

Hibridação em Soja

*Aluizio Borém¹
Leones Alves de Almeida²
Romeu Afonso de Souza Kiihl²*

O processo de hibridação é uma das etapas mais importantes no melhoramento genético de uma espécie vegetal. Na cultura da soja, a hibridação é essencial para o desenvolvimento de novas variedades, uma vez que, a partir de cruzamentos de parentais geneticamente distintos são desenvolvidas populações com variabilidade genética, para aplicação de métodos apropriados de avaliação e seleção de características superiores.

O melhoramento é um processo que permite contínuo desenvolvimento de novos cultivares. Com objetivos preestabelecidos, são realizadas hibridações para criar germoplasma diverso e fazer frente aos problemas reais ou potenciais da cultura. Um cultivar altamente produtivo e estável representa uma combinação bem balanceada de genes, interagindo com o ambiente em que é cultivado. Recentemente, técnicas de biotecnologia e engenharia genética têm sido utilizadas como recursos auxiliares nos

¹ Eng.-Agrônomo, M.S., Ph.D., Professor do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, 36571-000 Viçosa, MG. E-mail: borem@ufv.br

² Eng.-Agrônomo, M.S., Ph.D., Pesquisadores da Embrapa Soja, Cx. Postal 231, 86001-970 Londrina, PR. E-mail: leones@cnpso.embrapa.br

processos de seleção e aumento da variabilidade genética. Tradicionalmente, o melhoramento genético da soja tem por base a manipulação genética da soja realizada artificialmente. As hibridações são feitas na forma de cruzamentos simples, duplos ou múltiplos e servem para recombinar a variabilidade genética intra-específica ou para aumentar essa variabilidade, pela introgressão de genes em cruzamentos interespecíficos.

A soja é uma planta autógama. Apresenta flores perfeitas e pequenas. Nos processos de hibridação são necessários alguns conhecimentos da morfofisiologia da planta e da flor, e habilidade manual para realizar com sucesso os cruzamentos.

Classificação Botânica

A soja é considerada uma espécie exótica no País. Probst e Judd (1973) realizaram ampla revisão sobre a origem e história da soja. Essa cultura tem como centro de origem a região leste da China, onde sofreu domesticação por volta do século XI a.C. A partir daí foi introduzida em outras regiões e países do Oriente, como Manchúria, Coréia, Japão, União Soviética e países do sudeste da Ásia. No Ocidente, sua introdução se deu a partir do século XVIII, em 1739, quando foram plantadas experimentalmente, na Europa, sementes recebidas pelo Jardim Botânico de Paris. No continente americano, o primeiro relato data de 1804. A primeira referência ao plantio experimental da soja no Brasil data de 1882, quando foi avaliado material introduzido na Bahia. Dez anos mais tarde, foram realizados os primeiros estudos em São Paulo e, em 1901, no Rio Grande do Sul. Sua exploração comercial aconteceu bem mais tarde, com as primeiras referências estatísticas oficiais reportadas em 1941 e 1945, sobre produções no Rio Grande do Sul e São Paulo, respectivamente.

processos de seleção e aumento da variabilidade genética. Tradicionalmente, o melhoramento da soja tem por base a manipulação genética por meio da hibridação sexual realizada artificialmente. As hibridações são feitas na forma de cruzamentos simples, duplos ou múltiplos e servem para recombinar a variabilidade genética intra-específica ou para aumentar essa variabilidade genética múltiplos e servem para cruzamentos interespecíficos, pela introgressão de genes em

A soja é uma planta autógama. Apresenta flores perfeitas e pequenas. Nos processos de hibridação são necessários alguns conhecimentos da morfofisiologia da planta e da flor, e habilidade manual para realizar com sucesso os cruzamentos.

Classificação Botânica

A soja é considerada uma espécie exótica no País. Probst e Judd (1973) realizaram ampla revisão sobre a origem e história da soja. Essa cultura tem como centro de origem a região leste da China, onde sofreu domesticação por volta do século XI a.C. A partir daí foi introduzida em outras regiões e países do Oriente, como Manchúria, Coréia, Japão, União Soviética e países do sudeste da Ásia. No Ocidente, sua introdução se deu a partir do século XVIII, em 1739, quando foram plantadas experimentalmente, na Europa, sementes recebidas pelo Jardim Botânico de Paris. No continente americano, o primeiro relato data de 1804. A primeira referência ao plantio experimental da soja no Brasil data de 1882, quando foi avaliado material introduzido na Bahia. Dez anos mais tarde, foram realizados os primeiros estudos em São Paulo e, em 1901, no Rio Grande do Sul. Sua exploração comercial aconteceu bem mais tarde, com as primeiras referências estatísticas oficiais reportadas em 1941 e 1945, sobre produções no Rio Grande do Sul e São Paulo, respectivamente.

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma leguminosa anual cultivada comercialmente em mais de 35 países, nas mais diversas condições edafoclimáticas. A soja cultivada pertence à família Leguminosae, subfamília Papilionoideae. O gênero *Glycine* Willd. inclui doze espécies perenes no subgênero *Glycine* e duas espécies anuais no subgênero *Soja* (SINGH et al., 1988). As espécies anuais, cultivada, *G. max*, e selvagem, *G. soja*, apresentam número diploide de 40 cromossomos e podem ser intercruzadas, produzindo plantas híbridas férteis. Há poucos trabalhos relacionados com cruzamentos intersubgenéricos de *G. max* com as demais espécies perenes do subgênero *Glycine*, mas, de modo geral, esses cruzamentos são inviáveis ou os híbridos obtidos são altamente estéreis.

