

# Amendoim Selvagem

Uma fonte de resistência a pragas

**Soraya Cristina Leal-Bertioli - PhD**  
Pesquisadora EMBRAPA Recursos  
Genéticos e Biotecnologia,  
soraya@cenargen.embrapa.br

**Patrícia Messenberg Guimarães - PhD**  
Pesquisadora EMBRAPA Recursos  
Genéticos e Biotecnologia,  
messenbe@cenargen.embrapa.br

**Alessandra Pereira Fávero - MSc**  
Pesquisadora EMBRAPA Recursos  
Genéticos e Biotecnologia,  
favero@cenargen.embrapa.br

**Márcio de Carvalho Moretzsohn - MSc**  
Pesquisador EMBRAPA Recursos  
Genéticos e Biotecnologia,  
marciocm@cenargen.embrapa.br

**Karina Proite - MSc**  
Estudante de doutorado da UnB,  
proite@cenargen.embrapa.br

**David John Bertioli - PhD**  
Pesquisador Universidade Católica de Brasília  
david@pos.ucb.br

Ilustrações cedidas pelos autores

O amendoim cultivado, *Arachis hypogaea*, é uma das leguminosas produtoras de grãos mais plantada em todo o mundo, devido ao seu alto conteúdo de proteína e óleos insaturados. É cultivado extensivamente na China, Índia e Estados Unidos, além de diversos países da América Latina e África (Conab, 2002). Os principais problemas da cultura estão relacionados ao ataque de fungos da parte aérea e nematóides, necessitando periodicamente da utilização de defensivos agrícolas (Hagan, 1998 ; Subrahmanyam *et al.*, 1983; Bailey, 2002). Espécies silvestres de *Arachis* têm-se mostrado altamente promissoras como fonte de resistência a diversas pragas que atingem o amendoim e outras culturas, sendo que já foram identificadas algumas espécies com resistência a três fungos foliares (*Cercospora arachidicola*, *Cercosporidium personatum* e *Puccinia arachidis*) e ao nematóide das galhas (*Meloidogyne* spp.). Busca-se, agora, desenvolver ferramentas para a utilização destas espécies silvestres em programas de melhoramento genético, visando à obtenção de cultivares de amendoim com resistência mais duradoura (Fig.1).

O projeto "Identificação de resistências a stress biótico em *Arachis* selvagem e desenvolvimento de ferramentas para o melhoramento genético através de mapeamento e genômica comparativa" combina esforços e habilidades de pesquisadores da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, IBONE (Instituto Botânico del Nordeste, Argentina), Universidade de Aarhus (Di-



foto ilustrativa

namarca) e Sainsbury's Laboratories (Inglaterra) na busca de genes de resistência a fungos e nematóides patogênicos ao amendoim, e no desenvolvimento de um mapa genético para *Arachis* que possibilite a utilização destes genes.

## Produção de um mapa genético para facilitar a seleção assistida

Espécies silvestres de *Arachis* possuem alta diversidade genética e constituem uma rica fonte de genes de resistência. Diversos trabalhos têm mostrado que as espécies silvestres são muito mais resistentes a doenças do que a espécie cultivada (*Arachis hypogaea*) (Holbrook *et al.*, 2000). O amendoim cultivado é tetraplóide (tem quatro conjuntos de cromossomos, dois conjuntos do chamado genoma A e dois conjuntos do genoma B), enquan-



Fig.1 - Sementes de diferentes espécies de *Arachis*

to que a maioria das espécies silvestres é diplóide (apenas dois conjuntos de cromossomos). Esta diferença de ploidia dificulta a introgressão de genes dos parentes silvestres, uma vez que os híbridos obtidos de maneira tradicional são triplóides estéreis. Por isso, para obter híbridos férteis, necessita-se fazer cruzamentos entre espécies silvestres com genomas AA e BB. Os híbridos obtidos (AB) são então submetidos a tratamento com colchicina para duplicar o número de cromossomos, obtendo-se, assim, anfidiplóides sintéticos (AABB), que, em princípio, são compatíveis com o amendoim cultivado. Estes híbridos são então cruzados com *A. hypogaea* dando continuidade ao programa de pré-melhoramento de *Arachis*.

