



DEMONSTRAÇÃO DE MECANISMO DE RESISTÊNCIA E DA PRESENÇA DE GENES DIFERENTES DE RESISTÊNCIA A *RAMULARIA AREOLA* EM DOIS GENÓTIPOS DO ALGODOEIRO

Carla Zandoná Chimatti¹; Tanara Garcia de Novaes¹; Maria Paula Nunes¹; Wilson Paes de Almeida¹; Yeshwant Ramchandra Mehta¹; Ivan Schuster²

¹Iapar - Instituto Agronômico do Paraná, Rod. Celso Garcia Cid, km 375, Bairro Três Marcos, CEP: 86047-902, Londrina, PR, e-mail: yrmehta@iapar.br; ²Coodetec - Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola, BR 467, km 98, Cx. Postal 301, CEP: 85813-450, Cascavel- PR.

RESUMO - A mancha-de-ramularia, causada por *Ramularia areola* é parcialmente controlada através de até oito aplicações de fungicidas. Trabalho anterior demonstrou que a herança da resistência do genótipo FMT 02102996 a *R. areola* é governada por um gene dominante. Recentemente, a resistência do genótipo CNPA BA 2003-2059 a este patógeno foi verificada em casa de vegetação e no campo. O presente estudo foi realizado para verificar o mecanismo de resistência deste genótipo e verificar se os genes de resistência dos dois genótipos resistentes são os mesmos. Foram avaliadas populações segregantes do cruzamento entre o genótipo resistente CNPA BA 2003-2059 e o genótipo suscetível FMT 701, dos retrocruzamentos e do cruzamento entre os dois genótipos resistentes. As plantas foram classificadas como resistentes ou suscetíveis por meio de inoculação artificial. A análise dos resultados indicou que a resistência do genótipo CNPA BA 2003-2059 é condicionada por um gene dominante e demonstrou que cada um destes genótipos possui um gene diferente de resistência. Estes resultados pode auxiliar o planejamento dos programas de melhoramento do algodoeiro visando piramidar genes de resistência a *R. areola* em novas cultivares, ao mesmo tempo constituindo informação básica para o início de trabalhos de mapeamento genético de genes de resistência.

Palavras-chave: *Ramularia*, *Gossypium hirsutum*, genética.

INTRODUÇÃO

A mancha-de-ramularia, causada por *Ramularia areola*, é uma das doenças de importância econômica para o Brasil. Os sintomas desta doença iniciam-se com lesões pequenas (3-4 mm de largura) com formato angular. Em fase avançada da doença, as lesões tornam-se necróticas de cor marrom-escuro com clorose severa ao redor das lesões, e as folhas caem precocemente afetando a produção de algodão. No Brasil, a doença hoje é responsável por perdas estimadas em 30% da produção na região do cerrado e de até 75% em cultivares mais suscetíveis à doença no Estado de Mato Grosso. Em países como Madagascar e Índia, a mancha-de-ramularia já foi responsável por perdas acima de 60% da produção em algumas safras.

A doença é parcialmente controlada através de até oito aplicações de fungicidas. Enquanto estudos sobre herança de resistência a alguns patógenos importantes do algodoeiro foram realizados, há relativamente pouca informação sobre o mecanismo de resistência de *G. hirsutum* a *R. areola*). Trabalho anterior demonstrou que a herança da resistência do genótipo FMT 02102996 (originário de cruzamento entre Fibermax 966 e uma linhagem da Fundação Mato Grosso-FMT) a *R. areola* é governada por um gene dominante. Recentemente, a resistência do genótipo CNPA BA 2003-2059 (originário da Embrapa) a este patógeno foi verificada em casa de vegetação e no campo. O presente estudo foi realizado para verificar o mecanismo de resistência deste genótipo e ao mesmo tempo verificar se os genes de resistência de dois genótipos resistentes são mesmos ou diferentes, a fim de auxiliar trabalhos de melhoramento visando desenvolver novas cultivares resistentes a *R. areola*.

