

AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE CRUZAMENTOS ARTIFICIAIS EM *PHASEOLUS LUNATUS* L.

Edilson Santana De Sousa Segundo(bolsista PIBIC/CNPQ), *José de Ribamar Assunção Filho* (colaborador-mestrando UFPI), *Josilane Sousa da Penha* (colaboradora UFPI), *Verônica Brito Da Silva* (colaboradora-mestre em genética e melhoramento- UFPI), *Regina Lucia Ferreira Gomes*(orientadora depto de fitotecnia UFPI), *Angela Celis De Almeida Lopes* (co-orientadora depto de biologia)

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Phaseolus lunatus* L., também conhecida como feijão-fava ou simplesmente por fava, é cultivado na América do Norte, América do Sul, Europa, leste e oeste da África e sudeste da Ásia (BAUDOIN, 1988).

Existem vários métodos de melhoramento aplicáveis às espécies autógamas. Todavia, eles podem ser incluídos em três categorias: introdução de linhagens, seleção de linhas puras e hibridação (RAMALHO, 2003). Independentemente do método, a meta é atingir a homozigose ao final do programa.

Considerando a hibridação, esta deve ser utilizada quando o objetivo do programa é reunir num único indivíduo (linhagem) os alelos desejáveis que se encontram em linhagens distintas (FEHR, 1987; RAMALHO, 1997). Existem alguns passos fundamentais no melhoramento por hibridações, sendo eles a escolha dos progenitores, a obtenção de população segregante e a escolha do método de condução desta (CARNEIRO et al., 2002; RAMALHO et al., 1993; ALLARD,1971).

Para realização das hibridações é imprescindível o conhecimento sobre a morfologia floral da espécie. Com relação a esse aspecto, o feijão-fava apresenta flores reunidas em inflorescências compostas, axilares e em cachos, com um número de botões por inflorescência bastante variado. Elas são hermafroditas, papilionácea, o cálice é gamossépalo, a corola pode apresentar pétalas com coloração branca, rosa claro, rosa escuro e violeta. O androceu é formado por dez estames diadelfos, as anteras são bitecas, dorsifixas com deiscência longitudinal, ovário unilocular, apresentando 2 a 3 óvulos. O grão de pólen da fava apresentou-se em formato circular, abertura com três poros, e superfície lisa.

Segundo Freire Filho et al. (2005), na emasculação, os botões florais escolhidos devem estar bem formados e bem desenvolvidos, e que os mesmos sejam manuseados sem que o estigma e o estilete sofram danos, e sem que haja comprometimento da fixação ao racemo. Segundo Myer (1996), o botão a ser emasculado deve ser pego com firmeza, mas com bastante cuidado, para evitar algum estresse na frágil união do botão ao racemo.

A emasculação pode ser feita com pinça de aço reta ou curva, com pontas bem finas. Com seu auxílio, é feita a abertura do botão floral, que está seguro pelo polegar e indicador de uma das mãos, enquanto a pinça é manejada pela outra, ficando a ponta do botão para o lado do operador (VIEIRA, 1967). Para iniciar o processo, abre-se o estandarte e as outras partes florais (desenrolando a quilha), até que as exposições dos órgãos reprodutores masculinos e femininos, em seguida, retiram-se todas as anteras, sempre com cuidado para não

comprometer a estrutura do botão floral (VIEIRA, 1967). De acordo com Myer (1996), esse processo de emasculação não requer mais que 25 segundos por flor.

Em *Phaseolus*, a polinização manual é uma operação trabalhosa, um pouco demorada e muitas vezes limita o sucesso no programa de melhoramento (RAMALHO et al., 1993). A polinização é executada esfregando o estigma da flor aberta do progenitor masculino, no estigma exposto do botão floral do progenitor feminino. Segundo Myer (1996), o pólen permanece viável por 12 a 15 horas depois da antese, podendo-se usar uma flor para polinizar quatro a cinco botões emasculados.

Após a realização da polinização, coloca-se uma etiqueta presa por uma linha ou liga, logo abaixo do botão floral polinizado, para a identificação do botão e do cruzamento. Na etiqueta deve constar o cruzamento, colocando o nome dos parentais (colocando primeiro o parental feminino seguido do masculino) e a data (MYER, 1996; FREIRE FILHO et al., 2005).

