira Fávero
UFSCar



Profa. Dra. Bianca Baccili Zanotto
EMBRAPA



Profa. Dra. Andrea Soares da Costa Fuentes
UFSCar



Prof. Dr. José Francisco Montenegro Valls
EMBRAPA

Agradecimentos

Agradeço:

À minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Alessandra Pereira Fávero pela orientação e pela grande ajuda no desenvolvimento desse trabalho.

A Dr^ª. Bianca Baccili Zanotto Vigna pela coorientação quanto à biologia molecular.

Ao Gilberto Cesar Agostinho, Natal Silvestre, Dr^º. Wilson Malagó Jr. e a Dr^ª Flavia Aline Bressani Donatoni pela ajuda na utilização dos laboratórios.

À secretária do PPGGEV Ivanildes Menezes.

A CAPES pelo financiamento.

Ao programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos por permitir essa valiosa experiência.

Aos colegas de pesquisa: Rodrigo Roucourt Cezario, Lorena Marciano Rey Princigalli, Nádia Elisa Gonçalves, Gabrielle Correa de Melo, Naiana Barbosa Dinato, Daniel Daizo Shitara, Carolina Périco Graciano, Jessica Natalia Zanin dos Santos.

À Igreja Adventista da Promessa (IAP) de São Carlos pelo carinho, amor, e por tudo que tem feito por mim durante esses dois anos que passamos junto. Pelos momentos de descontração, e principalmente pelos momentos de comunhão que passamos junto adorando a Deus.

Aos meus pais Luiz Gregorio de Paula e Zilda Ferreira de Paula pelo apoio em todas as fases da minha vida e a quem eu devo a minha eterna gratidão.

Mais uma vez obrigado a todos e perdão se eu esqueci alguém.

**Caracterização morfológica, molecular e reprodutiva de
híbridos interespecíficos de *Arachis*
resistentes a pragas**

Resumo

O amendoim (*Arachis hypogaea*) representa, ao nível mundial, uma importante fonte de proteína e óleo. As pragas e doenças da parte aérea estão entre os fatores que mais limitam a produção economicamente sustentável do amendoim no Brasil. Dentre as pragas, o tripses e a lagarta-do-pescoço-vermelho são consideradas as pragas-chave no Estado de São Paulo. Para diminuir o custo da produção diante ao manejo destas pragas, o melhoramento genético para a obtenção de plantas resistentes a partir de plantas silvestres é uma alternativa viável. O principal entrave no melhoramento genético é que a grande maioria das espécies silvestres de *Arachis* é diplóide, enquanto que a espécie cultivada é alotetraploide. Para que a barreira da ploidia entre o amendoim silvestre e o cultivado possa ser quebrada, é necessária a obtenção de híbridos interespecíficos de genoma AB. Tais híbridos devem ser tratados com colchicina, no intuito de induzir a poliploidização e obter híbridos férteis com dois genomas completos distintos (anfidiplóide), que poderão ser cruzados com *A. hypogaea* por terem a mesma ou similar constituição genômica da espécie cultivada. Os objetivos do trabalho foram identificar híbridos oriundos de cruzamentos realizados entre espécies silvestres resistentes a tripses e a lagarta-do-pescoço-vermelho de genoma A, B ou K, identificar híbridos entre um anfidiplóide e *A. hypogaea* e caracterizar os híbridos e seus genitores 1) via marcadores moleculares tipo microssatélites, 2) quanto à viabilidade de grãos de pólen e 3) quanto a sua morfologia. Os marcadores moleculares foram genotipados em gel de poliacrilamida com padrão de 10 pares de base, para analisar os dados da viabilidade de grãos de pólen foi utilizada análise de variância e teste de médias Tukey e os dados da caracterização morfológica foram analisados via análise de componentes principais. Foram analisados seis locos microssatélites polimórficos, em vinte cinco plantas F₁, sendo quatorze delas resultado de autofecundação e onze de hibridação, totalizando três combinações híbridas distintas diplóides mais quatro plantas híbridas entre *A. hypogaea* e o anfidiplóide An 13. Os dados de viabilidade de pólen corroboraram a análise molecular na identificação dos híbridos, observando-se que o An

13 possuía alta viabilidade de grãos de pólen e os híbridos interespecíficos possuíam valores muito abaixo dos genitores e dos indivíduos autofecundados da progênie. Quanto às análises morfológicas, dos 63 descritores mensurados, os descritores do eixo central foram os que mais expressaram a variação morfológica observada. A viabilidade de grãos de pólen das plantas híbridas F₁ entre *A. hypogaea* e o anfidiplóide An 13 foi acima de 76%, mostrando a possibilidade de introgressão de novos genes de interesse em *A. hypogaea*.

Palavras-chave: *Arachis*, espécies silvestres, pré-melhoramento, *Enneothrips flavens*, *Stegasta bosquella*.

Morphological, molecular and reproductive characterization of interspecific hybrids of *Arachis* resistant to pests

Abstract

The peanut (*Arachis hypogaea*) is, worldwide, an important source of protein and oil. Pests and foliar diseases are among the factors that limit the economically sustainable production of peanuts in Brazil. Among the pests, thrips and the rednecked peanutworm are considered important pests in São Paulo State. To decrease the cost of production on the management of these pests, genetic improvement to obtain resistant varieties from wild plants is a viable alternative. The main obstacle in the genetic improvement is that the vast majority of wild species of *Arachis* is diploid, while the cultivated species is allotetraploid. For the barrier of ploidy between the wild and the cultivated peanut to be broken, it is necessary to obtain interspecific hybrids genome AB. Such hybrids should be treated with colchicine to induce polyploidy and get fertile hybrids with two distinct complete genomes (amphidiploid), which can be crossed with *A. hypogaea* to get the same or similar genomic constitution of the cultivated species. The aim of the research were to identify hybrids derived from crosses made between wild species with A, B or K genome that are resistant to thrips and the rednecked peanutworm and hybrids from one amphidiploid and *A. hypogaea*, characterize the hybrids and their parents 1) by microsatellite molecular markers, 2) by pollen viability and 3) by their morphology. The molecular markers were genotyped in polyacrylamide gel with standard 10 base pairs. The viability of pollen grains was used to analyze the data of analysis of variance and mean Tukey test, and morphological data were analyzed by Principal Component Analysis. Six polymorphic microsatellite loci were analyzed in 25 F₁ plants, 18 of them result of selfing and six of hybridization with a total of three different hybrid combinations plus four hybrid plants from across between the amphidiploid An 13 and *A. hypogaea*. The pollen viability data corroborated the molecular analysis in the identification of hybrids, noting that An 13 had high viability of pollen grains and interspecific hybrids had low values when compared to their parents and selfed individuals of progeny. From the 63 morphological descriptors measured the ones from the main axis expressed the most morphological variation observed. Pollen viability of F₁ hybrid plants obtained by cross among *A. hypogaea* and the

amphidiploid An 13 was above 76%, showing the possibility of new interesting genes introgression in *A. hypogaea*

Keywords: *Arachis*, wild species, pre-breeding, *Enneothrips flavens*, *Stegasta bosquella*.

SUMÁRIO

Conteúdo	
Resumo	iii
Abstract.....	v
SUMÁRIO	vii
Lista de Figuras	7
Lista de Tabelas	10
Lista de Abreviações e Siglas	13
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Produção de amendoim	18
2.2 Pragas como fatores importantes e limitantes na produção de amendoim no Brasil	20
2.2.1 Tripes-do-prateamento (<i>Enneothrips flavens</i> Moulton, 1941) (<i>Thysanoptera: Thripidae</i>).....	20
2.2.2 Lagarta-do-pescoço-vermelho (<i>Stegasta bosquella</i> Chambers, 1875) (<i>Lepidoptera: Gelechiidae</i>).....	22
2.2.3 Formas de controle	22
2.3 Infestações por vírus.....	23
2.4 Pré-melhoramento genético em <i>Arachis</i>	24
2.5 Estrutura floral e modo de fertilização	27
2.6 Caracterização reprodutiva.....	29
2.7 Caracterização molecular	29
2.8 Caracterização morfológica.....	30
2.9 Tratamento com colchicina	31
3. OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo Geral	32
3.2 Objetivos específicos	32
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1 Material Vegetal	33
4.2 Cruzamentos	34
4.3 Germinação das sementes.....	39

4.4 Viabilidade de grãos de pólen	40
4.5 Caracterização molecular	42
4.5.1 Genotipagem e análise dos dados	44
4.6 Caracterização morfológica	44
4.7 Tratamento com colchicina	46
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1 Primeira estação de cruzamentos.....	47
5.1.1 Cruzamentos	47
5.1.2. Germinação dos indivíduos das progênes e genitores	49
5.1.3 Caracterização reprodutiva	52
5.1.4 Caracterização molecular	54
5.1.5 Caracterização Morfológica	56
5.2 Segunda estação de cruzamentos.....	60
5.2.1 Cruzamentos	60
5.2.2 Germinação dos indivíduos das progênes e genitores	62
5.2.3 Considerações quanto à germinação dos indivíduos	62
5.2.4 Caracterização reprodutiva	64
5.2.5 Considerações quanto à caracterização reprodutiva.....	65
5.2.6 - Caracterização molecular	67
5.2.7 Caracterização Morfológica	69
5.2.8 Considerações quanto a morfologia e importância dos acessos para o programa de melhoramento	72
5.3 Hibridação entre <i>A. hypogaea</i> cv. IAC OL 4 e o anfidiplóide An 13	74
5.3.1 Cruzamentos	74
5.3.2 Germinação dos indivíduos das progênes e genitores.....	74
5.3.3 Caracterização reprodutiva	75
5.3.4 Caracterização molecular	76
5.3.5 Caracterização Morfológica	78
6. CONCLUSÕES	84
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema do cruzamento representando a hipótese da origem de amendoim <i>Arachis hypogaea</i>	25
Figura 2. Flor de amendoim dissecada mostrando: (a) hipanto, (b) sépalas, (c) eEstandarte, (d) asas, (e) quilha, (f) estames, (g) estigma e estilete. Adaptado de Nigam et al. (1990). 27	27
Figura 3. Três grupos de estames: (a) dois estaminódios estéreis, (b) quatro estames globosos com anteras dorsifixas e (c) quatro estames com anteras adnatas oblongas. Adaptado de Nigam et al. (1990).	28
Figura 4. Botão floral do genitor feminino <i>A. magna</i> V 13751.	35
Figura 5. Flor do genitor feminino <i>A. magna</i> V 13751 emasculada e polinizada artificialmente.	35
Figura 6. “Peg” de <i>A. vallsii</i> V 7635 x <i>A. kuhlmannii</i> V 9243 marcado com identificação colorida e com a flor na ponta.	36
Figura 7. “Peg” de <i>A. vallsii</i> V 7635 x <i>A. kuhlmannii</i> V 9243 marcado com identificação colorida amarrada ao suporte central.	36
Figura 8. “Pegs” do genitor feminino IAC OL4 marcados com identificação colorida e amarrados ao suporte central.	37
Figura 9. Máquina de peneirar amendoim utilizada para realizar a colheita.	38
Figura 10. Estufa utilizada para o crescimento do amendoim durante a estação fria.	40
Figura 11. Grãos de pólen corados com carmim acético 2% com glicerina (A) e tetrazólio 0,25% (B).	41
Figura 12. Contagem dos grãos viáveis e inviáveis.	41
Figura 13. Grãos de pólen corados com carmim acético 2% com glicerina (aumento de 100 X). A) Grãos de pólen do híbrido V 13751 x V 13250, as flechas vermelhas apontam grãos inviáveis. B) Grãos de pólen do acesso V13751.	41
Figura 14. Grãos de pólen de KG 30097 corados com tetrazólio 0,25% (aumento de 100 X). As flechas vermelhas apontam grãos inviáveis.	42
Figura 15. Grãos de pólen de V 13751 x V 9243 corados com tetrazólio 0,25% (aumento de 100 X). As flechas vermelhas apontam grãos inviáveis.	42
Figura 16. Observação de descritores morfológicos. A) Utilização do paquímetro B) Utilização do microscópio estereoscópio na observação de pêlos e cerdas.	44

- Figura 17. Indivíduos atacados por fungos. A) *A. magna* KG 30097. B) *A. magna* V 13751 x *A. kuhlmannii* V 9243..... 51
- Figura 18. Perfil de amplificação do marcador RI2A06 em gel de poliacrilamida 6% para os indivíduos da primeira caracterização. Indivíduos: KG 30097 (10); V 13751 (11); V 9243 (12); V 13250 (13); V 6325 (14); KG 30097 x V 9243 (1); KG 30097 x V 9243 (2); KG 30097 x V 9243 (3); V 13751 x V 9243 (4); V 13751 x V 9243 (5); V 13751 x V 9243 (6); An 13 (16); V 13751 x V 13250 (7); V 13751 x V 13250 (8); KG 30097 x V 6325 (9). As flechas indicam a banda de 160pb a ser observada para a genotipagem. Flechas em verde indicam os híbridos, em azul, os genitores masculinos e em rosa, o genitor feminino. 56
- Figura 19. Gráfico biplot resultante da primeira estação de cruzamento, obtido por meio da análise de componentes principais considerando os 63 descritores para os componentes 1 e 2. Os marcadores em triângulo são os genitores femininos, em círculos os genitores masculinos, e representando as progênes, em quadrado as plantas híbridas, e em losango plantas oriundas de autofecundação. 60
- Figura 20. Indivíduos de *A. magna* V 13751 x *A. kuhlmannii* V 7639 que morreram logo após serem transplantados para os vasos. 63
- Figura 21. Perfil de amplificação do marcador RM14B11 em gel de poliacrilamida 6% para os indivíduos da segunda caracterização. Indivíduos: V 7635 (6), Wi 1291 (7), KG 30097 (8), V 9243 (9), V 6325 (10), V 7639 (11), KG 30097 x V 7639 (1), V 7635 x V 7639 (2), V 7635 x V 9243 (3), Wi 1291 x V 6325 (4); Wi 1291 x V 6325 (5). As flechas indicam a banda de 342pb a ser observada para a genotipagem. Flecha em verde indica o híbrido, em azul, o genitor masculino e em rosa, o genitor feminino. 69
- Figura 23. Gráfico biplot resultante da segunda estação de cruzamento, obtido por meio da análise de componentes principais considerando os 63 descritores para os componentes 1 e 2. Os marcadores em triângulo são os genitores femininos, em círculos os genitores masculinos, e representando as progênes, em quadrado a planta híbrida, e em losango plantas oriundas de autofecundação. 71
- Figura 24. Flores do genitor feminino (KG 30097), do genitor masculino (V7639) e do híbrido (KG 30097 x V 7639). A flecha mostra o hipanto, um dos descritores avaliados neste estudo. 72

Figura 25. Perfil de amplificação do marcador IPAHM-406, para em indivíduos da progênie de IAC OL4 x An 13. Indivíduos: IAC OL4 x An 13 (1 a 10), IAC OL4 (11) e An 13 (12). As flechas indicam a banda de 320pb a ser observada para a genotipagem. Flechas em verde indicam os híbridos, em azul, os genitor masculino e em rosa, o genitor feminino.

..... 78

Figura 26. Gráfico biplot resultante do cruzamento entre IAC OL4 x An 13, obtido por meio da análise de componentes principais considerando os 63 descritores para os componentes 1 e 2. O marcador em triângulo representa o genitor feminino (11- IAC OL4), em círculo o genitor masculino (14-An 13), e representando as progênies, em quadrado as plantas híbridas (1 a 4-IAC OL4 x An 13), e em losango plantas oriundas de autofecundação (6 a 10 - IAC OL4 x An 13).

..... 81

Figura 27. Progênie de IAC OL4 x An 13. A flecha azul indica as plantas resistentes a ácaro, resultado de hibridação. A flecha vermelha indica as plantas suscetíveis a ácaro, resultado de autofecundação.

..... 82

Figura 28. Genitores e progênie de IAC OL4 x An 13. A flecha azul representa as plantas resistentes a ácaro (An 13 e híbridos). A flecha vermelha representa as plantas suscetíveis a ácaro (IAC OL4 e autofecundadas).

..... 83

Lista de Tabelas

Tabela 1. Cronograma das atividades.....	33
Tabela 2. Acessos utilizados como genitores resistentes a pragas, código BRA, nome da espécie, genoma, município, unidade federativa, latitude, longitude e altitude da área de coleta.....	34
Tabela 3. Combinações realizadas para as estações de cruzamentos. Espécies de genoma B, K e não identificado e <i>A. hypogaea</i> utilizados como genitores femininos e espécies de genoma A e um anfidiplóide como genitores masculinos.....	38
Tabela 4. Marcadores microssatélites (SSR) utilizados neste trabalho.....	43
Tabela 5. Descritores avaliados e respectivos códigos.....	45
Tabela 6. Combinações entre espécies para a safra 2012/2013. Genitor Feminino (GF), Genitor Masculino (GM), Número de Polinizações (NPO), Número de “Pegs” (NP), Número de Abortos (NA), Número de sementes (NS), Número de Híbridos (NH) e Porcentagem de Sucesso (PS) estão indicados.....	48
Tabela 7. Germinação de sementes para a safra 2013/2014. Genitor Feminino (GF), Genitor Masculino (GM), Número de Sementes (NS), Número de Sementes Germinadas (NSG), Número de Germinação Espontânea (NGE), Número de Plantas Envasadas (NPE) estão indicados.....	50
Tabela 8. Análise de variância em acessos e repetições, corados com tetrazólio 0,25%....	52
Tabela 9. Análise de variância em acessos e repetições, corados com carmim acético 2% com glicerina.....	52
Tabela 10. Porcentagem de grãos de pólen viáveis dos indivíduos avaliados na primeira caracterização, segundo as duas técnicas de coloração utilizadas.....	53
Tabela 11. Identificação de autofecundação ou hibridização por marcadores microssatélites em indivíduos dos cruzamentos interespecíficos de <i>Arachis</i> spp. da primeira estação cruzamentos.....	55
Tabela 12. Análise de componentes principais dos descritores morfológicos avaliados na primeira caracterização. Autovalores, diferença entre os componentes, proporção e proporção acumulada estão indicados.....	56
Tabela 13. Contribuição dos descritores morfológicos para a análise de componentes principais nos híbridos da primeira estação de cruzamento.....	58

Tabela 14. Combinações entre espécies para a safra 2013/2014. Genitor Feminino (GF), Genitor Masculino (GM), Número de Polinizações (NPO), Número de “pegs” (NP), Número de Abortos (NA), Número de Sementes (NS), Número de Híbridos (NH) e Porcentagem de Sucesso (PS) estão indicados.	61
Tabela 15. Germinação de sementes da Safra 2014/2015. Genitor Feminino (GF), Genitor Masculino (GM), Número de Sementes (NS), Número de sementes Germinadas (NSG), Número de Plantas Envasadas (NPE) estão indicados.	62
Tabela 16. Análise de variância em acessos e repetições, corados com carmim acético 2% com glicerina, safra 2013/2014	64
Tabela 17. Análise de variância em acessos e repetições, corados com tetrazólio 0,25%, safra 2013/2014	64
Tabela 18. Porcentagem de grãos de pólen viáveis dos indivíduos avaliados na segunda caracterização, segundo as duas técnicas de coloração utilizadas.....	65
Tabela 19. Identificação de autofecundação ou hibridização por marcadores microssatélites em indivíduos dos cruzamentos interespecíficos de <i>Arachis</i> spp. da segunda estação cruzamentos.	68
Tabela 20. Análise de componentes principais dos descritores morfológicos avaliados na segunda caracterização. Autovalores, diferença entre os componentes, proporção e proporção acumulada estão indicados.	69
Tabela 21. Contribuição dos descritores morfológicos para a análise de componentes principais no híbrido resultante da segunda estação de cruzamento.	70
Tabela 22. Análise de variância em acessos e repetições, corados com carmim acético 2% com glicerina para os genitores e indivíduos da progênie de IAC OL4 x An 13.....	75
Tabela 23. Análise de variância em acessos e repetições, corados com tetrazólio 0,25% para os genitores e indivíduos da progênie de IAC OL4 x An 13.....	75
Tabela 24. Porcentagem de grãos de pólen viáveis para os genitores e indivíduos da progênie de IAC OL4 x An 13.	76
Tabela 25. Identificação de autofecundação ou hibridização por marcadores microssatélites em indivíduos dos cruzamentos entre IAC OL4 x An 13.....	77
Tabela 26. Análise de componentes principais dos descritores morfológicos avaliados na segunda caracterização. Autovalores, diferença entre os componentes, proporção e proporção acumulada estão indicados.	79

Tabela 27. Contribuição dos descritores morfológicos para a análise de componentes principais nos híbridos de IAC OL4 x An 13.....	80
Tabela 28. Plantas resultantes de hibridação e autofecundação após caracterização reprodutiva, molecular e morfológica.	84

Lista de Abreviações e Siglas

An – Anfidiplóide
CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento
CTAB – Cationic Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide
DNA – ácido desoxirribonucleico
dNTP – Desoxirribonucleotídeo Trifosfato
GF - Genitor Femino
GM - Genitor Masculino
Godoy - Ignácio José de Godoy
IBPGR - International Board for Plant Genetic Resources
NA - Número de Abortos
NGE - Número de Germinação Espontânea
NP - Número de Pegs
NPE - Número de Plantas Envasadas
NPO – Número de Polinizações
NS - Número de Sementes
NSG - Número de sementes Germinadas
P - Parental
pb – Pares de Base
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
PS - Porcentagem de Sucesso
SAS – Statistical Analysis System
U - Unidade
USDA - United States Department Of Agriculture

1. INTRODUÇÃO

Devido ao seu sabor, aroma e alto teor de óleo e proteína, o amendoim é uma importante matéria-prima para confeitarias, indústrias alimentícias, além de potencial fonte energética para biocombustível. Seu impacto econômico se deve principalmente à sua grande diversidade de formas de consumo (SANTOS et al., 2005). Os grãos possuem teores de óleo e proteína em torno de 45% e 23%, respectivamente (GODOY et al., 2005).

Considerando as estatísticas oficiais, na safra 2013/2014, o Brasil produziu 315,8 mil toneladas de amendoim, em uma área aproximada de 92,2 mil hectares. No Estado de São Paulo, foram produzidas 286,8 mil toneladas, fazendo deste o principal produtor no país, com 90,8 % da produção nacional (CONAB, 2015).

Segundo Gallo et al. (2002) existem muitas pragas que são limitantes de produção para o cultivo do amendoim, como lagarta elasm (*Elasmopalpus lignosellus*), lagarta-rosca (*Agrotis ipsilon*), lagarta-do-pescoço-vermelho (*Stegasta bosquella*), lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*), percevejo castanho (*Scaptocoris castanea* e *Atarsocoris brachiariae*), percevejo-preto (*Cyrtomenus mirabilis*), tripes (*Enneothrips flavens*) e (*Caliothrips brasiliensis*), cigarrinha (*Empoasca sp*) e os ácaros (*Tetranychus urticae* e *T. evansi*). Porém, o tripes e a lagarta-do-pescoço-vermelho são considerados as pragas chaves limitantes de produção para a cultura no Estado de São Paulo.

Como o tripes e a lagarta-do-pescoço-vermelho se alojam nos folíolos novos e ainda fechados do amendoim, estes estão protegidos contra os inseticidas de contato, assim sendo, o controle destas duas pragas deve ser realizado com a utilização de inseticidas sistêmicos, o que acaba encarecendo o manejo.

A obtenção de cultivares resistentes a pragas através do melhoramento genético é uma alternativa para reduzir o custo na produção para esta cultura. Os trabalhos têm detectado alta resistência em diversas das espécies silvestres, bem como em anfidiplóides (GODOY et al., 2011). A utilização eficiente de germoplasma exótico de amendoim beneficia programas de pesquisa que objetivam a produção de novas cultivares melhoradas, a partir de germoplasma adaptado a tipos potenciais de resistência a doenças e pragas, com a identificação de componentes superiores de qualidade (WYNNE e HALWARD, 1989).

Segundo Valls e Simpson (2005), o amendoim é uma espécie cujo gênero ocorre naturalmente em cinco países da América do Sul, inclusive no Brasil. Pertence à Família *Fabaceae* e ao Gênero *Arachis*, cujas espécies estão alocadas em nove seções distintas. Este trabalho tem como foco a seção *Arachis*, que possui 31 espécies silvestres mais o amendoim cultivado (*Arachis hypogaea*).

Projetos específicos em pré-melhoramento de amendoim no Brasil que possibilitaram a realização deste trabalho foram iniciados em 2000, com apoio da Fapesp, seguido com parcerias entre Embrapa, IAC, APTAs Regionais e UNESP, com apoios financeiros da Embrapa (em vigência atualmente) e CNPq.

Durante esse período, algumas etapas do pré-melhoramento foram iniciadas, como a caracterização de espécies resistentes a pragas, gerando um conjunto de conhecimentos iniciais à disposição deste projeto (JANINI et al., 2010a; JANINI, 2011) bem como os primeiros materiais genéticos visando resistência a doenças.

Os primeiros trabalhos da equipe (FÁVERO, 2004; FÁVERO et al., 2009) geraram informações valiosas sobre o potencial de resistência a doenças em diversos acessos de *Arachis spp.* da coleção de germoplasma disponível. Paralelamente, trabalhos envolvendo o anfidiplóide *A. ipaënsis* e *A. duranensis* contribuíram para o estudo da evolução da espécie cultivada, constituindo-se em um marco na estratégia do uso de anfidiplóides para superar a barreira de incompatibilidade com o amendoim cultivado (FÁVERO et al., 2006). Ao mesmo tempo, iniciaram-se, a partir deste anfidiplóide, os primeiros cruzamentos e seleção visando à introgressão de genes silvestres de resistência à mancha preta no amendoim cultivado (SANTOS et al., 2011a).

Estes primeiros anfidiplóides desenvolvidos pela equipe são utilizados em diversos trabalhos, tanto visando o melhoramento genético do amendoim quanto trabalhos de desenvolvimento de ferramentas genéticas e genômicas, no Brasil e no exterior (FONCÉKA et al., 2012; LEAL-BERTIOLI et al., 2009, 2012).

Novos anfidiplóides vêm sendo desenvolvidos (FÁVERO et al., 2006) e diversos estudos de caracterização morfológica e reprodutiva têm sido realizados, comparando-se híbridos interespecíficos diplóides estéreis e seus respectivos anfidiplóides, observando o efeito de gigantismo em estômatos, estruturas foliares e florais (OLIVEIRA et al., 2008).