Tradicionalmente, nos programas de melhoramento de plantas que envolvem hibridações seguidas de retrocruzamentos, grande parte do genoma da parental doadora é incorporada ao genoma da planta receptora e, por isso, são necessárias várias gerações para a eliminação gradual dos genes indesejáveis, enquanto o genótipo do

parental recorrente é mantido para os demais locos. Em cada geração são selecionadas as plantas que apresentam a característica de interesse a ser introgridida, e as demais características do parental recorrente. Este processo de seleção, após a introgressão, pode ser otimizado através da construção de mapas genéticos e da identificação de marcadores moleculares fortemente associados aos genes de interesse. Desta forma, é possível, em cada fase de seleção, a escolha dos indivíduos que contenham o máximo de características do parental recorrente, diminuindo assim o tempo do processo de melhoramento. Isso é particularmente importante em programas que visam à introgressão de genes de resistência a pragas. Neste caso, a seleção indireta através de marcadores moleculares possibilita, além da redução de tempo, a identificação e seleção de genótipos resistentes na ausência do patógeno e a transferência e manutenção de mais de um gene de resistência principal durante a seleção (piramidização de genes de resistência).

Para a implementação de um esquema efetivo de seleção assistida por marcadores em programas de melhoramento genético, três requerimentos são essenciais: (1) alguns marcadores devem estar fortemente ligados aos genes que controlam as características de interesse; (2) os marcadores devem estar facilmente disponíveis para a análise de grandes populações e (3) as técnicas utilizadas devem ser reproduzíveis entre laboratórios e com baixo custo.

### Mapeamento comparativo: Um atalho para um mapa genético

Espécies de *Arachis* têm genomas muito grandes. O genoma haplóide de *Arachis hypogaea* tem aproximadamente  $1,74 \times 10^9$  pares de bases. Isto dificulta a identificação e o mapeamento direto de genes de interesse. Uma outra espécie da família das leguminosas, *Lotus japonicus*, tem um genoma bem menor, tem um mapa genético de alta resolução já disponível e os projetos de sequenci-

## Estudos de expressão gênica

O estudo da expressão gênica tem demonstrado ser uma importante ferramenta no entendimento dos processos biológicos em nível molecular. Por exemplo, estes estudos podem ser utilizados na identificação de uma rede de genes expressos de fundamental importância no desenvolvimento de uma determinada estrutura, ou na resposta de um organismo a um estímulo externo. O estudo da expressão gênica diferencial pode contribuir para a caracterização de resistências, pois possibilita a identificação de genes-chave desta rede através da comparação da expressão gênica durante o desenvolvimento de uma estrutura sob condições normais e em organismos carregando uma mutação ou submetidos a algum tipo de stress. Através do acúmulo de dados da expressão diferencial de vários genes sob diferentes condições, pode-se reconstruir as vias reguladas por estes genes, prever onde eles atuam e identificar novos genes associados ao processo.

Para o entendimento da função de um gene, é fundamental o estudo de onde e quando ele é expresso. Recentemente, várias estratégias foram desenvolvidas para permitir o estudo da função de vários genes simultaneamente, entre elas: a genética reversa (geração de mutações específicas em genes de interesse), screens mutagênicos (geração de mutações randômicas e screening de um pool de mutantes para se identificar fenótipos de interesse) e bioinformática (a análise dos dados gerados por todas as estratégias acima). As estratégias acima, associadas aos projetos genoma, que têm como objetivo o sequenciamento do genoma inteiro de vários organismos, têm possibilitado o estudo sistemático da expressão diferencial de genes em nível de genoma como um todo. A análise da expressão diferencial de genes em resposta ao ataque de um patógeno constitui, portanto, uma ferramenta importante no isolamento de genes de resistência ou de fatores envolvidos com a interação patógeno-hospedeiro.

