

Hibridação em Feijão

Luiz Alexandre Peternelli¹

Aluizio Borém²

José Eustáquio S. Carneiro³

Com o objetivo de aumentar a variabilidade nas populações de plantas autógamas ou simplesmente combinar fenótipos favoráveis de dois ou mais indivíduos, ou outros estudos genéticos, pode-se realizar a hibridação artificial de genitores devidamente selecionados (ALLARD, 1971). Com a segregação subsequente, a possibilidade de encontrar indivíduos geneticamente superiores depende da criteriosa avaliação das populações.

O método utilizado para a execução da hibridação, qualquer que seja, não assegura o sucesso total. Contudo, pode-se aumentar o percentual de sucesso dos cruzamentos a partir do momento em que o melhorista se preocupa com a maneira pela qual eles são efetuados. Este capítulo foi elaborado justamente com o objetivo de fornecer informações

¹ Eng.-Agrônomo, M.S., Ph.D. Professor do Departamento de Informática da Universidade Federal de Viçosa. 36570-000 Viçosa, MG, Brasil. E-mail: petrnelli@ufv.br

² Eng.-Agrônomo, M.S., Ph.D., Professor do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa. 36570-000 Viçosa, MG, Brasil. E-mail: borem@ufv.br.

³ Eng.-Agrônomo, M.S., D.S., Professor do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa. 36570-000 Viçosa, MG, Brasil. E-mail: jesc@ufv.br

sobre os métodos de hibridação e os cuidados e condições que devem ser observados na realização dos cruzamentos artificiais de feijão.

Classificação Botânica

Extensa revisão, além de inúmeros comentários a respeito da classificação botânica do feijoeiro-comum, é apresentada por Debouck (1991). O gênero *Phaseolus* pertence à família Leguminosae, subfamília Papilionoideae, tribo Phaseoleae, subtribo Phaseolineae (ADAMS et al., 1985) e é representado por várias espécies, das quais, segundo Debouck (1991), cinco são cultivadas: *P. vulgaris* L., *P. coccineus* L., *P. lunatus* L., *P. acutifolius* A. Gray var. *latifolius* Freeman e *P. polyanthus* Greenman. Atenção especial será dada à espécie *P. vulgaris* L., feijão-comum, amplamente cultivado no Brasil.

Cruzamentos dentro do gênero *Phaseolus*

Assim como as demais espécies citadas anteriormente, *P. vulgaris* é diploide, apresenta 11 pares de cromossomos ($2n=2x=22$) (HUCL; SCOLES, 1985; NORMAN et al., 1995). Essas cinco e outras espécies do gênero *Phaseolus* fazem parte do mesmo reservatório genético e podem potencialmente ser consideradas fontes de características importantes para o melhoramento. Cruzamentos de *P. vulgaris* com *P. coccineus*, *P. lunatus* e *P. polyanthus* podem ser feitos com sucesso, ao passo que há mais dificuldade com *P. acutifolius* (DEBOUCK, 1991). Nesse caso, técnicas de cultivo de embriões são necessárias.

Hibridação dentro da espécie *Phaseolus vulgaris* L. é obtida com relativa facilidade e, geralmente, resulta em híbridos normais e férteis. Entretanto, Singh e Gutiérrez (1984), além de outros pesquisadores, como Peternelli (1989, dados não publicados), Vieira et al. (1989) e Genchev (1996), relatam casos em que determinados cruzamentos produziram híbridos anormais, chamados anões. Essas plantas F₁ anormais são caracterizadas pelo crescimento reduzido, clorose foliar, atrofiamento do sistema radical e esterilidade, acarretando, quase sempre, morte prematura das plântulas.

De acordo com Shii et al. (1980), essa incompatibilidade ou fraqueza do híbrido F₁ se deve à ação de dois genes dominantes complementares denominados DL₁ e DL₂. O gene DL₁ normalmente está presente em cultivares de sementes pequenas, como Rio Tibagi e Carioca, e o gene DL₂ em cultivares de sementes grandes ou médias, como Preto 60 Dias e Diacol Andino (SINGH; GUTIÉRREZ, 1984; VIEIRA et al., 1989). Portanto, apenas as plantas F₁ de constituição DL₁-DL₂- são anormais. Cultivares de genótipo dl₁dl₁dl₂dl₂, como Milionário 1732 e Rio Vermelho, sempre produzem híbridos F₁ normais nos cruzamentos de que participam. Percebe-se, assim, que a combinação de fenótipos favoráveis de cultivares geneticamente incompatíveis em cruzamentos pode ser obtida utilizando, como ponte, cultivares de constituição dl₁dl₁dl₂dl₂.

Taxa de Alogamia

Devido à estrutura de sua flor, o feijoeiro é uma espécie que se multiplica predominantemente por autofecundação. Os estames e o estigma estão bem protegidos pelas pétalas, de modo que, por ocasião da abertura da flor, os grãos de pólen caem diretamente sobre o estigma. Mesmo assim, os insetos podem

ocasionar pequena taxa de fecundação cruzada. Estudos realizados, no Brasil, com o plantio de cultivares de feijão em fileiras alternadas permitiram concluir que a taxa de cruzamentos naturais, avaliada pela porcentagem de fecundação cruzada, variou de 0,18 a 6,0% (VIEIRA, 1960; POMPEU, 1963; JUNQUEIRA NETTO; LASMAR FILHO, 1971; PACOVA; ROCHA, 1975).

Em Pelotas, RS, Brasil, Antunes et al. (1973), citados por Vieira (1978), obtiveram valores bem mais elevados, adotando a técnica de cercar uma planta com plantas de outro cultivar. No espaçamento de 0,2 x 0,2 m, o cultivar cercado rendeu 10,57% de híbridos; no espaçamento de 0,8 x 0,8 m, 6,2%.

Além da distância entre plantas, a porcentagem de fecundação cruzada depende das condições do meio, as quais, por sua vez, influenciam a população e a atividade dos insetos capazes de polinizar o feijoeiro. A taxa de fecundação cruzada depende também dos cultivares utilizados, isto é, do tipo de suas flores e da maior ou menor coincidência dos períodos de floração.