Com a implementação da parceria Embrapa – IAC e a inclusão de outros colaboradores ao grupo intensificaram-se os trabalhos de prospecção de caracteres desejáveis no germoplasma silvestre de *Arachis*. Informações sobre a germinação e dormência das sementes silvestres foram obtidas (CARREGA et al., 2010), assim como a composição química das sementes (CARVALHO et al., 2008) e resistência às doenças foliares (CARREGA et al., 2009a; FÁVERO et al., 2008; MICHELOTTO et al., 2008; SANTOS et al., 2008, 2011b), bem como iniciaram-se os estudos para busca de resistência ou tolerância de espécies silvestres ao tripses, *Enneothrips flavens* (CROSARIOL NETTO et al., 2009; MICHELOTTO et al., 2010; JANINI et al., 2008, 2010a, 2010b) e lagarta-do-pescoço-vermelho, *Stegasta bosquella* (JANINI et al., 2008b, 2010c; CARREGA et al., 2009b).

Em todos os países que possuem programas de melhoramento de amendoim, apenas uma pequena porcentagem da diversidade genética presente nas coleções é aproveitada. Isto ocorre, em alguns casos, porque o germoplasma não está totalmente caracterizado para identificação de características de interesse. Em outros casos, ocorre porque os programas de introgressão de genes, dificultados por barreiras genéticas, envolvem estratégias a longo prazo, inibindo os melhoristas a ampliar essa diversidade. Assim, a tendência é o estreitamento da base genética da cultura, dificultando a criação de cultivares mais resistentes a pragas e doenças ou limitando os ganhos genéticos para outros caracteres de importância para os agricultores ou para o mercado dos produtos.

Em pesquisas realizadas no Brasil e em diversos países, no caso das doenças foliares, várias espécies do gênero *Arachis* têm sido consideradas altamente resistentes (STALKER e MOSS, 1987; PANDE e RAO, 2001; FÁVERO et al., 2001, 2009). No caso das pragas aqui citadas, principalmente a lagarta-do-pescoço-vermelho, as pesquisas são mais restritas porque elas ocorrem como pragas importantes apenas aqui no Brasil (MICHELOTTO et al., 2013b).

No Brasil, não existe um anfidiplóide que tenha sido desenvolvido e selecionado para resistência a pragas, nem uma cultivar com essa característica disponível no mercado para o uso do agricultor. Por isso, não se sabe como esses genes envolvidos na resistência vão se comportar quando submetidos à hibridação e posteriormente ao tratamento com a colchicina. Acredita-se que é possível a obtenção de híbridos diplóides e

anfidiplóides a partir dos cruzamentos desses acessos resistentes aos insetos-pragas supracitados.

A Embrapa possui até o momento dez anfidiplóides disponíveis, que foram selecionados para resistência a doenças. A partir deste projeto pretende-se adicionar novos híbridos, agora selecionados para resistência a pragas. Esses indivíduos resistentes tornar-se-ão uma valiosa fonte genética a ser utilizada no desenvolvimento de cultivares a serem utilizadas pelos agricultores.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Produção de amendoim

O amendoim é considerado como a quarta maior cultura oleaginosa no mundo, com 10,23% do total da safra, estando atrás da soja, algodão e colza. Segundo USDA (2015) a produção mundial em 2012/2013 foi de 40,12 milhões de toneladas. Os principais produtores em 2013 foram a China (41,60%), Índia (12,46%), Nigéria (7,65%), Estados Unidos da América (7,62%), Burma (3,41%), Indonésia (2,86%), Sudão (2,56) e Argentina (2,56%).

O amendoim pode ser cultivado em muitos tipos diferentes de solos, mas a produtividade é maior quando o solo é bem drenado, com certo grau de fertilidade e de textura arenosa, para que os “pegs” possam entrar no solo e para que não haja muita perdas de grãos durante a colheita (BELTRÃO et al., 2009). O solo deve ser bem preparado para facilitar a germinação, o desenvolvimento da planta e as trocas respiratórias entre o solo e as vagens durante a frutificação. É também de grande importância o manejo dos elementos nutricionais para obter maior produtividade. A maioria destes elementos ficam concentrados na parte vegetativa da planta, assim sendo, podem voltar para o solo após a colheita (BOLONHEZI et al., 2013).

Segundo Reichardt (1987) o amendoim pode ser plantado em várias condições agroecológicas, e que vai determinar a produção é a escolha da cultivar e a interação desta com a temperatura e as condições hídricas. Expõem ainda que cultura terá um bom desenvolvimento desde que a temperatura média esteja entre 22°C e 29°C e quantidade de chuva da sementeira a colheita esteja entre 500 mm e 700 mm.

Para o estado de São Paulo existem duas épocas em que o amendoim pode ser plantado. A primeira é chamada de safra das “águas” que tem o período de sementeira entre os meses de setembro/outubro, com colheita no mês de janeiro. Quando comparada com a segunda época de plantio a produtividade é maior, mas também ocorre maior incidência de doenças e de germinação de sementes nas vagens devido a elevada pluviosidade. Esta época é a preferida dos agricultores, pois o amendoim é plantado em

rotação com a cana-de-açúcar, e nos meses de janeiro/fevereiro a área de cultivo já deve estar disponível para a renovação do canavial. A segunda época é chamada safra da “seca” que tem a semeadura no final de janeiro a fevereiro com colheita no mês de maio. Quando comparada com a primeira época de plantio, a produção é menor devido a atraso na maturação das semente, pois a colheita é feita em período com temperaturas mais baixas, porém a incidência de doenças é menor, e menos sementes germinam nas vagens devido a pluviosidade ser menor (BOLONHEZI et al., 2013). Segundo o Registro Nacional de Cultivares há, para o ano de 2015 o total de 27 cultivares de amendoim (*Arachis hypogaea*) disponíveis para o plantio. Estas sementes foram produzidas pelo Instituto Agronômico de Campinas (18 cultivares), Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (quatro cultivares), Wilco do Brasil (duas cultivares), El Carmen Sementes do Brasil Ltda (duas cultivares) e Instituto Agronômico do Paraná (uma cultivar). O Brasil produziu amendoim em larga escala, prioritariamente para fabricação de óleo, entre as décadas de 1950 e 1970. Com a expansão da soja no mercado internacional, a cultura do amendoim teve reduzido o seu volume de produção e passou a ser explorada visando à indústria de doces e confeitos. A partir do final da década de 1990, o Brasil voltou a registrar crescimento da área plantada e produção, abastecendo o seu mercado interno e tornando-se também exportador do produto *in natura* (FREITAS e AMARAL, 2002).

O Brasil ocupa o 17º lugar em produção, mas a produtividade é a 3º do mundo (USDA, 2015). Aproximadamente 80% da produção de amendoim no Brasil está localizada no Estado de São Paulo. Segundo estudos da Conab (2015) que monitoraram as safras de amendoim no Brasil desde 1977 a 2013, em 1977 o Brasil produziu 314,3 mil toneladas em uma área de 222,4 mil hectares, já em 2013 o Brasil produziu 326,3 mil toneladas em uma área de 96,6 mil hectares. Estes números revelam a importância do melhoramento genético e de novas tecnologias para o cultivo do amendoim, pois o Brasil produziu em 2013 aproximadamente a mesma quantidade que em 1977, isso com uma área de cultivo bem menor, indicando que houve um grande aumento na produtividade.

Com a tendência para modernização tecnológica da produção agroindustrial e ampliação do mercado, a cultura tem despertado o interesse de agricultores tecnicados em outras regiões do país, nos Estados de Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Bahia.

2.2 Pragas como fatores importantes e limitantes na produção de amendoim no Brasil

As pragas e doenças da parte aérea estão entre os fatores que mais limitam a produção economicamente sustentável do amendoim no Brasil. A cultura do amendoim na região Centro-Sul do Brasil deve estar protegida quimicamente das pragas, especialmente dos insetos que atacam a parte aérea, para que as máximas produtividades sejam obtidas. No Brasil, o tripes-do-prateamento (*Enneothrips flavens* Moulton) e a lagarta-do-pescoço-vermelho (*Stegasta bosquella* Chambers) são considerados pragas-chave, pelos prejuízos causados, ocorrência generalizada nas culturas e elevados níveis populacionais (CALCAGNOLO et al., 1974; GALLO et al., 2002). Estimam-se em cerca de 30% as reduções de produtividade na ausência de controle ou pelo controle químico não eficiente desses insetos (JANINI, 2011). As infestações desses insetos têm um aspecto característico importante e peculiar: ambos se alojam nos brotos (ponteiros) dos ramos, provocando danos mais ou menos severos ao desenvolvimento vegetativo das plantas. Este hábito de ataque faz com que os produtos químicos (inseticidas) a serem usados para o seu controle sejam de atuação sistêmica, o que torna esse controle mais eficiente, porém mais caro.

2.2.1 Tripes-do-prateamento (*Enneothrips flavens* Moulton, 1941) (*Thysanoptera: Thripidae*)

Os tripes são pequenos insetos sugadores da Ordem Thysanoptera, medindo geralmente entre 0,5 e 5,0 mm de comprimento. A maioria dos tripes se nutre de material vegetal (fitófagos) e, quando se alimentam, destroem as células da planta, podendo também ser vetores para outros organismos (BORROR e DE LONG, 1969).

Rosseto et al. (1968) encontraram a espécie *E. flavens* nos ápices vegetativos de amendoimzeiro, causando estrias prateadas e deformações nos folíolos, com grandes prejuízos para a cultura. Batista (1967), estudando o tripes *E. flavens*, observou que o período crítico vai até 70 dias após a germinação do amendoim. Lourenção (2007) encontrou que independente da cultivar testada, as plantas foram mais infestadas ao redor de 56-57 dias após o plantio, dados que corroboram com o estudo de Moraes (2005). Gallo et al. (2002) verificaram que o ciclo ovo-adulto dos tripes tem duração de, em média, 13 dias, os quais estão distribuídos da seguinte forma: a) incubação: 6 dias; b) primeiro

estádio ninfal: 2 dias; c) segundo estágio ninfal: 2 dias; d) pré-pupa: 1 dia; e) pupa: 2 dias (GALLO et al., 2002; JANINI, 2011). As fêmeas são ovíparas, e os ovos são depositados dentro da folha. A forma jovem apresenta uma coloração amarelada, enquanto os adultos são escuros.

Este inseto vive protegido dentro dos folíolos fechados, onde também se alimenta furando o tecido foliar e sugando o conteúdo celular, ao se alimentarem de tecidos jovens, interferem no desenvolvimento da planta causando distorção nas folhas, já que as células não afetadas continuaram a crescer normalmente. Ao se alimentarem de tecidos desenvolvidos, que possuem paredes celulares rígidas, causam a característica típica da infestação do tripes, o prateamento das folhas, pois ao sugarem as células o ar tomará o lugar do conteúdo celular, e estas se tornarão cheias de ar.

Lourenção (2007) estudando o efeito da infestação de *E. flavens* sobre o desenvolvimento de cultivares de amendoim, encontrou que, dependendo da cultivar plantada, diante de infestação de *E. flavens* com ausência de controle, ocorre redução na emissão de brotos e no desenvolvimento vegetativo das plantas. Moraes (2005) encontrou correlação entre o tamanho da infestação com a fenologia da planta, sendo que as maiores infestações foram observadas no período quando havia maior emissão de folíolos, e que quando a planta deixava de emitir brotações a população diminuía, isto mostra que algumas plantas utilizam este recurso como defesa, estratégia que causa menor desenvolvimento da planta, o que acaba comprometendo a produtividade.

As consequências causadas às plantas diante da infestação por estas duas pragas em questão são bastante similares. Estudando o controle de tripes, Almeida e Arruda (1962) expõem que os danos causados as folhas do amendoim dificultam a absorção de energia luminosa, levando a uma menor realização de fotossíntese ocasionando, assim, uma redução do desenvolvimento das plantas e, conseqüentemente, da produção. Com este ataque, a planta atrasa o desenvolvimento e emite novas brotações (BONDAR, 1928; BRANDÃO FILHO, 1943).

2.2.2 Lagarta-do-pescoço-vermelho (*Stegasta bosquella* Chambers, 1875) (*Lepidoptera: Gelechiidae*)

A lagarta-do-pescoço-vermelho (*Stegasta bosquella*) é um inseto da Ordem Lepidoptera (BORROR e DE LONG, 1969). O adulto mede geralmente entre 6,0 e 7,0 mm de comprimento. A lagarta deste inseto é um fitófago que ataca o folíolo do amendoim enquanto ainda está fechado. Áreas foliares destruídas de modo simétrico, e a presença de excrementos deixados nos folíolos, caracterizam a infestação desta praga na cultura (GALLO et al., 2002).

Segundo Matuo (1973), o ciclo é distribuído de seguinte forma: a) incubação: 2 a 3 dias; b) lagarta: de 8 a 15 dias; c) pupa: de 4 a 10 dias; d) e os adultos: de 6 a 17 dias. A lagarta desenvolvida mede aproximadamente 6,0 mm e possui uma coloração branco-esverdeada de cabeça preta, e os dois primeiros segmentos torácicos são vermelhos, caracterizando assim o nome popular deste inseto-praga.

Calcagnolo et al. (1974) verificaram que os danos produzidos pela lagarta-do-pescoço-vermelho na cultura do amendoim ocorrem ao longo de um intervalo crítico de 27 dias (43 a 70 dias após a germinação).

2.2.3 Formas de controle

O controle mais eficiente do tripses tem sido através da utilização de inseticidas, onde normalmente são feitas de três a seis pulverizações durante o ciclo da cultura, o que acarreta em aumento considerável nos custos de produção (GODOY et al., 2005). Nakano et al. (1981) estimaram os prejuízos do tripses *E. flavens* em 1% para cada tripses/folíolo, em média, até aos 70 dias da germinação da cultura, ou seja, se durante o período crítico houver uma infestação média de 10 tripses/folíolo, haverá uma perda de 10% na produtividade.

Segundo Lara (1991), a adoção de variedades resistentes é considerada uma das melhores alternativas para o controle das pragas, pois não agridem o meio ambiente, mantêm as pragas em baixos níveis e reduzem os custos com agrotóxicos e tratos culturais.

No caso do amendoim, é sabido que espécies silvestres apresentam resistências não somente às pragas, mas como também a doenças e outros agentes, bióticos e abióticos. É sabido também que estas espécies não apresentam características de interesses comerciais, e que sendo assim, devem ser trabalhadas para se obter a resistência associada à alta produtividade (SINGH et al., 1991).

2.3 Infestações por vírus

Preocupados com os recentes ataques de vírus sobre a cultura do amendoim no Brasil, pesquisadores do IAC/Campinas e da APTA/Pindorama fizeram coletas de plantas com sintomas de vírus nas regiões produtoras de amendoim no Estado de São Paulo. Foram visitados, ao todo, 21 campos de produtores, nas seguintes cidades: Santa Adélia, Luzitania, Jaboticabal, Itápolis, Pindorama, Tupã, Rancharia, Marília, Guaimbê e Guarantã. As plantas coletadas foram enviadas para Universidade Federal Rural de Pernambuco para identificação de quais os vírus que estavam atacando a produção do amendoim, e os tripes foram enviados para a Universidade Federal do Piauí para identificação de quais espécies que estavam sendo responsáveis pela transmissão dos vírus.

Segundo Nagata et al. (2003), os tripes são os vetores para disseminação dos tospovirus, e os autores descrevem que *Frankliniella schultzei* e *Frankliniella occidentalis* são classificados como os principais vetores. Expõem ainda que somente as ninfas adquirem o vírus, que o tripe pode transmitir o vírus na fase final da segunda larva ou por adultos, e que o tempo de latência do vírus é em média de 84h a 171h, dependendo da temperatura. Sendo assim quando o tripe se torna o vetor, há uma grande chance de o vírus ser transmitido.

Pesquisadores estão temendo que esse vírus possa o *Tomato spotted wilt virus* (Bunyaviridae: Tospovirus). Segundo Moraes (2006), a cultura do amendoim está sujeita ao ataque da doença Mancha Anular, mais conhecida como vira-cabeça-do-tomateiro, causada pelo TSWV, que tem como consequência o subdesenvolvimento das plantas e necrose da parte apical.

Em parceria com Dr. Corley Holbrook, algumas linhagens e cultivares estão sendo avaliadas quanto à resistência ao *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) em condições de campo em Tifton, Georgia, EUA (GODOY, comunicação pessoal, 2014).

O tripses-do-prateamento é a principal praga que ataca a cultura do amendoim em São Paulo, e estudos estão avaliando qual o papel deste inseto na transmissão dos vírus. Caso esta espécie tenha um papel importante neste processo, a resistência genética a tripses será uma importante forma de controle dos vírus.

2.4 Pré-melhoramento genético em *Arachis*

Quanto à origem do amendoim *Arachis hypogaea*, a hipótese mais aceita é a de origem monofilética (Figura 1), que por fertilização cruzada realizada provavelmente por abelhas entre espécies diplóides ($2n = 2x = 20$) de genoma A e B, gerou um híbrido diplóide provavelmente estéril de genoma AB ($2n = 2x = 20$). Este híbrido diplóide de genoma AB sofreu duplicação no número de cromossomos por mutação natural, gerando uma planta alotetraplóide ($2n = 4x = 40$) fértil de fórmula genômica AABB (FREITAS et al., 2003). Atualmente acredita-se que *A. duranensis* (genoma A) e *A. ipaënsis* (genoma B) sejam os doadores do genoma para o amendoim *Arachis hypogaea* (FÁVERO, 2004; SINGH e SMARTT, 1998). Estas duas espécies não ocorrem naturalmente no Brasil, *A. duranensis* ocorre na Bolívia, Paraguai e Argentina, já *A. ipaënsis* ocorre somente na Bolívia (KRAPOVICKAS e GREGORY, 1994). Assim sendo, acredita-se que o evento que deu origem ao amendoim, tenha ocorrido na região que hoje pertence ao país da Bolívia.

O amendoim é uma espécie cujo gênero ocorre naturalmente em cinco países da América do Sul, inclusive no Brasil, formando uma diversidade com 81 espécies já identificadas (KRAPOVICKAS e GREGORY, 1994; VALLS e SIMPSON, 2005; VALLS et al., 2013). Sendo o Brasil o centro de origem e detentor da maior diversidade genética do gênero *Arachis*, a conservação, caracterização e uso sustentável do germoplasma autóctone são de grande importância para a sua utilização nos trabalhos de melhoramento do amendoim no país.

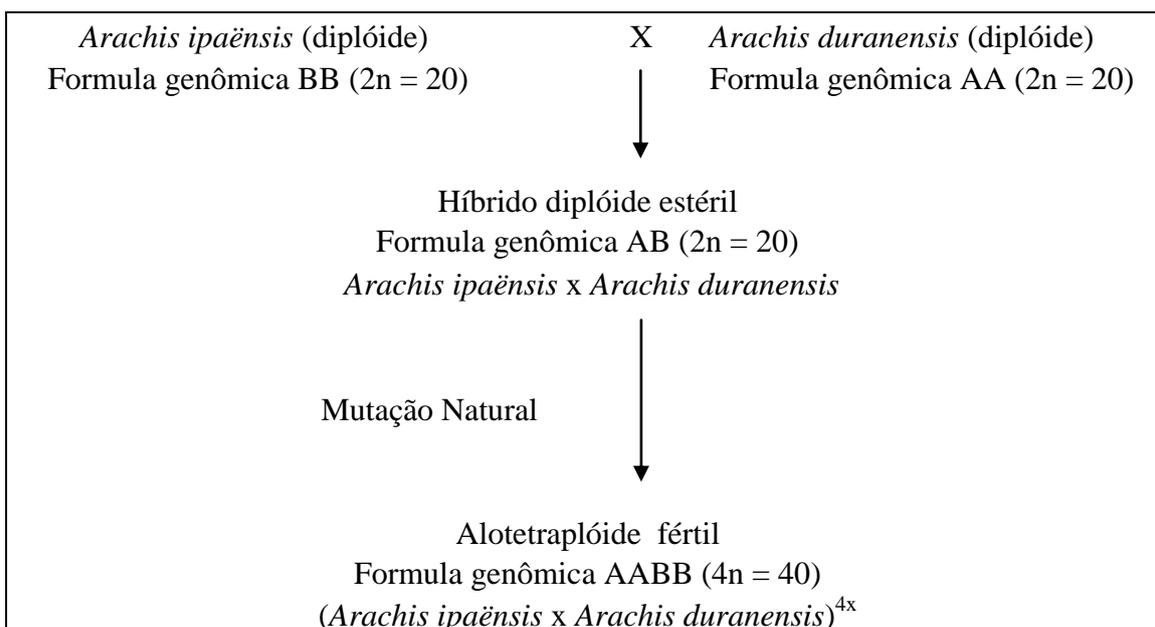


Figura 1. Esquema do cruzamento representando a hipótese da origem de amendoim *Arachis hypogaea*.

O Banco Ativo de Germoplasma de Espécies Silvestres de *Arachis* localiza-se na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília e conta com 1250 acessos desse germoplasma, em sua grande maioria coletados em território brasileiro. Em relação à espécie cultivada, o Instituto Agrônomo de Campinas é o que detém a maior coleção do país (2100 acessos). Esse acervo genético torna essas duas instituições parceiras naturais na utilização dessa variabilidade para o aprimoramento tecnológico da cultura por meio da criação de cultivares (MICHELOTTO, 2013b).

Muitas espécies silvestres de *Arachis* têm apresentado características de interesses econômicos para o programa de melhoramento em amendoim (VARMAN et al., 2000), como resistência a pragas (JANINI, 2011; MICHELOTTO, 2013a), a doenças (PANDE e RAO, 2001; FÁVERO et al., 2009), a nematódeos (NELSON et al., 1989) e a vírus (HERBERT e STALKER, 1981).

Simpson e Starr (2001) lançaram a primeira cultivar de amendoim com resistência a nematóides de galhas e é também a primeira com genes transferidos a partir de espécies silvestres de *Arachis*. A cultivar COAN de amendoim foi o primeiro caso de genes transferidos a partir de espécies silvestres diplóides de *Arachis* (SIMPSON e STARR, 2001). Ela é altamente resistente a nematóides de galhas (*Meloidogyne arenaria* e *M. javanica*). Esta cultivar é do tipo Runner e foi obtida a partir de cruzamentos entre

A. batizocoi x (*A. cardenasii* x *A. diogoi*). Para produção do anfidiplóide, o híbrido desse cruzamento, estéril, foi tratado com colchicina para impedir a separação dos cromossomos já duplicados na anáfase da mitose, e ocasionar a poliploidia da planta. Este anfidiplóide sintético TxAG-6 foi cruzado com *A. hypogaea* cv. Florunner. Após cinco retrocruzamentos e seguidas seleções para caracteres agronômicos e resistência a nematóides, foi lançada a cultivar COAN.

Em *Arachis*, a maioria das espécies silvestres é diplóide. As espécies da Seção *Arachis* podem possuir genoma A, AB, B, D, F, G e K, enquanto que a espécie cultivada *A. hypogaea* é alotetraploide e possui fórmula genômica AABB (STALKER, 1991c; FERNÁNDEZ e KRAPOVICKAS, 1994; PEÑALOZA e VALLS, 1997, 2005; LAVIA, 1998; ROBLEDO e SEIJO, 2008, 2010; ROBLEDO et al., 2009; SILVESTRI et al., 2014). A barreira da ploidia faz com que os híbridos interespecíficos obtidos sejam estéreis.

Simpson (1991) e Simpson e Starr (2001) apresentam três formas de introgressão de genes de espécies em *A. hypogaea*. A primeira seria o cruzamento da espécie silvestre diplóide ($2n=20$) com *A. hypogaea*, gerando um híbrido triplóide que seria tratado com colchicina para duplicação dos cromossomos, tornando-o hexaplóide e fértil. Este hexaplóide seria retrocruzado com *A. hypogaea* várias vezes até que haja a perda de cromossomos e a progênie volte a ter 40 cromossomos. Este tipo de técnica tem sido usada nos Estados Unidos e na Índia (VINDHIYAMAN, 2001; VARMAN, 2001). O segundo processo de introgressão seria a duplicação de cromossomos de espécies silvestres de genoma A e B tornado-as tetraplóides, com subsequente cruzamento entre elas e posterior cruzamento desse híbrido com *A. hypogaea*. Vários retrocruzamentos são necessários para manter somente caracteres de interesse oriundos das espécies silvestres. Esta técnica não tem se mostrado muito interessante, pois há altos índices de esterilidade após o primeiro retrocruzamento. O terceiro processo seria o cruzamento entre uma espécie de genoma A com uma de genoma B, gerando um híbrido estéril que seria tetraploidizado através do uso da colchicina, tornando um anfidiplóide fértil que seria cruzado com *A. hypogaea* e retrocruzado várias vezes até que todos os caracteres de interesse em *A. hypogaea* sejam recuperados. A forma que mostrou resultados mais promissores foi gerando anfidiplóides (AABB) e cruzando com o amendoim cultivado, assim como no presente trabalho.

2.5 Estrutura floral e modo de fertilização

Simpson et al. (1994) citam que geralmente a floração do amendoim ocorre entre 14 e 55 dias após o plantio. As flores surgem da axila foliar, e os botões florais são possíveis de serem observados 36 a 48 horas antes que a flor se abra (CUSTODIO, 2009).

A flor do amendoim tem corola papilionada, e geralmente é fecundada por auto-polinização, mas que pode haver polinização cruzada por abelhas (SIMPSON et al., 1994).

Segundo Conagin (1955) a corola da flor do amendoim é constituída de cinco pétalas (Figura 2): estandarte (c), duas asas (d), e uma quilha constituída de duas pétalas soldadas (e). A flor ainda conta com o hipanto (a), sépalas (b), estames (f), estigma e estilete (g).



Figura 2. Flor de amendoim dissecada mostrando: (a) hipanto, (b) sépalas, (c) estandarte, (d) asas, (e) quilha, (f) estames, (g) estigma e estilete. Adaptado de Nigam et al. (1990).