METODOLOGIA

Genótipos: Sementes genéticas de três genótipos (CNPA BA 2003-2059 e FMT 02102996 como resistentes e FMT 701 como suscetível) foram utilizadas. Após semeadura, plantas de 25 dias de idade foram inoculadas em casa de vegetação para confirmar reação de resistência ou suscetibilidade ao isolado no. 44 de *R. areola* da coleção do IAPAR. Após confirmação de suas reações, sementes de apenas uma planta autofecundada de cada genótipo foram usadas para cruzamentos e multiplicação de sementes para futuros estudos (NOVAES et al., 2009; ZANDONÁ et al., 2011). Plantas destes genótipos foram cultivadas em casa de vegetação, em vasos de 30 cm de diâmetro contendo solo esterilizado (mistura em proporções iguais de solo, areia e composto).

As populações segregantes foram obtidas do cruzamento entre o genótipo resistente CNPA BA 2003-2059 e o genótipo suscetível FMT 701 e dos retrocruzamentos entre o F1 e o progenitor resistente (RC1F1_R), e o progenitor suscetível (RC1F1_S) também foram realizados. Foram obtidos também populações segregantes do cruzamento entre os genótipos resistentes FMT 02102996 e CNPA BA 2003-2059. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação, em vasos de 30 cm de diâmetro contendo solo esterilizado (mistura em proporções iguais de solo areia e composto). Sementes de todas as populações, juntamente com os progenitores, foram multiplicadas paralelamente em todas as fases do trabalho para evitar o efeito da idade de sementes na expressão dos sintomas da doença.

Preparo de inóculo e inoculação. Um isolado monospórico de *R. areola* previamente determinado como o mais agressivo (Isolado no. 44 da coleção do IAPAR), foi utilizado em todas as inoculações. Colônias do fungo cultivadas por 5-10 dias em meio de cultura específico (V8) para a esporulação, foram utilizadas para preparo do inóculo. O inóculo foi ajustado aproximadamente a 10⁴

conídios/ml. Aos 20 dias de idade, as populações segregantes e dos progenitores foram inoculadas utilizando um pulverizador manual, e incubadas em câmara de crescimento ajustado a 21 °C e à umidade relativa (HR) do ar de 95%, por 48 h. Posteriormente, as plantas foram transferidas para a casa de vegetação, com variação de temperatura de 20 a 30 °C.

Avaliações. A severidade da infecção nas folhas foi avaliada 30 dias após a inoculação utilizando uma escala visual da área foliar infectada (AFI) entre 0 a 100% em três categorias; onde: 1 = Pontuações necróticas sem clorose cobrindo 0-1% da AFI; 2 = Pequenas pontuações necróticas sem clorose cobrindo <5% da AFI; 3 = manchas tipicamente angulares, com clorose, e cobrindo > 5% da AFI; (NOVAES et al., 2011). Plantas de categorias 1 e 2 consideradas como resistentes e da categoria 3 como suscetíveis. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de qui-quadrado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as plantas do genótipo FMT 02102996 apresentaram resistência ao patógeno, e da mesma forma todas as plantas do genótipo suscetível FMT 701 mostraram suscetibilidade (Fig. 1). As plantas da geração F1 do cruzamento entre FMT 701 x CNPA BA 2003-2059 mostraram resistência completa. Conforme esperado, as plantas da geração F2 segregaram entre resistentes e suscetíveis e ajustaram-se todos à segregação de um gene dominante (3R:1S) condicionando a resistência da cultivar CNPA BA-2003-2059 à mancha-de-ramularia. Plantas da geração RC1F1s segregaram na razão de 1:1, enquanto que as plantas da geração RC1F1R, foram todas resistentes (Tabela 1). Resultados semelhantes foram encontrados por Novaes et al. (2009) mostrando resistência monogênica do genótipo FMT 02102996.

A dominância para resistência dos genótipos CNPA BA 2003-2059 e FMT 02102996 foi completa. Plantas da geração F1 do cruzamento entre CNPA BA-2003-2059 e FMT 02102996 como genótipos resistentes, foram todas resistentes. Utilizando-se uma população de 348 plantas da geração F2, a segregação na proporção de 15R:1S foi obtida, e a diferença entre observados e esperados, segundo a análise de qui-quadrado, não foi significativa (Tabela 2). O esperado se os dois genótipos tivessem o mesmo gene de resistência, então todas as plantas F2 deveriam ser resistentes. Essa é a segregação esperada para dois genes independentes e com dominância completa em ambos para o fenótipo resistência.