Ibarra-Perez et al. (1997) apresentam ampla revisão da taxa de alogamia em feijoeiro-comum em vários países, como Brasil e Chile (de 0 a 6%), México (de 1,2 a 3,7%) e Porto Rico (de 0,2 a 39%). Comentam que essa grande variação decorre da diferença entre os cultivares, da técnica utilizada pelos pesquisadores na estimativa da taxa de fecundação cruzada e do ambiente em que os experimentos foram conduzidos.

Confome os padrões estabelecidos pela Comissão de Sementes e Mudas (CSM-MG) para a produção de sementes básicas e certificação no Estado de Minas Gerais, o isolamento mínimo exigido entre campos de produção de sementes de diferentes cultivares é de 3 m. Estudos realizados por Ferreira et al. (2007) sobre fluxo gênico em feijão-comum, estimado pela taxa de fecundação cruzada entre dois cultivares de feijão mesoamericanos, fornecem

importantes subsídios para a CSM-MG sobre a questão do isolamento mínimo para campos de sementes. Nesse trabalho, o cultivar fonte de pólen (Diamante Negro), de flor violeta, foi semeado no centro e, ao seu redor, foi semeado, em quadrados concêntricos, o cultivar receptor de pólen (Talismã), de flor branca. A maior frequência de híbridos naturais ocorreu a 0,5 e 1,0 m da fonte (0,136% e 0,11%, respectivamente). Essa frequência foi reduzida a praticamente 0% a 3,25 m da fonte.

Características da Flor

O ciclo vegetativo da maioria dos cultivares no Brasil é de aproximadamente três meses (80 a 100 dias), dependendo da época de plantio. Entretanto, há cultivares extremamente precoces, que completam o ciclo no lapso de 65 a 70 dias apenas, sendo, por isso, denominados de precoces ou "feijões de sessenta dias". Os extremos de ciclo vegetativo registrados são 61 e 280 dias.

O surgimento das flores tem início, em geral, até 45 dias depois da emergência das plântulas, dependendo da maior ou menor precocidade do cultivar, e o período de floração varia de 12 a 20 dias, aproximadamente (VIEIRA, 1978).

A inflorescência do feijoeiro, denominada de racemo, é composta de várias flores perfeitas, típicas das leguminosas. Cada flor apresenta: cálice coberto por bractéolas grandes, persistentes; corola composta de cinco pétalas brancas, rosadas ou violáceas, sendo a maior o estandarte, as duas menores as asas e as duas últimas, fundidas, a quilha, que envolve completamente os órgãos reprodutores masculino (androceu) e feminino (gineceu). O androceu é constituído por dez estames, sendo nove unidos e um livre (diadelfo). O gineceu é formado por um ovário, estreito e alongado, que contém, usualmente, de cinco a dez

óvulos, e por um estilete, terminado em um estigma recurvado, provido de pelos (VIEIRA, 1978). Na Figura 1 são ilustradas as partes florais do feijoeiro.

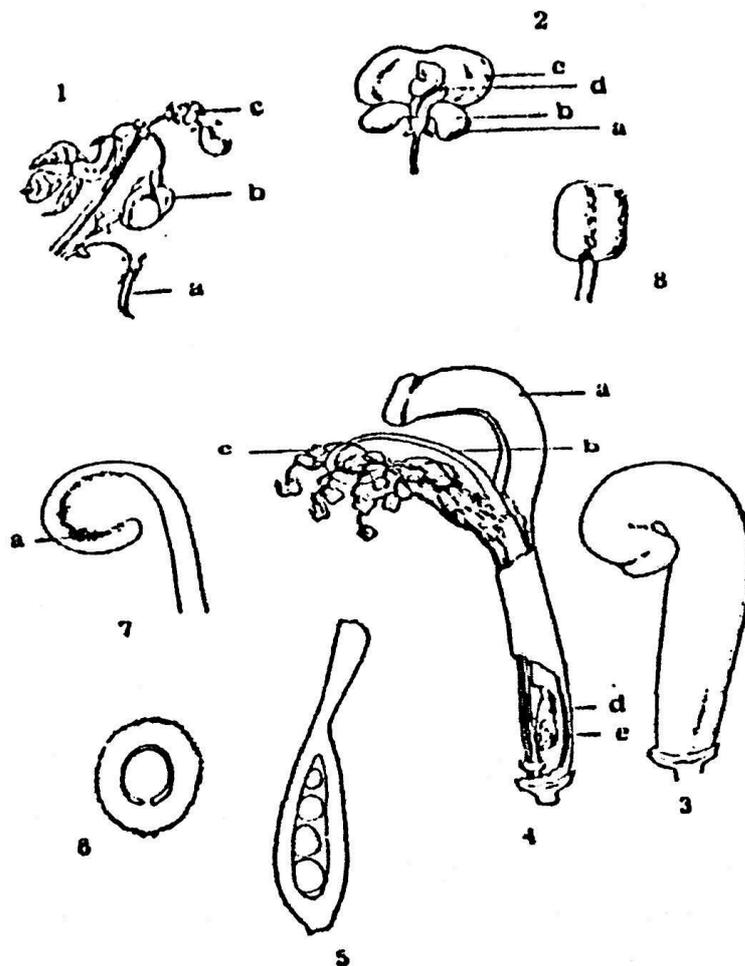


Figura 1 - Estrutura da flor do feijoeiro: (1) inflorescência com vagem nova (a) e flores em diferentes estádios de desenvolvimento (b,c); (2) flor completamente aberta (vista frontal), vendo-se o cálice (a), a asa (b), o estandarte (c) e a quilha (d); (3) quilha fechada; (4) dissecação da quilha, vendo-se fragmento da quilha (a), estilete (b), antera (c), ovário (d) e óvulo (e); (5) e (6) corte longitudinal e transversal do ovário; (7) estigma pubescente; e (8) antera.

Fonte: VIEIRA (1978).