Segundo Nigam et al. (1990) a quilha é responsável por proteger o estigma e os diferentes tipos de estames (Figura 3): duas anteras estaminódios estéreis (a), quatro globosas (b) e quatro biloculadas (c). Em algumas variedades, a antera pode se abrir de 7 a 8 horas antes da flor. E o estigma se torna receptivo aproximadamente 24 horas antes e 12 horas após a antese. A fertilização ocorre aproximadamente 6 horas após polinização. Para que haja polinização cruzada, a quilha tem que ser rompida, liberando as estruturas

reprodutivas para um agente polinizador, caso contrário, a autopolinização é regra. Com a fertilização do óvulo inicia o crescimento do meristema intercalar localizado na base do ovário, originando o “peg” (Figura 7), uma estrutura com geotropismo positivo que empurra o óvulo fecundado até o solo, onde vagens e frutos se desenvolvem. O “peg” se torna visível em aproximadamente 4 a 6 dias após a fertilização em condições ambientais normais. (PELEGRIN et al., 2013).



Figura 3. Três grupos de estames: (a) dois estaminódios estéreis, (b) quatro estames globosos com anteras dorsifixas e (c) quatro estames com anteras adnatas oblongas. Adaptado de Nigam et al. (1990).

Para avaliar as razões pelo fracasso na obtenção de frutos do amendoim na Carolina do Norte/EUA, Stalker e Wynne (1982) avaliaram o fotoperíodo em resposta a floração e frutificação em nove espécies selvagens de amendoim da seção *Arachis* e três cultivares de *A. hypogaea*. Tanto para as espécies silvestres como para as cultivares foram observados alterações em função do fotoperíodo, e foram observadas plantas que produziram mais flores em tratamentos de dias longos do que nos tratamentos de dia curtos, plantas que produziram a mesma quantidade de flores em tratamentos de dias longos e curtos e plantas que tiveram maior floração em tratamentos de dias curtos do que nos tratamentos de dias longos. Este estudo mostra que a produção de flores é influenciada pelo fotoperíodo, e que as espécies são influenciadas de formas diferentes e, diferentes manipulações do fotoperíodo podem ser utilizadas para a obtenção de mais flores, dependendo da espécie.

2.6 Caracterização reprodutiva

Apesar de poucos resultados conclusivos na literatura quanto ao comportamento reprodutivo das espécies silvestres de *Arachis*, o uso das estimativas de viabilidade de pólen constitui uma ferramenta importante para mensurar a qualidade dos materiais envolvidos nos cruzamentos (CUSTODIO, 2009).

Ao produzir um híbrido sintético pelo cruzamento entre espécies silvestres de genomas distintos, devido o híbrido não possuir cromossomos homólogos a meiose será irregular e a tendência é que a porcentagem de viabilidade de grãos de pólen diminua, em relação aos parentais. O valor baixo da viabilidade de grãos de pólen desse híbrido indica que os parentais envolvidos apresentam grande distância genética entre si (CUSTODIO, 2009) e que os cromossomos presentes nos híbridos não conseguem se parearem na metáfase I para que a meiose ocorra de regularmente. Sendo assim, a viabilidade de grãos de pólen pode ser utilizada como marcador para a identificação de híbridos e para estabelecer parentesco evolutivo entre as espécies envolvidas.

2.7 Caracterização molecular

Marcadores moleculares microssatélites tem sido grandes aliados nos programas de pré-melhoramento em *Arachis* para a identificação de híbridos. Fávero (2004) utilizando o *primer* Lec em gel de agarose 1,2 %, conseguiu identificar 17 híbridos resultantes dos cruzamentos entre KG 30006 x V13710 e KG 30076 x V 12812. Utilizando microssatélites, Moretzsohn et al. (2013) estudaram as relações do amendoim cultivado (*Arachis hypogaea*) e suas espécies selvagens. Assim, foi possível obter informações importantes sobre os genomas e a similaridade genética entre as espécies silvestres envolvidas neste trabalho.

Burow et al. (2001) estudaram a transmissão da cromatina de anfidiplóides sintéticos para o amendoim cultivado mediante o uso de marcadores moleculares (sondas de DNA) no cruzamento $\{A. hypogaea \times [A. batizocoi \times (A. cardenasii \times A. diogoi)]^{4x}\}$. Eles observaram que cromatina derivada das espécies silvestres de genoma “A” envolvidas (*A. cardenasii* e *A. diogoi*), formavam mosaicos nos cromossomos, mostrando eventos de

recombinação entre as espécies. Na progênie tetraplóide, a recombinação entre cromossomos foi similar ao pareamento cromossômico observado em *A. hypogaea*, com recombinação geralmente feita entre cromossomos pertencentes ao mesmo genoma (A ou B).

Atualmente, os marcadores moleculares são ferramentas importantes dentro de programas de melhoramento. Dentre eles, os microssatélites ou SSRs (*Simple Sequence Repeats*) têm sido indicados para estudos de variabilidade genética, cálculos de frequência alélica, desvio em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, mapeamento genético e físico de genomas, identificação e discriminação de indivíduos, testes de paternidade e estudo de genética de populações, pois são de natureza co-dominante e constituem em uma das classes de marcadores moleculares mais polimórficas atualmente disponível (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Estes marcadores consistem de sequências curtas de nucleotídeos repetidas na mesma ordem e em sequência, cujo nível de polimorfismo produzido é devido à variação do número de unidades de repetição em um determinado loco. Marcadores SSRs são obtidos com o uso de iniciadores que flanqueiam regiões contendo os microssatélites. Os iniciadores para SSR são desenhados nas regiões flangeadoras onde os microssatélites foram previamente localizados, a partir do sequenciamento de fragmentos de DNA, obtidos de bibliotecas genômicas, ou de sequências disponíveis em bancos de dados públicos (SALLA et al., 2002). Diante deste contexto, o presente trabalho tem como um dos objetivos verificar, pela utilização de marcadores moleculares microssatélites, a ocorrência de hibridização e/ou autofecundação nas progênies F₁ derivadas dos cruzamentos realizados. Esta técnica foi escolhida devido a sua natureza codominante, facilidade e rapidez na obtenção dos resultados.

2.8 Caracterização morfológica

Os trabalhos de caracterização morfológica de plantas são úteis para a identificação de acessos de germoplasma em coleção e como ferramenta auxiliar em melhoramento genético (VEIGA et al., 1996). Sendo assim, a caracterização morfológica pode ser utilizada para eliminar plantas semelhantes e/ou selecionar aquelas com características favoráveis.

Custodio (2009) apresenta uma descrição detalhada associada ao ciclo reprodutivo e à morfologia do botão e da flor de espécies do gênero *Arachis*. Isso somente foi possível ser descrito devido a uma caracterização morfológica. Informações importantes para o programa de melhoramento, como período de floração, importância do fotoperíodo e as estruturas responsáveis pela fertilização e produção do fruto também foram levantadas nesse trabalho.

Em híbridos entre espécies silvestres de *Arachis*, o conhecimento da morfologia é essencial para a análise do desenvolvimento vegetativo da planta. Além disso, a caracterização morfológica é uma ferramenta fundamental para discriminar indivíduos híbridos daqueles oriundos de autofecundação (FÁVERO, 2004).

2.9 Tratamento com colchicina

Mais de 50 espécies de plantas do gênero *Colchicum* podem conter colchicina, sendo a espécie *Colchicum autumnale* a mais utilizada na extração desta substância (EIGSTI e DUSTIN, 1955).

Segundo Faleiro (2012) durante a divisão celular, a colchicina atua como antimitótico ao se ligarem aos dímeros de tubulina, impedindo a formação dos microtúbulos e conseqüentemente a formação das fibras do fuso. Pereira et al. (2012) expõe que além da colchicina impedir a polimerização do fuso acromático, ela pode também estar o fragmentando, e que quando esta estrutura celular é danificada ou inexistente, na anáfase não vai ocorrer a separação dos cromossomos duplicados e, como consequência a divisão celular não ocorre e a célula inicia o novo ciclo celular com a quantidade de DNA duplicado.

Tanto para estudos de melhoramento genético, quanto para estudos de evolução e caracterizações botânicas, esta técnica vem sendo utilizada para a obtenção dos anfidiplóides, e os resultados tem sido satisfatórios. No programa de pré-melhoramento em *Arachis*, a colchicina é utilizada para induzir a poliploidia e transformar híbridos interespecíficos diplóides estéreis em anfidiplóides sintéticos poliplóides férteis (FÁVERO, 2004; LÜDKE, 2014; SANTOS, 2012).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Identificar híbridos oriundos de cruzamentos interespecíficos e caracterizá-los quanto sua viabilidade de grãos de pólen, genotipagem molecular e morfologia de planta.

3.2 Objetivos específicos

- a) Identificar os híbridos interespecíficos oriundos de cruzamentos entre espécies resistentes a tripes-do-prateamento e a lagarta-do-pescoço-vermelho de genoma A, B, K e uma espécie de genoma desconhecido;
- b) Identificar híbridos entre um anfidiplóide e uma cultivar;
- c) Caracterizar os híbridos e seus genitores quanto à viabilidade de grãos de pólen;
- d) Caracterizar os híbridos e seus genitores utilizando marcadores microssatélites;
- e) Caracterizar morfológicamente os híbridos e seus genitores.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho foram realizadas duas estações de cruzamentos e duas caracterizações, durante três safras de amendoim (Tabela 1).

As safras 2012/2013 e 2013/2014 se iniciaram nos meses de setembro com a preparação do solo, e se estenderam até maio quando as sementes foram colhidas. A safra 2014/2015 foi antecipada, iniciando no mês de junho com a preparação do solo, e se estendendo até maio quando as sementes foram colhidas.

Os cruzamentos foram realizados entre os meses de dezembro a março, sendo a primeira estação de cruzamentos realizada durante a Safra de 2012/2013 e a segunda durante a Safra 2013/2014.

A primeira caracterização foi realizada durante a Safra 2013/2014, quando foram analisados os indivíduos das progênies da primeira estação de cruzamento. A segunda caracterização ocorreu durante a Safra 2014/2015, que analisou os indivíduos das progênies da segunda estação de cruzamento.

Tabela 1. Cronograma das atividades.

	Safra 2012/2013	Safra 2013/2014	Safra 2014/2015
Período	Setembro → Maio	Setembro → Maio	Junho → Maio
Cruzamento	1ª Estação de cruzamentos	2ª Estação de cruzamentos	
Caracterização		1ª Caracterização	2ª Caracterização

4.1 Material Vegetal

Durante três anos, foram avaliadas em condições de campo e laboratório, na Agência Paulista de Tecnologias para o Agronegócios (APTA Regional Centro-Norte) em Pindorama e na Unesp/Jaboticabal (JANINI, 2011) diversas espécies silvestres quanto à resistência a tripes e a lagarta-do-pescoço vermelho. Dentre esses indivíduos, seis acessos de espécies de genomas A, três acessos de genomas B, um acesso de genoma K, e um acesso de genoma desconhecido foram selecionados e utilizados em cruzamentos

interespecíficos (Tabela 2). Para os cruzamentos entre o anfidiplóide e a cultivar, foram utilizados o An 13 (anfidiplóide) e o IAC OL4 (cultivar).

As sementes dos acessos utilizados no projeto fazem parte da coleção de trabalho de *Arachis* presente na Embrapa Pecuária Sudeste.

Tabela 2. Acessos utilizados como genitores resistentes a pragas, código BRA, nome da espécie, genoma, município, unidade federativa, latitude, longitude e altitude da área de coleta.

BRA	Acesso	Espécie	¹ Genoma	Município	² UF ou país	Lat (W)	Long (S)	Alt (M)
38792	VOFSv 14760	<i>A. gregoryi</i> C.E.Simpson, Krapov. & Valls	B	Vila Bela S. Trindade	MT	15° 29'	60° 13'	245
18619	CoSzSv 6862	<i>A. helodes</i> Martius ex Krapov & Rigoni	A	-	MT	15° 22'	56° 13'	175
12505	VSGr 6325	<i>A. helodes</i> Martius ex Krapov. & Rigoni	A	S. Antonio do Leverger	MT	15° 52'	56° 04'	150
30643	V 13250	<i>A. kempff-mercadoi</i> Krapov., W.C. Gregory & C. E. Simpson	A	Sta. Cruz de la Sierra	BO	17° 45'	63° 10'	280
36901	Wi 1291	<i>A. krapovickasii</i> C.E.Simpson, D.E. Williams, Valls & I.G. Vargas	K	S. J. Chiquitos	BO	18° 14'	60° 51'	317
22560	VPoBi 9243	<i>A. kuhlmannii</i> Krapov. & W. C. Gregory	A	Corumbá	MS	18° 52'	56° 16'	100
17515	VRGeSv 7639	<i>A. kuhlmannii</i> Krapov. & W. C. Gregory	A	Miranda	MS	20° 15'	56° 23'	125
12688	VSGr 6413	<i>A. kuhlmannii</i> Krapov. & W. C. Gregory	A	Cáceres	MT	15° 47'	57° 25'	200
36871	KGjSSc 30097	<i>A. magna</i> Krapov., W.C. Gregory & C. E. Simpson	B	San Ignacio de Velasco	BO	16° 22'	60° 04'	380
33812	VSPmSv 13751	<i>A. magna</i> Krapov., W.C. Gregory & C. E. Simpson	B	Vila Bela da S. Trindade	MT	16° 16'	59° 27'	530
17493	VRGeSv 7635	<i>A. vallsii</i> Krapov. & W. C. Gregory	-	Miranda	MS	20° 05'	56° 42'	150
-	An 13	-	AB	-	-	-	-	-
-	IAC OL4	-	AB	-	-	-	-	-

¹O traço no genoma do acesso V 7635 representa que o genoma é desconhecido. ²MT = Mato Grosso; MS = Mato Grosso do Sul; BO = Bolívia.

4.2 Cruzamentos

Os cruzamentos foram realizados na Embrapa Pecuária Sudeste (São Carlos, SP) em duas estações de cruzamentos, entre os meses de dezembro a março, das safras de 2012/2013 e 2013/2014.

Os cruzamentos foram realizados manualmente de forma controlada em casa de vegetação, em plantas envasadas. Os botões florais dos genitores femininos foram emasculados ao final da tarde e as flores polinizadas na manhã do dia seguinte (Figuras 4 e 5).



Figura 4. Botão floral do genitor feminino *A. magna* V 13751.



Figura 5. Flor do genitor feminino *A. magna* V 13751 emasculada e polinizada artificialmente.

Todas as flores polinizadas artificialmente foram marcadas e, aproximadamente duas semanas após a polinização, a flor marcada foi observada. Caso surgisse um “peg” em sua base (Figura 6), este “peg” era marcado com uma nova linha amarrada a um suporte fixado no centro do vaso (Figura 7 e 8). Nesta etapa era importante

observar a flor, caso ela ainda estivesse presente na ponta do “peg”, e analisar se esta tinha sido emasculada. Caso a quilha ainda estivesse presente na flor, esta seria outra flor que saiu da mesma inflorescência e passou por dentro da linha que marcava a flor polinizada artificialmente. Esta segunda marcação que prendia o “peg” ao suporte central, além de facilitar a colheita das sementes, tinha função também de identificar a região, facilitando a manutenção da planta sem prejudicar o desenvolvimento da semente. Aproximadamente 45 dias após a semente começar a se desenvolver na ponta do “peg”, a semente era desenterrada, com cuidado para não romper o “peg”, e com o auxílio de um bisturi tinha a casca raspada. Se a casca estivesse escura, esta semente era colhida, pois esta já estava madura e, caso estivesse branca, era devolvida ao solo para completar a maturação.

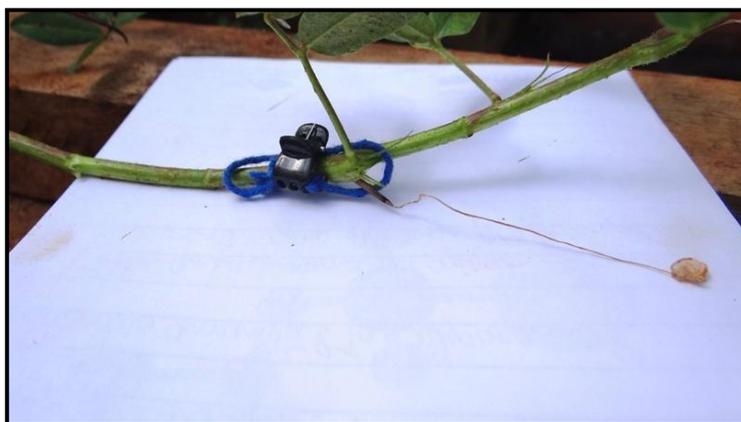


Figura 6. “Peg” de *A. vallsii* V 7635 x *A. kuhlmannii* V 9243 marcado com identificação colorida e com a flor na ponta.



Figura 7. “Peg” de *A. vallsii* V 7635 x *A. kuhlmannii* V 9243 marcado com identificação colorida amarrada ao suporte central.



Figura 8. “Pegs” do genitor feminino IAC OL4 marcados com identificação colorida e amarrados ao suporte central.

Para as duas estações de cruzamentos todos os genitores estavam presentes com no mínimo duas plantas. A presença de uma segunda planta serviu como medida de segurança caso algum patógeno ou praga viesse a atacar a planta genitora, ou mesmo se a planta apresentasse algum problema com a floração, ou perdesse alguma parte importante durante o crescimento, como o eixo central.

Na Tabela 3 é possível observar as combinações realizadas neste trabalho. Foram 19 combinações entre espécies de genoma B (*A. gregory* V 14760; *A. magna* KG 30097 e V 13751), K (*A. krapovickasii* Wi 1291), AB (IAC OL4) e de genoma não identificado (*A. vallsii* V 7635) utilizados como genitores femininos, e espécies de genoma A (*A. helodes* Co 6862; *A. helodes* V 6325; *A. kempff-mercadoi* V 13250; *A. kuhlmannii* V 6413; V 7639 e V 9243) e AB (An 13) como genitores masculinos.

Para todas as combinações, foi calculada a porcentagem de sucesso (PS) de hibridação, pela fórmula: $PS = (\text{número de híbridos/número de polinizações}) \times 100$.

Para a colheita foi utilizada uma máquina (Figura 9) para peneirar os vasos, e a separação das sementes foi de forma manual. Todos os vasos foram peneirados, sendo assim, obtiveram-se as sementes candidatas a híbridadas e aproveitou-se para multiplicar e renovar o estoque de sementes dos genitores utilizados no projeto.

Tabela 3. Combinações realizadas para as estações de cruzamentos. Espécies de genoma B, K e não identificado e *A. hypogaea* utilizados como genitores femininos e espécies de genoma A e um anfidiplóide como genitores masculinos.

Genitores femininos	Genitores masculinos	¹ Genoma
<i>A. gregory</i> V 14760	x <i>A. helodes</i> Co 6862	B x A
V 14760	x <i>A. kuhlmannii</i> V 6413	B x A
<i>A. krapovickasii</i> Wi 1291	x <i>A. kuhlmannii</i> V 7639	K x A
Wi 1291	x <i>A. kempff-mercadoidi</i> V 13250	K x A
Wi 1291	x <i>A. helodes</i> V 6325	K x A
Wi 1291	x <i>A. kuhlmannii</i> V 9243	K x A
<i>A. magna</i> V 13751	x V 7639	B x A
V 13751	x V 13250	B x A
V 13751	x V 6325	B x A
V 13751	x V 9243	B x A
<i>A. magna</i> KG 30097	x V 7639	B x A
KG 30097	x V 13250	B x A
KG 30097	x V 6325	B x A
KG 30097	x V 9243	B x A
<i>A. vallsii</i> V 7635	x V 7639	- x A
V 7635	x V 13250	- x A
V 7635	x V 6325	- x A
V 7635	x V 9243	- x A
<i>A. hypogaea</i> cv. IAC OL 4	x An 13 (<i>A. magna</i> V 13751 x <i>A. kempff-mercadoidi</i> V 13250) ^{4x}	AB x AB

¹Os traços na coluna do Genoma representam acessos de genoma desconhecidos.



Figura 9. Máquina de peneirar amendoim utilizada para realizar a colheita.

4.3 Germinação das sementes

Oito sementes de cada genitor e todas as sementes das progênes foram tratadas com Thiram para evitar o crescimento de fungos e colocadas para germinar envoltas em papel germiteste embebido em Ethrel a 0,65%, para proporcionar a quebra de dormência, caso ocorra. As sementes foram mantidas no germinador, em condições de 16 h a 20°C no escuro e 08 h a 35°C com luz fluorescente. Após seis dias no germinador, sementes que persistiam em não germinar receberam novo tratamento com Ethrel.

Foram preparados copos descartáveis de 180 ml com substrato e fundo furado para receberem as sementes recém-germinadas. As plantas permaneceram nos copos até alcançar tamanho e vigor para serem transplantadas para os vasos definitivos com volume de 25x40x40 cm.

Na safra 2013/2014 foi germinada e incorporada ao projeto uma semente de *A. magna* V 13751 x *A. kempff-mercadói* V 13250, candidata a anfidiplóide sintético. O híbrido que originou esta semente foi produzido na safra 2010/2011, quando foi caracterizado como híbrido, e na safra 2011/2012 foi tratado com colchicina, produzindo uma semente.

A germinação das sementes para a segunda caracterização foi antecipada. As sementes foram colocadas para germinar no mês de julho, para que se tivesse tempo de realizar todas as análises dentro do prazo estabelecido. Como em julho é período de inverno, houve a necessidade de utilizar alguma estrutura para manter as plantas aquecidas (Figura 10). Para isso foi utilizada uma estufa de vidro com controle de temperatura, contendo quatro lâmpadas incandescentes (60 W). A temperatura foi controlada por sensor de temperatura. As luzes eram ligadas e desligadas automaticamente conforme a temperatura estivesse abaixo (ligar) ou acima (desligar) de 30°C. Para acompanhar a variação de temperatura, dois termômetros foram utilizados, um fora e outro dentro da estufa, e durante dez dias (14/07/14 a 18/07/14 e 28/07/14 a 01/08/14) a variação foi verificada e anotada. Analisando os termômetros de dentro e de fora da estufa, observou-se diferença média de 6°C entre eles.



Figura 10. Estufa utilizada para o crescimento do amendoim durante a estação fria.

4.4 Viabilidade de grãos de pólen

Foram coletadas ao acaso quatro flores de cada indivíduo envolvido no trabalho. Com o auxílio de uma pinça, os grãos de pólen foram retirados das anteras, colocados sobre as lâminas e submetidos a dois tipos de corantes, carmim acético 2% com glicerina (Figura 11 (A) e 13) e tetrazólio 0,25 % (Figura 11 (B), 14 e 15). As anteras que apresentaram dificuldades em liberar os grãos de pólen foram maceradas sobre as lâminas, com uma gota de corante. As lâminas foram levadas ao microscópio (Figura 12) para análise dos grãos viáveis e inviáveis. Os critérios para considerar os grãos de pólen como viáveis foram os grãos estarem bem desenvolvidos e inteiramente corados, sendo que os grãos mal desenvolvidos ou parcialmente coloridos, foram considerados como não viáveis. Foram contados 200 grãos em cada amostra (repetição) oriunda de uma flor, totalizando 800 grãos por indivíduo. As porcentagens de grãos de pólen corados foram calculadas para cada amostra de todos os indivíduos envolvidos.

As análises de variância e o teste de médias de Tukey foram realizados no software Statistical Analysis System (SAS).

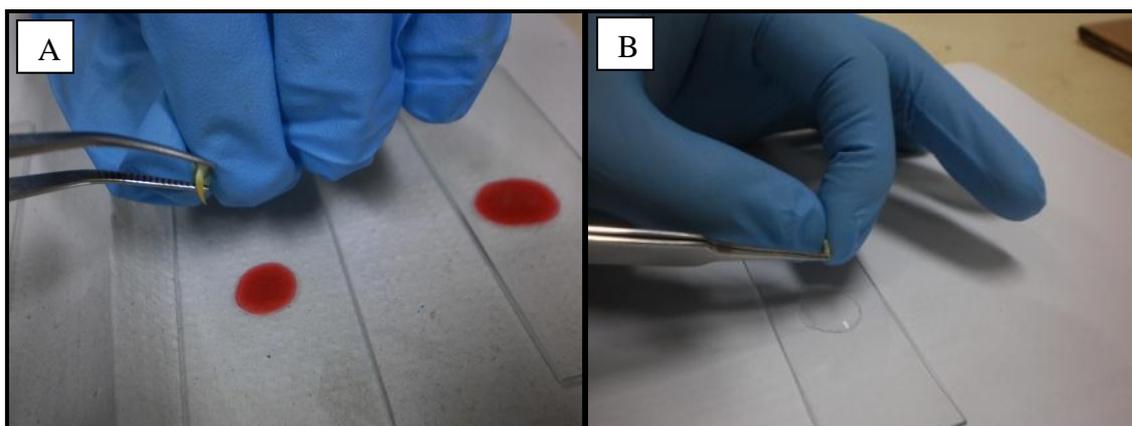


Figura 11. Grãos de pólen corados com carmim acético 2% com glicerina (A) e tetrazólio 0,25% (B).



Figura 12. Contagem dos grãos viáveis e inviáveis.

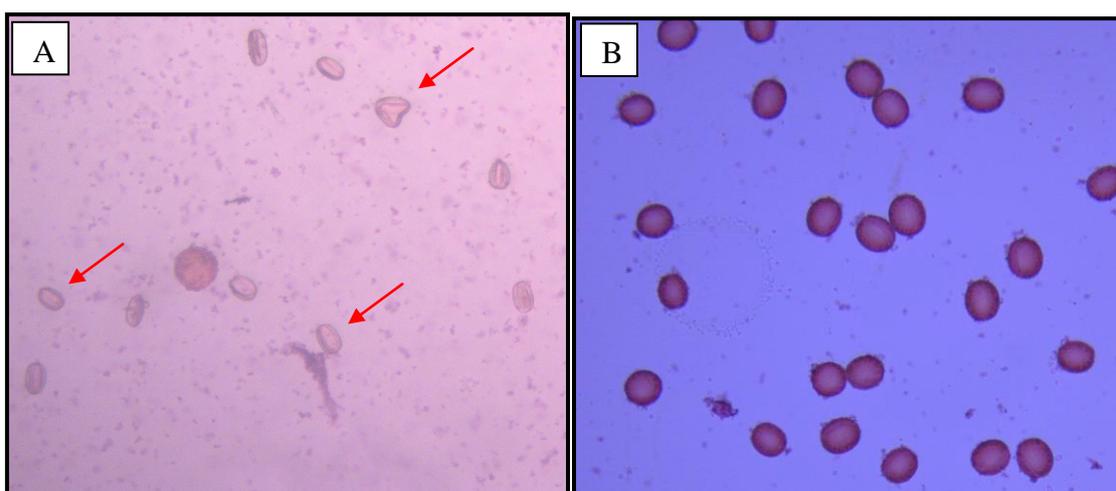


Figura 13. Grãos de pólen corados com carmim acético 2% com glicerina (aumento de 100 X). A) Grãos de pólen do híbrido V 13751 x V 13250, as flechas vermelhas apontam grãos inviáveis. B) Grãos de pólen do acesso V13751.