Neste projeto, a identificação de genes expressos diferencialmente em germoplasma resistente de *Arachis* está sendo realizada através da análise de ESTs e de microarranjos. Para tal, várias bibliotecas de cDNA foram construídas a partir de *Arachis stenosperma* submetido a diferentes situações de stress (inoculado com nematóides e fungos) as quais estão

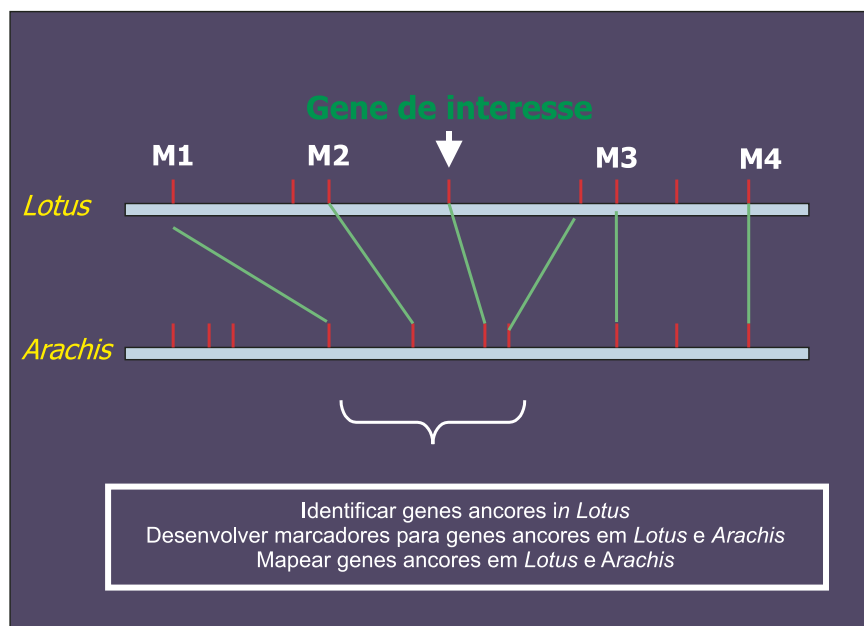


Fig.2 - Exemplo de estudo de sintenia: Marcadores moleculares (M1 a M4) em posições colineares nos genomas de *Lotus* e *Arachis*.

amento de ESTs (expressed sequenced tags) e do genoma estrutural estão quase completos (Asamizu *et al.*, 2000; Sato *et al.*, 2001). Por isso, *L. japonicus* tem sido considerada uma planta-modelo para todas as leguminosas, auxiliando no entendimento de outras espécies de genomas mais complexos. A comparação entre estes dois gêneros e a análise da ordem dos genes nos cromossomos possibilita a identificação de regiões correlatas entre os dois genomas (chamada sintenia), ou seja, o mapeamento comparativo. Neste processo, são identificados marcadores moleculares comuns aos diversos genomas, chamados marcadores-âncoras. Como exemplo de transferência de informação da planta modelo para leguminosas cultivadas pode-se citar o caso dos fenótipos mutantes: uma vez que o gene responsável por um fenótipo mutante seja clonado em *Lotus*, a análise fenotípica comparativa e a informação do mapa podem ser utilizadas como base para identificar genes candidatos para o gene correspondente em outras leguminosas.

