

Seleção Natural vs. Seleção Artificial em Populações de Soja sob Ataque da Ferrugem Asiática

Aliny Simony Ribeiro¹, José Francisco Ferraz de Toledo¹, Carlos Alberto Arrabal Arias¹, Marcelo Fernandes de Oliveira¹, Claudio Portela¹, Ubirajara Vieira Moreira¹, Breno Francovig Rachid¹, Sérgio Wacelkoski¹ e Julia Barbosa de Souza Silva¹

Resumo

O objetivo do trabalho foi comparar a seleção natural com a artificial para selecionar genótipos de soja com resistência duradoura à ferrugem asiática. Foram avaliadas 14 linhagens por dois anos, oriundas de populações sob pressão e sem pressão da doença. As avaliações consistiam na determinação do tipo de lesão e da severidade da doença. A variável tipo de lesão apresentou distribuição normal na maioria das populações avaliadas e a severidade média variou entre as populações. Deste modo, os resultados apresentados evidenciaram que a seleção natural somente favorece a presença e expressão de genes maiores, apresentados na variável tipo de lesão. Já quando se considera a variável severidade, governada por genes menores, a pressão de seleção não evidencia redução na severidade das populações avaliadas.

Introdução

A cultura da soja vem se expandindo progressivamente, tornando-a de grande importância econômica no mundo. Atualmente, são produzidas, por ano, cerca de 236 milhões de toneladas deste grão. Nesse contexto, o Brasil aparece como o segundo maior produtor com aproximadamente 25% de toda a produção mundial. De modo geral, estresses bióticos e abióticos limitam a distribuição geográfica da soja e de outras culturas e acarretam reduções significativas no crescimento e na produtividade de espécies economicamente importantes (CONAB, 2010). Algumas doenças fúngicas têm recebido grande atenção devido aos prejuízos que causam à produção de soja. Dentre elas, a ferrugem asiática é atualmente a principal doença que acomete a cultura da soja no Brasil e uma das mais importantes do mundo.

A resistência genética é um dos principais objetivos dos pesquisadores trabalhando com resistência à ferrugem asiática. No entanto, existem grandes dificuldades para obter resistência à ferrugem asiática da soja, pois rapidamente surgem novas raças do patógeno que superam a resistência presente nas cultivares recentemente indicadas. A eficiência da resistência vertical tem sido questionada. A alternativa para isto é o uso da resistência horizontal, condicionada por poligenes, que proporcionam uma variação fenotípica contínua na reação do hospedeiro, reduzindo a intensidade da doença (Bergamin Filho, 1995).

Alguns estudos já desenvolveram determinadas estratégias de melhoramento para se obter resistência duradoura. Foram encontrados genitores com alta capacidade combinatória, que contribuem para o aumento da frequência dos alelos favoráveis (Ribeiro et al., 2009a). Também ficou evidenciado que o controle genético da resistência da soja à ferrugem asiática, avaliada por meio da severidade do patógeno, é governada pelo efeito aditivo dos genes de pequeno efeito (Ribeiro et al., 2009b; Toledo et al., 2009, Ribeiro et al., 2007). Não obstante os diversos resultados já obtidos, necessita-se ainda verificar se a metodologia adotada pelo programa de melhoramento de resistência à ferrugem asiática da Embrapa Soja está sendo eficiente para selecionar genótipos com resistência duradoura. Ou seja, se o método de condução das populações sob pressão do inóculo está permitindo a ação da seleção natural.

Material e Métodos

Foram realizados dois anos de experimentação, nos anos agrícolas 2009/10 e 2010/11, sendo estes compostos por 14 linhagens. As populações segregantes que deram origem a essas linhagens foram conduzidas no campo experimental da Embrapa Soja, em Londrina, PR, sendo que nove linhagens selecionadas foram obtidas de populações avançadas sob pressão de inóculo (seleção natural) e cinco linhagens foram obtidas de populações avançadas em campos tratados com fungicida, evitando a presença do patógeno (seleção artificial). As populações segregantes conduzidas pelo método "bulk" foram constituídas por pelo menos 3.000 indivíduos, para que as combinações gênicas desejáveis tivessem possibilidade real de aparecer.