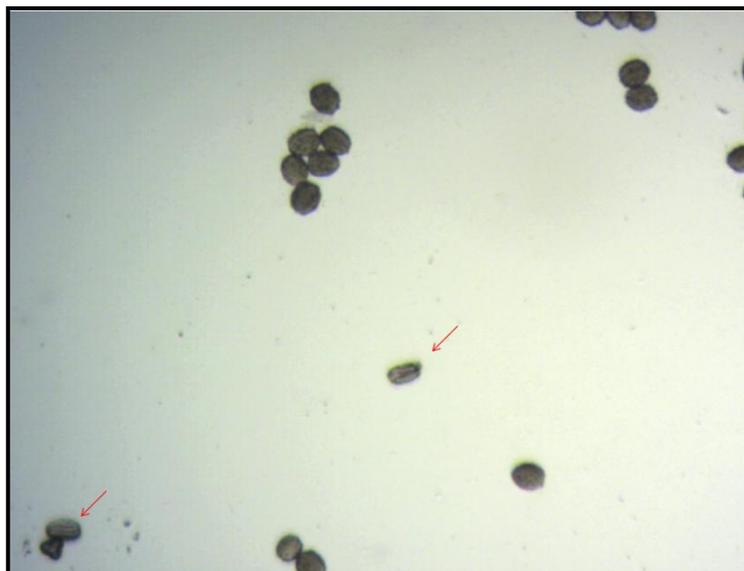


Figura 14. Grãos de pólen de KG 30097 corados com tetrazólio 0,25% (aumento de 100 X). As flechas vermelhas apontam grãos inviáveis.



Figura 15. Grãos de pólen de V 13751 x V 9243 corados com tetrazólio 0,25% (aumento de 100 X). As flechas vermelhas apontam grãos inviáveis.

4.5 Caracterização molecular

Em casa de vegetação, duas amostras de cada planta foram coletadas, identificadas, embaladas em papel alumínio e colocadas em frasco com nitrogênio líquido. Uma das amostras foi utilizada para a extração de DNA (ácido desoxirribonucleico) e a outra ficou armazenada em freezer -80°C para eventual necessidade.

O DNA genômico foi isolado de folhas jovens usando o protocolo baseado em CTAB (*Cationic Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide*) descrito por Grattapaglia e Sederoff (1994), com a inclusão de um passo adicional de precipitação com 1,2M NaCl, logo após o tampão CTAB. A quantificação do DNA total foi realizada em espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000).

Foram avaliados 10 marcadores microssatélite (Tabela 4) por meio da amplificação por PCR e verificação da amplificação em gel de agarose 2,5 % corado com brometo de etídeo. Foram selecionados os que melhores amplificavam nas amostras avaliadas e que apresentavam maior polimorfismo para os indivíduos em questão. Os marcadores testados foram pré-selecionados dentro do programa de melhoramento de amendoim, na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (EMBRAPA-CENARGEN) em Brasília, a partir do trabalho de Moretzsohn et al. (2013).

Tabela 4. Marcadores microssatélites (SSR) utilizados neste trabalho.

	SSR	¹ Temperatura de amplificação (°C)	Tamanho (pb)
1	Ah3	50	202
2	gi-623	52	178
3	IPAHM-406	59	350
4	PM3	NA	168
5	PM36	50	200
6	seq3D9	58	292
7	RI2A06	52	159
8	RM14B11	52	312
9	RN12E01	52	138
10	Seq18G9	NA	225

¹NA: marcadores que não amplificaram nas amostras.

As condições de amplificação dos marcadores foram estabelecidas a partir de testes em diferentes temperaturas de anelamento dos *primers* na PCR. As reações de PCR foram realizadas em termociclador (BioRad T100), com volume final de 15 µl, nas seguintes condições: 120ng de DNA genômico, 0,65U de Taq DNA polimerase, 1x tampão PCR (200mM Tris pH8,4, 500mM KCl), 1,5 mM MgCl₂, 0,2µM de dNTP, e 0,165 µM de cada *primer*. O programa utilizado para amplificação consistiu de: 95°C por 5 min, 30 ciclos de (94°C 45 seg; X°C 45 seg; 72°C 45 seg.) e 72°C 10 min, sendo X°C a temperatura específica para anelamento dos *primers*.

4.5.1 Genotipagem e análise dos dados

Os marcadores que apresentaram sucesso na amplificação foram submetidos a eletroforese em géis de poliacrilamida 6% e corados com nitrato de prata (CRESTE et al., 2002) para visualização dos fragmentos. O tamanho destes foi estimado com o padrão molecular 10 bp (Invitrogen). Foram considerados híbridos aqueles indivíduos que possuíam o alelo proveniente do parental masculino que não era comum ao parental feminino nos locos polimórficos avaliados.

4.6 Caracterização morfológica

Os caracteres morfológicos foram avaliados no período de novembro a janeiro das safras de 2013/2014 e 2014/2015. Foram coletadas ao acaso quatro folhas do ramo lateral, uma folha do eixo central e quatro flores, de todos os indivíduos envolvidos no trabalho. A folha coletada foi sempre a última folha expandida, tanto dos ramos laterais quanto do eixo central.

Foram observados 63 caracteres morfológicos (Tabela 5) também já avaliados em outros trabalhos (IBPGR, 1990; MONÇATO, 1995; FÁVERO, 2004; LÜDKE, 2014). De acordo com a natureza dos caracteres, o material foi medido por régua ou paquímetro, ou observado no microscópio estereoscópio (Figura 16).

Os dados foram analisados utilizando a Análise de Componentes Principais gerada pelo software SAS. Os resultados dos componentes 1 e 2 foram multiplicados pelos valores médios de cada característica para cada indivíduo e os valores resultantes foram usados para construção do gráfico biplot, utilizando o software Microsoft Excel.

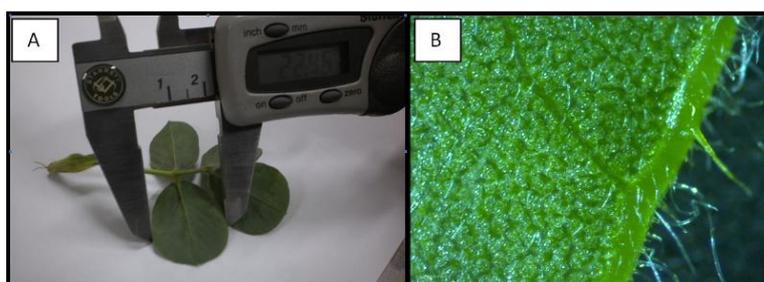


Figura 16. Observação de descritores morfológicos. A) Utilização do paquímetro B) Utilização do microscópio estereoscópio na observação de pêlos e cerdas.

Tabela 5. Descritores avaliados e respectivos códigos.

Descritores	Abreviatura	¹ Forma de medida	² EC	³ RL	⁴ Fl
Altura da planta	AP	Centímetro	X	-	-
Comprimento do ramo lateral	cRL	Centímetro	-	X	-
Comprimento de folíolo proximal	Cfp	Milímetro	X	X	-
Largura de folíolo proximal	Lfp	Milímetro	X	X	-
Comprimento de folíolo distal	Cfd	Milímetro	X	X	-
Largura de folíolo distal	Lfd	Milímetro	X	X	-
Comprimento de pecíolo	Cp	Milímetro	X	X	-
Comprimento de peciólulo	Cpo	Milímetro	X	X	-
Comprimento de estípula livre	Cel	Milímetro	X	X	-
Largura de estípula livre	Lel	Milímetro	X	X	-
Comprimento da parte adnata	CPD	Milímetro	X	X	-
Pêlos no folíolo abaxial margem	Pfabm	Escala de 1 a 3	X	X	-
Pêlos no folíolo abaxial centro	Pfabc	Escala de 1 a 3	X	X	-
Pêlos no folíolo abaxial nervura principal	Pfabnp	Escala de 1 a 3	X	X	-
Pêlos no folíolo adaxial margem	Pfadm	Escala de 1 a 3	X	X	-
Pêlos no folíolo adaxial centro	Pfadc	Escala de 1 a 3	X	X	-
Pêlos no folíolo adaxial nervura principal	Pfadnp	Escala de 1 a 3	X	X	-
Cerdas no folíolo margem	Cefm	Escala de 1 a 3	X	X	-
Pêlos no pecíolo	PP	Escala de 1 a 3	X	X	-
Pêlos no peciólulo	Ppo	Escala de 1 a 3	X	X	-
Cerdas no pecíolo	CEP	Escala de 1 a 3	X	X	-
Cerdas no peciólulo	cepo	Escala de 1 a 3	X	X	-
Pêlos na estípula (parte livre) centro	peplc	Escala de 1 a 3	X	X	-
Pêlos na estípula (parte livre) margem	peplm	Escala de 1 a 3	X	X	-
Pêlos na estípula (parte adnata) centro	pepac	Escala de 1 a 3	X	X	-
Pêlos na estípula (parte adnata) margem	pepam	Escala de 1 a 3	X	X	-
Cerdas na estípula (parte livre)	cepl	Escala de 1 a 3	X	X	-
Cerdas na estípula (parte adnata)	cepa	Escala de 1 a 3	X	X	-
Antocianina na estípula	Ae	Ausência ou presença	X	X	-
Comprimento do estandarte	CE	Milímetro	-	-	X
Largura do estandarte	LE	Milímetro	-	-	X
Comprimento da asa	CA	Milímetro	-	-	X
Largura da asa	LA	Milímetro	-	-	X
Comprimento do lábio inferior	CLI	Milímetro	-	-	X
Comprimento do lábio posterior	CLP	Milímetro	-	-	X
Comprimento do hipanto	CH	Milímetro	-	-	X

¹Na coluna da unidade a escala de quantidade indica: Ausência (1), pouco (2) e muito (3); ²EC: eixo central; ³RL: ramo lateral; ⁴FL: flor.

4.7 Tratamento com colchicina

Foram retiradas estacas de, aproximadamente, 20 cm de todas as plantas híbridas, com o auxílio de uma tesoura. Somente as folhas apicais ainda fechadas foram mantidas e os ápices das estacas foram mergulhados dentro de tubos de ensaio contendo solução de colchicina a 0,2%. Os tubos foram fechados e levados a incubadora BOD (Demanda Bioquímica do Oxigênio). Foi utilizada luz branca fluorescente e temperatura de 28°C por oito horas. Passadas as oito horas, as estacas foram lavadas em água corrente por aproximadamente 20 minutos (FÁVERO, 2004; LÜDKE, 2014), e então mantidas em um recipiente com água até o dia seguinte de manhã. Assim, com o auxílio de um bisturi, as estacas foram cortadas em bisel (corte oblíquo) em cima do último nó e plantadas em copos descartáveis (180 ml) com o mesmo substrato dos vasos para se desenvolverem. Nesta etapa, as estacas foram revestidas com sacos plásticos para minimizar a perda de água. Quando enraizaram e cresceram, as plantas foram transplantadas para os vasos. Todos os indivíduos foram identificados com etiquetas plásticas contendo o nome do híbrido, acompanhado da letra “C” para identificar que planta havia sido tratada com colchicina.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Primeira estação de cruzamentos

5.1.1 Cruzamentos

Todos os cruzamentos planejados foram realizados já que nenhuma combinação de espécies foi comprometida devido à dessincronia entre o período florescimento dos acessos envolvidos, como ocorreu em Custodio (2009).

A primeira estação de cruzamentos foi realizada na safra de 2012/2013, tendo início em setembro de 2012 e se estendendo até abril de 2013.

Como genitores femininos foram utilizados os acessos *A. krapovickasii* Wi 1291, de genoma K; *A. magna* KG 30097 e *A. magna* V 13751, ambos de genoma B e *A. vallsii* V 7635, de genoma não identificado. Os genitores masculinos, todos de genoma A, foram representados pelos acessos *A. helodes* V 6325; *A. kempff-mercadoi* V 13250; *A. kuhlmannii* V 7639 e *A. kuhlmannii* V 9243.

Foram realizadas 1569 polinizações no período de dezembro de 2012 a março de 2013, das quais foram gerados 87 “pegs” e obtidas 26 sementes F₁. Nesta etapa foi observado o primeiro tipo de aborto para este trabalho, que foram “pegs” que não produziram sementes.

Cinco sementes foram caracterizadas como resultado de hibridação e, a porcentagem média de sucesso foi de 0,32% (Tabela 6).

A combinação *A. magna* KG 30097 x *A. kuhlmannii* V 7639 foi a que recebeu o maior número de polinizações (120) e, no entanto, produziu somente quatro “pegs” e uma semente, confirmada como resultado de autofecundação. O acesso *A. magna* KG 30097 com quatro combinações, foi o que apresentou maior dificuldade na produção de híbridos, foram realizadas 463 polinizações, do qual se obteve 36 “pegs” e 18 sementes, todas resultado de autofecundação.

Tabela 6. Combinações entre espécies para a safra 2012/2013. Genitor Feminino (GF), Genitor Masculino (GM), Número de Polinizações (NPO), Número de “Pegs” (NP), Número de Abortos (NA), Número de sementes (NS), Número de Híbridos (NH) e Porcentagem de Sucesso (PS) estão indicados.

¹ GF	-	² GM	NPO	NP	NA	NS	NH	PS (%)
KG 30097	X	V 7639	120	4	3	1	0	0,00
	X	V 13250	113	7	0	9	0	0,00
	X	V 6325	114	11	8	3	0	0,00
	X	V 9243	116	14	9	5	0	0,00
V 13751	X	V 7639	114	6	4	2	0	0,00
	X	V 13250	105	7	5	2	2	1,90
	X	V 9243	104	22	18	4	3	2,88
	X	V 6325	86	9	9	0	0	0,00
Wi 1291	X	V 7639	81	1	1	0	0	0,00
	X	V 13250	69	2	2	0	0	0,00
	X	V 6325	107	0	0	0	0	0,00
	X	V 9243	64	4	4	0	0	0,00
V 7635	X	V 7639	119	0	0	0	0	0,00
	X	V 13250	102	0	0	0	0	0,00
	X	V 6325	88	0	0	0	0	0,00
	X	V 9243	67	0	0	0	0	0,00
TOTAL	-	-	1.569	87	56	26	5	-
MÉDIA	-	-	-	-	-	-	-	0,32

¹GF: Genitores femininos - *A. krapovickasii* Wi 1291; *A. magna* KG 30097; *A. magna* V 13751; *A. vallsii* V 7635; ²GM: Genitores masculinos - *A. helodes* V 6325; *A. kempff-mercadoid* V 13250; *A. kuhlmannii* V 7639; *A. kuhlmannii* V 9243.

O acesso *A. magna* KG 30097 além de apresentar defesas contra pragas, ele também apresenta resistência a doenças (FÁVERO et al., 2009), sendo um material de grande importância para o programa de melhoramento de amendoim. Fávero (2004) realizou cruzamentos com quatro combinações envolvendo *A. magna* KG 30097 (*A. simpsonii* V 13710, *A. kuhlmannii* V 10506, *A. kempff-mercadoid* V 13250 e *A. diogoi* KG 10602) como genitor feminino e teve dificuldades de obter sementes dos cruzamentos que envolvia estes acessos. Somente uma destas combinações foi utilizada neste projeto *A. magna* KG 30097 x *A. kempff-mercadoid* 13250 do qual se obteve nove sementes, que apresentaram grandes dificuldades na germinação, e por fim apodreceram. Lüdke (2014) obteve três híbridos de *A. valida* KG 30147 x *A. magna* KG 30097 e quatro híbridos de *A. valida* V 13514 x *A. magna* KG 30097. Custodio (2009) conseguiu quatro híbridos da combinação *A. gregoryi* V 14957 x *A. magna* KG 30097, porém, nestes dois casos, todos

os acessos envolvidos eram de genoma B, indicando que a distancia genética entre os materiais envolvidos afeta diretamente a produção do híbrido.

Ao contrario de *A. magna* KG 30097, o acesso V 13751 de *A. magna* se mostrou bastante eficiente para produção de híbridos, sendo que todos os cinco híbridos produzidos nesta primeira estação de cruzamentos possuíam este acesso como genitor feminino.

Em todas as oito combinações envolvendo os acessos *A. krapovickasii* Wi 1291 e *A. vallsii* V 7635 como genitor feminino foram verificadas dificuldades na obtenção de sementes. Em destaque o acesso *A. vallsii* V 7635 que não produziu “pegs” durante a estação. Rodrigues (2006) realizou sete combinações envolvendo o acesso *A. vallsii* V 7635 (genoma desconhecido) com acessos de genoma A (V 14309; V 10229; V 10470; V 14167; Vp 5000; V 13023; GKP 10017), e somente nas três primeiras foi possível obter híbridos. Nenhuma destas combinações foram utilizadas neste trabalho, mas a dificuldade na obtenção do híbrido entre este acesso com outros acessos de genoma A continua presente.

Nove combinações não produziram sementes, o que pode ter ocorrido porque em *Arachis* vários fatores podem interferir na produção de híbridos, como: a) falta de fertilização; b) fertilização atrasada; c) inabilidade dos proembriões crescerem após o “peg” atingir o solo; d) crescimento muito lento dos proembriões (TALLURY et al., 1995).

Foi verificado que nos cruzamentos entre *A. magna* V 13751 x *A. kuhlmannii* V 9243 e *A. magna* V 13751 x *A. kempff-mercadoi* V 13250, três e duas plantas, respectivamente, tiveram ausência de dormência e germinaram nos vasos antes da colheita. Estas foram transplantadas em outros vasos para se desenvolverem. Tal mecanismo de quebra de dormência é comum em híbridos interespecíficos de *Arachis*, sendo observado em outras ocasiões (CUSTODIO, 2009; LÜDKE, 2014; RODRIGUES, 2006). Estas cinco plantas posteriormente foram confirmadas como híbridas.

5.1.2. Germinação dos indivíduos das progênes e genitores

Na safra de 2013/2014, oito sementes de cada genitor e todas as sementes das progênes produzidas na primeira estação de cruzamento, mais uma semente oriunda

de (*A. magna* V 13751 x *A. kempff-mercadói* V 13250)^{4x} foram colocadas para germinar. As sementes dos genitores não apresentaram problemas para germinar.

Das 26 sementes das progênies produzidas na primeira estação de cruzamentos, somente 13 germinaram e as demais permaneceram por 20 dias no germinador e acabaram apodrecendo, possivelmente por um aborto pós-zigótico. As 13 sementes que germinaram foram plantadas em copos, e somente seis sobreviveram para serem transplantadas nos vasos. Além dessas seis plântulas, foram incorporadas ao ensaio mais cinco que tiveram germinação espontânea nos vasos, germinando antes da colheita.

Na safra de 2010/2011 foi produzida uma semente de *A. magna* V 13751 x *A. kempff-mercadói* V 13250. Na safra de 2011/2012 esta semente foi caracterizada como híbrido e tratada com colchicina (*A. magna* V 13751 x *A. kempff-mercadói* V 13250)^{4x}, gerando uma semente. Na safra de 2012/2013 esta semente foi colocada para germinar (não teve problemas para germinar e sobreviveu para ser transplantada para o vaso), a fim de confirmar o caráter de anfidiplóide sintético. Esta planta foi denominada An 13 neste trabalho.

Em suma, foram utilizadas 20 plantas de espécies silvestres (genitores), 11 plantas F₁ das progênies da primeira estação de cruzamento (Tabela 7), e uma semente candidata a anfidiplóide sintético. Destas 11 plantas F₁, duas morreram cinco semanas após o transplante para os vasos.

Tabela 7. Germinação de sementes para a safra 2013/2014. Genitor Feminino (GF), Genitor Masculino (GM), Número de Sementes (NS), Número de Sementes Germinadas (NSG), Número de Germinação Espontânea (NGE), Número de Plantas Envasadas (NPE) estão indicados.

¹ GF		² GM	NS	NSG	NGE	NPE
KG 30097	x	V 7639	1	0	0	0
	x	V 13250	9	3	0	0
	x	V 6325	3	2	0	1
	x	V 9243	5	5	0	3
V 13751	x	V 7639	2	2	0	2
	x	V 13250	2	0	3	3
	x	V 9243	4	1	2	2
TOTAL			26	13	5	11

¹GF: Genitores femininos - *A. magna* KG 30097; *A. magna* V 13751. ²GM: Genitores masculinos - *A. helodes* V 6325; *A. kempff-mercadói* V 13250; *A. kuhlmannii* V 7639; *A. kuhlmannii* V 9243.

Estes genitores que foram germinados para as caracterizações das progênes da primeira estação de cruzamento também foram aproveitados para realizar a segunda estação de cruzamentos.

Ainda na tabela 7, foi possível ver os outros tipos de abortos observados neste trabalho, tanto pré como pós-zigóticos, pois observou-se “pegs” sem a formação de sementes, sementes mal formadas, sementes bem formadas que não germinaram e plântulas de baixo vigor que acabaram por morrer. Todas estas características podem ser indicativos de que eram indivíduos híbridos que não conseguiram se estabelecer.

Cinco plantas, identificadas pelos números 1, 2, 3, 4 e 6, foram atacadas por fungos, o que ocasionou morte rápida (3 a 5 dias a partir dos sintomas iniciais) das plantas (Figura 17). Dentre as plantas afetadas, estavam três indivíduos oriundos de autofecundação de *A. magna* KG 30097 x *A. kuhlmannii* V 9243 (1, 2 e 3) e dois híbridos de *A. magna* V 13751 x *A. kuhlmannii* V 9243 (4 e 6). As plantas 3 e 6 foram enviadas para Clínica Fitopatológica Professor Hiroshi Kimati na ESALQ/USP para análise. Na amostra 3 foi observada a presença dos fungos *Rhizoctonia solani* (causador da rhizoctoniose) associado ao sistema radicular e *Leptosphaerulina crassiasca* (causador da mancha de leptosferulina) associado à parte aérea da amostra analisada. Na amostra 6 foi observada a presença dos fungos: *Rhizoctonia solani* (este em pequena quantidade), associado ao sistema radicular, e *Leptosphaerulina crassiasca*, *Cylindrocladium sp.* (causador da podridão negra) e *Cercospora arachidicola* (causador da mancha castanha). Os dois híbridos de *A. magna* V 13751 x *A. kuhlmannii* V 9243 não foram perdidos, por que este material já havia sido estaqueado e tratado com colchicina. Após este ocorrido, todos os outros híbridos foram estaqueados e multiplicados como medida de segurança.



Figura 17. Indivíduos atacados por fungos. A) *A. magna* KG 30097. B) *A. magna* V 13751 x *A. kuhlmannii* V 9243.

5.1.3 Caracterização reprodutiva

Foram caracterizadas 14 plantas, sendo cinco genitores e nove indivíduos das progênies (F₁). Para os dois métodos de coloração, a análise de variância indicou diferenças significativas entre os indivíduos e não houve diferença entre as repetições (Tabela 8 e 9).

Tabela 8. Análise de variância em acessos e repetições, corados com tetrazólio 0,25%.

Tratamento	GL	Soma de quadrados	Quadrados médios	F Valor	¹ Pr > F
Acesso	8	60351,3615	7543,9202	9103,9400	0,0001
Repetição	3	1,4157	0,4719	0,5700	0,6410

¹Pr <0,05 são significativos.

Tabela 9. Análise de variância em acessos e repetições, corados com carmim acético 2% com glicerina.

Tratamento	GL	Soma de quadrados	Quadrados médios	F Valor	¹ Pr > F
Acesso	14	283670,4060	0,2026	1336,5200	0,0001
Repetição	3	0,0002	0,0001	0,4500	0,7180

¹Pr <0,05 são significativos.

Trabalhos que se utilizaram destas duas técnicas para estimar viabilidade de grãos de pólen mostraram que grãos de pólen de acessos de espécies silvestres tendem a apresentar alta viabilidade, enquanto híbridos oriundos de cruzamentos entre espécies de genomas distintos tendem a apresentar uma baixa viabilidade (CUSTODIO, 2009; FÁVERO, 2004; STALKER et al., 1991a, 1991b).

Com relação aos resultados obtidos por coloração com carmim acético 2% com glicerina, como era esperado, todas as plantas dos genitores apresentaram alta viabilidade, acima de 93% (Tabela 10). Três indivíduos da progênie de *A. magna* (KG 30097) x *A. kuhlmannii* (V 9243) e um da progênie de *A. magna* (KG 30097) x *A. helodes* (V 6325) apresentaram alta porcentagem de pólen viável. Tal resultado indica que essas progênies podem ser resultado de autofecundação. Entretanto, cinco plantas F₁ apresentaram uma baixa viabilidade, indicando que estas plantas podem ser resultado de hibridação. Os grupos “a”, “ab”, “b” e “c” englobaram genitores e indivíduos não híbridos das progênies, enquanto o grupo “d” reuniu os indivíduos híbridos das progênies.

Com relação aos resultados com tetrazólio 0,25% como corante, todas as plantas dos genitores apresentaram alta viabilidade, acima de 77% (Tabela 10). Três

plantas F₁ apresentaram baixa viabilidade, indicando que estas plantas podem ser resultado de hibridação interespecífica. Os grupos “a”, “b”, “c” e “d” englobaram os genitores e indivíduos não híbridos das progênes, enquanto no grupo “e” estavam os indivíduos híbridos. Para esta análise, foram avaliados somente nove indivíduos, pois as plantas 1, 2, e 3 de autofecundação morreram, assim como os híbridos 4 e 6, como mencionado anteriormente.

Como os híbridos 4 e 6 haviam sido estaqueados antes de morrerem, na safra de 2013/2014 eles produziram flores regularmente e puderam ser avaliados por coloração de tetrazólio 0,25%, confirmando a hibridação dos mesmos. As plantas 4 e 6 de *A. magna* (V 13751) x *A. kuhlmannii* (V 9243) apresentaram, respectivamente, 1,3 e 1,5 % de grãos de pólen corados.

Tabela 10. Porcentagem de grãos de pólen viáveis dos indivíduos avaliados na primeira caracterização, segundo as duas técnicas de coloração utilizadas.