O manejo de pragas e doenças é uma prática indispensável, devendo-se realizar aplicações de inseticidas, em intervalos regulares, para o controle ou eliminação de insetos e formigas, pois estes poderão transportar pólen de um lugar para outro, podendo ocorrer polinização (MYER, 1996).

A morfologia floral do feijão-fava é bem conhecida, embora sejam escassos os dados sobre sua biologia floral e polinização, sendo que no Brasil, praticamente não existem estudos sobre estes temas. Tais estudos podem ser utilizados como pré-requisito para vencer as barreiras genéticas e morfológicas à hibridação. Assim, este trabalho tem como objetivo determinar o método mais eficiente de cruzamento artificial em feijão-fava.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida entre os meses de janeiro a julho de 2011, em telado do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal do Piauí (UFPI), no município de Teresina- PI, a 74,4 m de altitude, latitude média de 05° 5' S e longitude de 42° 49' W, com precipitação média anual de 1350 mm.

As três sub-amostras de feijão-fava, de hábito de crescimento determinado, utilizadas foram: UFPI-728, coletada na Paraíba, e G25165 e G26200, provenientes do Centro Internacional de Agricultura Tropical, na Colômbia, incorporadas ao Banco de Germoplasma de Feijão-fava (BAG de Feijão-fava) da UFPI. A semeadura foi realizada em vasos, sendo dez vasos por sub-amostra, em intervalos de sete dias. Foram utilizadas três sementes por vaso, deixando-se uma planta após desbaste.

Com o objetivo de possibilitar um melhor desenvolvimento das plantas, aplicou-se fertilizante químico, na formulação 13: 13: 15, a cada duas semanas, mediante a diluição de uma colher de chá de fertilizante para cada litro de água, sendo aplicados 300 ml por vaso, evitando o contato com o caule da planta. A fertilização química teve início em fevereiro.

As aplicações de defensivos agrícolas foram realizadas de acordo com a ocorrência de insetos e formigas, com o objetivo de evitar polinizações indesejáveis que os mesmos poderiam ocasionar.

Quatros métodos de hibridação artificial, descritos por Freire Filho et al. (2005), que diferem entre si, foram avaliados. No método 1, segundo Kheradnam e Niknejad (1971); Zary e

Miller Júnior (1982), serão utilizados pólen de flores coletadas pela manhã; os botões serão emasculados e polinizados na mesma manhã. No método 2, segundo Rachie et al. (1975) e Zary e Miller Júnior (1982), serão utilizados polens de flores coletadas pela manhã (flor aberta) e armazenadas sob refrigeração até sua utilização. No fim da tarde os botões florais serão emasculados e polinizados. No método 3, segundo Sen e Bhowal (1960), Ebong (1972), Rachie et al. (1975) e Blackhurst e Miller Jr. (1980), serão utilizados botões florais emasculados no fim da tarde do dia que antecede a sua antese natural; pólen de flores serão coletados e os botões polinizados no início da manhã do dia seguinte. No método 4, serão utilizados pólen de flores coletados a tarde e os botões florais serão emasculados e polinizados na mesma tarde. Para diferenciar cada método, serão utilizadas etiquetas de diferentes cores, que serão colocadas no pedúnculo da inflorescência.

As hibridações artificiais, realizadas em um telado, foram conforme a metodologia descrita anteriormente. Em geral, a técnica utilizada nessas hibridações compreendeu as seguintes etapas: realizou-se a escolha do botão a ser utilizado; após o reconhecimento do botão floral que abriria no dia seguinte; abriu-se o botão floral, com auxílio de uma pinça, que consiste no corte das pétalas que envolvem os órgãos masculinos e femininos pelo lado côncavo do botão floral; sendo que a emasculação consistiu na remoção das anteras, com a pinça, após desenrolar a quilha que é enrolada em forma de espiral, envolvendo as anteras (grãos de pólen); escolheu-se uma flor recém aberta do genitor doador de pólen destacando-se o perianto, e em seguida, cortando-se levemente a quilha pelo lado côncavo, forçando a exposição do aparelho sexual; em seguida promoveu-se a aderência dos estames e respectivas anteras da flor doadora de pólen, sobre o estigma da flor emasculada; por fim, colocou-se a etiqueta no pedúnculo da inflorescência, preenchida com o nome do receptor e doador, respectivamente, e a data da polinização. Depois esses procedimentos, esperou-se entre vinte e quatro e quarenta e oito horas para fazer a verificação da ocorrência ou não da fertilização, sendo que, se a etiqueta ficava no pedúnculo após esse período, ocorreria a fertilização.