A seleção de plantas para obtenção das progênies que foram utilizadas nos experimentos ocorreu nas populações F₄, na safra 2008/09. Essas 14 linhagens do experimento possuem em seu genoma presença e

¹Embrapa Soja, Caixa Postal 231, CEP 86001-970 Londrina, PR, Brazil. E-mail: aliny.jata@gmail.com, jftoledo@uol.com, arias@cnpso.embrapa.br, portela@cnpso.embrapa.br, bmoreira@cnpso.embrapa.br, breno@cnpso.embrapa.br, sergio.w@cnpso.embrapa.br.

ausência de genes maiores e menores. Ou seja, há nove linhagens conduzidas sob pressão de inoculo: a) cujos parentais possuem genes maiores e menores para resistência/tolerância à ferrugem; b) cujos parentais possuem apenas genes menores para resistência/tolerância à ferrugem; c) derivadas de parentais sem genes maiores ou menores conhecidos para resistência/tolerância. Da mesma forma há cinco linhagens derivadas desses mesmos parentais, porém desenvolvidas sem a pressão do inóculo, ou seja, a presença de genes menores é improvável e a presença de genes maiores pode ser testada a priori ou acompanhada.

No período de outono-inverno do ano de 2009, foram realizadas a multiplicação das progênies em casa-de-vegetação. A semeadura foi realizada em vasos de plástico contendo um substrato de 2:1:7 de esterco, areia e terra, respectivamente. O plantio das sementes das progênies foi realizada individualmente em 65 vasos, para garantir que fossem usadas 50 famílias por progênie, utilizando-se três sementes em cada um deles. Após a emergência das plântulas foram mantidas duas plantas por vaso. No período de outono-inverno de 2010, foi repetida a mesma multiplicação das sementes, para a realização do experimento no ano agrícola 2010/2011, utilizando os mesmos procedimentos citados acima.

O experimento foi conduzido na fazenda experimental da Embrapa Soja, em Londrina, PR, localizada na latitude 23°23'S, em Latossolo Roxo Eutrófico, clima temperado subquente e subúmido, com temperaturas anuais variando de 11 a 29°C. Dois ensaios foram conduzidos em cada ano agrícola. No primeiro as plantas foram tratadas com aplicação de fungicida, preventivamente, a cada 15 dias, e no segundo foram feitas inoculações do patógeno nas bordaduras quando as plantas estavam predominantemente no estágio V₃. Cada ensaio foi composto por 2.800 parcelas, em delineamento inteiramente casualizado, utilizando a metodologia de plantio em covas, com casualização individual de plantas (1 planta = 1 cova = 1 parcela), com espaçamento dentro e entre as linhas, de 0,20 m e de 1,5 m, respectivamente. No intervalo entre duas linhas úteis do experimento foram semeadas duas linhas de bordadura utilizando a cultivar BRSMS Bacuri, para garantir a presença de inóculo da ferrugem asiática. As progênies foram representadas por 50 famílias com quatro indivíduos cada uma.

O inóculo consistiu de uma população fúngica coletada em campos comerciais no Estado do Mato Grosso e mantida na cultivar BRSMS Bacuri em condições de casa-de-vegetação. A cultivar BRSMS Bacuri é utilizada como filtro, pois é resistente ao isolado prevalente na região sul do Brasil, mas suscetível ao isolado MT. Os urediniosporos foram coletados batendo-se as folhas infectadas sobre uma bandeja plástica e diluídos em água destilada com 0,05% (v/v) de "Tween 20" (Uniqema) para uma concentração final de aproximadamente 10.000 esporos/ml, através de contagem dos mesmos em câmara Neubauer utilizada para contagem de células. As plantas foram inoculadas quando atingiram o estágio de desenvolvimento V₃-V₄. Para a inoculação das plantas foi utilizado um pulverizador manual. A operação foi realizada ao anoitecer para evitar a inviabilização dos uredósporos pela falta de água livre na folhas e baixa umidade do ambiente.