Identificação	Indivíduos	¹ Porcentagem Média de viabilidade de grãos de pólen	
		carmim acético 2% com glicerina	² Tetrazólio 0,25%
2	<i>A. magna</i> (KG 30097) x <i>A. kuhlmannii</i> (V 9243)	99,50 a	-
9	<i>A. magna</i> (KG 30097) x <i>A. helodes</i> (V 6325)	99,13 a	96,00 b
1	<i>A. magna</i> (KG 30097) x <i>A. kuhlmannii</i> (V 9243)	98,88 a	-
13	<i>A. kempff-mercadoi</i> (V 13250)	97,88 a	88,87 c
11	<i>A. magna</i> (V 13751)	96,75 ab	77,33 d
10	<i>A. magna</i> (KG 30097)	96,25 ab	98,37 a
12	<i>A. kuhlmannii</i> (V 9243)	95,83 ab	90,00 c
15	<i>A. kuhlmannii</i> (V 7639)	95,63 ab	-
14	<i>A. helodes</i> (V 6325)	93,00 b	89,75 c
3	<i>A. magna</i> (KG 30097) x <i>A. kuhlmannii</i> (V 9243)	91,5 c	-
8	<i>A. magna</i> (V 13751) x <i>A. kempff-mercadoi</i> (V 13250)	2,50 d	1,50 e
5	<i>A. magna</i> (V 13751) x <i>A. kuhlmannii</i> (V 9243)	2,38 d	1,33 e
4	<i>A. magna</i> (V 13751) x <i>A. kuhlmannii</i> (V 9243)	2,38 d	-
6	<i>A. magna</i> (V 13751) x <i>A. kuhlmannii</i> (V 9243)	2,12 d	-
7	<i>A. magna</i> (V 13751) x <i>A. kempff-mercadoi</i> (V 13250)	1,88 d	0,87 e
CV %		2,72	2,53

¹Médias não seguidas de uma mesma letra diferem a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. ²Os traços na coluna da coloração por tetrazólio representam ausência de dados.

Todos os indivíduos presentes neste trabalho tiveram uma boa floração, assim sendo, todas as plantas foram avaliadas quanto a análise de viabilidade de grãos de pólen, ao contrário do observado por Custodio (2009) e Lüdke (2014) pela ausência de

floração em alguns híbridos. As plantas 4, 5 e 6 apresentaram atraso na floração, que ocorreu somente em dezembro de 2013, enquanto as outras plantas já estavam florindo.

A planta oriunda da semente de (*A. magna* V 13751 x *A. kempff-mercadoi* V 13250)^{4x}, quando submetida à coloração por carmin acético 2% com glicerina e tetrazólio 0,25 %, apresentou viabilidade de grãos de pólen de 98 e 95 %, respectivamente.

5.1.4 Caracterização molecular

Foram selecionados três marcadores microssatélites mais polimórficos e que melhor amplificaram nas amostras, sendo eles: Seq3D09, IPAHM406, RI2A06. Estes foram utilizados para avaliar 15 amostras de *Arachis*, sendo cinco amostras dos genitores silvestres, nove amostras de prováveis híbridos e uma amostra da planta oriunda de (*A. magna* V 13751 x *A. kempff-mercadoi* V 13250)^{4x} (Tabela 11).

Os locos avaliados permitiram a identificação de autofecundação nos indivíduos 1, 2, 3 e 9 e hibridação nos indivíduos 4, 5, 6, 7 e 8. Para analisar o indivíduo resultante de autofecundação, foi observada a banda que estava presente no genitor masculino, ausente no genitor feminino, e ausente no indivíduo da progênie. Para identificar as hibridações foi observada a banda que estava presente no genitor masculino, ausente no genitor feminino, e presente no indivíduo da progênie.

Dentre os marcadores selecionados, o RI2A06 com a banda 160pb (indicada pelas flechas na Figura 18) foi capaz de discriminar todos os indivíduos (Tabela 11 e Figura 18). Em se tratando das plantas de autofecundação, podemos observar que o genitor feminino KG 30097 (10) não possui a banda 160pb, que está presente nos genitores masculinos V 9243 (12) e V 6325 (14), assim sendo, os indivíduos 01, 02 e 03 da progênie de KG 30097 x V 9243 e o indivíduo 9 da progênie de KG 30097 x V 6325 foram considerados resultados de autofecundação, pois não possuem a banda 160pb presente nos genitores masculinos (12 e 14). Para as plantas resultantes de hibridação, podemos observar que o genitor feminino V 13751 (11) também não possui a banda 160pb, que está presente nos genitores masculinos V 9243 (12) e V 13250 (13), assim sendo, os indivíduos 4, 5 e 6 da progênie de V 13751 x V 9243 e os indivíduos 7 e 8 da progênie de V 13751 x V 13250 foram considerados híbridos, pois apresentam a banda 160pb, também presente nos genitores masculinos (12 e 13). O An 13 (16) é um anfidiplóide sintético oriundo de (*A. magna* V 13751 x *A. kempff-mercadoi* V 13250)^{4x}, assim sendo, esse indivíduo

apresentou a mesma constituição molecular que os dois híbridos de V 13751 x V 13250 (7 e 8).

Seguindo o mesmo critério de classificação, o marcador IPAHM-406 pela banda 272pb identificou autofecundação nas plantas 1, 2, 3 e 9 e, hibridação nas plantas 4, 5, 6, 16, 7 e 8. O marcador Seq3d9 pela banda 270pb identificou autofecundação nas plantas 1, 2, 3 e 9 e, identificou hibridação nas plantas 4, 5 e 6. Nas plantas 16, 7 e 8 os genitores não apresentaram polimorfismo neste marcador (Seq3d9), tornando impossível a identificação da hibridação.

Os resultados dos marcadores que não apresentaram informações relevantes para identificação de hibridização não são apresentados.

Tabela 11. Identificação de autofecundação ou hibridização por marcadores microsstatélites em indivíduos dos cruzamentos interespecíficos de *Arachis* spp. da primeira estação cruzamentos.

Identificação	¹ Indivíduos	² Marcador (Banda em pb)			³ Resultado
		RI2A06 (160pb)	Seq3D09 (270pb)	IPAHM406 (272pb)	
10	KG 30097 (GF)	-	-	-	NA
11	V 13751 (GF)	-	-	-	NA
12	V 9243 (GM)	X	X	X	NA
13	V 13250 (GM)	X	-	X	NA
14	V 6325 (GM)	X	X	X	NA
1	KG 30097 x V 9243	-	-	-	Autofecundação
2	KG 30097 x V 9243	-	-	-	Autofecundação
3	KG 30097 x V 9243	-	-	-	Autofecundação
4	V 13751 x V 9243	X	X	X	Hibridação
5	V 13751 x V 9243	X	X	X	Hibridação
6	V 13751 x V 9243	X	X	X	Hibridação
16	(V 13751 x V 13250) ^{4x} (An)	X	-	X	NA
7	V 13751 x V 13250	X	-	X	Hibridação
8	V 13751 x V 13250	X	-	X	Hibridação
9	KG 30097 x V 6325	-	-	-	Autofecundação

¹GM: Genitor masculino, GF= Genitor feminino, An = Anfidiplóide. ²X = presença da banda; - = ausência da banda; pb = pares de bases. ³NA = não se aplica.

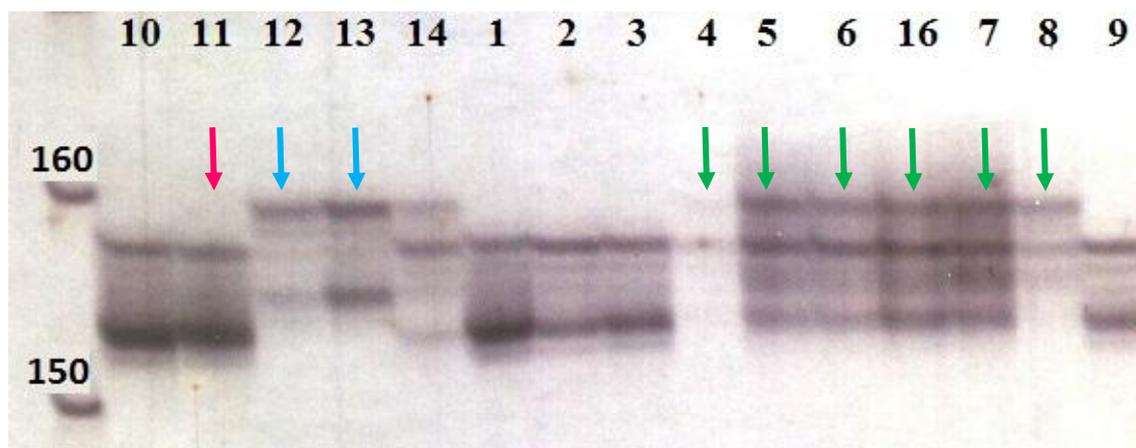


Figura 18. Perfil de amplificação do marcador RI2A06 em gel de poliacrilamida 6% para os indivíduos da primeira caracterização. Indivíduos: KG 30097 (10); V 13751 (11); V 9243 (12); V 13250 (13); V 6325 (14); KG 30097 x V 9243 (1); KG 30097 x V 9243 (2); KG 30097 x V 9243 (3); V 13751 x V 9243 (4); V 13751 x V 9243 (5); V 13751 x V 9243 (6); An 13 (16); V 13751 x V 13250 (7); V 13751 x V 13250 (8); KG 30097 x V 6325 (9). As flechas indicam a banda de 160pb a ser observada para a genotipagem. Flechas em verde indicam os híbridos, em azul, os genitores masculinos e em rosa, o genitor feminino.

5.1.5 Caracterização Morfológica

As mesmas 14 plantas analisadas molecularmente foram caracterizadas morfológicamente. Os três primeiros componentes da análise multivariada explicaram 97% da variação total das características morfológicas avaliadas (Tabela 12).

Tabela 12. Análise de componentes principais dos descritores morfológicos avaliados na primeira caracterização. Autovalores, diferença entre os componentes, proporção e proporção acumulada estão indicados.

Componentes	Autovalor	Diferença	Proporção	Proporção Acumulada
1	6156,2500	5179,9800	0,8200	0,8200
2	976,2600	810,4800	0,1300	0,9500
3	165,7800	63,2200	0,0200	0,9700
4	102,5600	59,9600	0,0100	0,9800
5	42,5900	15,9200	0,0000	0,9900

Na Tabela 13 é possível observar as características que mais explicaram a variação observada segundo o Prin 1. Tanto os valores positivos quanto os negativos indicam a importância do descritor, os valores próximos a zero, possuem menor importância, assim sendo, os dados foram elevados ao quadrado para que os valores

negativos se tornassem positivos, assim, foi possível classifica-los em forma decrescente e observar os descritores mais importantes.

Dentre os 20 descritores mais importantes, 13 foram coletados no eixo central da planta, seis no ramo lateral e um na flor (Tabela 13). Todos os outros descritores, não presentes nesta tabela, foram considerados irrelevantes neste trabalho para determinar a variação morfológica entre os indivíduos. A soma de todos os valores do Prin elevado ao quadrado de cada descritor é igual a 1,0 (um), observando este valor podemos concluir que o descritor apEC (Altura da planta) foi responsável por mais de 57% da variação observada, seguido pelos descritores cRL (Comprimento do ramo lateral), cfdEC (Comprimento de folíolo distal), cfpEC (Comprimento de folíolo proximal) e cpEC (Comprimento de pecíolo), respectivamente com 20, 06, 05 e 04%.

Tabela 13. Contribuição dos descritores morfológicos para a análise de componentes principais nos híbridos da primeira estação de cruzamento.

Descritores	¹ Siglas	Prin1	Prin1^2	^{2,3} Indivíduos									
				12	4	5	6	11	16	7	8	13	
Altura da planta	apEC	0,75893	0,576	80,80	112,46	-	-	78,12	10,00	147,84	133,26	90,50	
Comprimento do ramo lateral	cRL	0,44947	0,202	135,00	26,40	24,25	19,55	114,5	55,00	77,50	89,50	68,50	
Comprimento de folíolo distal	cfDEC	0,25732	0,0662	51,85	28,48	-	-	44,23	42,50	37,09	31,83	35,67	
Comprimento de folíolo proximal	cfpEC	0,23233	0,054	43,52	27,47	-	-	39,36	38,50	30,97	27,00	32,34	
Comprimento de pecíolo	cpEC	0,20319	0,0413	63,09	29,80	-	-	39,26	11,50	40,09	27,24	17,63	
Comprimento de estípula livre	ceIEC	0,15104	0,0228	27,85	8,85	-	-	25,74	23,80	18,68	19,11	22,16	
Largura de folíolo distal	lfDEC	0,11708	0,0137	21,40	12,17	-	-	20,46	20,10	13,53	14,34	14,91	
Largura de folíolo proximal	lfpEC	0,09867	0,0097	15,88	10,17	-	-	16,45	16,70	10,74	10,57	13,00	
Comprimento da parte adnata	cpDEC	0,07151	0,0051	15,27	12,03	-	-	12,75	15,80	8,50	7,63	10,09	
Comprimento de pecíolulo	cpoEC	0,06034	0,0036	17,09	8,03	-	-	11,87	8,36	7,98	6,62	6,59	
Comprimento do hipanto	chFL	-0,0473	0,0022	52,43	75,12	88,08	87,23	66,66	84,00	58,73	69,08	74,63	
Comprimento de estípula livre	ceRL	0,0284	0,0008	14,39	13,75	11,53	10,40	17,62	18,10	15,49	17,58	15,49	
Comprimento de folíolo distal	cfDRL	0,02239	0,0005	25,99	28,60	30,57	23,55	24,43	32,70	34,49	36,31	27,84	
Comprimento de folíolo proximal	cfpRL	0,02148	0,0005	23,36	25,23	27,68	22,52	23,06	28,60	31,00	29,84	25,30	
Largura de folíolo distal	lfDRL	0,01523	0,0002	21,07	13,37	13,34	12,20	17,44	23,10	19,83	18,33	17,62	
Largura de folíolo proximal	lfpRL	0,01406	0,0002	16,70	11,65	12,20	11,12	15,41	19,00	16,91	14,49	15,05	
Largura de estípula livre	leIEC	0,0119	0,0001	2,84	1,97	-	-	2,50	2,46	2,33	2,36	3,29	
Pêlos no folíolo abaxial margem	pfabmEC	0,00944	9E-05	3,00	3,00	-	-	3,00	4,00	3,00	3,00	2,00	
Pêlos no folíolo abaxial centro	pfabcEc	0,00931	9E-05	3,00	3,00	-	-	3,00	4,00	3,00	3,00	3,00	
Pêlos no folíolo abaxial nervura principal	pfabnpEC	0,00917	8E-05	3,00	3,00	-	-	2,00	1,00	3,00	3,00	3,00	

¹Siglas terminadas em EC se referem ao eixo central, em RL ao ramo lateral e em FL à flor. ²Indivíduos: 8,9 e 10 - V 13751 x V 9243; 14 - V 13751; 4 - V 9243; 15 - An 13; 16 e 17 - V 13751 x V 13250; 18 - V 13250. ³Os traços representam ausência de dados

A partir dos componentes 1 e 2 multiplicados pelos valores médios de cada característica para cada indivíduo, foi possível construir o gráfico biplot (Figura 19). Ao analisar os cinco descritores mais importantes para a primeira caracterização, observa-se que quatro destes pertencem ao eixo central da planta, estes descritores juntos somam 72% da variação morfológica observada, assim, eles foram bastante discriminativos, e as plantas que não o possuíam (o eixo morreu durante o desenvolvimento) ficaram totalmente dispersas no gráfico.

Os genitores ficaram bem distribuídos no gráfico. As plantas 1, 2, 3 e 9, resultantes dos cruzamentos entre os indivíduos KG 30097 x V 9243 e KG 30097 x V 6325 e identificadas como resultado de autofecundação pelo teste de paternidade, agruparam-se à direita no gráfico, próximo ao genitor feminino (planta 10), exceto a planta 1, que não possuía o eixo central, e ficou oposta a essas plantas, se apresentando à esquerda.

As plantas 4, 5 e 6, identificadas como híbridas pelo teste de paternidade, apresentaram-se um pouco distante de seus parentais. A planta 4, a única que apresentava o eixo central, apresentou-se muito diferente dos genitores, porém permaneceu mais próxima ao genitor masculino (13) que ao feminino (12). Assim como na planta 1, que não possuía eixo central, as plantas híbridas 5 e 6 se apresentaram muito distante da planta 4. Analisando o descritor mais importante, observa-se que os genitores feminino e masculino apresentaram respectivamente 80,80 e 78,12 cm para o apEC, sendo assim, as plantas 4 (única com eixo central) apresentando 112,46 cm, se distribuiu de forma distante dos dois genitores. Essa distância entre as características entre dos genitores e a progênie pode ser observada nos descritores na Tabela 13.

Os híbridos 7 e 8, resultantes do cruzamento entre V 13751 x V 13250, apresentaram-se mais próximos ao genitor masculino (13) que ao genitor feminino (11). Analisando o descritor mais importante, observa-se que os genitores feminino e masculino apresentaram respectivamente 78,12 e 90,50 cm para o apEC, sendo assim, as plantas 7 e 8 apresentando respectivamente 147,84 e 133,26 cm, se distribuíram mais próximo ao genitor masculino que ao feminino.

O An 13 resultado de (V 13751 x V 131250)^{4x} apresentou bastante diferente de seus genitores silvestres e dos híbridos 7 e 8 do qual ele teve origem, se distribuindo com certa distância em relação aos dois genitores e aos híbridos.



Figura 19. Gráfico biplot resultante da primeira estação de cruzamento, obtido por meio da análise de componentes principais considerando os 63 descritores para os componentes 1 e 2. Os marcadores em triângulo são os genitores femininos, em círculos os genitores masculinos, e representando as progênies, em quadrado as plantas híbridas, e em losango plantas oriundas de autofecundação.

5.2 Segunda estação de cruzamentos

5.2.1 Cruzamentos

A segunda estação de cruzamento foi realizada na safra de 2013/2014, tendo início em setembro de 2013 e se estendendo até abril de 2014.

Todos os cruzamentos que envolveram os acessos *A. krapovickasii* Wi 1291 e *A. vallsii* V 7635 apresentaram grandes dificuldades na obtenção de sementes durante a primeira estação, assim como o cruzamento (*A. magna* V 13751x *A. kuhlmannii* V 9243). Sendo assim, estas combinações foram repetidas na segunda estação.

Foram utilizados os acessos *A. gregory* V 14760, *A. krapovickasii* Wi 1291, *A. magna* KG 30097, *A. magna* V 13751, de genoma B e *A. vallsii* V 7635, de genoma não identificado, como genitor feminino. Os genitores masculinos (todos de genoma A) foram

representados pelos acessos *A. helodes* Co 6862, *A. helodes* V 6325, *A. kempff-mercadoi* V 13250, *A. kuhlmannii* V 6413, *A. kuhlmannii* V 7639 e *A. kuhlmannii* V 9243.

Foram realizadas 1.571 polinizações no período de dezembro de 2013 a março de 2014. Obteve-se 79 “pegs”, dos quais foram obtidas 23 sementes F₁. Assim como na primeira estação de cruzamentos, foi observada grande quantidade de “pegs” abortados que não produziram sementes. Uma semente foi caracterizada como resultado de hibridação e a porcentagem média geral de sucesso foi de 0,06% (Tabela 14).

Das 12 combinações de cruzamentos realizadas na segunda estação, somente três (*A. vallsii* V 7635 x *A. helodes* V 6325, *A. gregory* V 14760 x *A. kuhlmannii* V 6413 e *A. gregory* V 14760 x *A. helodes* Co 6862), incluindo as duas novas combinações que não haviam sido cruzadas na primeira estação, não produziram sementes.

Assim como na primeira estação, a combinação *A. magna* KG 30097 x *A. kuhlmannii* V 7639 foi a que recebeu o maior número de polinizações (304), produzindo seis “pegs” e três sementes, do qual uma foi confirmada com híbrida, apresentando a porcentagem de sucesso de 0,33%.

Tabela 14. Combinações entre espécies para a safra 2013/2014. Genitor Feminino (GF), Genitor Masculino (GM), Número de Polinizações (NPO), Número de “pegs” (NP), Número de Abortos (NA), Número de Sementes (NS), Número de Híbridos (NH) e Porcentagem de Sucesso (PS) estão indicados.

¹ GF		² GM	NPO	NP	NA	NS	NH	PS (%)
V 13751	X	V 6325	173	11	8	3	0	0
KG 30097	X	V 7639	304	6	3	3	1	0,33
V 14760	X	Co 6862	119	12	12	0	0	0
	X	V 6413	97	13	13	0	0	0
Wi 1291	X	V 7639	71	4	1	3	0	0
	X	V 13250	70	7	5	2	0	0
	X	V 9243	91	11	8	3	0	0
	X	V 6325	86	4	0	4	0	0
V 7635	X	V 13250	175	4	3	1	0	0
	X	V 7639	115	2	0	2	0	0
	X	V 9243	148	4	2	2	0	0
	X	V 6325	122	1	1	0	0	0
TOTAL	-	-	1571	79	56	23	1	-
MÉDIA	-	-	-	-	-	-	-	0,06

¹GF: Genitores femininos - *A. gregory* V 14760; *A. krapovickasii* Wi 1291; *A. magna* KG 30097; *A. magna* V 13751; *A. vallsii* V 7635. ²GM: Genitores masculinos - *A. helodes* Co 6862; *A. helodes* V 6325; *A. kempff-mercadoi* V 13250; *A. kuhlmannii* V 6413; *A. kuhlmannii* V 7639; *A. kuhlmannii* V 9243.

5.2.2 Germinação dos indivíduos das progênes e genitores

Na safra 2013/2014, oito sementes de cada genitor e todas as sementes das progênes produzidas na segunda estação de cruzamentos foram colocadas para germinar. As sementes dos genitores não apresentaram problemas para germinar.

Das 23 sementes produzidas pelas combinações silvestres, 18 germinaram e as demais permaneceram por 20 dias no germinador, e por fim apodreceram. As sementes germinadas foram plantadas em copos, e somente cinco sobreviveram para serem transplantadas nos vasos (Tabela 15). Assim como na germinação das sementes para a primeira caracterização, nesta germinação também foi observado abortos de sementes bem desenvolvidas que não germinaram e de sementes bem germinadas que não tiveram vigor para sobreviver nos vasos. Sendo assim, nesta etapa foram caracterizadas 16 plantas de espécies silvestres utilizadas como genitores nos cruzamentos e cinco plantas F₁.

Tabela 15. Germinação de sementes da Safra 2014/2015. Genitor Feminino (GF), Genitor Masculino (GM), Número de Sementes (NS), Número de sementes Germinadas (NSG), Número de Plantas Envasadas (NPE) estão indicados.

¹ GF		² GM	NS	NSG	NPE
KG 30097	X	V 7639	3	3	1
V 13751	X	V 6325	3	3	0
Wi 1291	X	V 7639	3	1	0
	X	V 13250	2	1	0
	X	V 9243	3	2	0
V 7635	X	V 6325	4	4	2
	X	V 13250	1	1	0
	X	V 7639	2	1	1
	X	V 9243	2	2	1
TOTAL	-	-	23	18	5

¹GF - *A. krapovickasii* Wi 1291; *A. magna* KG 30097; *A. magna* V 13751; *A. vallsii* V 7635. ²GM - *A. helodes* V 6325; *A. kempff-mercadoi* V 13250; *A. kuhlmannii* V 7639; *A. kuhlmannii* V 9243

5.2.3 Considerações quanto à germinação dos indivíduos

Em geral, o número reduzido de plantas candidatas a híbridas foi devido ao grande número de sementes que não germinaram e de plântulas que morreram poucos dias após serem retiradas do germinador e plantadas para se desenvolverem. Este baixo vigor de

plântulas ou aborto pós-zigótico pode ter ocorrido por estes indivíduos serem híbridos. Pode-se inferir que estes indivíduos foram resultados de hibridação, pois nenhum acesso silvestre germinado durante este trabalho apresentou problemas para germinar, ou morte na fase inicial do desenvolvimento. Para os próximos trabalhos que seguirão, é recomendada a inserção de técnica de resgate de embrião em cultura de tecidos (*in vitro*) na metodologia.

Das combinações de cruzamentos realizadas neste trabalho, obtinha-se certo número de sementes, mas ao colocar para germinar, algumas apresentavam um alto grau de dormência, que não foi superada até pelo uso de Ethrel, e quando estas sementes superavam a dormência, acabavam morrendo ainda quando plântulas. O acesso KG 30097 apresentou a maior porcentagem de sucesso para obtenção de sementes, mas quando a progênie era colocada para germinar apresentava alta dormência, ou a raiz parava de se desenvolver logo após germinação ainda no germinador, e morriam. Isso aconteceu também para todas as plantas resultantes de cruzamentos entre genitores de genoma K (*A. krapovickasii* Wi 1291) com A, impedindo assim a realização da caracterização da planta, poliploidização, e a avaliação do comportamento do anfidiplóide AAKK cruzado com *A. hypogaea* AABB.

Duas plantas da progênie da primeira estação, produzidas pela combinação *A. magna* V 13751 x *A. kuhlmannii* V 7639 germinaram e foram transplantados para os vasos, mas logo em seguida morreram (Figura 20). Na segunda estação, a combinação *A. krapovickasii* Wi 1291 x *A. helodes* V 6325 produziu quatro sementes, duas destas se desenvolveram nos vasos e as outras duas morreram jovens.



Figura 20. Indivíduos de *A. magna* V 13751 x *A. kuhlmannii* V 7639 que morreram logo após serem transplantados para os vasos.

Houve um aumento considerável na coleção de trabalho local, todos os híbridos foram multiplicados por estaca, e estes também foram tratados com colchicina, e estão sendo observados na tentativa de se obter os anfidiplóides sintéticos. Todas essas plantas são mantidas em casa de vegetação.

Mesmo obtendo um pequeno número de sementes em relação ao número de polinizações que foram realizadas, foi possível obter seis plantas híbridas, mais que suficiente para dar continuidade ao programa de pré-melhoramento.

5.2.4 Caracterização reprodutiva

A análise totalizou 11 plantas, sendo seis genitores e cinco indivíduos das progênies (F_1). Para os dois métodos de coloração, a análise de variância indicou diferenças significativas entre os indivíduos, e que não houve diferenças entre as repetições (Tabela 16 e 17).