Contrário aos nossos resultados e aos resultados reportados por Novaes et al. (2009), Lucena et al. (2007) reportaram resistência poligênica a *R. areola* no genótipo VH8-4602, pertencente a espécie *G. barbadense*, de origem africana (LUCENA et al., 2007). Sendo a resistência poligênica, a

transferência de genes de resistência (QTL) de *G. barbadense* a *G. hirsutum* não será muito fácil. Além disso, embora ambas as espécies sejam alo tetraplóides, elas diferem por falta de homologia entre cromossomos ou braços de cromossomos (HARLAND, citado por GRIDI-PAPP, 1965).

Os resultados da presente investigação comprovaram que a resistência a *R. areola* em cada um dos dois genótipos utilizados é governada por alelos dominantes em locos diferentes. Estes resultados contribuem para estabelecer estratégias de melhoramento dirigido a piramidação de genes de resistência em genótipos agronomicamente desejáveis. Para piramidação de genes de resistência, futuros trabalhos sobre novos genes de resistência são desejáveis para que a resistência possa ser efetiva em todas as regiões de algodão do Brasil. Há grande preocupação entre cotonicultores do país quanto ao uso intensivo e sistemático de fungicidas, seja do ponto de vista da sustentabilidade ambiental, seja do custo benefício e até do uso e aceitação do produto brasileiro noutros mercados.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos comprovaram que a resistência de genótipos CNPA BA 2003-2059 e FMT 02102996 do algodoeiro à mancha-de-ramularia (*R. areola*) é condicionada por alelos dominantes em diferentes genes. Tais resultados podem auxiliar o planejamento dos programas de melhoramento genético, visando à piramidação de genes de resistência a *R. areola* em novas cultivares e ao mesmo tempo constituem informação básica para o início de trabalhos de mapeamento genético de genes de resistência a ser utilizado em melhoramento assistido por marcadores moleculares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAUQUIL, J.; SÉMENT, G. L. Faux mildiou du cotonnier (*Ramularia areola* Atk.) dans le sud-ouest de Madagascar. **Coton et Fibres Tropicales**, v. 28, p. 279-286, 1973.
- CIA, E.; FUZZATTO, M. G.; CHIAVEGATO, E. J.; FARIAS, F. J. C.; ARAÚJO, A. E. Desempenho de cultivares e linhagens de algodoeiro diante da incidência de Ramularia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 2., 1999, Ribeirão Preto, SP. **Anais...** Campina Grande: EMBRAPA-CNPA, 1999. p. 468-470.
- GRIDI-PAPP. Botânica e genética. In: CULTURA e adubação do algodoeiro. São Paulo: Instituto brasileiro de Potassa, 1965. 567 p.
- LUCENA, V. S.; HOFFMAN, L. V.; SUASSUNA, N. D.; GIBAND, M.; BARROSO, P. A. V.; ALMEIDA, V. C.; COUTINHO, M. Caracterização da genética de resistência a mancha-de-ramularia nas cultivares Guazuncho-2 e VH8-4602. In: CONGRESSO BRASILEIRO DO ALGODÃO, 6., 2007, Uberlândia. **Resumos....** Uberlândia, 2007.