No experimento sob pressão do inóculo foi realizada a coleta de discos foliares de uma amostra da população, de 1 cm de diâmetro e acondicionados em ependorf com 1 ml de água destilada. Esse procedimento foi realizado para a determinação do tipo de lesão. O procedimento foi realizado em três coletas e as avaliações foram realizadas com o auxílio de microscópio e lupa. A classificação para o tipo de lesão tinha o objetivo de caracterizar os tipos de lesões como resistentes ou suscetíveis. Lesões de resistência ou RB (*Reddish Brown*) caracterizam-se pela cor castanho-avermelhada, com pouca ou nenhuma esporulação, enquanto as lesões de suscetibilidade ou TAN caracterizam-se pela cor castanho-claro com alta esporulação de urédias. Para essa avaliação, foi tomado o trifólio mais inferior, o qual foi identificado para que as avaliações seguintes fossem realizadas sempre no mesmo trifólio.

A avaliação de severidade foi realizada com o auxílio da escala diagramática proposta por Canteri e Godoy (2003). Foi realizada somente uma avaliação de severidade, no 25º dia do aparecimento da primeira lesão, já que esse foi determinado em trabalhos anteriores como a melhor data para a realização deste tipo de avaliação (Ribeiro et al., 2009a, 2007). Como somente uma avaliação foi realizada, foram usados três diferentes avaliadores, para garantir um ajuste das médias.

Resultados e Discussão

A existência de variabilidade genética é condição essencial para o melhorista poder exercer pressão de seleção artificial, sobre qualquer população de plantas. Quando uma população sofre com o ataque de doenças em gerações iniciais, há ocorrência de eliminação ou perda dos indivíduos menos adaptados, onde estes não conseguem deixar descendentes, em que há a atuação da seleção natural, mecanismo proposto por Darwin, que é o processo pelo qual certas modificações "favoráveis" tornam-se cada vez mais comuns de uma geração para a seguinte. Lewontin (2000), usando como exemplo os insetos, afirma que estes estão ficando cada vez mais resistentes aos inseticidas não é porque cada indivíduo adquire níveis cada vez mais altos de resistência durante

a sua vida, mas sim porque as variantes resistentes sobrevivem e se reproduzem, enquanto os organismos suscetíveis morrem. Ou seja, uma população modifica-se, não porque cada indivíduo passa por desenvolvimentos paralelos durante a vida, e sim porque existe variação entre os indivíduos e algumas variantes produzem mais descendentes do que outras.

A determinação de quais indivíduos irão sobreviver e se reproduzir e quais não irão depende, de modo significativo, da interação entre organismos individuais e o meio ambiente. Algumas variações permitem que os indivíduos se adaptem, podendo sobreviver mais tempo e produzir mais descendentes que outros indivíduos. Darwin chamou estas variações de favoráveis e argumentou que, com o tempo, as variações favoráveis herdadas tendiam, por meio da seleção natural, a tornarem-se mais comuns na população. Quais são os indivíduos que irão sobreviver e se reproduzir e quais não o farão é determinado numa proporção significativa pela interação entre estas variações e o meio ambiente. Algumas variações capacitam indivíduos a sobreviver por mais tempo e a produzir mais descendentes. Nas populações naturais, a frequência de alguns alelos aumenta de geração para geração, enquanto a de outros diminui. Se um indivíduo tiver em seu genótipo uma combinação favorável de alelos, é mais provável que ele sobreviva e se reproduza. Como consequência, seus alelos provavelmente estarão presentes em uma proporção aumentada na geração seguinte. Ao contrário, se a combinação de alelos não for favorável, será menos provável que o indivíduo sobreviva e se reproduza. A representação de seus alelos na próxima geração será reduzida ou talvez eliminada (Raven et al., 2001).