A sequência do florescimento depende do hábito de crescimento da planta. Nas de hábito de crescimento determinado, as gemas apicais da haste principal e dos ramos diferenciam-se, quase simultaneamente, em inflorescências ao entrarem na fase reprodutiva, fazendo com que a planta cesse seu crescimento. Os racemos surgem nas extremidades da haste principal e dos ramos, e também nas axilas das folhas. O aparecimento das flores dá-se do ápice para a base da planta. O período de floração é curto e a maturação uniforme (PORTES, 1996).

Nas plantas de hábito de crescimento indeterminado, os racemos são formados somente nas axilas foliares. Portanto, as plantas continuam crescendo e produzindo flores por um período mais longo em relação às de hábito de crescimento determinado. O aparecimento das flores dá-se da base para o ápice da planta (PORTES, 1996).

A deiscência de pólen e a autopolinização ocorrem quando o botão floral está prestes a abrir, usualmente na noite anterior à abertura da flor, começando o tubo polínico a crescer quase imediatamente (WILLIAMS, 1962, citado por BLISS, 1980). Arndt e Gepts (1991) comentam que a porcentagem de germinação dos grãos de pólen pode cair drasticamente se as plantas sofrerem falta de água ou se forem submetidas a altas temperaturas. Relatam ainda que, em boas condições, a porcentagem de germinação dos grãos de pólen fica em torno de 70%, independentemente da localização da inflorescência na planta ou da posição da flor na inflorescência.

As flores, em geral, abrem-se de manhã, provavelmente em resposta à luz e à temperatura. Acredita-se que a deiscência das anteras dependa, primeiramente, da sua maturação e, depois, da diminuição da umidade relativa.

A superfície do estigma é coberta por um líquido açucarado, secretado pelas células epidérmicas. Os stames seguem a espiral do estilete, de forma que as anteras ficam encostadas no estigma. O pólen cai diretamente sobre a superfície estigmática, antes da abertura da flor ou durante essa fase, resultando na autopolinização (IBRAHIM; COYNE, 1975; WEBSTER et al., 1977; VIEIRA, 1978; citados por BLISS, 1980).

Métodos de Hibridação

Antes de fazer referência aos métodos de hibridação, alguns aspectos gerais diretamente relacionados com a eficiência dos cruzamentos artificiais devem ser comentados.

O estigma fica receptivo cerca de dois dias antes e um dia depois da antese normal (BLISS, 1980). Botões que estão encorpados, sem nenhum sinal de ruptura, com a cor do estandarte já aproximando da coloração normal da flor quando aberta, devem ser escolhidos para o trabalho. Antes de efetuar a hibridação no botão floral que está sendo trabalhado, deve-se observar se a autopolinização já ocorreu. Nesse caso, o estigma fica distendido, verde-claro em vez de branco, seco em vez de pegajoso e com um pouco de pólen aderido. Caso seja detectada a autopolinização, elimina-se o botão floral e procura-se outro que esteja em boas condições.

Importante pré-requisito para o sucesso da hibridação é evitar danos aos estigmas e estiletos das flores emasculadas e seu ressecamento após a polinização.

Os equipamentos básicos recomendados para a realização das hibridações são: uma pinça de ponta fina (dependendo da preferência do operador, pode ser curva ou reta), etiquetas de papel ou fios de lã de várias cores, lápis e um recipiente para o transporte desse material. Para o caso de cruzamentos realizados no campo, também é necessário um assento simples de madeira, para maior

conforto do operador. Bliss (1980) relata ainda que são necessários também um frasco de álcool para a limpeza da pinça, papel-celofane para envolver o botão, mantendo a umidade relativa local mais estável, além de uma pequena lente de aumento, conforme preferência do operador.

Normalmente, os cruzamentos são identificados por meio de pequenas etiquetas de papel (tipo joia), colocadas no pedicelo de cada botão floral trabalhado. As etiquetas devem ser resistentes e de tamanho suficiente para anotação do nome ou número dos genitores envolvidos. Outras informações, como data, hora e iniciais do nome do indivíduo que efetua a hibridação, normalmente chamado de operador, também podem ser anotados dependendo da finalidade do trabalho.

O uso da etiqueta na identificação dos cruzamentos, embora comum, faz com que a operação seja mais demorada. Como alternativa, podem-se utilizar fios de lã de diferentes cores, para a identificação de um genitor masculino. Nesse caso, quando o operador colhe uma flor em determinado genitor masculino, ele leva junto um fio de lã correspondente para ser colocado no pedicelo do botão floral polinizado do genitor feminino.

Para ter certeza dos cruzamentos, plantas com um ou mais caracteres recessivos deveriam ser usadas como genitores femininos, ao passo que o genitor masculino teria os alelos dominantes para os caracteres. Dentre os genes marcadores mais utilizados, podem ser citados: cor da semente (preta, dominante), cor do hipocótilo (roxa, dominante), hábito de crescimento (indeterminado, dominante) e cor da flor (roxa, dominante) (SINGH, 1991).

Para o caso de não ser possível usar esses tipos de genes marcadores, podem-se utilizar as técnicas dos marcadores moleculares na identificação dos híbridos (ALZATE-MARIN et al., 1996).

Os métodos para a realização dos cruzamentos de feijão e os principais cuidados para maior chance de êxito nas hibridações foram descritos em várias oportunidades (MISHAND, 1956; VIEIRA, 1967; ANTUNES, TEIXEIRA; MMERMANN, 1980; RAMALHO; SANTOS; MMERMANN, 1993). O feijão é uma espécie autógama, protógina e cleistógama, portanto sua flor apresenta as estruturas reprodutivas masculinas e femininas muito próximas e envoltas pela quilha. Essa característica garante a autogamia do feijão, pois, quando o botão floral se abre, a autopolinização já ocorreu.

Assim os métodos utilizados para a realização dos cruzamentos no feijoeiro devem necessariamente envolver algum mecanismo que impeça que as anteras permaneçam em contato com o estigma por ocasião da autopolinização, ou seja, no estágio final do botão floral até a abertura da flor. Isso é conseguido de dois modos: eliminando as anteras do botão floral a ser trabalhado ou pressionando as asas do nodo a expor o estigma para fora da quilha, isolando-o do contato com as anteras. Esses procedimentos deram origem a dois métodos básicos de hibridação em feijão: com emasculação e sem emasculação do botão floral.