No caso específico de *Arachis*, a análise genômica comparativa poderá auxiliar no desenvolvimento de marcadores para o melhoramento genético da cultura, o que certamente facilitará a clonagem de genes de interesse. A exploração da colinearidade entre genes de *Arachis* e *Lotus* buscando a identificação entre as duas espécies e a identificação de regiões

cromossômicas ortólogas (genes homólogos localizados em genomas de diferentes organismos) tem sido realizada através do desenvolvimento de um banco de ESTs de *Arachis* (Guimarães *et al.*, 2003). Este banco de dados deverá acelerar o mapeamento do genoma de *Arachis*, a identificação de resistências e o desenvolvimento de marcadores a serem utilizados nos programas de melhoramento. Um benefício adicional do projeto é o desenvolvimento de um sistema genético unificado para a família das leguminosas, pois trabalhando com *Lotus* que é considerado um dos gêneros mais adaptados desta família e *Arachis* que é considerado um dos mais primitivos, qualquer região de similaridade encontrada provavelmente existirá em todas as leguminosas. Até o momento, já foram encontradas homologias entre *Lotus* e *Arachis* em vários genes que codificam para enzimas envolvidas em importantes cadeias metabólicas, além da homologia entre genes envolvidos na simbiose destas plantas com bactérias fixadoras de nitrogênio estarem sendo estudadas (Sandal, *et al.*, 2003) (Fig. 2). A identificação de tais regiões pode facilitar o isolamento de genes envolvidos neste processo, possibilitando o desenvolvimento de variedades de *Arachis* com maior capacidade de fixação de nitrogênio, o que resultaria na redução da utilização de fertilizantes nitrogenados, contribuindo para uma produção de alimentos mais sustentável.



sendo seqüenciadas de forma massal visando à construção de um banco de dados de ESTs e dos chips de DNA.

Uma vez isolados e confirmada sua função, estes genes podem ser introgrididos para o amendoim cultivado ou transferidos a outras plantas de interesse econômico, que sejam atingidas pelas mesmas pragas, como a soja e feijão, para as quais já existem disponíveis métodos de transformação.

### **O impacto da utilização destas novas técnicas no cultivo do amendoim**

O Brasil produz atualmente aproximadamente 170 mil toneladas de amendoim, sendo o maior produtor o estado de São Paulo, com aproximadamente 60 mil ha plantados e 80-90% da produção do país (Conab, 2002). Um dos principais problemas dos produtores de amendoim deste estado é o ataque de doenças fúngicas de parte aérea, como a mancha barrenta (*Didymella arachidicola*), mancha castanha (*Cercospora arachidicola*), mancha preta (*Cercosporidium personatum*), ferrugem (*Puccinia arachidis*) e verrugose (*Sphaceloma arachidis*). A principal cultivar plantada no país é a cv. Tatu, com aproximadamente 80% da área plantada e é altamente suscetível às doenças acima citadas. A última cultivar de *A. hypogaea* lançada pelo Instituto Agronômico de Campinas (IAC), a IAC-Caiapó, é de ciclo longo (com 130 dias) e possui resistência moderada às cercosporioses, à mancha barrenta e a ferrugem (Conab, 2002).

As espécies silvestres da seção *Arachis* têm sido utilizadas no melhoramento do amendoim na Índia, Argentina, Estados Unidos e Brasil. Várias das espécies, que, na maioria, são brasileiras, possuem níveis de resistência a pragas e doenças superiores aos encontrados em acessos de *A. hypogaea* (Stalker & Moss, 1987; Fávero *et al.*, 2000 e 2001). A falta de informações sobre o potencial destas espécies para o melhoramento de cultivares é a principal barreira para seu uso. As 69 espécies silvestres de *Arachis* descritas e existentes são restritas ao Brasil, Bolívia, Paraguai, Argentina e Uruguai, sendo 57 endêmicas ao Brasil. As expedições de coleta realizadas desde 1959 têm permitido a preservação de mais de 1600 acessos no banco de germoplasma, localizado na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, através de seu curador e principal

coletor, Dr. José Francisco M. Valls. Neste banco de germoplasma, há acessos que representam todas as espécies de *Arachis*, exceto uma, *Arachis martii*, considerada extinta.