Tabela 16. Análise de variância em acessos e repetições, corados com carmim acético 2% com glicerina, safra 2013/2014

Tratamento	GL	Soma de quadrados	Quadrados médios	F Valor	¹ Pr > F
Acesso	10	39358,6591	3935,8659	45,9100	0,0001
Rep	3	103,5170	34,5057	0,4000	0,7522

¹Pr <0,05 são significativos.

Tabela 17. Análise de variância em acessos e repetições, corados com tetrazólio 0,25%, safra 2013/2014

Tratamento	GL	Soma de quadrados	Quadrados médios	F Valor	¹ Pr > F
Acesso	10	38248,9587	3824,8959	76,5100	0,0001
Rep	3	36,5547	12,1849	0,2400	0,8651

¹Pr <0,05 são significativos.

Para os grãos de pólen corados com carmim acético 2% com glicerina (Tabela 18). A maioria dos genitores apresentaram alta viabilidade (acima de 69%), exceto a planta 24 que continuou a apresentar viabilidade mais baixa (46,25%). Das cinco plantas candidatas a híbridas, quatro continuaram a apresentar alta viabilidade (acima de 91%) e uma (KG 30097 x V 7639) apresentou baixa viabilidade (1,37%). Os grupos “a”, “ab”, “b”

e “c” englobaram os genitores e indivíduos não híbridos das progênes, enquanto no grupo “d” permaneceu o indivíduo híbrido da progênie.

Com relação aos resultados da coloração com tetrazólio 0,25%, a maioria dos genitores apresentaram alta viabilidade (acima de 68% de grãos corados), exceto a planta 24 (V 7639) que apresentou a viabilidade abaixo do esperado (24,83 %), porém, muito mais alta que a plantas consideradas resultantes de hibridação. Das plantas candidatas a híbridas, quatro delas apresentaram alta viabilidade (acima de 88%) e uma (KG 30097 x V 7639) apresentou baixa viabilidade (1,12%). Os grupos “a”, “b” e “c” englobaram os genitores e indivíduos não híbridos das progênes, enquanto no grupo “d” permaneceu o indivíduo híbrido da progênie.

Tabela 18. Porcentagem de grãos de pólen viáveis dos indivíduos avaliados na segunda caracterização, segundo as duas técnicas de coloração utilizadas.

Identificação	Indivíduo	¹ Porcentagem Média Viabilidade de grãos de pólen	
		carmim acético 2% com glicerina	tetrazólio 0,25%
9	<i>A. kuhlmannii</i> (V 9243)	99,12 a	94,87 a
7	<i>A. krapovickasii</i> (Wi 1291)	98,62 a	95,12 a
8	<i>A. magna</i> (KG 30097)	98,62 a	90,87 a
3	<i>A. vallsii</i> (V 7635) x <i>A. kuhlmannii</i> (V 9243)	98,25 a	94,37 a
4	<i>A. krapovickasii</i> (Wi 1291) x <i>A. helodes</i> (V 6325)	98,00 a	91,00 a
6	<i>A. vallsii</i> (V 7635)	98,00 a	88,62 a
5	<i>A. krapovickasii</i> (Wi 1291) x <i>A. helodes</i> (V 6325)	95,62 a	88,33 a
2	<i>A. vallsii</i> (V 7635) x <i>A. kuhlmannii</i> (V 7639)	91,62 ab	89,12 a
10	<i>A. helodes</i> (V 6325)	69,12 b	68,12 b
11	<i>A. kuhlmannii</i> (V 7639)	46,25 c	24,83 c
1	<i>A. magna</i> (KG 30097) x <i>A. kuhlmannii</i> (V 7639)	1,37 d	1,12 d
CV %	-	11,38	9,30

¹Médias não seguidas de uma mesma letra diferem a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

5.2.5 Considerações quanto à caracterização reprodutiva

Em se tratando de estratégias reprodutivas e especiação, Krapovickas e Gregory (1994) expõe que a autofertilização é considerada o modo de reprodução normal em *Arachis*, mas a flor também pode receber esporádicas visitas de insetos. Sendo assim, a fertilidade pode ser utilizada para determinar o grau de isolamento genético entre as espécies. Acima de 50% dos grãos de pólen corados, a deiscência das anteras é normal.

Abaixo de 50%, as anteras começam a apresentar dificuldade na deiscência. Próximo aos 25%, as anteras não são deiscentes, mas os grãos ainda podem ser capturados por um polinizador, como abelhas. Abaixo de 15% as anteras tem que ser dissecadas para a obtenção dos grãos de pólen e abaixo de 10%, devido à pequena quantidade de grãos de pólen viáveis, é questionado se é possível haver sucesso na polinização.

Nos indivíduos 4, 5, 6, 7 e 8 da primeira estação de cruzamentos, e no indivíduo 1 da segunda estação as anteras se apresentaram indeiscentes e houve dificuldade na retirada dos grãos de pólen, sendo assim, estas tiveram que ser maceradas na lamina para obtenção dos grãos. Estas plantas F₁ resultantes de cruzamentos interespecíficos entre acessos de genoma A e B foram classificadas como híbridas, e todas apresentaram uma baixa viabilidade de grãos de pólen, indicando grande isolamento genético entre os genitores destas plantas. Segundo Moretzsohn et al. (2013), as espécies de genoma A e as espécies genoma B estudadas possuem aproximadamente 20% de similaridade genômica.

Stalker et al. (1991a) realizou cruzamentos entre os acessos *A. batizocoi* (K 9484, G 30079, G 30081 e G 30082) e *A. magna* KG 30097 (20 cromossomos), os quatro primeiros são considerados atualmente como de genoma K, genoma este desconhecido por Stalker durante o estudo. Todos esses acessos foram utilizados como sendo de genoma B, quando verdadeiramente somente o acesso *A. magna* KG 30097 possui este genoma. Neste estudo citogenético pode-se observar a viabilidade de grãos de pólen associada com a meiose de cruzamentos intra e interespecíficos. Foram realizados o teste de viabilidade de grãos de pólen e estudo de meiose. Todos os genitores apresentaram acima de 99% de grãos corados, uma baixa presença de univalentes (abaixo de 0,06 univalentes) e alta taxa de bivalentes (aproximadamente 10 bivalentes) durante a meiose, logo, estes foram considerados normais. Todos indivíduos das progênes resultantes de cruzamentos intraespecíficos apresentaram acima de 87% de grãos de pólen corados, com baixa quantidade de univalentes e alta quantidade de bivalentes, indicando alta similaridade genética entre os acessos utilizados para a produção destes híbridos. Neste mesmo estudo, o acesso KG 30097 (genoma B) foi cruzado com vários outros acessos de genoma K (*A. batizocoi* K 9484, G 30079, G 30081 e G 30082) e em todos os casos a viabilidade de grãos de pólen corados foram superiores a 66% com baixa presença de univalentes e alta presença de bivalentes durante a meiose. Segundo Moretzsohn et al. (2013) esses dois genomas possuem somente 16% de similaridade genética. Com base neste estudo,

podemos observar que alguns acessos de genoma K são capazes de se parar ao genoma B e produzirem grãos de pólen viáveis.

Fávero (2004) produziu quatro híbridos de genoma KA utilizando o acesso *A. batizocoi* K 9484 (K) com plantas de genoma A, em todos os casos a viabilidade de grãos de pólen se mostrou abaixo de 0,79%.

Lüdke (2014) realizou quatro ciclos de cruzamentos intra e interespecíficos entre espécies da secção *Arachis*, sempre utilizando acessos de genoma B como genitor feminino. Foi observado que os híbridos com maior porcentagem média de viabilidade de grãos de pólen eram justamente os que tinham os genitores de mesmo genoma, no caso o genoma B. O híbrido intra específico de genoma B *A. valida* V 13514 x *A. valida* V 15096 [B x B] apresentou 98,4% de viabilidade de grãos de pólen. Já o híbrido *A. valida* V 13514 x *A. williamsii* Wi 1118 [B x B] apresentou 18,6% de viabilidade de grãos de pólen. Segundo Moretzsohn et al. (2013) os parentais destes híbridos apresentam respectivamente, aproximadamente 58% e 36% de similaridade genética entre eles.

5.2.6 - Caracterização molecular

Para esta estação de cruzamentos, foram selecionados os seis marcadores microssatélites mais polimórficos e que melhor amplificaram nas amostras, sendo eles: Seq3D09, IPAHM406, RI2A06, gi-623, RM14B11 e RN12E01. Estes foram utilizados para avaliar 11 amostras de *Arachis*, sendo seis amostras dos genitores e cinco amostras de prováveis híbridos de combinações entre espécies silvestres.

Os locos avaliados permitiram a identificação de autofecundação nos indivíduos 4, 5, 3 e 2 e hibridação no indivíduo 1. Para analisar o indivíduo resultante de autofecundação e hibridação, foi utilizado o mesmo critério da primeira estação de cruzamento.

Dentre os marcadores avaliados, o RM14B11 com a banda de 342 pb foi o mais informativo (Tabela 19 e Figura 21). Em se tratando das plantas de autofecundação, podemos observar que os genitores femininos Wi 1291 (7), KG 30097 (8) e V 7635 (6) não possuem a banda de tamanho estimado de 342pb, que está presente em todos os genitores masculinos V 6325 (10), V 7639 (11) e V 9243 (9), assim sendo, os indivíduos 4 e 5 de Wi 1291 x V 6325, o 3 de V 7635 x V 9243 e o 2 de V 7635 x V 7639 foram considerados

resultados de autofecundação por não apresentar a banda de 342pb presente nos genitores masculinos 10, 11 e 9. Podemos observar que o genitor feminino KG 30097 (8) também não possui a banda 342pb, que está presente no genitor masculino V 7639 (11), assim sendo, o indivíduo 1 de KG 30097 x V 7639 foi considerado resultado de hibridação por apresentar a banda 342pb do genitor masculino 11.

O marcador seq3D9 foi capaz de discriminar os indivíduos resultantes de autofecundação pela banda de 280pb para os indivíduos 3 e 2, e pela banda de 268pb para os indivíduos 4 e 5. Os genitores (8 e 11) do indivíduo 1 não apresentaram polimorfismo para este marcador, impossibilitando a confirmação da hibridação.

Foram testados seis marcadores e somente o RM14B11 foi capaz de discriminar o híbrido de KG 30097 x V 7639, os outros marcadores não apresentavam polimorfismo entre os genitores feminino (KG 30097) e masculino (V 7639).

Os resultados dos marcadores que não apresentaram informações relevantes para identificação de hibridização não são apresentados.

Tabela 19. Identificação de autofecundação ou hibridização por marcadores microssatélites em indivíduos dos cruzamentos interespecíficos de *Arachis* spp. da segunda estação cruzamentos.

Identificação	¹ Indivíduo	² Marcador (Banda em pb)			³ Resultado
		RM14B11 (342pb)	seq3D9 (280pb)	seq3D9 (268pb)	
6	V 7635 (GF)	-	-	-	NA
7	Wi 1291 (GF)	-	-	-	NA
8	KG 30097 (GF)	-	X	-	NA
9	V 9243 (GM)	X	X	-	NA
10	V 6325 (GM)	X	-	X	NA
11	V 7639 (GM)	X	X	-	NA
1	KG 30097 x V 7639	X	X	-	Hibridação
2	V 7635 x V 7639	-	-	-	Autofecundação
3	V 7635 x V 9243	-	-	-	Autofecundação
4	Wi 1291 x V 6325	-	-	-	Autofecundação
5	Wi 1291 x V 6325	-	-	-	Autofecundação

¹GM: Genitor masculino, GF= Genitor feminino. ²X = presença da banda; - = ausência da banda; pb = pares de bases. ³NA = não se aplica.

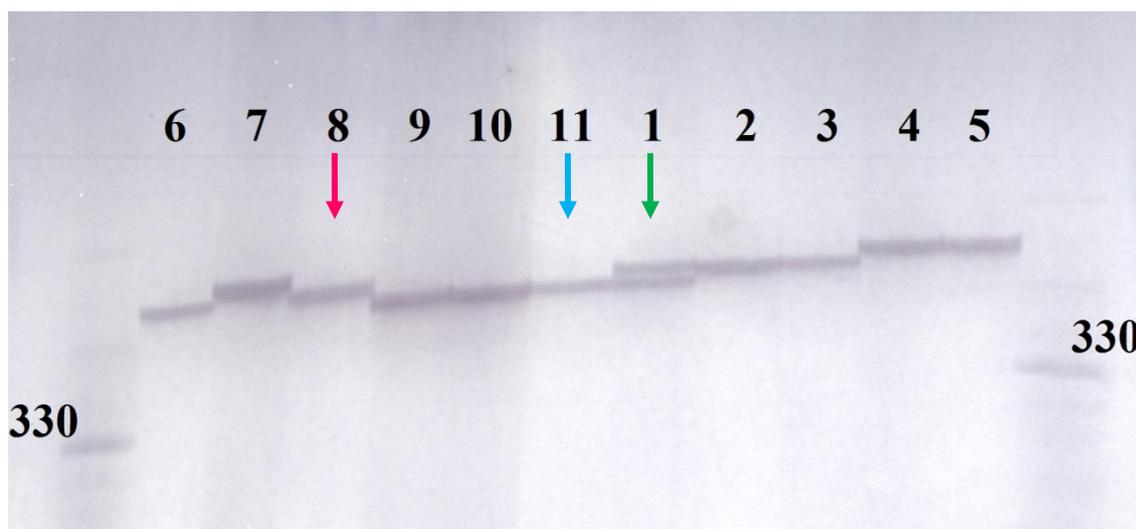


Figura 21. Perfil de amplificação do marcador RM14B11 em gel de poliacrilamida 6% para os indivíduos da segunda caracterização. Indivíduos: V 7635 (6), Wi 1291 (7), KG 30097 (8), V 9243 (9), V 6325 (10), V 7639 (11), KG 30097 x V 7639 (1), V 7635 x V 7639 (2), V 7635 x V 9243 (3), Wi 1291 x V 6325 (4); Wi 1291 x V 6325 (5). As flechas indicam a banda de 342pb a ser observada para a genotipagem. Flecha em verde indica o híbrido, em azul, o genitor masculino e em rosa, o genitor feminino.

5.2.7 Caracterização Morfológica

Os mesmos indivíduos analisados reprodutivamente foram caracterizados morfológicamente. Na Tabela 20, é possível observar que os resultados dos autovalores revelaram que os três primeiros componentes explicaram 97% da variação total das características morfológicas.

Tabela 20. Análise de componentes principais dos descritores morfológicos avaliados na segunda caracterização. Autovalores, diferença entre os componentes, proporção e proporção acumulada estão indicados.

Componentes	Autovalores	Diferença	Proporção	Proporção Acumulada
1	7023,9534	3218,9518	0,6062	0,6062
2	3805,0015	3377,4322	0,3284	0,9346
3	427,5692	215,6210	0,0369	0,9715
4	211,9482	144,3709	0,0183	0,9897
5	67,5773	16,2868	0,0058	0,9956

Na Tabela 21 é possível observar os descritores que mais explicaram a variação observada segundo o Prin 1. Os dados foram elevados ao quadrado para que os valores negativos se tornem positivos e posteriormente classificados em ordem decrescente. Dentre os 20 descritores mais importantes, oito foram coletados no eixo central da planta, sete no ramo lateral e cinco na flor. Todos os outros descritores, não presentes nesta tabela foram considerados irrelevantes neste trabalho para determinar a variação morfológica entre os indivíduos. Observando o valor de Prin² que indica a importância de cada descritor para esta análise, constatou que para a segunda caracterização o descritor cfp (Comprimento de folíolo proximal), tanto para o eixo central quanto para o ramo lateral, tiveram a mesma importância, sendo ambos responsáveis por 39% da variação observada, seguido pelos descritores aeEC (Antocianina na estípula), CLP (Comprimento do lábio posterior) e cRL (Comprimento do ramo lateral), respectivamente com 10, 3 e 2%.

Tabela 21. Contribuição dos descritores morfológicos para a análise de componentes principais no híbrido resultante da segunda estação de cruzamento.

Descritores	¹ Siglas	PRIN 1	PRIN 1 ²	² Indivíduos		
				8	11	1
Comprimento de folíolo proximal	cfpEC	0,6253	0,3910	47,8900	27,2000	31,2200
Comprimento de folíolo proximal	cfpRL	0,6253	0,3910	23,5325	16,9400	16,9400
Antocianina na estípula	aeEC	-0,3210	0,1030	1,0000	2,0000	1,0000
Comprimento do lábio posterior	CLP	-0,1991	0,0396	7,9725	6,0625	6,0625
Comprimento do ramo lateral	cRL	-0,1632	0,0266	90,0000	88,5000	88,5000
Comprimento do hipanto	CH	-0,1196	0,0143	38,7350	45,5450	45,5450
Comprimento do estandarte	CE	-0,0774	0,0060	11,0550	10,5150	10,5150
Comprimento de peciólulo	cpoRL	0,0652	0,0043	5,8100	5,9800	5,9800
Comprimento de pecíolo	cpRL	0,0652	0,0043	15,8875	10,7900	10,7900
Pêlos no folíolo abaxial margem	pfabmEC	0,0620	0,0038	2,0000	2,0000	2,0000
Comprimento de pecíolo	cpEC	0,0550	0,0030	67,2500	41,4400	53,1300
Comprimento de peciólulo	cpoEC	0,0550	0,0030	13,7200	9,3300	12,3100
Antocianina na estípula	aeRL	-0,0451	0,0020	1,0000	2,0000	2,0000
Comprimento da asa	CA	0,0394	0,0016	8,7200	8,9125	8,9125
Altura da planta	apEC	0,0366	0,0013	80,0000	8,0000	9,5000
Largura de folíolo distal	lfdEC	0,0239	0,0006	22,2300	17,7300	20,7200
Largura de folíolo distal	lfdRL	0,0239	0,0006	20,1975	17,3575	17,3575
Largura de folíolo proximal	lfpEC	-0,0236	0,0006	19,3000	13,9200	17,0900
Largura de folíolo proximal	lfpRL	-0,0236	0,0006	16,2425	13,3175	13,3175
Pêlos no folíolo abaxial margem	pfabmRL	0,0212	0,0004	2,5000	2,0000	2,0000

¹Siglas terminadas em EC se referem ao eixo central, em RL ao ramo lateral e em FL à flor. ²Indivíduos: 21 - KG 30097; 24 - V 7639; 25 - KG 30097 x V 7639.

A partir dos componentes 1 e 2 multiplicados pelos valores médios de cada característica para cada indivíduo, foi possível construir o gráfico biplot (Figura 22). Assim como no gráfico dos resultados da primeira estação de cruzamento, os genitores ficaram bem distribuídos no gráfico.

Para os cruzamentos entre os indivíduos V 7635 x V 9243 e V 7635 x V 7639 obteve-se uma semente F_1 de cada (plantas 3 e 2), identificadas como resultado de autofecundação pelo teste de paternidade, estas duas plantas se distribuíram na parte superior central do gráfico, próximo ao genitor feminino V 7635 (planta 6).

As plantas Wi 1291 x V 6325 (plantas 4 e 5) se agruparam próximas uma a outra. O genitor feminino Wi 1291 (7) se distribuiu de forma inesperada, se apresentando muito distante dos outros indivíduos, quando o esperado era de ele estar próximo às plantas 4 e 5, assim sendo, esta planta foi retirada do gráfico por não se apresentar informativa para a análise. Este acesso inicialmente foi germinado de forma errada, assim que a planta começou a se desenvolver, por caracteres morfológicos foi percebido o erro, e este acesso foi imediatamente germinado de forma correta, assim sendo, este resultado mostra que a idade de planta ao fazer a caracterização morfológica, para este caso interferiu diretamente na análise.

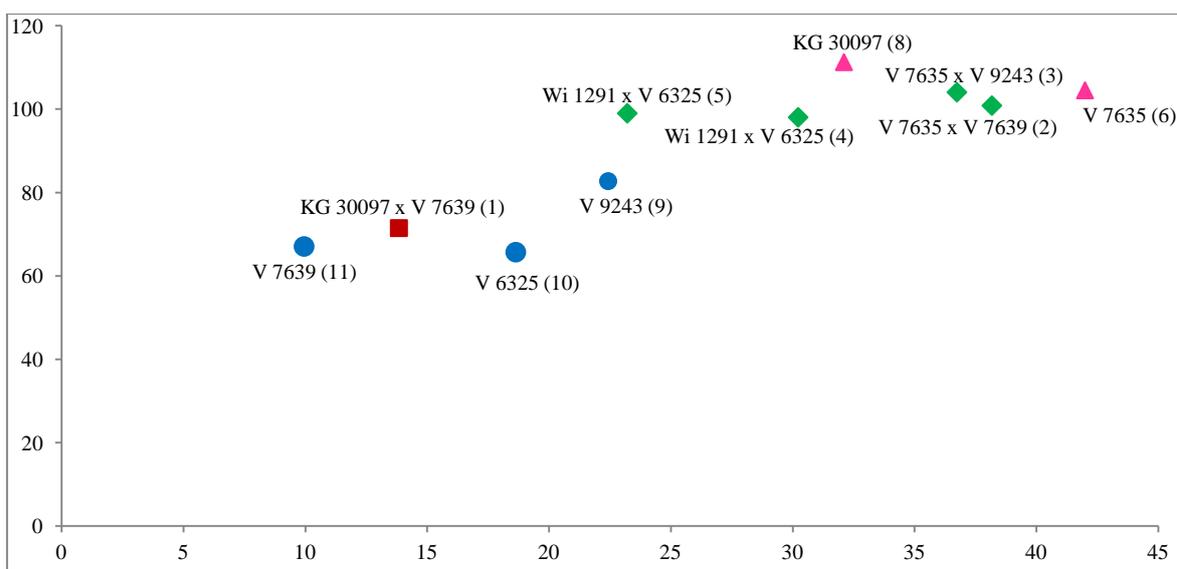


Figura 22. Gráfico biplot resultante da segunda estação de cruzamento, obtido por meio da análise de componentes principais considerando os 63 descritores para os componentes 1 e 2. Os marcadores em triângulo são os genitores femininos, em círculos os genitores masculinos, e representando as progênes, em quadrado a planta híbrida, e em losango plantas oriundas de autofecundação.

O indivíduo KG 30097 x V 7639 (1) considerado como híbrido, distribuiu-se distante do genitor feminino KG 30097 (8) e próximo ao genitor masculino V 7639 (11). Analisando os dois descritores mais importantes, observa-se que os genitores feminino e masculino apresentaram respectivamente 27,20 e 16,94 mm para o cfpRL, sendo assim, a planta 1 apresentando 16,94 mm, se distribuiu muito próximo ao genitor masculino. Essa proximidade com o genitor masculino pode ser observada também em outros descritores na Tabela 21.

Estes dois genitores possuem uma característica interessante para a hibridação. Foi utilizado o acesso de KG 30097 que possui flor laranja, e o acesso V 7639 que possui flor amarela. Assim que surgiu a primeira flor na planta KG 30097 x V 7639 (1) foi criada uma grande expectativa quanto ao sucesso na hibridação desta planta, já que a flor era amarela, possuindo característica do genitor masculino e não do feminino (Figura 23). Nesta figura pode ser observada a diferença no comprimento do hipanto (CH), um dos principais descritores para indicar a diversidade morfológica observada.



Figura 23. Flores do genitor feminino (KG 30097), do genitor masculino (V7639) e do híbrido (KG 30097 x V 7639). A flecha mostra o hipanto, um dos descritores avaliados neste estudo.

5.2.8 Considerações quanto a morfologia e importância dos acessos para o programa de melhoramento

Dos 20 descritores listados como sendo os que mais explicavam a variação observada no componente 1 do resultado da primeira estação de cruzamentos, 15 destes foram listados também como mais importantes no componente 1 do resultado da segunda estação de cruzamento. Estes resultados apresentam quais são as características relevantes para coleta dos dados e quais são irrelevantes, economizando-se tempo na geração de dados de espécies relacionadas a estas (Fávero, 2004).

Segundo Janini (2011), que avaliou 35 acessos de *Arachis*, incluindo espécies silvestres, anfidiplóides sintéticos e cultivares, os acessos das espécies *A. kempff-mercadoid* V13250, *A. kuhlmannii* V7639, V 9243, *A. magna* V 13751 e *A. magna* KG 30097 estão entre os acessos que mais se destacaram por apresentarem menores infestações, maiores tolerâncias e antibiose a *E. flavens* e *S. bosquella*. Alguns acessos possuem defesas múltiplas, atacando as duas pragas ao mesmo tempo. Neste projeto foram produzidos seis plantas híbridas de três combinações distintas V 13751 x V 13250, V 13751 x V 9243 e KG 30097 x V 7639.

As duas plantas híbridas de *A. magna* (V 13751) x *A. kempff-mercadoid* (V 13250) tiveram mais características fenotípicas do acesso V 13250, fazendo assim que o indivíduo se distribuísse mais próximo ao genitor masculino que ao genitor feminino. Segundo Janini (2011) o acesso V 13250 apresentou-se entre os que foram menos atacados por *E. flavens* (resistência) e entre os que menos sofreram danos por tripses e lagarta-do-pescoço-vermelho (tolerância múltipla). O acesso V 13751 esteve entre os que apresentaram menores reduções de desenvolvimento das plantas (tolerância múltipla), entre os que foram menos atacados por *S. bosquella* (resistência) e entre os que menos sofreram danos por tripses e lagarta-do-pescoço-vermelho (tolerância múltipla).

As três plantas híbridas de *A. magna* V 13751 x *A. kuhlmannii* V 9243 tiveram características muito diferentes dos seus genitores, isso fez com que eles se distribuíssem com certa distancia dos genitores no gráfico, podendo ocorrer um certo nível de heterose que precisaria ser avaliada. Segundo Janini (2011) o acesso V 13751 apresentou resistência a *S. bosquella* e tolerância múltipla as duas pragas. O acesso V 9243 esteve no grupo dos menos atacados por *E. flavens* (resistência) e entre os que apresentaram menores reduções de desenvolvimento das plantas (tolerância múltipla).