Características da Planta

Algumas características da planta devem ser consideradas no processo de hibridação. O conhecimento dessas características da planta e da flor e do comportamento de cada genótipo em determinado ambiente é importante para a programação dos cruzamentos. É grande a variabilidade genética para características como ciclo vegetativo e reprodutivo, altura de planta etc., caracteres muito influenciados pelo ambiente.

Há grande diversidade de ciclo (número de dias contados desde a emergência das plântulas até a maturação) no germoplasma de soja: de 80 dias para as mais precoces a 200 dias para as mais tardias. De modo geral, as variedades brasileiras têm ciclo entre 100 e 160 dias e, para determinada região, podem ser classificadas em grupos de maturação precoce, semiprecoce, médio, semitardio e tardio. O ciclo total da planta pode ser dividido em duas fases: vegetativa e reprodutiva. A fase vegetativa é o período da emergência da plântula até a abertura das primeiras flores.

A fase reprodutiva compreende o período do início da floração até a maturação.

A estatura da planta é altamente dependente das condições ambientais e do genótipo da variedade. No Brasil, variedades comerciais normalmente apresentam altura média de 60 cm a 120 cm. Também o número de flores produzidas é maior do que o que a planta pode converter efetivamente em vagens. Van Schaik e Probst (1958) relatam que uma planta pode emitir até 800 flores, com uma taxa de fertilização de 13 a 57%, dependendo do genótipo e das condições ambientais. O período total de florescimento pode durar de três a mais de cinco semanas, dependendo do genótipo e do ambiente (HARDMAN, 1970).

O hábito de crescimento também interfere no porte da planta. Com relação a essa característica, a soja pode ser de crescimento indeterminado, semideterminado e determinado. Essa classificação é baseada no tipo de crescimento da haste principal no final do período de florescimento. Variedade de hábito de crescimento determinado caracteriza-se por apresentar plantas com caules terminados por racemos florais. Após o início do florescimento, as plantas crescem muito pouco em altura. Por outro lado, variedades de hábito de crescimento indeterminado não apresentam racemos terminais e continuam desenvolvendo nós e alongando o caule, de forma que crescem em altura significativamente até o final do florescimento. Os racemos axilares são menores em tamanho e em número de flores. Nos tipos semideterminados, à semelhança dos indeterminados, o florescimento tem início quando aproximadamente metade dos nós da haste principal já se formou, mas o florescimento e o desenvolvimento de novos nós terminam mais abruptamente do que nos tipos indeterminados.

Garner e Allard (1920) foram os primeiros a verificar a importância do comprimento do dia como um dos fatores ambientais a atuar no processo de indução floral da soja. Chamaram esse fenômeno de fotoperiodismo e classificaram a soja como espécie de dias curtos, isto é, induzida a florescer

quando o comprimento do dia é menor que determinado nível crítico, específico de cada genótipo. A soja floresce somente quando períodos mais curtos de luz estão associados a períodos mais longos de escuro. Porém, se o período de escuro for interrompido por breves intervalos de luz, a planta se comporta como se estivesse submetida a fotoperíodos longos, tendo sido demonstrado por Hamner e Bonner (1938) que o período de ausência de luz (escuro) era o fator indutor do florescimento. Portanto, a soja é uma espécie de noites longas, mas, por tradição, o termo fotoperiodismo foi mantido. O período entre a emergência e o florescimento pode ser dividido em, no mínimo, três fases distintas: pré-indutiva, indutiva e pós-indutiva. Na fase pré-indutiva a planta não é influenciada pelo fotoperíodo, sendo conhecida como período juvenil; na fase indutiva é afetada pelo fotoperíodo; e na pós-indutiva novamente deixa de ser influenciada pelo efeito fotoperiódico.

As variedades convencionais, na grande maioria, são altamente sensíveis a mudanças de latitudes ou datas de semeadura devido às respostas às variações no fotoperíodo (HARTWIG, 1973). Nas regiões tropicais ou nas semeaduras fora de época, fotoperíodos mais curtos durante a estação de crescimento da soja reduzem o período vegetativo (florescimento precoce) e causam reduções na produtividade e no porte das plantas. Material insensível ao fotoperíodo tem sido identificado (CRISWELL; HUME, 1972; SHANMUGASUNDARAM, 1981), porém esses genótipos são muito precoces para serem usados no desenvolvimento de cultivares para as condições brasileiras.

O uso de período juvenil longo foi a solução encontrada por alguns melhoristas de soja para retardar o florescimento em dias curtos (HARTWIG; KIIHL, 1979; KIIHL; ALMEIDA, 1985; HINSON, 1989). Durante a fase juvenil, a soja não floresce mesmo quando submetida a fotoperíodo indutivo, permitindo maior crescimento vegetativo. Vários genótipos com essa característica (inicialmente foram utilizados os genótipos Santa Maria,

PI 159925 e PI 240664) foram identificados e usados no desenvolvimento de variedades. Posteriormente, foram identificadas e selecionadas mutações naturais com período juvenil longo (SS-1, Paranagoiana, Doko-18, Savanão etc.), que ocorreram em várias variedades e estão sendo bem utilizadas como progenitores nos cruzamentos realizados no Centro Nacional de Pesquisa de Soja da Embrapa. Essas variedades só se tornam aptas a responder ao estímulo fotoperiódico depois de número de dias após a emergência maior, em relação às variedades de período juvenil curto.