Durante a realização dos cruzamentos, foram coletados dados referentes ao número de dias para o florescimento, padrão de florescimento, horário da abertura das flores e número de dias para maturação.

As médias das subamostras referentes ao número de dias para maturação de vagem e número de botões por inflorescência (racemo) foram comparadas com auxílio do software Assistat, versão 7.6 beta (2011), pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), de acordo com o delineamento inteiramente casualizado. As hibridações artificiais foram avaliadas através de cálculos de porcentagem, avaliando-se os índices de pega em cada tipo de método utilizado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Dentre os 1156 cruzamentos artificiais realizados em feijão- fava, 623 foram de acordo com o método 1; 127 pelo método 2; 116 conforme o método 3 e 290 pelo método 4. Destes cruzamentos, apenas 18 vagens foram obtidas, sendo 16 pelo método 1, uma pelo método 3 e uma pelo método 4. Assim, dos cruzamentos artificiais realizados pelo método 1, houve 2,57% de pegamento. Nos métodos 3 e 4, obteve-se apenas um pegamento em cada um,

correspondendo a 0,86% e 0,37% de pegamento, respectivamente. O método 2 foi o que apresentou o resultado mais desfavorável, sem nenhum pegamento. Desta forma, em 1,55% dos cruzamentos obtivemos pegamento. Esses resultados concordam com outros estudos semelhantes (ZAYS, 1966; BLISS, 1980; VAID, 1999 E PETERNELLI E BORÉN, 1999). Bliss (1980), Vaid (1990) e Peterelli e Borén (1999) relatam que pode ser obtido maior sucesso nas hibridações em ambientes sem controle de temperatura e umidade, quando as polinizações são realizadas nos horários mais frescos da manhã ou da tarde. Tal ocorrência foi observada apenas nos horários da manhã neste experimento, pois as diferenças entre o número de vagens formadas nos horários de 7 às 10 h, foram significativas.

As subamostras diferiram com relação ao número de dias para floração, número de botões por inflorescência e número de dias para maturação (Tabela 1).

Tabela 1. Resumo da análise de variância dos caracteres número de dias para floração (NDF), número de botões por inflorescência (NBI) e número de dias para maturação (NDM), avaliados em três subamostras de feijão-fava, em Teresina - PI, 2011.

Fontes de variação	GL	Quadrados médios		
		NDF	NBI	NDM
Subamostras	2	822,93**	573,29**	1947,13**
Resíduo	9	12,87	112,55	96,14
CV (%)		10,83	18,03	10,40

** significativo pelo teste F, a 1% de probabilidade.

Quanto ao coeficiente de variação (CV), observou-se baixos valores para NDM (10,40) e NDF (10,83), e médio para NBI (18,03). O coeficiente de variação indica o grau de precisão do experimento. Pimentel-Gomes (2009) classificou-os como baixos, quando inferiores a 10%; médios, quando de 10% a 20%; altos, quando de 20% a 30%, e muito altos, quando superiores a 30%, com base em ensaios realizados no campo. Entretanto, essa classificação não leva em consideração as particularidades da cultura estudada, e, principalmente, não faz distinção quanto à natureza do caráter avaliado (COSTA et al., 2002).

De acordo com as médias (Tabela 2), observa-se que o número de dias para a floração foi em média de 33,13, variando de 26,20 a 43,40 dias. As subamostras G25165 e G26200 foram as mais precoces, representando boas fontes de genes para precocidade. Santos et al. (2002), avaliando variedades de feijão-fava no estado da Paraíba, de hábito de crescimento indeterminado e trepador, observaram período para o florescimento entre 49 a 71 dias.

Tabela. 2 - Médias dos caracteres número de dias para o florescimento (NDF), número de botões por inflorescência (NBI) e número de dias para maturação (NDM), avaliados em três subamostras de feijão-fava, em Teresina - PI, 2011.