- MEHTA, Y. R.; ARIAS, C. A. A. Herança da resistência a *Stemphylium solani* e insensibilidade a sua fitotoxina em cultivares de algodoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 761-765, 2001.
- MEHTA, Y. R.; ARIAS, C. A. A.; TOLEDO, J. F. F. Inheritance of resistance to *Magnaporthe gresea* in wheat. **Summa Phytopathologica**, v. 27, p. 300-304, 2001.
- NOVAES, T.; ALMEIDA, W. P.; SCHUSTER, I., MEHTA, Y. R. Herança de resistência do algodoeiro a *Ramularia areola*. **Summa Phytopathologica**, 2011 (No Prelo).
- PUPIIM, O. J.; SCHUSTER, I.; PIRES, E.; BELOT, J.; SILVIE, P.; CHITARRA, L. G.; HOFFMANN, L. v.; BARROSO, P. A. V. Herança de resistência do algodoeiro à doença azul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DO ALGODÃO, 6., 2007, Uberlândia. **Resumos**.... Uberlândia, 2007.
- SHIVANKAR, S. K., WANGIKAR, P. D. Estimation of crop losses due to grey mildew disease of cotton caused by *Ramularia areola*. **Indian Phytopathology**, v. 45, n. 1, p. 74-76, 1992.
- UTIAMADA, C. M.; LOPES, J. C.; SATO, L. N.; ROIM, F. L. B.; KAJIHARA, L., OCCHIENA, E. M. Controle químico da ramularia (*Ramularia areola*) e ferrugem (*Phakospora gossypii*) na cultura do algodoeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 4., 2003, Goiania, GO. **Algodão: um mercado em evolução: anais**. Campina Grande: Embrapa Algodão; [Goiania]: Fundação GO, 2003.
- WALLACE, T.P.; EL-ZIK, K. M. Inheritance of resistance in three cotton cultivars to the HV1 isolate of bacterial blight. **Crop Science**, v. 29, n. 5, p. 1114-1119, 1989.
- ZANDONÁ, C.; MEHTA, Y. R.; SCHUSTER, I.; ALVES, P. F. R.; BOMFETI, C. A.; BIBANCO, K. R. P.; SILVA, R. B.; LOPES, L. P. Mecanismo genético de resistência em três cultivares de algodoeiro a *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 6, p. 647-649, 2005.
- ZANDONÁ, C., NOVAES, T. G., MEHTA, Y. R., SCHUSTER, I., TEIXEIRA, E. A., CUNHA, E. A. Herança de resistência à *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em algodoeiro brasileiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 1, p. 76-78. 2006.

Tabela 1. O mecanismo de resistência a *Ramularia areola* do genótipo CNPA BA- 2003-2059 verificado através de teste de qui-quadrado para o padrão de segregação da severidade de área foliar infectada das populações dos progenitores, da geração F2 e dos retrocruzamentos, envolvendo a cultivar suscetível FMT 701 do algodoeiro (*Gossypium hirsutum*).

Progenitor/ População segregante	Reação Foliar**	Número de indivíduos em cada categoria de infecção*						X ²	P
		N° total de indivíduos	Razão teórica (R:S)	Observada		Esperada			
				R	S	R	S		
FMT 701	S	15	0:1	0	15	0	15	-	-
CNPA-BA 2003-2059	R	15	1:0	15	0	15	0	-	-
F1	R	35	1:0	35	0	35	0	-	-
F2	Segreg.	406	3:1	306	100	304,5	101,5	0,03NS	86,35%
RC1F1 _R	R	48	1:0	48	0	48	0	-	-
RC1F1 _S	Segreg.	48	1:1	27	21	24	24	0,75NS	36,65%

*Inoculação realizada em casa de vegetação, nas plântulas de 25 dias de idade, utilizando isolado agressivo n°. 44 de *R. areola* da coleção do IAPAR; ** A reação das plantas foi observada 30 dias após a inoculação utilizando uma escala visual de porcentagem da área foliar infectada (AFI) entre 0 a 100%. Segreg=segregando. NS=não significativo (P=0,5).

Tabela 2. Comprovação da presença de genes diferentes de resistência a *Ramularia areola* em dois genótipos de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*) verificada através de teste de qui-quadrado para o padrão de segregação da severidade de área foliar infectada das populações dos progenitores e da geração F2, envolvendo cruzamento entre CNPA BA-2003-2059 e FMT 02102996.

Genótipo e População segregante	Reação Foliar**	Número de indivíduos em cada categoria de infecção*						X ²	P
		N° total de indivíduos	Razão teórica (R:S)	Observada		Esperada			
				R	S	R	S		
FMT 02102996***	R	26	1:0	26	0	26	0	-	-
CNPA-BA 2003-2059	R	13	1:0	13	0	13	0	-	-
F1	R	30	1:0	30	0	30	0	-	-
F2	Segreg.	348	15:1	319	29	326,25	21,75	2,58NS	10,84%

*Inoculação realizada em casa de vegetação, nas plântulas de 25 dias de idade, com isolado agressivo n°. 44 de *R. areola* da coleção do IAPAR; ** A reação das plantas foi observada 30 dias após a inoculação utilizando uma escala visual de porcentagem de área foliar infectada (AFI) entre 0 e 100%. Segreg=segregando. NS=não significativo (P=0,5),***=Resistência desta cultivar é governada por um gene dominante (Novaes et al, 2009).