O controle genético do florescimento em dias curtos é diferente do praticado em dias longos, que tem pouco valor na previsão do florescimento em dias curtos. O período juvenil longo é condicionado por genes recessivos que podem ser influenciados por outros eventos genéticos na planta (KIIHL; HARTWIG, 1979; HINSON, 1989; KIIHL; GARCIA, 1989).

Características da Flor

A soja é essencialmente uma espécie autógama, com flores perfeitas, e os órgãos masculinos e femininos ficam protegidos dentro da corola. Insetos, principalmente abelhas, podem transportar o pólen e realizar a polinização de flores de diferentes plantas, mas a taxa de fecundação cruzada, em geral, é menor que 1%. Ahrent e Caviness (1994) investigaram a taxa de alogamia em diversos genótipos de soja e concluíram que a taxa de fecundação cruzada pode atingir até 2,5%, em campo. Sedyama et al. (1985) reportam taxa de alogamia natural entre 0,09 e 1,3% para fileiras adjacentes de plantas. Vernetti (1983) também relata taxa de alogamia de 1% em condições normais de cultivo. A característica cleistogâmica da flor é a responsável pela baixa taxa de alogamia na espécie.

Uma descrição do desenvolvimento da flor e sua estrutura é apresentada por Carlson e Lersten (1987). As flores zigomórficas surgem em racemos axilares e terminais e são constituídas de cálice tubular e corola de cinco partes florais. O cálice é composto de cinco sépalas desiguais, normalmente pubescentes. A corola consta de cinco pétalas distintas. A pétala maior é denominada estandarte, as outras duas, lateralmente localizadas, são as asas, e as duas pétalas anteriores, denominadas quilhas, ou carenas, envolvem e protegem internamente os órgãos sexuais (Figura 1). As flores da soja podem apresentar coloração branca, púrpura diluída ou roxa. Essa característica é determinada por interações de diferentes locos gênicos, o principal deles com alelos W_1 , que, na forma heterozigota ou homozigota, condiciona a cor roxa; o genótipo homozigoto recessivo w_1w_1 apresenta flores brancas. Em razão do efeito pleiotrópico do loco W_1 , as plantas com flores roxas apresentam hipocótilo roxo e aquelas com flores brancas, hipocótilo verde.

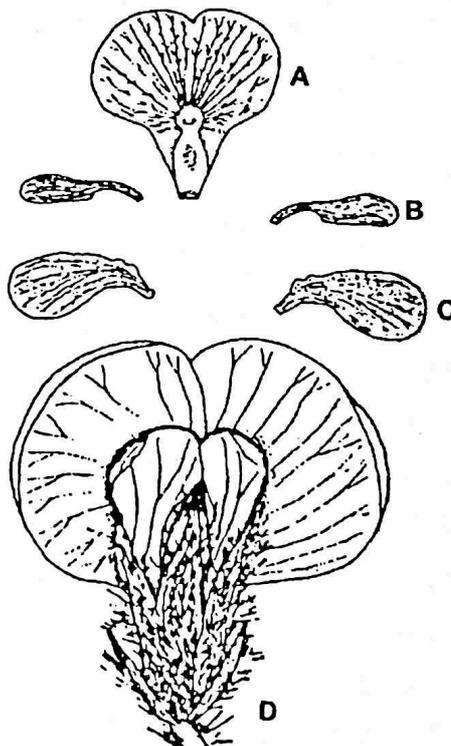


Figura 1 - Estrutura da flor da soja: (a) estandarte; (b) asa; (c) quilha ou carena; e (d) flor aberta.

O gineceu consta de um único ovário, também pubescente, que contém de um a quatro óvulos, com um estilo curvo, terminado em estigma bifido, globoso e coberto por papilas (Figura 2). Segundo Kuehl (1961), o órgão reprodutor feminino está receptível à polinização e fecundação um a dois dias antes da antese, permanecendo assim por mais dois dias.

O androceu é constituído de dez estames, nove dos quais fundidos (diadelfo), formando uma coroa abaixo do estigma (Figura 2). Cerca de 24 horas antes da antese, os filamentos iniciam um rápido processo de alongamento e elevam as anteras ao nível do estigma, envolvendo-o por completo. Na antese, as anteras se abrem e os grãos de pólen são espalhados diretamente sobre o estigma. Inicia-se então a germinação dos grãos de pólen e o crescimento dos tubos polínicos em direção aos óvulos, porém somente poucos os atingirão para fertilização.

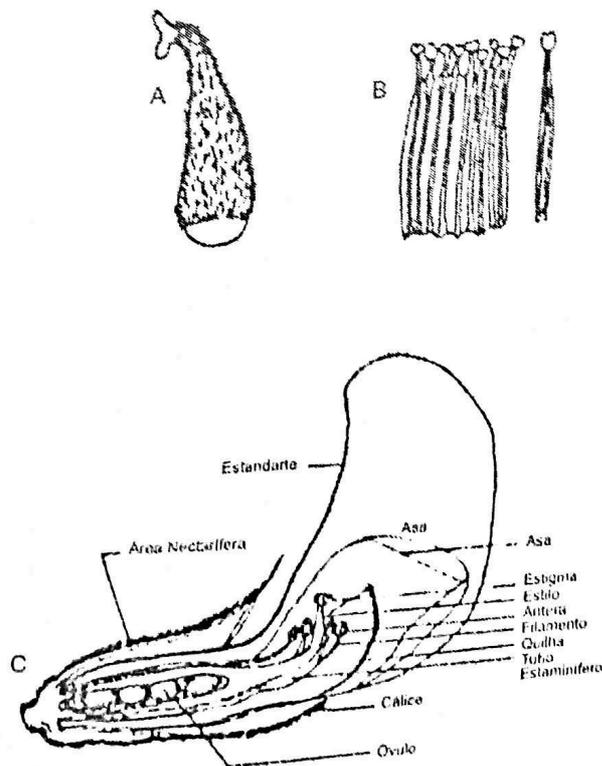


Figura 2 - Estrutura da flor da soja: (a) gineceu, (b) androceu e (c) seção longitudinal de uma flor.