Antes de explicar o procedimento de cada método, convém salientar a forma correta de segurar o botão floral e a pinça. O botão deve ser cuidadosamente retido pelo polegar e o indicador de uma das mãos. A pinça deve ser manejada com a outra mão, apoiando o dedo mínimo e o anular na mão que está segurando o botão. Após abrir o botão, é recomendável segurar a pinça obliquamente, com a ponta para cima, para reduzir os riscos de danificar o pistilo.

A forma correta de segurar a pinça influencia sobremaneira o sucesso do cruzamento, e o operador, à medida que for praticando, poderá decidir a maneira mais confortável e eficiente de realizar as hibridações. Não há regras rígidas, mas o bom senso e a observação

inteligente, além, é lógico, de algum conhecimento teórico sobre o assunto certamente são fundamentais.

Descrição dos Métodos

Com Emasculação do Botão Floral (BUISHAND, 1956; VIEIRA, 1967)

Utilizando-se uma pinça de ponta fina, abre-se o estandarte, partindo da base da linha de sutura em direção ao ápice. Aberto o estandarte, dobra-se um de seus lados (o direito, em relação ao operador) de modo a expor completamente a asa que cobre a espiral da quilha. O estandarte dobrado é mantido nessa posição pelo dedo polegar. Com a pinça, removem-se a asa do lado direito e a parte visível da asa do lado esquerdo, pondo à mostra a quilha enrolada.

A operação seguinte consiste na remoção da quilha, até que as anteras fiquem livres desse envoltório. Com a pinça, toma-se uma porção da base da quilha, puxa-se cuidadosamente para cima, procurando, dessa maneira, arrancar-lhe uma pequena faixa que atinja todo o seu comprimento. Isso deve ser feito sempre acompanhando a curvatura da quilha. Assim, começando pela eliminação de pequenas faixas, vai-se arrancando toda a quilha, sempre tomando cuidado para não danificar o estilete ou o estigma. Tão logo a quilha tenha sido removida, os estames, agora bem visíveis, podem ser retirados e o estigma polinizado.

Para o fornecimento de pólen, flores recém-abertas do genitor masculino, de coloração intensa, são colhidas previamente. Flores nesse ponto estão polinizadas e apresentam estigma coberto de grãos de pólen viáveis. Assim, pressionam-se para baixo as asas da flor, forçando a saída do estigma carregado de pólen. O estigma é arrancado e esfregado no estigma do botão emasculado, transmitindo-

lhe, dessa forma, o pólen (Figura 2). Pode-se também deixar os dois estigmas entrelaçados (enganchados).

Terminada a operação, procura-se recompor a flor polinizada do melhor modo possível, cobrindo o estigma com as pétalas remanescentes. Outros botões, flores e vagens da inflorescência devem ser eliminados para evitar competição e confusão por ocasião da colheita das sementes híbridas.

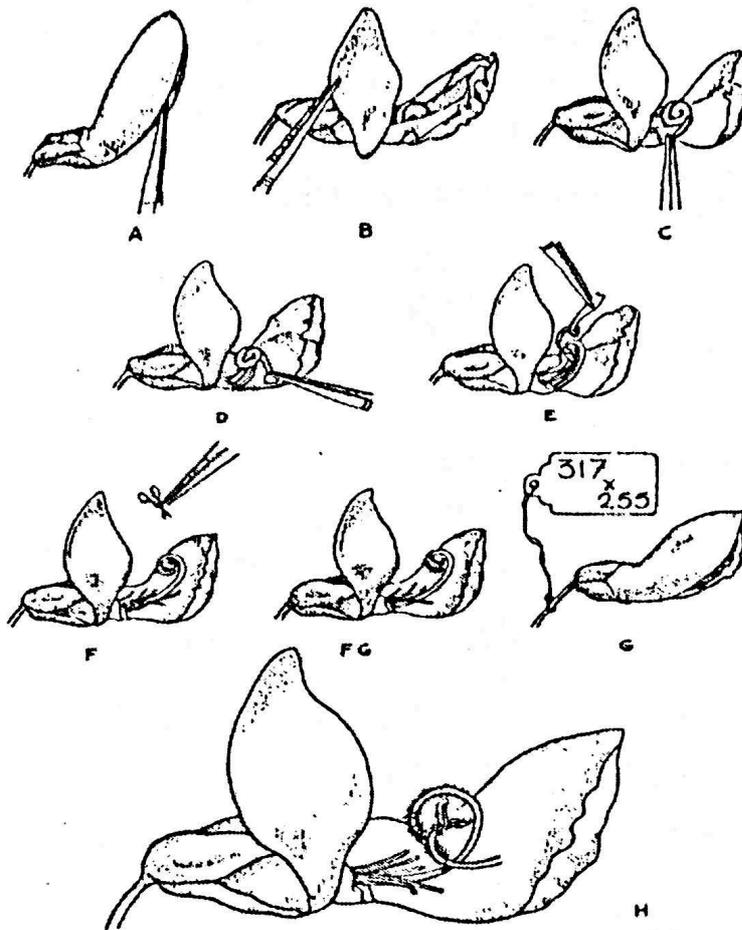


Figura 2 - Método de hibridação com emasculação: (A) o estandarte é aberto e (B) virado para trás; após a remoção das asas (C), inicia-se a remoção da quilha, cuidadosamente (D e E); (F) os estames são removidos; (FG) o estigma do genitor masculino é esfregado no estigma do genitor feminino; (H) o estigma do genitor masculino é entrelaçado no estigma do genitor feminino e (G) o botão é fechado e identificado.

Sem a emaculação do botão floral (BUISHAND, 1956; ANTUNES et al., 1980)

Este método consiste em abrir o botão floral, que será utilizado como genitor feminino, da mesma forma exposta no método com emasculação. Feito isso, prendem-se, com a ponta da pinça, as extremidades das duas asas e pressionam-se para baixo, de modo que o estigma ainda não polinizado se projete para fora da quilha, enquanto os estames permanecem isolados dentro dela. A polinização é realizada esfregando o estigma da flor aberta do genitor masculino no estigma do botão floral que está sendo trabalhado (Figura 3).