O híbrido de *A. magna* (KG 30097) x *A. kuhlmannii* (V 7639) teve a maioria de suas características fenotípicas mais similares ao genitor masculino, e este se distribuiu

muito próximo ao acesso V 7639. Segundo Janini (2011) este foi o acesso que obteve melhores avaliações contra *E. flavens* e *S. bosquella*. Esteve entre os que sofreram menores infestações e danos de ambas as pragas (resistência múltipla), entre os que tiveram menores reduções de desenvolvimento das plantas (tolerância múltipla), entre os que se destacaram pela produtividade e menor redução de produção (tolerância múltipla), entre os que sofreram menores danos por tripes e lagarta-do-pescoço-vermelho (tolerância múltipla), entre os que afetaram o desenvolvimento do tripes nos teste de antibiose (antibiose), e entre os que afetaram o desenvolvimento da lagarta-do-pescoço-vermelho (antibiose). Segundo Fávero (2004) este acesso ainda possui resistência à mancha castanha (*Cercospora arachidicola*), e à ferrugem (*Puccinia arachidis*). Segundo Nelson (1989), o acesso V 7639 possui ainda resistência ao nematoide *Meloidogyne arenaria*. O acesso KG 30097 esteve entre os que apresentaram menores reduções de desenvolvimento das plantas (tolerância múltipla) e entre os que afetaram o desenvolvimento do tripes nos teste de antibiose (antibiose).

5.3 Híbridação entre *A. hypogaea* cv. IAC OL 4 e o anfidiplóide An 13

5.3.1 Cruzamentos

Na segunda estação de cruzamentos, a planta de (*A. magna* V 13751 x *A. kempff-mercadoi* V 13250)^{4x} teve seu caráter anfidiplóide confirmado, assim sendo, esta planta foi cruzada com a cultivar IAC OL4. Foram realizadas 98 polinizações, obtendo 10 “pegs”, os quais produziram 10 sementes, quatro delas confirmadas como híbridas. Não foi observado nenhum aborto de “pegs” que não produziram sementes. A porcentagem de sucesso foi de 4,08%.

5.3.2 Germinação dos indivíduos das progênes e genitores

Das 10 sementes produzidas pela combinação entre a cultivar e o anfidiplóide, todas germinaram, foram plantadas nos copos e transplantadas nos vasos. Não foram observados nenhum aborto de sementes bem desenvolvidas que não germinaram ou de sementes germinadas que não tiveram vigor para sobreviver nos vasos.

Estas plantas foram analisadas na segunda caracterização, a fim de confirmar o caráter híbrido.

5.3.3 Caracterização reprodutiva

Os genitores e os 10 indivíduos da progênie de IAC OL4 x An 13, também foram submetidas aos dois tipos de coloração. Para os dois métodos de coloração, a análise de variância indicou diferenças significativas entre os indivíduos, e que não houve diferenças entre as repetições (Tabela 22 e 23).

Tabela 22. Análise de variância em acessos e repetições, corados com carmim acético 2% com glicerina para os genitores e indivíduos da progênie de IAC OL4 x An 13.

Tratamento	GL	Soma de quadrados	Quadrados médios	F Valor	¹ Pr > F
Acesso	10	1761,1540	176,1154	11,3300	0,0001
Repetição	3	64,3303	21,4434	1,3800	0,2687

¹Pr <0,05 são significativos.

Tabela 23. Análise de variância em acessos e repetições, corados com tetrazólio 0,25% para os genitores e indivíduos da progênie de IAC OL4 x An 13.

Tratamento	GL	Soma de quadrados	Quadrados médios	F Valor	¹ Pr > F
Acesso	10	1030,5600	103,0560	4,6200	0,0006
Repetição	3	102,4234	34,1411	1,5300	0,2273

¹Pr <0,05 são significativos.

Para os grãos de pólen corados com carmim acético 2% com glicerina (Tabela 24), os dois genitores apresentaram alta viabilidade (acima de 76%). Das 10 plantas candidatas a híbridas, todas apresentaram alta viabilidade (acima de 81%). Os grupos “abc”, “bcd” e “cd” englobaram os híbridos, o genitor feminino (IAC OL4) esteve no grupo “a” e genitor masculino (An 13) no grupo “d”.

Com relação aos resultados da coloração com tetrazólio 0,25%, assim como na coloração por carmim acético 2% com glicerina, todos apresentaram alta viabilidade de grãos de pólen (acima de 87% de grãos corados). Das 10 plantas candidatas a híbridas, todas apresentaram alta viabilidade (acima de 80%). Os grupos “ab”, e “b” englobaram os híbridos, o genitor feminino (IAC OL4) esteve no grupo “a” e genitor masculino (An 13) no grupo “ab”.

Aqui é possível observar a diferença entre os híbridos interespecíficos e os híbridos produzidos a partir de um anfidiplóide. Os híbridos interespecíficos diplóides possuem dois genomas distintos, mas não possuem os cromossomos homólogos. Tomando como exemplo os dois híbridos de V13751 x V13250 caracterizados na 1ª safra 2012/2013, ambos apresentaram baixa viabilidade de grãos de pólen (abaixo de 22%). O An 13 é um tetraplóide oriundo de (V13751 x V13250)^{4x}, um híbrido que foi tratado com colchicina, o que ocasionou a poliploidia da semente. Com isso a semente passou a ter em suas células os cromossomos homólogos para os dois genomas distintos, o que estabilizou as divisões celulares, com isso, este material apresentou acima de 76% de viabilidade de grãos de pólen. A partir da obtenção do anfidiplóide a ploidia está estabilizada, e o programa de melhoramento pode dar continuidade, tanto que todos os quatro indivíduos híbridos da progênie de IAC OL4 x An 13 apresentaram viabilidade de grãos de pólen acima de 80%.

Tabela 24. Porcentagem de grãos de pólen viáveis para os genitores e indivíduos da progênie de IAC OL4 x An 13.

Identificação	Indivíduo	Porcentagem Média da viabilidade de grãos de pólen	
		carmim acético 2% com glicerina	tetrazólio 0,25%
6	IAC OL4 x An 13	97,37 a	87,25 ab
10	IAC OL4 x An 13	96,12 a	94,00 a
11	IAC OL4	95,50 a	93,87 a
7	IAC OL4 x An 13	95,50 a	92,25 a
9	IAC OL4 x An 13	94,75 a	96,37 a
5	IAC OL4 x An 13	92,87 ab	96,37 a
8	IAC OL4 x An 13	91,87 ab	93,75 a
4	IAC OL4 x An 13	90,87 abc	86,50 ab
2	IAC OL4 x An 13	84,37 bcd	80,25 b
3	IAC OL4 x An 13	81,50 cd	87,16 ab
1	IAC OL4 x An 13	80,55 cd	86,55 ab
12	An 13	76,75	87,12 ab
CV %		4,33	5,21

¹Médias não seguidas de uma mesma letra diferem a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

5.3.4 Caracterização molecular

Utilizando os marcadores microssatélites Seq3D09, IPAHM406 e RI2A06, foram analisadas molecularmente 14 amostras de *Arachis*, sendo duas amostras dos genitores, e dez 10 amostras de prováveis híbridos entre IAC OL4 x An 13 (Tabela 25).

Os locos avaliados permitiram a identificação de autofecundação nos indivíduos 5, 6, 7, 8, 9 e 10 e hibridação nos indivíduos 1, 2, 3 e 4. Para analisar o indivíduo resultante de autofecundação e hibridação, foi utilizado o mesmo critério da primeira e da segunda estação de cruzamentos (Tabela 25).

Dentre os marcadores selecionados, utilizou-se aqui o IPAHM-406 com a banda de 320pb, que identificou seis indivíduos da progênie como resultado de autofecundação, e quatro de hibridação (Figura 24). Em se tratando das plantas de autofecundação, podemos observar que o genitor feminino IAC OL4 (11) não possui a banda de 320 pb, que está presente no genitor masculino An 13 (12), assim sendo, seis indivíduos (5, 6, 7, 8, 9 e 10) da progênie de IAC OL4 x An 13, não apresentando a banda de 320 pb presente no genitor masculino (12), são considerados resultados de autofecundação. Para as plantas resultantes de hibridação, sabendo que o genitor masculino An 13 (12) possui a banda de 320 pb e o genitor feminino IAC OL4 (11) não possui, a presença desta banda nos indivíduos 1, 2, 3 e 4 caracteriza estas plantas como híbridas.

Os resultados dos marcadores que não apresentaram informações relevantes para identificação de hibridização não são apresentados.

Tabela 25. Identificação de autofecundação ou hibridização por marcadores microssatélites em indivíduos dos cruzamentos entre IAC OL4 x An 13.

Identificação	¹ Indivíduo	² Marcador (Banda em pb)			³ Resultado
		IPAHM406 (320pb)	Seq3D09 (280pb)	RI2A06 (160pb)	
11	IAC OL4 (GF)	-	-	-	NA
12	An 13 (GM)	X	X	X	NA
1	IAC OL4 x An 13	X	X	X	Hibridação
2	IAC OL4 x An 13	X	X	X	Hibridação
3	IAC OL4 x An 13	X	X	X	Hibridação
4	IAC OL4 x An 13	X	X	X	Hibridação
5	IAC OL4 x An 13	-	-	-	Autofecundação
6	IAC OL4 x An 13	-	-	-	Autofecundação
7	IAC OL4 x An 13	-	-	-	Autofecundação
8	IAC OL4 x An 13	-	-	-	Autofecundação
9	IAC OL4 x An 13	-	-	-	Autofecundação
10	IAC OL4 x An 13	-	-	-	Autofecundação

¹GM: Genitor masculino, GF= Genitor feminino. ²X = presença da banda; - = ausência da banda; pb = pares de bases. ³NA = não se aplica.

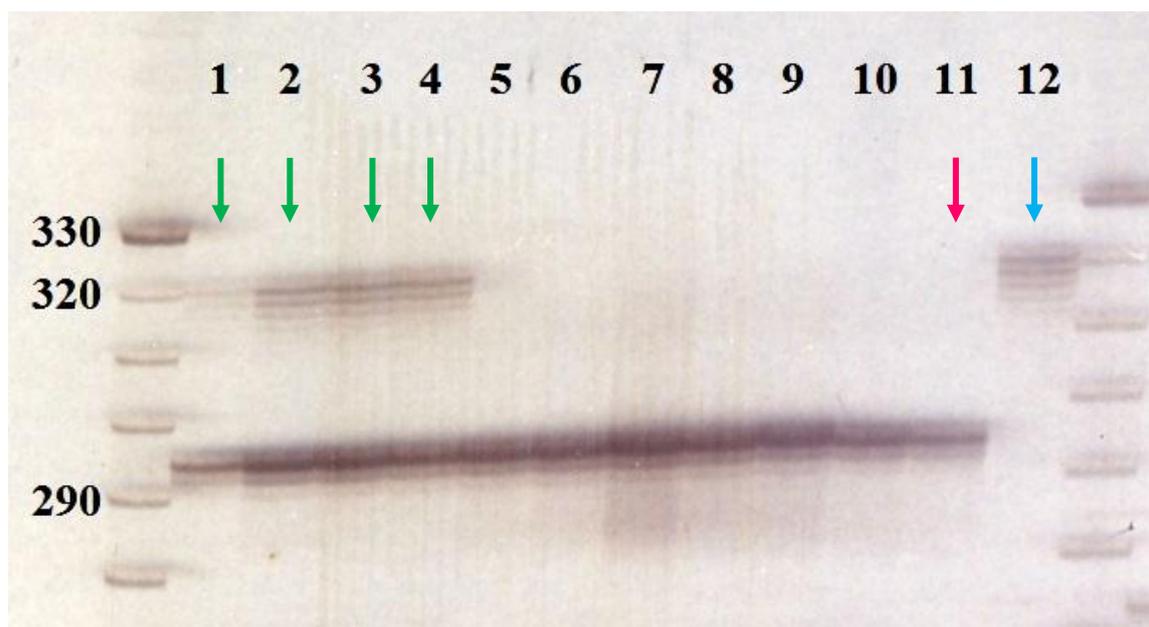


Figura 24. Perfil de amplificação do marcador IPAHM-406, para em indivíduos da progênie de IAC OL4 x An 13. Indivíduos: IAC OL4 x An 13 (1 a 10), IAC OL4 (11) e An 13 (12). As flechas indicam a banda de 320pb a ser observada para a genotipagem. Flechas em verde indicam os híbridos, em azul, os genitor masculino e em rosa, o genitor feminino.

Seguindo o mesmo critério, o marcador RI2A06 identificou hibridação nas plantas 1, 2, 3 e 4 e, autofecundação nas plantas 5, 6, 7, 8, 9 e 10 pela presença da banda de 160pb no genitor masculino e nos indivíduos da progênie. O marcador Seq3d9 também identificou hibridação nas plantas 1, 2, 3 e 4 e, autofecundação nas plantas 5, 6, 7, 8, 9 e 10 pela presença da banda de 280pb no genitor masculino e nos indivíduos da progênie.

5.3.5 Caracterização Morfológica

A análise dos indivíduos produzidos no cruzamento entre IAC OL4 x An 13 totalizou 12 plantas, dois genitores e 10 plantas (F_1) candidatas a híbridas.

Na Tabela 26, é possível observar que os resultados dos autovalores revelaram que os três primeiros componentes explicaram 86% da variação total das características morfológicas.

Tabela 26. Análise de componentes principais dos descritores morfológicos avaliados na segunda caracterização. Autovalores, diferença entre os componentes, proporção e proporção acumulada estão indicados.

Componentes	Autovalores	Diferença	Proporção	Proporção Acumulada
1	3238,98418	1513,27595	0,4742	0,4742
2	1725,70822	787,05566	0,2527	0,7269
3	938,65257	483,12267	0,1374	0,8643
4	455,5299	304,34289	0,0667	0,931
5	151,18701	17,85608	0,0221	0,9531

Na Tabela 27 é possível observar os descritores que mais explicaram a variação observada segundo o Prin 1. Os dados foram elevados ao quadrado para que os valores negativos se tornem positivos. Dentre os 20 descritores mais importantes, 10 foram coletados no eixo central da planta, oito descritores no ramo lateral e dois descritores na flor. Todos os outros descritores, não presentes nesta tabela foram considerados irrelevantes neste trabalho para determinar a variação morfológica entre os indivíduos. Observando o valor de Prin² que indica a importância de cada descritor para esta análise, constatou que para esta caracterização o descritor aeEC (Antocianina na estípula) foi o mais importante, sendo responsável por mais de 19% da variação observada, seguido pelos descritores cpoEC (Comprimento de pecíolo), CLP (Comprimento do lábio posterior), lfdEC (Largura de folíolo distal), cpRL (Comprimento de pecíolo), respectivamente com 13, 11, 9 e 8%. Neste resultado foi observado que a importância dos descritores ficaram mais distribuídas, quando comparada as duas análises semelhantes já citada anteriormente, onde os descritores apEC e cfpRL apresentaram respectivamente 75% e 45% de importância para a variação morfológica.

Tabela 27. Contribuição dos descritores morfológicos para a análise de componentes principais nos híbridos de IAC OL4 x An 13.

Descritores	¹ Siglas	PRIN 1	PRIN 1 ²	² Indivíduos					
				1	2	3	4	11	12
Antocianina na estípula	aeEC	-0,444	0,197	1,000	2,000	2,000	2,000	1,000	2,000
Comprimento de peciólulo	cpoEC	0,372	0,138	14,260	15,610	12,770	19,180	12,620	16,010
Comprimento do lábio posterior	clpFL	-0,339	0,115	0,000	9,090	8,693	7,508	8,423	8,118
Largura de folíolo distal	lfdEC	-0,301	0,091	28,690	29,460	26,680	25,550	14,820	25,980
Comprimento de pecíolo	cpRL	0,297	0,088	45,740	54,390	60,765	46,530	37,095	20,515
Largura de folíolo proximal	lfpEC	-0,259	0,067	22,230	22,720	20,390	20,010	10,900	23,050
Comprimento de folíolo distal	cfDEC	0,236	0,056	63,100	57,950	51,620	55,560	33,530	59,160
Comprimento de folíolo proximal	cfpEC	0,199	0,04	53,650	49,080	43,390	43,920	27,730	50,670
Comprimento de folíolo distal	cfDRL	0,191	0,036	47,978	53,623	54,548	50,265	33,323	35,103
Altura da planta	apEC	-0,174	0,03	19,500	30,500	34,500	34,000	24,700	11,500
Comprimento de estípula livre	celEC	0,156	0,024	24,190	23,460	28,990	24,210	18,130	27,290
Comprimento de estípula livre	celRL	0,137	0,019	19,238	24,188	23,888	24,865	19,990	20,303
Comprimento de folíolo proximal	cfpRL	0,132	0,017	38,550	47,230	48,535	44,795	27,978	31,728
Comprimento do hipanto	chFL	0,12	0,014	0,000	67,108	64,307	48,778	21,163	80,005
Comprimento do ramo lateral	cRL	0,11	0,012	21,750	52,000	36,500	51,000	24,000	50,000
Largura de estípula livre	lelEC	-0,109	0,012	2,150	3,360	2,840	2,570	2,410	3,110
Comprimento da parte adnata	cpDEC	0,105	0,011	11,550	16,510	16,140	17,850	15,220	17,390
Largura de folíolo proximal	lfpRL	-0,088	0,008	20,553	26,083	27,430	26,108	16,540	19,323
Antocianina na estípula	aeRL	-0,077	0,006	2,000	1,250	1,500	1,000	1,000	2,000
Comprimento da parte adnata	cpDRL	0,075	0,006	8,773	12,193	13,635	12,425	10,655	7,820

¹Siglas terminadas em EC se referem ao eixo central, em RL ao ramo lateral e em FL à flor. ²Indivíduos: 11- IAC OL4; 14 - An 13; 1 a 4 - IAC OL4 x An 13.

A partir dos componentes 1 e 2 multiplicados pelos valores médios de cada característica para cada indivíduo, foi possível construir o gráfico biplot (Figura 25). Assim como o gráfico dos resultados da primeira estação de cruzamento os genitores ficaram bem distribuídos no gráfico.

Do cruzamento entre IAC OL4 x An 13 obteve-se dez sementes. As plantas 5, 6, 7, 8, 9 e 10 foram identificadas como resultado de autofecundação pelo teste de paternidade, estas seis plantas se distribuíram na parte central do gráfico, próximo ao genitor feminino IAC OL4 (11). As plantas 1, 2, 3 e 4 caracterizadas com resultado de hibridação, se distribuíram na parte superior esquerda do gráfico, se distribuindo mais próximo ao genitor masculino An 13 (12) que ao genitor feminino. Analisando o segundo descritor mais importante, observa-se que os genitores feminino e masculino apresentaram respectivamente 12,62 e 16,01 mm para o cpoEC, sendo assim, as plantas 1, 2, 3 e 4 apresentando respectivamente 14,26; 15,61; 12,77 e 19,18 mm, se distribuiu mais próximo ao genitor masculino. Essa proximidade com o genitor masculino pode ser observada também em outros descritores na Tabela 27.

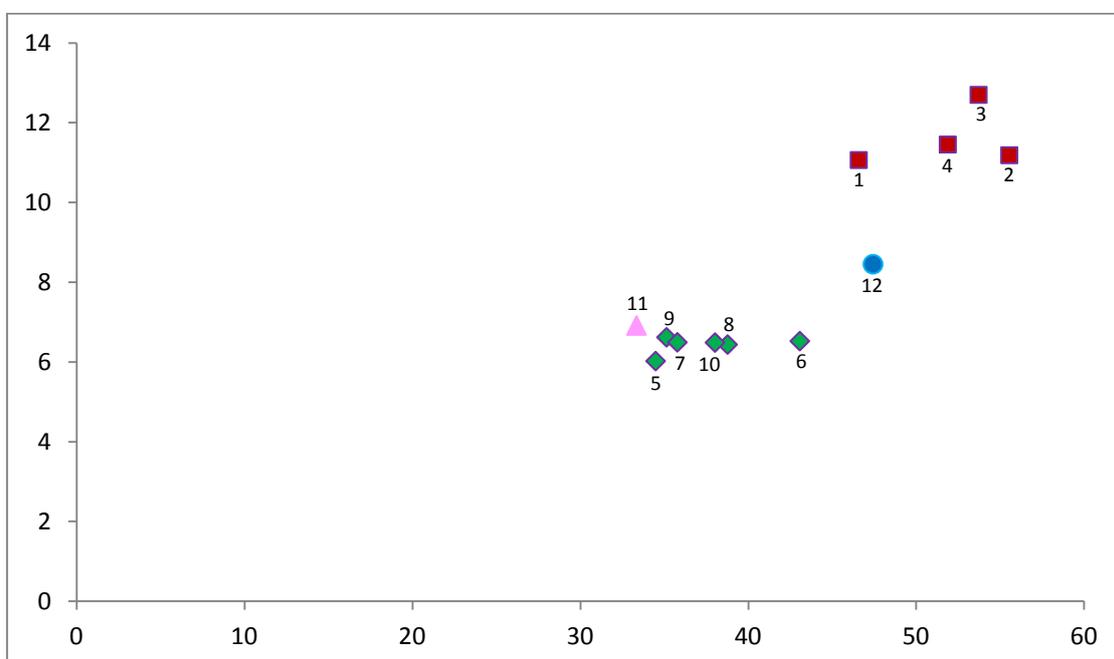


Figura 25. Gráfico biplot resultante do cruzamento entre IAC OL4 x An 13, obtido por meio da análise de componentes principais considerando os 63 descritores para os componentes 1 e 2. O marcador em triângulo representa o genitor feminino (11- IAC OL4), em círculo o genitor masculino (12-An 13), e representando as progênes, em quadrado as plantas híbridas (1 a 4-IAC OL4 x An 13), e em losango plantas oriundas de autofecundação (5 a 10 - IAC OL4 x An 13).

Sementes F_2 dos indivíduos híbridos da progênie do cruzamento entre IAC OL4 e An 13 serão geradas durante a safra 2014/2015. Ao obter as sementes F_2 de IAC OL4 x An 13, estas poderão ser avaliadas diretamente a campo quanto à resistência contra as pragas.

Durante a safra, os vasos em que estas plantas estavam sofreram uma forte pressão diante ao ataque de ácaros. Ao perceber que as plantas de An 13 e os híbridos estavam resistindo ao ataque todos os vasos (genitores e progênie) deixaram de ser pulverizados com acaricida. O genitor feminino IAC OL4 e as plantas consideradas resultantes de autofecundação sofreram uma pressão tão grande por parte dos ácaros que estas deixaram de se desenvolver e as folhas começaram a amarelar (Figura 26 e 27). Enquanto as plantas de IAC OL4 sofriam com o ataque dos ácaros, o genitor masculino An 13 e a plantas consideradas resultantes de hibridação continuavam seu desenvolvimento normalmente. Observou-se a presença de ácaros nestas plantas, mas em nível muito menor, quando comparado as plantas de IAC OL4. Por caracterização morfológica e pela observação das plantas diante deste ataque, foi possível identificar perfeitamente quais plantas eram resultantes de autofecundação e quais eram de hibridação.



Figura 26. Progênie de IAC OL4 x An 13. A flecha azul indica as plantas resistentes a ácaro, resultado de hibridação. A flecha vermelha indica as plantas suscetíveis a ácaro, resultado de autofecundação.



Figura 27. Genitores e progênie de IAC OL4 x An 13. A flecha azul representa as plantas resistentes a ácaro (An 13 e híbridos). A flecha vermelha representa as plantas suscetíveis a ácaro (IAC OL4 e autofecundadas).

6. CONCLUSÕES

É possível obter híbridos oriundos de cruzamentos interespecíficos de espécies silvestres de *Arachis* resistentes a pragas e a ácaros.

Os caracteres do eixo central foram os que mais explicaram a variação morfológica entre os indivíduos.

Os marcadores microssatélite RI2A06, IPAHM-406 e RM14B11 foram os mais informativos na identificação dos híbridos.

Utilizando as caracterizações reprodutiva, molecular e morfológica, foi possível identificar hibridação em 10 plantas dos seguintes cruzamentos: *A. magna* V 13751 x *A. kuhlmannii* V 9243, *A. magna* V 13751 x *A. kempff-mercadoi* V 13250, *A. magna* KG 30097 x *A. kuhlmannii* V 7639 e IAC OL4 x An 13 (V 13751 x V 13250)^{4x} (Tabela 28).

Utilizando as caracterizações realizadas, foi possível identificar autofecundação em 14 plantas dos seguintes cruzamentos: *A. magna* KG 30097 x *A. kuhlmannii* V 9243 e *A. magna* KG 30097 x *A. helodes* V 6325; assim como de *A. vallsii* V 7635 x *A. kuhlmannii* V 7639 e *A. vallsii* V 7635 x *A. kuhlmannii* V 9243; e de *A. krapovickasii* Wi 1291 x *A. helodes* V 6325 e IAC OL4 x An 13 (V 13751 x V 13250)^{4x} (Tabela 28).

Tabela 28. Plantas resultantes de hibridação e autofecundação após caracterização reprodutiva, molecular e morfológica.

Indivíduos	Número de plantas	
	Hibridação	Autofecundação
<i>A. krapovickasii</i> Wi 1291 x <i>A. helodes</i> V 6325	-	2
<i>A. magna</i> KG 30097 x <i>A. helodes</i> V 6325	-	1
<i>A. magna</i> KG 30097 x <i>A. kuhlmannii</i> V 7639	1	-
<i>A. magna</i> KG 30097 x <i>A. kuhlmannii</i> V 9243	-	3
<i>A. magna</i> V 13751 x <i>A. kempff-mercadoi</i> V 13250	2	-
<i>A. magna</i> V 13751 x <i>A. kuhlmannii</i> V 9243	3	-
<i>A. vallsii</i> V 7635 x <i>A. kuhlmannii</i> V 7639	-	1
<i>A. vallsii</i> V 7635 x <i>A. kuhlmannii</i> V 9243	-	1
IAC OL4 x An 13 (V 13751 x V 13250) ^{4x}	4	6
Total	10	14

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, P. R.; ARRUDA, H. V. Controle de tripes causador do prateamento das folhas do amendoim por meio de inseticidas. **Bragantia**, Campinas, v. 21, n. 38, p. 679-687, 1962.

BATISTA, G. C. Controle dos tripes do amendoim, séria praga da cultura no Estado de São Paulo. **Revista. Agrícola**, Piracicaba, v. 42, n. 2, p. 59-64, 1967.

BELTRÃO, N. E. M.; SANTOS, R. C.; GONDIM, T. M. S.; NOGUEIRA, R. J. M. C.; MELO FILHO, P. de A. Ecofisiologia e manejo cultural. In: SANTOS, R. C.; FREIRE, R. M. M.; SUASSUNA, T. M. F. **Amendoim: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 15-3, 2009.