Fatores que Afetam o Sucesso da Híbridação

A híbridação artificial de soja é relativamente simples, porém é dificultada pela reduzida dimensão da estrutura floral. Vários aspectos devem ser considerados para otimizar o pegamento dos cruzamentos e a produção de sementes híbridas. Dentre eles, os mais relevantes são citados a seguir.

Habilidade do Operador

Em razão das reduzidas dimensões das estruturas florais, o operador deve adquirir experiência e habilidade para obter níveis satisfatórios de sucesso na híbridação. As delicadas estruturas florais requerem habilidade e firmeza manual nos procedimentos de emasculação, polinização e etiquetagem das flores cruzadas. Em condições ideais, um operador cuidadoso e habilidoso pode obter taxa de sucesso (pegamento) superior a 90% dos cruzamentos realizados.

Ambiente

O processo de híbridação pode ser realizado em campo e, ou, em casa de vegetação. Em qualquer uma dessas situações, o grau de sucesso dos cruzamentos depende das condições edafoclimáticas durante todo o ciclo das plantas, principalmente durante as fases de florescimento e enchimento dos grãos.

As híbridações realizadas em campo são altamente dependentes do ambiente climático, representado por precipitação de chuva e temperatura. A escassez hídrica é considerada a principal causa do aborto de flores e vagens. As plantas podem murchar quando a evapotranspiração é

elevada, mesmo quando a umidade do solo está adequada. A relação entre evapotranspiração e aborto de flores e vagens pode explicar o cuidado da maioria dos melhoristas em não executar cruzamentos em temperatura elevada, ventos fortes e baixa umidade relativa do ar, que favorecem a ocorrência de máxima evapotranspiração. Irrigações suplementares no sulco são usadas para minimizar esse problema. O excesso hídrico e a consequente diminuição da aeração do solo podem resultar no aparecimento de doenças e na redução da atividade de fixação simbiótica. Plantas conduzidas com excesso hídrico apresentam-se cloróticas e pouco desenvolvidas. Bom nível nutricional do solo (fertilidade) pode ser conseguido com adubação equilibrada de macro e microelementos exigidos pela cultura, fornecidos com base na análise do solo.

Na casa de vegetação esses fatores limitantes podem ser mais bem controlados, aumentando o sucesso dos cruzamentos. Normalmente, as plantas são cultivadas em vasos com uma mistura de solo, areia e esterco curtido na proporção 1:1:1. Os nutrientes podem ser fornecidos por via de solução nutritiva ou por meio de fertilizantes químicos formulados para atender às exigências nutricionais da planta. Os vasos devem ser de tamanho suficiente para comportar de 5-10 l de solo. O número de plantas por vaso depende do tamanho dos vasos e do espaçamento entre eles. Em geral, é semeado maior número de sementes, deixando de uma a quatro plantas por vaso em cada desbaste.

O fornecimento de luz suplementar e o controle da temperatura são condições mais facilmente atingidas em ambiente de casa de vegetação, proporcionando melhores resultados de produção de sementes híbridas. Iluminação com luz branca fluorescente e incandescente, com intensidade de 21.000 lux é adequada para bons níveis de taxa fotossintética e controle da floração (TANNER; HUME, 1976). A temperatura diária ótima para o crescimento e reprodução da soja está entre 25 e 30 °C. A taxa

fotossintética decresce à medida que a temperatura declina para menos de 25°C. A temperatura afeta o crescimento e o início do florescimento. Baixas temperaturas retardam o florescimento e podem causar esterilidade, deixando as plantas com aspecto de macho-estéreis (THOMAS, 1989). Temperaturas superiores a 38 °C no início do desenvolvimento das plantas prejudicam seu desenvolvimento e contribuem significativamente para a queda de flores e vagens na fase reprodutiva. Para hibridação em casa de vegetação, a temperatura deve ser mantida entre 25 e 30 °C, para maior possibilidade de sucesso. Temperaturas abaixo de 25 °C reduzem a derriçagem de pólen, e acima de 30 °C estão associadas com o aborto de flores (HARTWIG, 1973).

Pragas e Doenças

Os progenitores dos blocos de cruzamento devem estar sempre livres de pragas e doenças para que não seja comprometida a produção de sementes híbridas.

A incidência de ácaros e pulgões é mais frequente em casa de vegetação, requerendo vistorias periódicas das plantas e pronto controle com inseticidas específicos. Esses artrópodes, por serem de tamanho minúsculo, atravessam as telas da casa de vegetação e são disseminados involuntariamente por pessoas que transitam entre as plantas e pelo fluxo de ar criado pelos ventiladores. A ocorrência de outras espécies de insetos é menos frequente, esporádica, mas exige também controle imediato. Desinfecção completa deve ser prática comum antes do plantio. A aplicação foliar de alguns tipos de inseticidas durante a fase do florescimento deve ser evitada, pois pode resultar, em alguns casos, no aumento da taxa de aborto de flores e vagens em desenvolvimento. De modo geral, a incidência de doenças foliares é mínima no ambiente protegido de casa de vegetação, mas as plantas podem ser

protegidas com pulverizações de fungicidas, especialmente para o controle do oídio e do míldio, que ocorrem mais frequentemente.