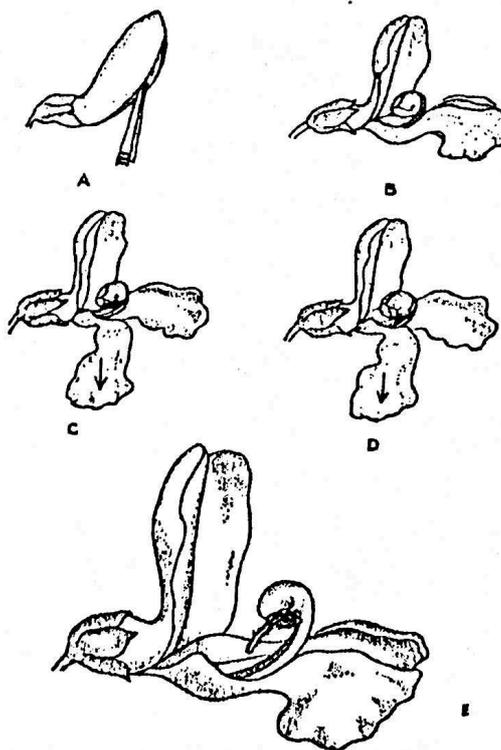


Figura 3 - Método de hibridação sem emasculação: (A) o estandarte é aberto; (B) o estandarte é virado para trás; (C e D) pressionando as asas para baixo, o estigma da flor feminina, ainda não polinizado, emerge da quilha; (E) o estigma do genitor masculino impregnado de pólen é esfregado e enganchado no estigma do genitor feminino de modo a formar um grampo.

Fonte: Adaptado de Buishand (1956).

Com esse procedimento, a dificuldade da emasculação pode ser evitada, especialmente em cultivares com flores muito pequenas. É possível, no entanto, que o estigma exposto se retraia para dentro da quilha. Dessa forma, pode acontecer de a flor ser polinizada pelo próprio pólen se, porventura, estiver viável (maduro). Para evitar esse problema, recomenda-se, além de esfregar, enganchar o estigma da planta polinizadora no estigma exposto do botão floral da planta-mãe, formando um grampo (Figura 3. E).

Algumas Considerações sobre os Métodos Citados

No método tradicional, realiza-se a emasculação, que consiste em abrir o botão, retirar as asas e a quilha e eliminar as anteras (VIEIRA, 1967). Este procedimento, além de muito trabalhoso, muitas vezes danifica o botão floral e o pegamento fica altamente dependente da habilidade do operador. O procedimento alternativo (sem emasculação) consiste em expor o estigma pressionando delicadamente as asas para baixo, de modo que ele fique para fora da quilha, impedindo o seu contato com as anteras por ocasião da autopolinização. Independente do método utilizado, a polinização é executada esfregando-se o estigma de uma flor aberta do genitor masculino no estigma da planta-mãe ou, o que é mais conveniente, enganchar o estigma da planta polinizadora no estigma do botão floral da planta-mãe.

Os resultados obtidos quanto à taxa de pegamento de cruzamentos é extremamente variável e dependente de uma série de fatores (WADE, 1943; BUIHAND, 1956; ANTUNES; TEIXEIRA; ZIMMERMANN, 1980). De modo geral, consegue-se de 30 a 50% de sucesso em polinizações realizadas em casas teladas, podendo chegar a valores bem superiores quando se tem um controle melhor da umidade e da temperatura, como acontece em certos tipos de casa de

vegetação. Além disso, esse sucesso é altamente dependente dos genitores envolvidos nos cruzamentos.

Antunes, Teixeira e Zimmermann (1980), estudando métodos de hibridação em feijão-comum, *Phaseolus vulgaris* L., concluíram que a polinização sem emasculação é superior ao método tradicional (com emasculação), pois permite maior número de polinizações por unidade de tempo e menor dano ao botão floral. Resultados semelhantes foram obtidos por Carrijo et al. (2002). Segundo Antunes et al. (1980) e Carrijo et al. (2002), a taxa de autofecundação que ocorreu utilizando esta técnica foi comparável à técnica com emasculação, justificando ainda mais a sua adoção.

Fatores que Afetam a Hibridação

O cruzamento artificial do feijoeiro, embora bem simples do ponto de vista técnico, envolve alguns fatores importantes, que devem ser observados previamente ao início dos trabalhos, para que se obtenha o máximo de eficiência. Considerar-se-á eficiência a razão entre o número de vagens híbridas sadias obtidas e o número de botões florais artificialmente polinizados.

Alguns desses fatores, talvez os mais importantes, são listados abaixo e serão discutidos a seguir:

- operador
- local
- temperatura
- umidade do ar e do solo
- pragas e doenças
- características do botão a ser polinizado
- característica da flor polinizadora
- escolha do botão floral a ser polinizado e manejo das flores remanescentes

- horário da polinização artificial

Operador

Além de habilidade manual, paciência e dedicação, o operador deve principalmente gostar do trabalho que está realizando. Quando for necessário o auxílio de pessoas que não estejam familiarizadas com a estrutura da flor e com os fatores biológicos e genéticos envolvidos, é importante nas primeiras horas de trabalho desses indivíduos dar-lhes explicações sobre as técnicas da hibridação artificial, os cuidados que devem ser tomados durante o trabalho e os fatores que afetam a eficiência das hibridações artificiais.

Local

Campo

Segundo Bliss (1980), a polinização artificial, no campo, ocorre com menor sucesso. Condições climáticas desfavoráveis, além de pragas e doenças, aumentam os danos às flores, que são frágeis, o que resulta em baixa porcentagem de êxito.

O sucesso da hibridação está diretamente relacionado com diversos fatores, como temperatura, umidade relativa e ataque de pragas e doenças. Porém, segundo Gonzalez (1981), a maioria dos pesquisadores concorda que a temperatura e a umidade relativa são os fatores de importância direta para a eficiência dos cruzamentos artificiais. Como, no campo, esses dois importantes fatores, além de outros, variam de modo imprevisível, na maioria das vezes a porcentagem de sucesso nessas condições é baixa, quando comparada com a obtida em casa de vegetação ou em qualquer outro local com ambiente menos variável, como indicam os resultados dos trabalhos de Wade (1943), Gonzalez (1981) e Radkov e Mitranov (1983).