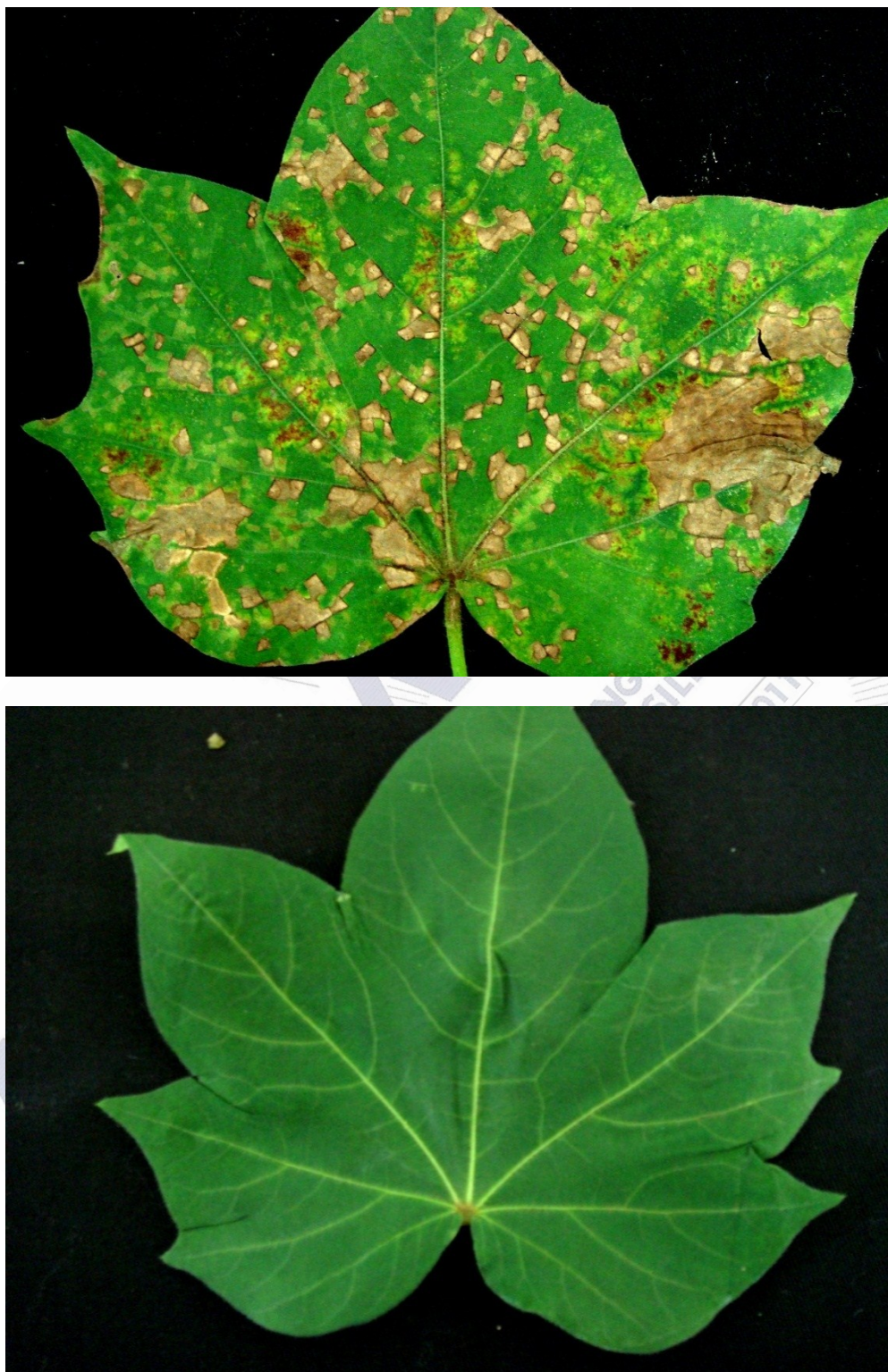


Figura 1 A-Sintomas da ramularia na folha do genótipo suscetível FMT 701 e; B-Sem sintomas no genótipo resistente CNPA BA 2003-2059, 30 dias após a inoculação em casa de vegetação utilizando o isolado no. 44 da *R. aréola* da coleção do IAPAR.