A identificação de espécies resistentes a doenças e pragas e a localização de marcadores associados aos genes de interesse auxiliarão sobremaneira a seleção de plantas com resistência, desde as primeiras fases do programa de melhoramento, até a obtenção de novas cultivares. Acredita-se que a possibilidade da piramidização de genes tornará as novas cultivares com resistências mais duradouras do que se fosse utilizada apenas a seleção baseada em avaliação agrônômica e fitopatológica das plantas, pois será possível a identificação de marcadores moleculares ligados a genes de resistência localizados nos genomas A e B oriundos de espécies silvestres e incorporados ao amendoim cultivado.

O projeto irá propiciar o diálogo mais intenso entre os parceiros na cooperação científica e tecnológica entre a União Européia e América Latina. Isto também beneficiará o treinamento de jovens pesquisadores em tecnologias de ponta em genômica e citogenética. Os mapas genéticos gerados e o mapeamento comparativo entre os genomas de *Arachis* e *Lotus* poderão facilitar o melhoramento de amendoim e, possivelmente, os programas de melhoramento de outras leguminosas. O desenvolvimento de variedades melhoradas de amendoim adaptadas à América Latina auxiliará na redução do uso de defensivos agrícolas e poluição associada, sem perdas na produtividade, contribuindo para o desenvolvimento sustentável da agricultura.

### **Bibliografia Citada**

Asamizu, E., Nakamura, Y., Sato, S., e Tabata, S. (2000). Generation of 7137 non-redundant expressed sequence tags from a legume, *Lotus japonicus*. DNA research 7 127-130.

Bailey, J. (2002). Peanut Disease Management. North Carolina Peanut Production Guide. Chapter 6. 19 pp.

Conab (2002). Conjuntura Semanal. Especiais 16-2009. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Companhia Nacional de Abastecimento-Conab.

Fávero, A. P.; Moraes, S. A.; Vello, N. A.; Valls, J. F. M. Caracterização de acessos de germoplasma de espécies silvestres de *Arachis* (Seção

*Arachis*) resistentes à ferrugem (*Puccinia arachidis*). Anais do 46º Congresso Nacional de Genética, 19 a 23 de setembro de 2000 - Águas de Lindóia- SP, p.533-534

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. Anais do I Congresso de Melhoramento de Plantas, 03 a 06 de abril de 2001 - Goiânia, GO.

Guimaraes, P.M., Leal-Bertioli, S., Seijo, G., Parniske, M., Stougaard, J., Bertioli, D. (2003). The identification of resistances to biotic stress in wild *Arachis* germplasm, and the development of tools for breeding by genetic mapping and comparative genomics. Annals of the 7th Congress of Plant Molecular Biology, Barcelona, 2003.

Hagan, A (1998). Foliar diseases of peanuts. Alabama Cooperative Extension System. ANR-369. (<http://www.Aces.edu/department/extcomm/publications/anr/anr-369.html>)

Holbrook, C.C., Stephenson, M.G. e Johnson, A.W. (2000). Level and geographical distribution of resistance to *Meloidogyne arenaria* in the US peanut germplasm collection. Crop Science 40 1168-1171.

Sandal, N., Madsen, L., Radutoiu, S., Krusell, L., Madsen, E., Kanamori, N., Sato, S., Tabata, S., James, E., Krause, K., Udvardi, M., Stougaard, J. (2003). Mapping and Map based cloning of symbiotic genes in the model legume *Lotus japonicus*. Annals of the 7th Congress of Plant Molecular Biology, Barcelona, 2003.

Sato, S., Kanerko, T., Nakamura, Y., Asamizu, E. kato, T. e Tabata, S. (2001). Structural analysis of a *Lotus japonicus* genome. I. Sequence features and mapping of fifty-six TAC clones which cover the 5,4 Mb regions of the genome. DNA Research 8 311-318.

Stalker, H.T., Moss, J.P. (1987). Speciation, cytogenetics, and utilization of arachis species. Advances in Agronomy 41 1-40.

Subrahmanyam, P., McDonald, D., Gibbons, R.W. e Subba Rao, P.V. (1983). Components of resistance to *Puccinia arachidis* in peanuts. Phytopathology 73 (2) 253-256. †