Entretanto, resultados satisfatórios foram obtidos em campo por Antunes, Teixeira e Zimmermann (1980). Esses pesquisadores, estudando diferentes métodos de cruzamento, em casa de vegetação e campo, chegaram à conclusão de que, em Goiânia, GO, a realização desses trabalhos no campo é satisfatória, possibilitando ampliação no número de cruzamentos no programa de melhoramento de feijão da Embrapa Arroz e Feijão.

Diaz et al. (1986), avaliando a cobertura do estigma após a emasculação, como meio de aumentar a eficiência dos cruzamentos artificiais, concluíram que ela não afetou o número de sementes por vagem. Porém, obtiveram alta eficiência de campo e concluíram que os principais fatores que contribuíram para o grande sucesso foram a temperatura favorável, a alta umidade relativa e a escolha intencional de botões para polinização na parte da planta em que normalmente se encontram mais vagens.

Casa de vegetação, câmara de crescimento ou telado

Segundo Bliss (1980), a maioria dos cruzamentos artificiais é feita com plantas cultivadas em câmaras de crescimento, em casa de vegetação ou num abrigo com telhado de plástico e paredes laterais de telas para impedir a entrada de insetos.

Se houver necessidade, as sementes podem ser tratadas com um fungicida apropriado antes da semeadura. Elas podem ser diretamente semeadas, em excesso, em vasos de plástico ou de barro, de 15 a 20 cm de diâmetro, em solo fértil e bem drenado. Prévia desinfecção do solo deve ser feita se houver suspeita de ocorrência de patógenos de solo. Em vasos desse tamanho, podem ser mantidas até duas plantas, sendo necessário, portanto, fazer algum desbaste assim que surgirem as folhas primárias. Em vasos de barro e maiores (cerca de 30 cm de diâmetro), Peternelli e Cardoso

(1990) concluíram que a produção de sementes e vagens por vaso não variou quando foram usadas de uma a cinco plantas em cada vaso, porém, em épocas de temperaturas mais amenas, houve tendência à produção de mais vagens e sementes à medida que aumentou o número de plantas por vaso.

As sementes podem também ser semeadas em meio inerte para a germinação, devendo as plântulas ser transplantadas para vasos que contenham o substrato quando as folhas primárias começarem a se expandir. Assim que a germinação ocorrer em meio inerte, uma solução nutritiva diluída deverá ser usada na irrigação, a fim de evitar a deficiência de nutrientes. Se houver limitação de sementes, em vez de eliminar as plântulas em excesso de cada vaso, deve-se transferi-las para os vasos em que germinou número de sementes menor do que o máximo desejado.

Tanto em casa de vegetação como no campo, a correção do solo e a aplicação de quantidades adequadas de macronutrientes e de micronutrientes devem ser observadas. Para uma adubação adequada é altamente recomendável a realização da análise do solo a ser utilizado nos vasos.

Temperatura

Nas condições brasileiras, a temperatura média ótima durante o ciclo da cultura é de 18 a 24 °C, sendo 21 °C a ideal (VIEIRA, 1967). Fancelli e Dourado Neto (1999), entretanto, consideram aptas para a cultura regiões com temperatura média entre 15 e 29 °C. Comumente, a taxa de abscisão dos órgãos reprodutivos no feijão atinge 50 a 70% do total de flores abertas (MARIOT, 1976, 1989), mas pode aumentar em temperaturas superiores a 30 °C durante o dia e 25 °C durante a noite (KAY, 1979). De acordo com Stobbe

et al. (1966), em temperaturas próximas de 35 °C, praticamente não ocorre vingamento de vagens.

Conforme comentários de Shonnard e Gepts (1994), pode-se concluir que o feijoeiro, na maioria dos estádios reprodutivos, é sensível a altas temperaturas, incluindo pré-floração (formação do botão floral), floração (vingamento de flores), formação de vagens (vingamento de vagens) e formação de grãos (vingamento de sementes),

Smith e Pryor (1962), citados por Vieira (1967), demonstraram que temperaturas acima de 30 °C ocasionam, em determinadas cultivares, sensível diminuição na capacidade de produção, pois o excesso de calor não só reduz a porcentagem de flores que vingam (MARSH; DAVIS, 1985) e a viabilidade do pólen (GROSS; KIGEL, 1994), como também faz decrescer o número de sementes por vagem e o número de vagens por planta (PETERNELLI; CARDOSO, 1990).

Ofir et al. (1993) comentam que o número de vagens e sementes, nos cultivares que estudaram, foi significativamente reduzido pela exposição a altas temperaturas (32 e 27 °C, durante o dia e à noite, respectivamente), por cinco dias na época da antese. Esses pesquisadores afirmam que a redução foi causada pelo aumento da abscisão de botões florais, flores e vagens novas e pela falha na fertilização e no desenvolvimento de sementes.

Agtunong et al. (1992), também avaliando o efeito de elevadas temperaturas (34/29 °C, dia/noite) por 16 dias, em três estádios de desenvolvimento do feijoeiro, verificaram que não houve produção de sementes quando o tratamento foi aplicado durante o período que abrange o pré e o pós-florescimento.

As baixas temperaturas também podem ser prejudiciais ao feijoeiro, dificultando o processo de

hibridação. Durante o crescimento vegetativo, baixas temperaturas reduzem a altura da planta e o crescimento de ramos, conduzindo à produção de pequeno número de vagens por planta (Portes, 1996).

Trabalhos realizados por Farlow (1981) em ambiente controlado, além de mostrarem redução no número de vagens por planta em temperaturas inferiores a 11,4 °C, também evidenciaram aumento no número de sementes abortadas a partir de 12,8 °C por efeito de baixas temperaturas na germinação do grão de pólen e no crescimento do tubo polínico.