Várias espécies de inseto atacam as plantas dos blocos de cruzamento semeados no campo. Atenção especial deve ser dada à ocorrência e ao controle dos insetos sugadores de vagens (percevejos), praga que causa aborto de vagens e de sementes nas fases iniciais do desenvolvimento reprodutivo. Também, várias doenças afetam as plantas nessas condições, em qualquer fase de seu desenvolvimento. As mais importantes são as causadas por fungos do solo e da parte aérea. Pulverizações preventivas, com inseticidas e fungicidas de amplo espectro de ação, são recomendadas para minimizar esses problemas.

Sincronização de Florescimento dos Progenitores

Um dos fatores a serem considerados na realização dos cruzamentos é a sincronização de florescimento entre os genótipos parentais. As combinações híbridas envolvem, muitas vezes, parentais divergentes quanto à data de florescimento. O início da indução floral é altamente influenciado pelo ambiente, principalmente pela reação do genótipo ao fotoperíodo e à temperatura. Genótipos de ciclo precoce podem ter o florescimento iniciado 30 dias após a emergência das plântulas e os tardios até 100 dias em condições normais de semeadura.

Vários artifícios podem ser usados para permitir a coincidência das épocas de florescimento dos genótipos que serão usados no processo de hibridação. Semeadura dos blocos de cruzamento em várias épocas, complementação de luz para estender o fotoperíodo e enxertia são os procedimentos mais usados pelos melhoristas.

O estabelecimento de blocos de cruzamento em várias épocas de semeadura é o meio mais prático para garantir a coincidência de floração. Além disso, o plantio espaçado no tempo permite período mais longo de disponibilidade de flores, facilitando a realização de grande número de cruzamentos num espaço de tempo maior. Os blocos de cruzamento podem ser instalados no campo, em casa de vegetação ou em ambos simultaneamente. De modo geral, os blocos de cruzamento são instalados no intervalo de uma semana entre as semeaduras. Nos programas de melhoramento da soja da Embrapa, no Centro Nacional de Pesquisa de Soja, e da Universidade Federal de Viçosa, adota-se o procedimento de semear os blocos por quatro a seis semanas consecutivas. Cada genótipo é semeado em parcelas de uma a quatro fileiras de 3-5 m de comprimento. O espaçamento entre as fileiras é de 80 cm para facilitar o trânsito e a realização dos cruzamentos. Fehr (1980) sugere que o espaçamento entre fileiras seja de 65 a 100 cm e que a densidade de plantas seja estabelecida de acordo com a disponibilidade de água e com o número de sementes a ser obtido por planta.

A enxertia do tipo garfagem pode ser usada para antecipar o florescimento dos genótipos muito tardios. Uma estaca da variedade tardia enxertada em planta que já esteja florescendo iniciará o florescimento até 42 dias mais cedo que o esperado (KIIHL et al., 1977). As primeiras flores aparecem no enxerto 21 a 50 dias após a enxertia.

A extensão do fotoperíodo também pode ser usada para diminuir as diferenças de florescimento entre os genótipos de soja. Com luzes fluorescentes e incandescentes, a extensão de 10 a 20 dias a partir da emergência faz com que os genótipos precoces floresçam mais tarde e mais próximo dos de ciclo mais tardios. Nesse caso, não haverá necessidade de muitas épocas de semeadura de blocos de cruzamento para coincidência no florescimento, sendo suficientes duas ou três.

Hibridação

A hibridação da soja é feita manualmente. Usa-se uma pinça para emasculiar a flor que será polinizada (feminina) e depositar o pólen no seu estigma. A pinça deve ter extremidades finas, sem ranhuras na parte interna. É procedimento simples, porém requer habilidade no manuseio das pequenas e frágeis estruturas florais. O operador deve evitar, sempre que possível, qualquer dano à estrutura reprodutora feminina (ovário, estilete e estigma) durante a emasculação. A taxa de sucesso nos cruzamentos depende também do conhecimento da morfologia e fisiologia da flor para identificar os estádios mais adequados de desenvolvimento dos botões florais para emasculação e das flores fornecedoras de pólen. Um melhorista experiente obtém sucesso em cerca de 65 a 90% das hibridações. As principais causas do insucesso da hibridação são uso de botões florais muito imaturos, danos ao aparelho reprodutor feminino e polinização inadequada.

Características do Botão Floral Feminino

As flores a serem emasculadas deverão estar com os estigmas receptivos à polinização. Normalmente, o órgão reprodutor feminino se encontra receptível no estágio de botão floral, um a dois dias antes da abertura completa da flor. No entanto, para facilitar a emasculação, o estágio ideal do botão floral é aquele em que é visível a coloração das pétalas entre as sépalas e que a flor se abre na manhã do dia seguinte ao do cruzamento. De modo geral, em cada racemo há dois botões florais no estágio de desenvolvimento ideal para aproveitamento como flores femininas, como pode ser visto na Figura 3.

Figura 3 - Racemo floral com flores abertas e botões florais em diferentes fases de desenvolvimento.