BOLONHEZI, D. ; GODOY, I. J. ; SANTOS, R. C. Manejo Cultural do Amendoim. In: SANTOS, R. C. FREIRE, R. M. M., LIMA, L. M. **O Agronegócio do amendoim no Brasil**. Brasília: Embrapa, p. 186-237, 2013.

BONDAR, G.. Uma praga do amendoim *Parastega (Gelechia) bosquella* Chambers. **Chácaras e quintais**, v. 38, n. 5, p. 5, 1928.

BORROR, D. J.; DE LONG, D. M. **Introdução ao Estudo dos Insetos**. Rio de Janeiro, USAID, 1969. 653 p.

BRANDÃO FILHO, J. S. Doenças e pragas do amendoim. **Agricultura e pecuária**, Maringá, v. 241, p. 4-5, 1943.

BUROW, M. D.; SIMPSON, C. E.; STARR, J. L.; PATERSON, A. H. Transmission genetics of chromatin from a synthetic amphidiploid to cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.): broadening the gene pool of a monophyletic polyploid species. **Genetics**, Athens, v. 159, n. 2, p. 823-837, 2001.

CALCAGNOLO, G.; LEITE, F. M.; GALLO, J. R. Efeitos da infestação do tripes nos folíolos do amendoimzeiro *Enneothrips (Enneothripiella) flavens* Moulton, 1941, no desenvolvimento das plantas, na qualidade da produção de uma cultura “das águas”. **O Biológico**, São Paulo, v. 40, p. 241-242, 1974.

CARREGA, W. C.; CROSARIOL NETTO, J.; FINOTO, E. L.; GODOY, I. J.; FÁVERO, A. P.; MARTINS, A. L. M.; MICHELOTTO, M. D. Sintomas de ataque de *Stegasta bosquella* (Chambers, 1875) em diferentes espécies silvestres de amendoim submetidas ou não ao controle químico. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ECOLOGIA, 9., 2009b, São Paulo. **Anais...** São Paulo: SEB, 2009b. p. 1-3.

CARREGA, W. C.; MICHELOTTO, M. D.; FINOTO, E. L.; CROSARIOL NETTO, J.; FÁVERO, A. P.; GODOY, I. J.; MARTINS, A. L. M. Incidência de Doenças Foliares em Acessos de Espécies Silvestres de Amendoim (*Arachis* spp.). In:

ENCONTRO SOBRE A CULTURA DO AMENDOIM, 7., 2009, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: FUNEP, 2009a. 1 CD-ROM.

CARREGA, W. C.; MICHELOTTO, M. D.; FINOTO, E. L.; FÁVERO, A. P.; CROSARIOL NETTO, J.; GODOY, I. J. Germinação e dormência de sementes de espécies silvestres de amendoim. In: ENCONTRO SOBRE A CULTURA DE AMENDOIM, 7., 2010, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: UNESP, 2010. p. 15.

CARVALHO, C. R. L.; GODOY, I. J.; MICHELOTTO, M. D.; FÁVERO, A. P.; VALLS, J. F. M.; BAGGIO, S. R. Composição química da semente de espécies silvestres de *Arachis*. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS, 2., 2008, Brasília. **Anais...** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos, 2008. p. 160.

CONAB. **Séries Históricas Relativas às Safras 1976/77 a 2013/14 de Área Plantada, Produtividade e Produção**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&t=2>. Acesso em: 19 de janeiro de 2015.

CONAGIN, C.H.T.M. Morfologia da flor e formação do fruto no amendoim cultivado (*Arachis hypogaea*, L.), **Bragantia**, Campinas, v.14, n. 24, p. 259-266, 1955.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gel by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v. 19, n. 4, p. 299-306, 2002.

CROSARIOL NETTO, J.; CARREGA, W. C.; FINOTO, E. L.; GODOY, I. J.; FÁVERO, A. P.; MARTINS, A. L. M.; MICHELOTTO, M. D. Sintomas de ataque de *Enneothrips flavens* (Moulton, 1941) (Thysanoptera: Thripidae) em diferentes espécies silvestres de amendoim submetidos ou não ao controle químico. In: ENCONTRO SOBRE A CULTURA DO AMENDOIM, 9., 2009, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: Funep, 2009. 1 CD-ROM.

CUSTODIO A. R. **Relações de cruzabilidade entre espécies e acessos de germoplasma do gênero *Arachis* associados ao genoma B do amendoim (*Arachis hypogaea* L.)**. 2009. 155 f. Tese (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

EIGSTI, O. J.; DUSTIN, P. Jr. **Colchicine in Agriculture, Medicine, Biology and Chemistry**. Ames, Iowa State College Press, 1955. 967 p.

FALEIRO, F. G. **Genética e biotecnologia aplicada ao melhoramento genético vegetal: relatório de pós-doutorado**. Planaltina, Embrapa Cerrados, 2012, 74 p.

FÁVERO, A. P. **Cruzabilidade entre espécies silvestres de *Arachis* visando à introgressão de genes de resistência a doenças do amendoim cultivado**. 2004. 165 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

FÁVERO, A. P.; MICHELOTTO, M. D.; SUASSUNA MARTINS, A. L. M.; LEONARDECZ NETO, E.; GODOY, I. J. Expressão da resistência de acessos e híbridos de espécies silvestres de amendoim (*Arachis* spp.) a múltiplas doenças foliares em condições de campo. In: ENCONTRO SOBRE A CULTURA DO AMENDOIM, 5., 2008, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: Funep, 2008. 1 CD-ROM.

FÁVERO, A. P.; MORAES, S. A.; GARCIA, A. A. F.; VALLS, J. F. M.; VELLO, N. A. Characterization of rust, early and late leaf spot resistance in wild and cultivated peanut germplasm. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, n. 1, p. 110-117, 2009.

FÁVERO, A. P.; MORAES, S. A.; VELLO, N. A.; VALLS, J. F. M. Caracterização de espécies silvestres de amendoim quanto à resistência à mancha castanha visando à introgressão de genes ao amendoim cultivado. In: CONGRESSO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 1., 2001, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Embrapa Arroz e Feijão, 2001. 1 CD-ROM.

FÁVERO, A. P.; SIMPSON, C. E.; VALLS, J. F. M.; VELLO, N. A. Study of the evolution of cultivated peanut through crossability studies among *Arachis ipaënsis*, *A. duranensis*, and *A. hypogaea*. **Crop Science**, Madison, v. 46, n. 4, p. 1546-1552, 2006.

FERNÁNDEZ, A., KRAPOVICKAS, A. Cromosomas y evolución en *Arachis* (Leguminosae). **Bonplandia**, Corrientes, v. 8, n.1/4, p. 187-220, 1994.

FERREIRA, M. E.; GRATAPAGLIA, D. **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise genética**. Brasília, EMBRAPA- CENARGEN, 1998. 220 p.

FONCÉKA, D.; COURTOIS, B.; BERTIOLI, D. J.; VIGNES, H.; TOSSIM, H. A.; RIVALLAN, R.; MORETZSOHN, M. C.; FAYE, I.; RAMI, J. F.; NDOYE, O.; GLASZMANN, J. C. Fostered and left behind alleles in peanut: interspecific QTL mapping reveals footprints of domestication and useful natural variation for breeding. **BMC Plant Biology**, Londres, v. 12, n. 26, p. 1-14, 2012.

FREITAS, F. O., PEÑALOZA, A. P. S., VALLS, J.F.M. **O amendoim contador de história**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003, 12 p.

FREITAS, S. M.; AMARAL, A. M. P. Alterações nas variações sazonais dos preços de amendoim nos mercados primários e atacadista, 1990-2001. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 32, n. 5, p. 45-54, 2002.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIN, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.

GODOY, I. J.; FÁVERO, A. P.; MICHELOTTO, M. D.; SANTOS, J. F.; JANINI, J. C.; BOIÇA JÚNIOR, A.; FINOTO, E.; MARTINS, A. L. M. Preparando o futuro - desenvolvimento de germoplasma do amendoim cultivado a partir de espécies

silvestres de *Arachis*. In: ENCONTRO SOBRE A CULTURA DO AMENDOIM, 8., 2011, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: UNESP, 2011.

GODOY, I. J.; MORAES, S. A.; ZANOTTO, M. D.; SANTOS, R. C. Melhoria do Amendoim. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de Espécies** Cultivadas. Viçosa, MG: UFV, 2005. p. 51-94.

GRATTAPAGLIA, D.; SEDEROFF, R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. **Genetics**, Bethesda, v. 137, n. 4, p. 1121-1137, 1994.

HERBERT, T. T.; STALKER, H. T. Resistance to Peanut Stunt Virus in Cultivated and Wild *Arachis* Species. **Peanut Science**, n. 8, n. 1, p. 45-47, 1981.

IBPGR Preliminary Descriptors for *Arachis* (IBPGR/ICRISAT) - International Crop Network Series. 2. Report of a Workshop on the Genetic Resources of Wild *Arachis* Species. Rome: International Board for Plant Genetic Resources, 1990.

IAC. **Cultivares amendoim**. Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br/areasdepesquisa/graos/amendoim.php>>. Acesso em: 01/04/2015.

JANINI, J. C. **Resistência de germoplasma silvestre de amendoim (*Arachis* spp.) a *Enneothrips flavens* Moulton, 1941 (Thysanoptera: Thripidae) e *Stegasta bosquella* (Chambers, 1875) (Lepidoptera: Gelechiidae)**. 2011. 105 f. Tese (Doutorado em Entomologia Agrícola) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista Julio Mesquita Filho, Jaboticabal, 2011.

JANINI, J. C.; BOIÇA JUNIOR, A. L.; GODOY, I. J.; MICHELOTTO, M. D.; FÁVERO, A. P. Avaliação de espécies silvestres e cultivares de amendoim para resistência a *Enneothrips flavens* Moulton. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 4, v. 69, p. 891-898, 2010a.

JANINI, J. C.; BOIÇA JÚNIOR, A. L.; GODOY, I. J.; MICHELOTTO, M. D.; BARBOSA, J. C. Avaliação da ocorrência de sintomas de *Enneothrips flavens* Moulton, 1941 (Thysanoptera: Thripidae) em plantas de espécies selvagens de amendoimzeiro (*Arachis* sp.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 22., 2008, Londrina. **Anais...** Londrina: SEB, 2008a. 1 CD-ROM.

JANINI, J. C.; BOIÇA JÚNIOR, A. L.; GODOY, I. J.; MICHELOTTO, M. D.; FÁVERO, A. P. Comportamento de plantas de espécies selvagens de amendoimzeiro ao ataque de *Stegasta bosquella* (Chambers, 1875) (Lepidoptera: Gelechiidae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 22., 2008, Londrina. **Anais...** Londrina: SEB, 2008b. 1 CD-ROM.

JANINI, J. C.; BOIÇA JÚNIOR, A. L.; GODOY, I. J.; MICHELOTTO, M. D.; FÁVERO, A. P. Comparação do Desenvolvimento de Plantas de Espécies Silvestres de *Arachis* sob o ataque de *Enneothrips flavens* e *Stegasta bosquella*. In: CONGRESSO

BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 23., 2010, Natal. **Anais...** Natal: Editora RN, 2010c. 1 CD-ROM.

JANINI, J. C.; BOIÇA JÚNIOR, A. L.; GODOY, I. J.; MICHELOTTO, M. D.; SOUZA, B. H. S.; FÁVERO, A. P. Identificação de Resistência em Espécies Silvestres de Amendoim (*Arachis* spp.) a *Enneothrips flavens* Moulton, 1941. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 23., 2010, Natal. **Anais...** Natal: Editora RN, 2010b. 1 CD-ROM.

KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, W. C. Taxonomía del género *Arachis* (Leguminosae). **Bonplandia**, Corrientes, v. 8, n. 1-4, p. 1-186, 1994.

LARA, F. M. **Princípios de Resistência de Plantas a Insetos**. São Paulo: Ícone, 1991. 336p.

LAVIA G.I. Karyotypes of *Arachis palustris* and *A. praecox* (section *Arachis*), two species with basic chromosome number $x=9$. **Cytologia**, Tokyo, v. 63, n. 2, p. 177-181, 1998.

LEAL-BERTIOLI, S. C. M.; BERTIOLI, D. J.; GUIMARÃES, P. M.; PEREIRA, T. D.; GALHARDO, I.; SILVA, J. P.; BRASILEIRO, A. C. M.; OLIVEIRA, R. S.; SILVA, PEDRO Ã. T.; VADEZ, V.; ARAUJO, A. C. G. The effect of tetraploidization of wild *Arachis* on leaf morphology and other drought-related traits. **Environmental and Experimental Botany**, Filadélfia, v. 84, n. 4, p. 17-24, 2012.

LEAL-BERTIOLI, S. C. M.; JOSÉ, A.; ALVES-FREITAS, D. M. T.; MORETZSOHN, M. C.; GUIMARÃES, P. M.; NIELEN, S.; VIDIGAL, B. S.; PEREIRA, R. W.; PIKE, J.; FÁVERO, A. P.; PARNISKE, M.; VARSHNEY, R. K.; BERTIOLI, D. J. Identification of candidate genome regions controlling disease resistance in *Arachis*. **BMC Plant Biology**, Londres, v. 9, n. 112, p. 1-12. 2009.

LOURENÇÃO, A. L.; MORAES, A. R. A.; GODOY, I. J.; AMBROSANO, G. M. B. Efeito da infestação de *Enneothrips flavens* Moulton sobre o desenvolvimento de cultivares de amendoim. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 4, 2007.

LÜDKE, D. C. W. **Estudo das relações sistemáticas da espécie endêmica brasileira *Arachis valida* Krapov. e W.C. Greg. baseado em cruzamentos intra e interespecíficos no gênero *Arachis* L.** 2014. 197 f. Tese (Doutorado em Botânica). Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

MATUO, T. **Danos da Lagarta-do-pescoço-vermelho, *Stegasta bosquella* Chambers, 1875 (Lepidoptera- Gelechiidae), em amendoimzeiro, *Arachis hypogaea* L.** 1973. 133 f. Tese (Doutorado em agronomia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista Julio Mesquita Filho, Jaboticabal, 1973.

MICHELOTTO, M. D.; FÁVERO, A.P.; SUASSUNA, N. D.; MARTINS, A. L. M.; LEONARDECZ NETO, E.; VALLS, J. F. M.; GODOY, I. J. Avaliação de acessos de

espécies silvestres de *Arachis* para resistência a doenças fúngicas foliares. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS, 2., 2008, Brasília. **Anais...** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos, 2008. p. 94.

MICHELOTTO, M. D.; GODOY, I. J. de; FÁVERO, A. P.; CARREGA, W. C.; FINOTO, E. L. Occurrence of *Enneothrips flavens* Moulton and *Stegasta bosquella* (Chambers) and its effects on agronomic traits of wild *Arachis* accessions. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 29, n. 1, p. 115-124, 2013a.

MICHELOTTO, M. D.; GODOY, I. J.; FINOTO, E. L.; SANTOS, J. F.; MARTINS, A. L. M.; CROSARIOL NETTO, J. ; CARREGA, W. C. Ocorrência e sintomas de ataque de tripes-do-prateamento (*Enneothrips flavens* Moulton) em linhagens de amendoim (*Arachis hypogaea* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 23., 2010, Natal. **Anais...** Natal: Editora RN, 2010. 1 CD-ROM.

MICHELOTTO, M. D.; GODOY, I. J.; FÁVERO, A. P. Espécies silvestres como fontes de resistência a pragas e doenças do amendoim. **Pesquisa & Tecnologia**, vol. 10, n. 2, 2013b.

MONÇATO, L. **Caracterização Morfológica de Germoplasma de Espécies de *Arachis*, seção *Caulorrhizae*, pela Análise Multivariada.** 1995. 122 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista Julio Mesquita Filho, Botucatu, 1995.

MORAES, A. R. A. **Efeito da infestação de *Enneothrips flavens* Moulton no desenvolvimento e produtividade de seis cultivares de amendoim, em condições de campo.** 2005. 104 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto Agrônomo (IAC), Campinas, SP. 2005.

MORAES, S. A. **Amendoim: Principais doenças, manejo integrado e recomendações de controle.** 2006. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2006_2/amendoim/Index.htm>. Acesso em: 28/08/2014

MORETZSOHN, M. C.; GOUVEA, E. G.; INGLIS, P. W.; LEAL-BERTIOLI, S. C. M.; VALLS, J.; F.; M.; BERTIOLI, D. J. A study of the relationships of cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) and its most closely related wild species using intron sequences and microsatellite markers. **Annals of Botany**, v. 111, n. 1, p. 113-126, 2013.

NAGATA, I. N. **Vetores de vírus.** 2003. Disponível em: <<http://www.grupocultivar.com.br/site/content/artigos/artigos.php?id=470>>. Acesso em: 16/09/2014.

NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; ZUCCHI, R. A. **Entomologia Econômica.** São Paulo: Livrocetes, 1981. 314 p.

NELSON, S. C.; SIMPSON, C. E.; STARR, J. L. Resistance to *Meloidogyne arenaria* in *Arachis* spp. germplasm. **Journal of Nematology**, v. 21, n. 48, p. 654-660, 1989.

NIGAM, S. N.; RAO, M. J. V.; GIBBONS, R. W. Artificial hybridization in groundnut. Andhra Pradesh: **International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics**. 1990. Information Bulletin, n. 29.

OLIVEIRA, C. M.; VALLS, J. F. M.; FÁVERO, A. P. Caracterização reprodutiva e morfológica de híbridos diplóides e anfidiplóides de *Arachis*. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS, 2., 2008, Brasília. **Anais...** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos, 2008. p. 160.

PANDE, S.; RAO, J. N. Resistance of wild *Arachis* species to late leaf spot and rust in greenhouse trials. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 85, n. 8, p. 851-855, 2001.

PELEGRIN, C.M.G., VALLS, J.F.M., MARIATH, J.E.A. Pericarp ontogenesis in wild species of *Arachis* L. (Leguminosae; Papilionoideae). **Flora**, Jena, v. 208, p. 118-127, 2013.

PEÑALOZA, A.P.S., VALLS, J.F.M. 1997. Contagem do número cromossômico em acessos de *Arachis decora* (Leguminosae). In Simpósio Latino-Americano de Recursos Genéticos Vegetais, 1., 1997, Campinas. **Resumos...** Campinas: IAC, 1997. p.39.

PEÑALOZA, A.P.S., VALLS, J.F.M. Chromosome number and satellited chromosome morphology of eleven species of *Arachis* (Leguminosae). **Bonplandia**, Corrientes, v. 14, n. 1-2. p. 65-72. 2005.

PEREIRA, R. C.; DAVIDE L. C.; TECHIO V. H.; TIMBÓ A. L. O. Duplicação cromossômica de gramíneas forrageiras: uma alternativa para programas de melhoramento genético. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 7, p.1278-1285, 2012.

REICHARDT, K. A. **A água em sistemas agrícolas**. São Paulo: Manole, p. 188, 1987.

ROBLEDO, G., LAVIA, G.I., SEIJO, G. Species relations among wild *Arachis* species with the A genome as revealed by FISH mapping of rDNA loci and heterochromatin detection. **Theoretical Applied Genetic**, v. 118, p. 1295-1307, 2009.

ROBLEDO, G., SEIJO, G. Characterization of the *Arachis* (Leguminosae) D genome using fluorescence in situ hybridization (FISH) chromosome markers and total genome DNA hybridization. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 3, p. 717-724, 2008.

ROBLEDO, G., SEIJO, G. Species relationships among the wild B genome of *Arachis* species (section *Arachis*) based on FISH mapping of rDNA loci and heterochromatin detection: a new proposal for genome arrangement. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 121, n.6, p. 1033-1046, 2010.

RODRIGUES, L. S. **Análise das relações de cruzabilidade interespecífica e interseccional no gênero *Arachis***. 2006. 155 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Genética) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Julio Mesquita Filho, Botucatu, 2006.

ROSSETO, C. J.; POMPEU, A. S.; TELLA, R. *Enneothrips flavens* Moulton, 1941 (Thysanoptera:Thripidae) causando prateamento do amendoineiro no Estado de São Paulo. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 20, n. 2, p.757, 1968.

SALLA, M. F. S.; RUAS, C. F.; RUAS, P. M.; CARPENTIERI-PÍPOLO, V. Uso de marcadores moleculares na análise da variabilidade genética em acerola. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 1, p. 15-22, 2002.

SANTOS, J. F.; FÁVERO, A. P.; MICHELOTTO, M. D.; CARREGA, W. C.; FINOTO, E. L.; GODOY, I. J. Resistência múltipla a doenças foliares em espécies silvestres e anfidiplóides de amendoim. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 34., 2011, Campinas. **Anais...** Campinas: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2011b. 1 CD-ROM.

SANTOS, J. F.; GODOY, I. J.; FÁVERO, A. P.; MOURA, N. F.; MICHELOTTO, M. D.; MARTINS, A. L. M. Resistência a mancha preta em populações F₄ selecionadas de cruzamentos entre o amendoim cultivado e um anfidiplóide de *Arachis*. **Bragantia**, Campinas, v. 70, n. 3, p. 512-518, 2011a.

SANTOS, J. F.; GODOY, I. J.; FÁVERO, A. P.; MOURA, N. F.; MICHELOTTO, M. D.; MARTINS, A. L. M. Avaliação do potencial de resistência a mancha preta em populações F₄ oriundas de cruzamentos entre espécies silvestres de *Arachis* e o amendoim cultivado. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS, 2., 2008, Brasília. **Anais...** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos, 2008. p. 413.

SANTOS, R. C.; GODOY, I. J. ; FÁVERO, A. P. Melhoramento do Amendoim. In: SANTOS R. C. (Org.). **O Agronegócio do Amendoim no Brasil**. Brasília: Embrapa, 2005, p. 123-192.

SANTOS, S. P. **Produção e caracterização de alotetraploides sintéticos entre espécies silvestres do gênero *Arachis***. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Botânica) - Universidade de Brasília, Brasília, Brasil, 2012.

SILVESTRI, M.C., ORTIZ, A.M., LAVIA, G.I. rDNA loci and heterochromatin positions support a distinct genome type for 'x = 9 species' of section *Arachis* (*Arachis*, Leguminosae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 301, p. 014-1092, 2014.

SIMPSON, C. E. Pathways for introgression of pest resistance into *A. hypogaea*. **Peanut Science**, College Station, v. 18, n. 1, p. 22-26, 1991.

SIMPSON, C. E.; STARR, J. L. Registration of 'Coan' peanut. **Crop Science**, Madison, v.41, n. 3, p.918, 2001.

SIMPSON, C.E.; VALLS, J.F.M.; MILES, J.W. Reproductive biology and the potential for genetic recombination in *Arachis*. In: KERRIDGE, P. C.; HARDY, B. (eds) **Biology and agronomy of forage Arachis**. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical. p.43-52. 1994.

SINGH, A.K., SMARTT, J. The genome donors of the groundnut/peanut (*Arachis hypogaea* L.) revisited. **Genetic Resources and Crop Evolution**. v. 45, n. 2, p. 113-11, 1998.

SINGH, A.K.; STALKER, H.T.; MOSS, J.P.; Cytogenetics and use of alien genetic variation in groundnut improvement. In: TSUCHIYA, T.; GUPTA, P.K. (Ed.). **Chromosome Engineering in Plants: Genetics, Breeding, Evolution. Part B**. Amsterdam: Elsevier Science, 1991, p.65-77.

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

STALKER, H. T.; DHESI, J. S.; PARRY, B. C.; HAHN, J. H. Cytological and infertility relationships of *Arachis* section *Arachis*. **American Journal of Botany**, Raleigh, v. 78, n. 2, p. 238-246, 1991b.

STALKER, H. T.; DHESI, J. S.; PARRY, D. An analysis of the B genome species *Arachis batizocoi* (Fabaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 174, p.159-169, 1991a.

STALKER, H.T. A New Species in Section *Arachis* of Peanuts with a D Genome. **American Journal of Botany**, v. 78, n. 5, p. 630-637, 1991c.

STALKER, H. T.; WYNNE, J. C. Photoperiodic Response of Peanut Species. **Peanut Science**, v. 10, n. 2, p. 59-62, 1983.

TALLURY, S. P.; STALKER, H. T.; PATEE, H. E. Early reproductive ontogeny in interspecific crosses of *Arachis hypogaea* and Section *Arachis* species. **Annals of Botany**, v. 76, n. 6, p. 397-404, 1995.

USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - Foreign Agricultural service . **Peanut area, yield and production**. Disponível em : <<http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdreport.aspx?hidReportRetrievalName=BVS&hidReportRetrievalID=918&hidReportRetrievalTemplateID=1>>. Acesso em: 19 de janeiro de 2015.

VALLS, J. F. M. ; COSTA, L. C. ; CUSTODIO, A. R. . A novel trifoliolate species of *Arachis* (Fabaceae) and further comments on the taxonomic section *Trierectoides*. **Bonplandia**, Corrientes, v. 22, p. 91-97, 2013.

VALLS, J. F. M.; SIMPSON, C. E. New species of *Arachis* L. (Leguminosae) from Brazil, Paraguay and Bolivia. **Bonplandia**, Corrientes, v. 14, n. 1-2, p. 35-63, 2005.

VARMAN, P. V. Breeding behavior of triploids in back crosses with *Arachis hypogaea*. **Madras Agricultural Journal**, Tamil Nadu, v. 88, n. 7-9, p. 375-378, 2001.

VARMAN, P. V.; GANESAN, K. N.; MOTHILAL, A. Wild germplasm: potential source for resistance breeding in groundnut. **Journal of Ecobiology**, Palani, V. 12, N. 3, p. 223-228, 2000.

VEIGA, R. F. A.; NAGAI, V.; GODOY, I. J.; CARVALHO, L. H.; MARTINS, A. L. M. Caracterização morfológica de acessos de amendoim: avaliação da sensibilidade de alguns descritores. **Bragantia**, Campinas, v. 55, n. 1, p. 45-46, 1996.

VINDHIYAMAN, P. Interspecific gene transfer from *Arachis correntina* into *A. hypogaea*. **Annals of Agricultural Research**, Ghaziabad, v. 22, n. 2, p. 225-228, 2001.

WYNNE, J. C.; HALWARD, T. M. Germplasm enhancement in peanut. In: STALKER, H. T.; CHAPMAN, C. (Ed.). **Science Management of Germplasm: Characterization, Evaluation and Enhancement**. Rome: International Board for Plant Genetic Resources, 1989. p. 155-174.