Subamostras	NDF (dias)	NBI	NDM (dias)
UFPI-728	43,40 a	58,98 ab	97,81 a
G25165	29,80 b	61,12 a	95,79 a
G26200	26,20 b	56,34 b	89,36 b
Média Geral	33,13	58,81	94,00

O número de botões por inflorescência apresentou média de 58,81, com as subamostras variando de 56 (G26200) a 61(G25165) botões. Este caráter é importante para as etapas iniciais de um programa de melhoramento, pois quanto maior o número de botões por inflorescência maior o número de flores para os cruzamentos artificiais.

Quanto ao número de dias para a maturação, a média geral foi de 94,00 dias, sendo que a sub-amostra G26200 destacou-se como a mais precoce.

As sub-amostras não diferiram entre si com relação aos horários de abertura dos botões florais. Observa-se que a abertura dos mesmos ocorreu durante todo o dia, iniciando por volta das 6:10h da manhã indo até às 17:45h da tarde, mesmo em horários em que as condições de temperatura foram menos amena.

Foram observados também que ocorre uma maior incidência de abertura floral nos períodos mais quentes do dia, das 11h às 15h. Observando ainda que o horário de maior abertura floral é justamente no período em que a hibridação artificial tem a maior probabilidade de não gerar frutos ou não darem certo, que é justamente no período das primeiras horas da tarde, das 12h às 15h, sendo um período crítico para o pegamento dos cruzamentos artificiais.

4. CONCLUSÕES

A subamostra G26200 apresenta precocidade quanto aos números de dias para florescimento e maturação; As subamostras UFPI-228 e G25165 apresentam maiores números de botões por inflorescência.

O horário de realização da polinização artificial em *Phaseolus lunatus* L. influencia na percentagem de pegamento de vagens nas condições climáticas de Teresina - Pi.

O método 1 (pólen de flores coletadas pela manhã e botões emasculados e polinizados na mesma manhã) foi o mais eficiente nas hibridações artificiais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAUDOIN, J. P. Genetic resources, domestication and evolution of lima bean, *Phaseolus lunatus*. In: Gepts, P. (ed.). Genetic resources of *Phaseolus* bean. Amsterdam: **Kluwer Academic Publishers**, 1988, p. 393-407.

CARNEIRO, J. E. de; RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. DE F.B.; GONÇALVES, F.M.A. Breeding potencial of single, Double and multiple crosses in common bean. *Crop Breeding and applied Biotechnology*, v.2,n.4,p.515-524,2002.

ALLARD, R.W. Princípios de melhoramento genético das plantas. São Paulo: Edgar Blucher, 1971. 381p.

BLISS, F. A.; common bean. In: FEHR, W.R (coord). Hybridization of crop plants. MADISON; America Society of Agronomy crop. Science Society of America. 1980. P.84-273.

COSTA, N. H. A. D.; SERAPHIN, J. C.; ZIMMERMANN, F. J. P. Novo método de classificação de coeficientes de variação para a cultura do arroz de terras altas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 37, n. 3, p. 243-249, 2002.

FEHR, W.R. Principles of cultivar development. New York : MacMillan, 1987. 525p.

FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; BARRETO, P. D.; SANTOS, A. A. dos Melhoramento genético. In: FREIRE FILHO, F. R. et al. (Org.) **Feijão caupi: avanços tecnológicos**. Brasília-

DF, Embrapa Meio-Norte, 2005. p. 25-104.

MYER, G. O. Hand crossing of cowpeas. Ibadan, Nigéria : IITA, 1996 (IITA Research Guide, 42). Disponível em : <<http://www.iita.org/info/tm%5fmat/irg42.html>>

PETERNELLI, L. A.; BOREN, A. Hibridação artificial em feijão. In: Boren, A. (Ed.). Hibridação artificial de plantas. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1999. P.269-294.

RAMALHO, M. A. P. Melhoramento de plantas autógamas. Lavras: UFLA/FAEPE. 2003 (Textos acadêmicos); RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; ZIMMERMANN, M. J. O. :**Genética quantitativa em plantas autógamas: aplicações ao melhoramento do feijoeiro**. Goiânia: UFG, 1993. 271p.

VAID, K. Factors in artificial crossing of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). Legume. Res., Kamal, v.13, n.2, p.87-88, 1990.

VIEIRA, C. O feijão comum. Cultura, doenças e melhoramento. Viçosa: Imprensa Universitária da UFV, 1967. 220 p.

ZAYAS, J .C. Los Frutas Anonaceas. Havana: La Habana, 1996. 63p.