Umidade do Ar e do Solo

As plantas de feijão reagem desfavoravelmente tanto ao excesso como à falta d'água. Encharcamentos por um período de 24 a 48 horas resultam em queda de folhas e flores e, portanto, em redução na produção (BLISS, 1980). Em trabalhos realizados no campo, devem-se evitar solos muito pesados, pois o excesso de chuva pode prejudicar o desenvolvimento da planta. Quando se tratar de escassez de chuva, a irrigação poderá corrigir a situação. Em hibridações em casa de vegetação e no campo, o essencial é que não falte água à cultura, durante a floração e formação de vagens e grãos, para não haver queda de flores e de vagens pequenas e para permitir bom enchimento das vagens, conforme pode ser verificado no trabalho desenvolvido por Fiegenbaum et al. (1991).

Alta umidade relativa reduz o secamento das flores após a emasculação e conduz a bom pegamento dos cruzamentos, mas também pode aumentar as doenças foliares. Em casa de vegetação, uma forma de aumentar a umidade relativa, favorecendo o pegamento, é realizar aspersões freqüentes sobre as bancadas e calçadas, durante a polinização, em dias quentes.

Hernández e Tay (1975), citados por Gonzalez (1981), e Okonkwo e Clayberg (1984) relatam que a umidade relativa, além da temperatura, tem influência direta no êxito das hibridações. Segundo os primeiros pesquisadores, Wington (s.d.) obteve 73% de sucesso nos cruzamentos, colocando um pedaço de papel absorvente úmido ao redor do botão floral polinizado artificialmente.

Wade (1943) cita a importância de, após a emasculação e polinização, cobrir o estigma com a pétala remanescente (estandarte), voltando à forma original do botão tão completamente quanto possível, com o objetivo de conservar a umidade. Porém, Diaz et al. (1986), trabalhando com seis cultivares, verificaram que a eficiência da hibridação e o número de sementes formadas por vagem foram similares em ambos os métodos, cobrindo, ou não, o estigma. Convém salientar que esse trabalho foi conduzido em campo e que, segundo os autores, a temperatura e a umidade relativa local foram muito favoráveis.

Pragas e Doenças

É essencial que as plantas a serem utilizadas estejam livres de pragas e doenças. Mosca-branca, ácaro, pulgão, mosca-minadora e oídio ocorrem com frequência em casa de vegetação. Nesses casos, é comum a utilização de inseticidas e fungicidas registrados para a cultura. Entretanto, deve-se ter sempre em mente os cuidados necessários para não colocar em risco a saúde do operador, sobretudo na época da realização das hibridações.

Características do Botão a Ser Polinizado

Devem-se utilizar botões florais fechados, porém encorpados, com o estandarte já tomando a coloração normal da flor quando aberta. Botões florais com essas características encontram-se a aproximadamente 24 horas da antese e apresentam o estigma receptivo, entretanto as anteras ainda não estão liberando grãos de pólen.

Gonzalez (1981) observou que, ao utilizar um único cultivar como genitor feminino e diferentes cultivares como genitores masculinos, os cruzamentos foram similares em eficiência; por outro lado, utilizando diferentes cultivares como genitores femininos e um mesmo genitor masculino, houve diferença na eficiência da polinização. Portanto, infere-se que o genitor feminino é fator decisivo na eficiência do cruzamento artificial.

O referido pesquisador considerou o maior tamanho e a maior consistência dos botões florais do genitor feminino como fatores preponderantes para a alta eficiência das hibridações artificiais, em comparação com a baixa eficiência obtida quando se utilizou, como genitor feminino, um cultivar cujos botões eram de menor tamanho e mais frágeis.

Bash e Gowda (1975), citados por Gonzalez (1981), obtiveram 10% de pegamento em cruzamentos artificiais quando o cultivar apresentou botões florais pequenos, entre 30 e 33% quando eram medianos, e 37% quando eram grandes. Quanto menor o botão a ser polinizado, maior a possibilidade de danos causados pelo operador, reduzindo as possibilidades de sucesso do cruzamento artificial.

Características da Flor Polinizadora

Devem-se utilizar como doadoras de pólen flores que se abrirem no mesmo dia em que se vão realizar as hibridações. Flores do dia apresentam pétalas de coloração intensa e ausência de sinais de murchamento ou senescência.

Escolha do Botão Floral e Manejo das Flores Remanescentes

Esses dois pontos também influenciam a eficiência das polinizações. Deve-se ter em mente que pequena porcentagem das flores produzidas chega a formar vagem e

produzir sementes. Por isso, o conhecimento dos melhores botões resultará em maior número de vagens formadas com menor número de cruzamentos realizados.

Diaz et al. (1986) salientam que a obtenção de alta eficiência em condições de campo (de 53 a 62%), nos cruzamentos artificiais que realizaram, foi devida, além da temperatura favorável e alta umidade relativa, à escolha intencional dos botões florais a serem polinizados na parte da planta em que a maioria das vagens é encontrada. A posição das flores na inflorescência também é importante, pois as flores localizadas mais na base da inflorescência têm maior probabilidade de produzir vagens e conseqüentemente sementes.

Os cruzamentos realizados até o quarto dia de floração terão maior possibilidade de êxito, pois, a partir desse dia, o abortamento de flores cresce continuamente até atingir 100% (SILVEIRA et al., 1980). Polinizações realizadas apenas nos primeiros botões de cada planta (nunca ultrapassando 10 polinizações por planta), por Hernández e Tay (1975), citados por Gonzalez (1981), permitiram eficiência de 64 a 74% nos cruzamentos artificiais.

Fanjul (1978), citado por Gonzalez (1981), assegurou que há competição entre botões florais de diferentes nós de uma inflorescência e entre botões de um mesmo nó. Gonzalez (1981), em casa de vegetação, obteve uma eficiência de 55,2% nas polinizações quando removeu as flores remanescentes do genitor feminino e 46,7% quando não foram removidas. Essa não remoção também é recomendada por Andrade-Aguilar (1988) com o objetivo de eliminar a competição pelas flores autofecundadas durante o desenvolvimento das vagens híbridadas.