Características da Flor Polinizadora

As flores aptas para fornecer pólen para o processo de polinização são as que se encontram no estágio de antese, completamente abertas e com o estandarte expandido (Figura 3). Nessa fase, as anteras liberam os grãos de pólen. Todavia, devem ser testadas quanto à liberação de pólen, haja vista que a derricação deste varia conforme o grau de abertura floral e conforme as variedades. Em algumas condições de ambiente, é possível coletar as flores durante todo o dia e usá-las imediatamente na polinização manual. Em alta umidade relativa, a liberação do pólen pode ocorrer somente após o meio-dia, quando a umidade relativa do ar é mais baixa. Nesses casos, as flores polinizadoras podem ser coletadas em envelopes ou placas de Petri e submetidas à desidratação por cerca de três a quatro horas, devendo ser usadas no mesmo dia da coleta. O pólen torna-se

viável cerca de 10 horas antes da antese e pode ser armazenado por um mês, sem perder a viabilidade se armazenado dessecado, em temperatura de 3 °C. A viabilidade do pólen no interior da flor é de aproximadamente 48 horas quando armazenado com temperatura de aproximadamente 5°C (KUEHL, 1961). Johnson e Bernard (1963) relatam que uma solução de 30% de sacarose e 120 ppm de ácido bórico pode ser usada para testar a viabilidade do pólen.