Horário para a Hibridação Artificial

O horário ideal para a realização das hibridações está intimamente relacionado com a variação da temperatura e

umidade no local de trabalho. Dessa forma, maior sucesso pode ser obtido com polinizações nos horários mais frescos da manhã (até as 10 horas, dependendo do local) ou da tarde (a partir das 15 horas), em ambientes sem controle de temperatura e umidade (BLISS, 1980). Vaid (1990) relata ter obtido altas porcentagens de pegamento e formação de vagens (que variaram de 10 a 30%, dependendo do cruzamento envolvido) quando a emasculação foi realizada de manhã ou no final da tarde e a polinização entre as 8 e 11 horas da manhã.

Deve-se também observar o comportamento das cultivares utilizadas como genitores femininos e masculinos. As flores são comumente utilizadas como fonte de pólen no dia em que se abrem, sendo removidas do genitor masculino e usadas imediatamente de manhã, caso haja botões disponíveis no genitor feminino, ou colocadas num saco plástico e mantidas em refrigerador, para utilização à tarde, quando houver botões aptos à polinização nesse período.

Quando o genitor feminino se encontra com os botões em estado ideal à tarde, poder-se-á optar pelo seguinte procedimento: no final da tarde, realizar o máximo de emasculações possível, sem se preocupar em polinizar no mesmo momento. Na manhã seguinte, quando houver muitas flores do genitor masculino recém-abertas, fazer a polinização dos botões trabalhados no dia anterior. Como a umidade e temperatura noturnas são satisfatórias, não haverá perigo de ressecamento do estigma.

Considerações Finais

São fornecidas a seguir algumas recomendações gerais acerca das técnicas de hibridação artificial de feijão-comum, com o objetivo de obter boa eficiência nos cruzamentos artificiais.

- Utilizar um bom "gene marcador", que permitirá rápida e fácil identificação da progênie oriunda dos cruzamentos

artificiais. Podem ser usadas também marcadores moleculares.

- Fazer plantios em pelo menos três épocas, com intervalos de aproximadamente uma semana, para garantir a coincidência no aparecimento de botões e flores dos genitores. No caso de cultivares de ciclos diferentes, fazer o plantio de modo que ocorra sincronismo no florescimento.
- Fazer o controle da temperatura durante todo o desenvolvimento das plantas. Se não for possível, deve-se identificar a época do ano em que a temperatura seja mais favorável para a realização dos cruzamentos artificiais.
- Evitar excesso ou falta de umidade durante todo o ciclo da planta. Durante as hibridações e depois, até que o pegamento esteja garantido, deve-se manter elevada a umidade relativa.
- Controlar pragas e doenças, porém com muito cuidado, em razão da necessidade da permanência do operador na área.
- Se possível utilizar como genitores femininos cultivares com botões florais maiores e mais consistentes.
- Selecionar botões situados na parte mediana da planta (terço médio) e eliminar os botões e flores remanescentes. Em plantas de hábito de crescimento determinado, selecionar também botões da inflorescência terminal e trabalhar apenas com um ou dois botões por inflorescência, eliminando os demais.
- Em locais sem controle de umidade e temperatura, trabalhar, preferivelmente, nas horas mais frescas do dia, especialmente pelas manhãs.

Referências

- ADAMS, M.W.; COYNE, D.P.; DAVIS, P.H.; GRAHAM, P.H.; FRANCIS, C.A. Common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). In: SUMMERFIELD, R.J.;

- ROBERTS, E.H. (Ed.). **Grain legume crops**. London: Willian Collins Sons & Co. Ltd, 1985. p. 433-476.
- AGTUNONG, T.P.; REDDEN, R.; MENGGE-NANG, M.A.; SEARLE, C.; FUKAI, S. Genotypic variation in response to high temperature at flowering in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 32, p. 1135-1140, 1992.
- ALLARD, R. W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. Tradução de Almiro Blumenschein, Ernesto Paternieni, José T. do Amaral Gurgel, Roland Vencovsky. São Paulo: Edgard Blucher. 1971. 381p.
- ALZATE-MARIN, A.L.; BAIA, G.S.; MARTINS FILHO, S.; PAULA JUNIOR, T.J.; SEDIYAMA, C.S.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Use of RAPD-PCR to identify true hybrid plants from crosses between closely related progenitors. **Rev. Bras. Gen.**, v. 19, p. 621-623, 1996.
- ANDRADE-AGUILAR, J.A.; JACKSON, M.T. The insertion method: a new and efficient technique for intra- and interspecific hybridization in *Phaseolus* beans. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 31, p. 218-219, 1988.
- ANTUNES, I.F.; TEIXEIRA, M.G.; ZIMMERMANN, M.J. DE O. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 23, p. 117-119, 1980.
- ARNDT, G.; GEPTS, P. Germination of bean pollen. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 34, p. 76-77, 1991.
- BLISS, F.A. Common bean. In: FEHR, W.R. (Ed.) **Hybridization of crops plants**. Madison: Am. Soc. of Agron. 1980. p. 273-284.
- BUISHAND, T.J. The crossing of beans (*Phaseolus* spp.). **Euphytica**, v. 5, p. 41-50, 1956.
- CARRIJO, F.F.R.; RAMALHO, M.A.P.; ABREU, A.F.B.; CARNEIRO, J.E.S. Pollen mixture, a recombination alternative in common bean breeding. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, n. 2, v. 3, p. 375-380, 2002.
- DEBOUCK, D. Systematics and Morphology. In: SCHOONHOVEN, A. VAN; VOYSEST, O. (Eds.). **Common beans: research for crop improvement**. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), Cali, Colombia: 1991. p.55-117.
- DIAZ, M.; VELÁZQUEZ, O.; SÁNCHEZ, J. A. Eficiencia de la hibridación en el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). **Ciencias de La Agricultura**, v. 26, p. 141-143, 1986.
- FANCELLI, A.L.; DOURADO NETO, D. **Estresses de água e temperatura na cultura do feijão**. In: FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. (Eds.) **Feijão irrigado: estratégias básicas de manejo**. Piracicaba: Publique, 1999. p. 155-169.