Emasculação

Quando possível, a escolha do genitor que servirá como mãe deve incidir sobre o que possui um carácter condicionado por gene recessivo (marcador), como flor branca, pubescência cinza, hilo marrom etc. Assim, as plantas híbridas F₁ serão facilmente diferenciadas das autofecundações.

Antes da emasculação, é necessário eliminar todas as flores abertas e os botões florais menos desenvolvidos de cada racemo (Figura 3). Essa operação é feita com o auxílio de uma pinça, deixando somente os mais aptos ao cruzamento. O operador deve ter o cuidado de se certificar da eliminação de todos os botões imaturos, mesmo os de tamanho reduzido.

O botão floral selecionado deve ser firmado com o polegar e o indicador, porém sem muita pressão. Em seguida, prende-se cada sépala com a pinça, removendo-a por meio de movimentos para os lados e para baixo. O procedimento deve ser repetido com todas as sépalas. Na Figura 4 pode ser visto o modo de conter a flor e remover as sépalas.

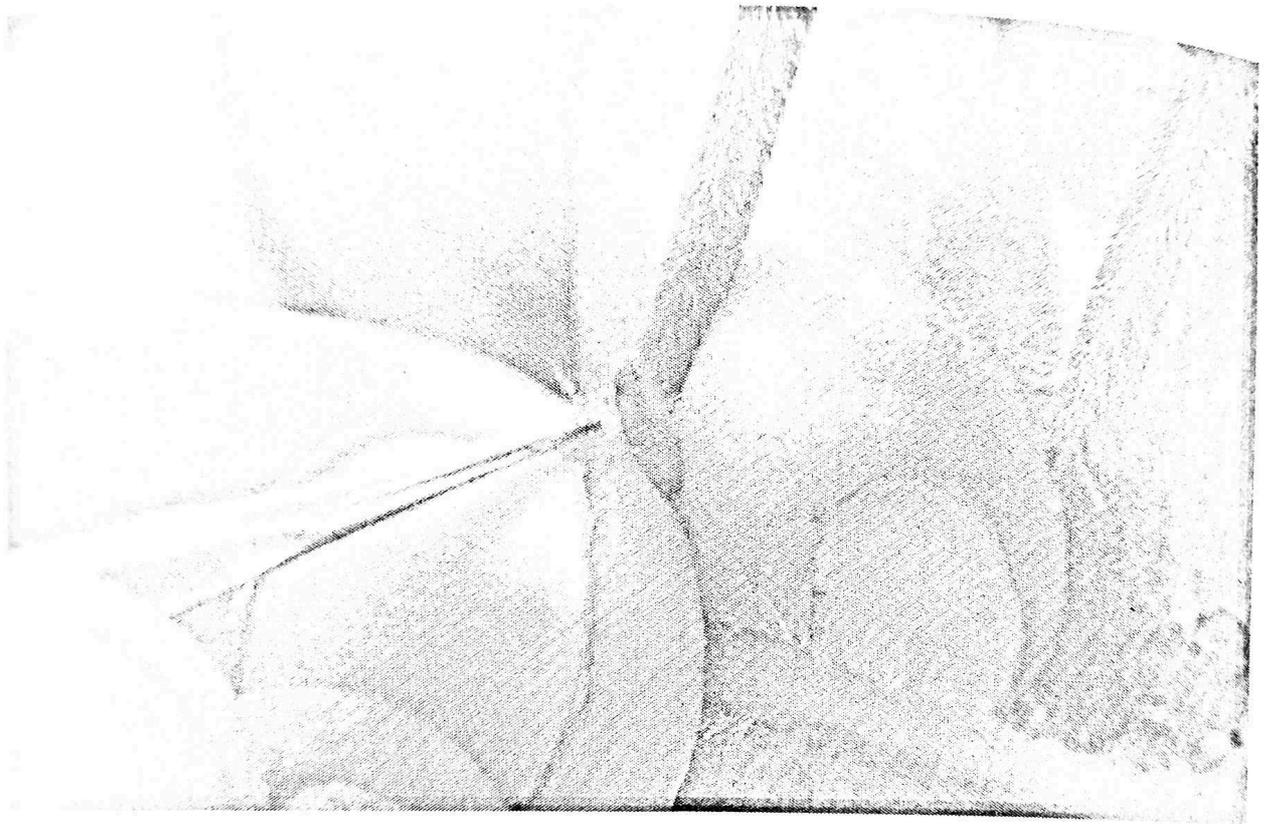
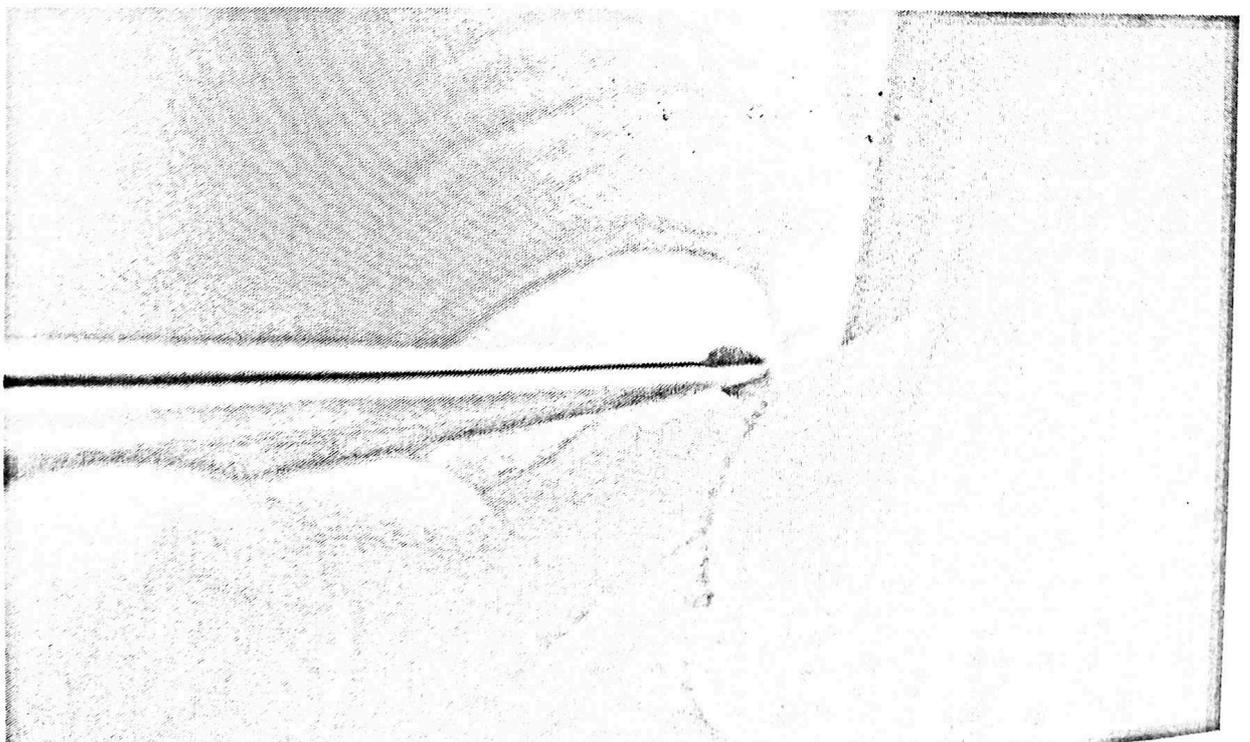


Figura 4 - Botão de flor no estado ideal para emasculação, vendo-se a remoção das sépalas.

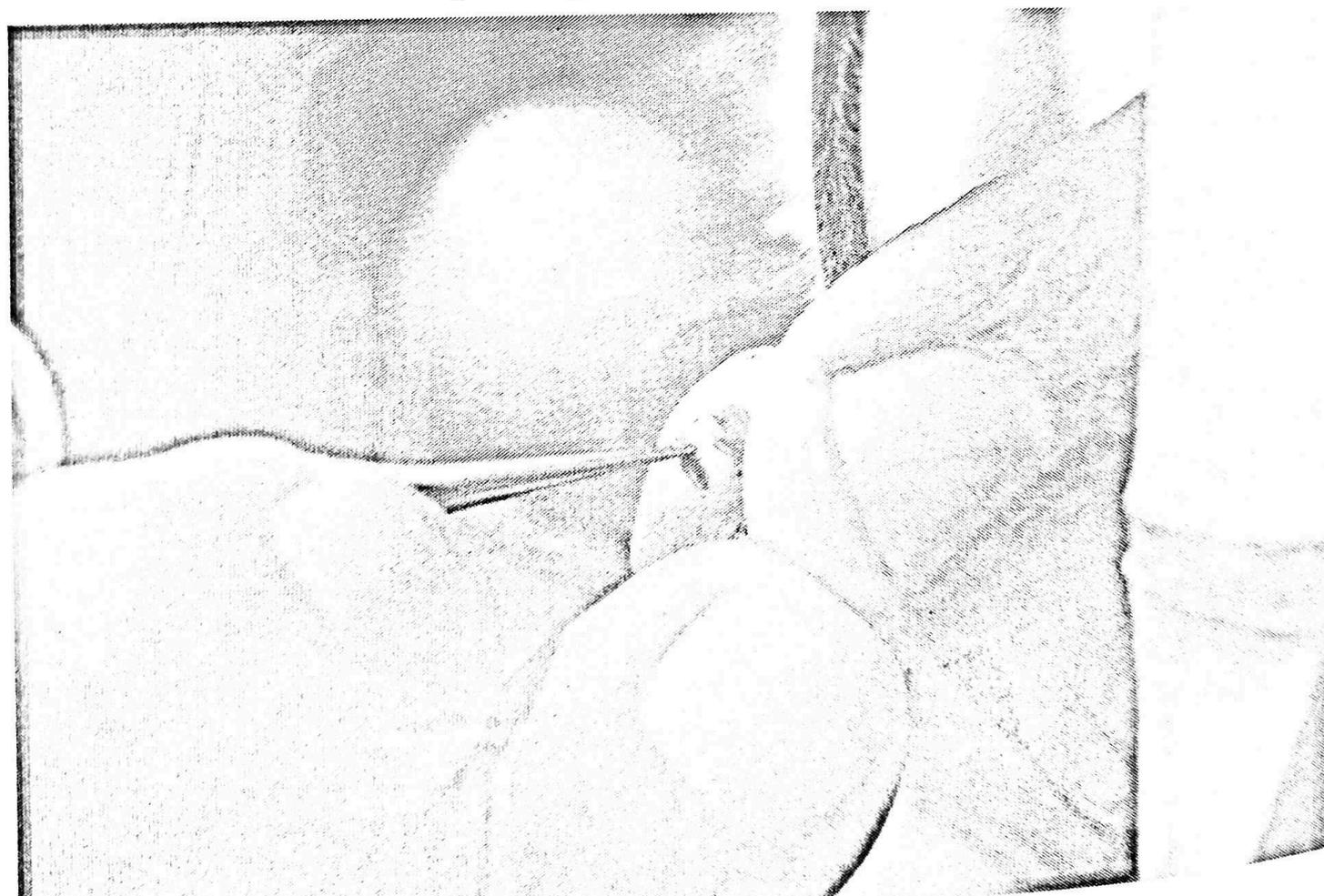


A corola, que fica então completamente exposta, é presa com uma pinça e removida por movimentos para os lados e para cima, como se vê na Figura 5. O posicionamento correto da pinça na corola permite a remoção de todas as pétalas e estames em uma única operação, sem causar dano ao estigma. Anteras remanescentes poderão ser removidas com a ponta da pinça. Porém, a remoção não é obrigatória, uma vez que o estigma já se encontra receptivo e elas ainda não estão prontas para liberar os grãos de pólen (WALKER et al., 1979).

Polinização

Terminado o processo de emasculação, o estigma fica exposto e pronto para a polinização. Essa operação manual consiste na remoção dos estames da flor masculina e deposição do pólen no estigma da flor emasculada. Os estames podem ser removidos com pinça fechada, introduzida na parte posterior da flor para separar as duas quilhas. Esse processo pode ser visto na Figura 6. Os estames expostos são removidos juntamente com o pistilo e pincelados delicadamente sobre o estigma da flor emasculada, depositando o pólen sobre ele (Figura 7). É sempre recomendável examinar periodicamente se está havendo liberação normal de pólen nas anteras. Para comprovação, muitos melhoristas tocam as anteras com a ponta de um lápis preto ou mesmo com a unha do polegar. Logo em seguida à deposição do pólen no estigma receptivo, inicia-se o processo de germinação, e a fecundação ocorre dentro de 12 horas. Dessa forma, não se faz necessária a proteção do botão floral polinizado.

Figura 6 - Botão floral após a emasculação e remoção das anteras para polinização.



Identificação do Cruzamento

Os racemos com botões florais polinizados devem ser identificados com etiquetas, nas quais serão registrados os números correspondentes aos cruzamentos realizados. As etiquetas são fixadas no próprio racemo ou no entrenó correspondente ao racemo trabalhado (Figura 8). Essas etiquetas são de tamanho reduzido, por isso é necessário anotar em caderneta apropriada as demais informações (progenitores envolvidos, datas, dados etc.) correspondentes a cada combinação híbrida.

Duas a três semanas após a polinização, examinam-se os cruzamentos e removem-se todas as vagens, flores e botões florais que não tenham sido artificialmente cruzados. As vagens resultantes da hibridação artificial podem ser identificadas pela ausência das sépalas no cálice.

Horário para a Polinização Artificial

As condições de ambiente determinam o melhor período do dia para realizar a coleta do pólen e o cruzamento. De modo geral, as flores que fornecerão o pólen são coletadas pela manhã e acondicionadas no dessecador, sendo o processo de polinização realizado no período da tarde. Dependendo do local, é possível realizar a hibridação, com sucesso, em qualquer hora do dia. O horário ideal para a polinização varia conforme as diferentes regiões e épocas do ano, dependendo da temperatura e da umidade relativa do ar local. Por exemplo, durante o mês de janeiro, em Viçosa, MG, as flores polinizadoras iniciam a liberação do pólen às oito horas da manhã, quando a temperatura já é relativamente alta. Em alta umidade relativa, a derriçagem é iniciada após as oito horas, quando o orvalho já se dissipou completamente. Em Londrina, PR, os blocos de cruzamento instalados na casa de vegetação são semeados no inverno e no verão, de agosto a fevereiro. Nas semeaduras realizadas de agosto a setembro, as flores polinizadoras são coletadas entre oito e nove horas, e armazenadas em desumidificadores com sílica-gel. Os cruzamentos são realizados após as 15 horas. O mesmo procedimento é adotado para as semeaduras de dezembro a fevereiro, sendo frequentemente possível coletar pólen viável durante cruzamentos realizados no período da tarde.

Referências

- AHRENT, D.K.; CAVINESS, C.E. Natural cross-pollination of twelve soybean cultivars in Arkansas. *Crop Science*, v. 34, p. 376-378, 1994.
- CARLSON, J.B.; LERSTEN, N.R. Reproductive morphology. In: WILCOX, J.R. (Ed.). *Soybeans: Improvement, production, and uses*. Madison, WI: ASA 1987. p. 95-134. (Agronomy Monograph, 16).