Considerando a ferrugem asiática, estão descritos alguns genes que conferem resistência a esta doença, onde estes determinam o tipo de lesão da doença. Para indivíduos resistentes, as lesões são chamadas RB e, para indivíduos suscetíveis as lesões são denominadas TAN. Estas são diferenciadas por meio de sua coloração, onde a lesão do tipo RB é uma lesão mais escura e a lesão do tipo TAN é caracterizada por uma coloração mais clara.

Na tabela 1, podemos verificar a proporção da frequência esperada de uma amostra da população avaliada (8 indivíduos), onde a frequência de 7RB:1TAN é referente as populações expostas à doença, em que um genitor possui um gene maior dominante para a resistência à ferrugem asiática; a frequência 0RB:8TAN é referente as populações cujo nenhum genitor possui resistência à ferrugem, e; a frequência 4RB:4TAN é referente as populações que possuem um genitor com gene maior, porém a população não foi exposta à presença da doença em gerações iniciais. Diante da proporção da frequência observada, fica evidenciado que a metodologia de condução de populações sob ataque da doença em gerações iniciais foi eficiente para a grande maioria das populações observadas em ambos os anos agrícolas de avaliação.

Tabela 1- Frequência esperada e observada do tipo de lesão avaliados em amostras das populações de soja nos anos agrícolas 2009/2010 e 2010/2011.

PROGÊNIES	2010				2011						
	FE		FO		.²	P	FO		.²	P	
	RB	TAN	RB	TAN			RB	TAN			
Populações com pressão de seleção em gerações iniciais											
1	BRS-231 x GC84058-21-4	7	1	4	4	10.29	0.00	3	5	18.29	0.00
2	BRS-231 x GC84051-9-1	7	1	8	0	1.14	0.29	3	5	18.29	0.00
3	BRS-231 x KINOSHITA	7	1	8	0	1.14	0.29	7	1	0.00	1.00
4	BRS-184 x GC84058-21-4	7	1	8	0	1.14	0.29	4	4	10.29	0.00
5	BRS-184 x NOVA SANTA ROSA	7	1	6	2	1.14	0.29	2	6	28.57	0.00
6	BRAS99-10553 X GC84058-21-4	7	1	6	2	1.14	0.29	6	2	1.14	0.29
7	Padre x BRS 232	0	8	5	2	-	-	2	6	-	-
8	Embrapa-48 x BRQ04-448	7	1	7	1	0.00	1.00	6	2	1.14	0.29
9	PRI05-317 X BRS- 231	7	1	7	1	0.00	1.00	3	5	18.29	0.00
Populações sem pressão de seleção											
10	BRI01-21893 x BRS 231	0	8	4	4	-	-	5	3	-	-
11	(GC84058-21-4 X BRS 134) X BRI01-7316	4	4	5	3	0.50	0.48	5	3	0.50	0.48
12	BRI01-22350 x BRS 231*3 OI	0	8	3	5	-	-	6	2	-	-
13	BRI01-7316 X BRS 184*3 OI	4	4	3	5	0.50	0.48	5	3	0.50	0.48
14	(GC84058-21-4 X BRS 134) X RI 133	4	4	6	2	2.00	0.16	4	4	0.00	1.00

As proporções ou frequências dos alelos e genótipos no conjunto gênico de uma população permanecem constantes, ou em equilíbrio, de geração para geração a menos que sobre ela atuem outros agentes que não a reprodução sexuada – Equilíbrio de Hardy-Weinberg (Raven et al., 2001).

A severidade média, avaliada por meio da porcentagem da área foliar infectada pela doença, pode ser visualizada na tabela 2. As médias apresentadas mostram que a severidade, um caráter de variação contínua, logo, governado por genes menores, apresentou variação entre as populações e o teste de médias agrupou populações que tiveram pressão de seleção junto com aquelas que não tiveram. Assim, conduzir populações em gerações iniciais na presença da ferrugem, não ocasiona redução na severidade da progênie.

Tabela 2 - Severidade média das populações de soja avaliadas nos anos agrícolas 2009/2010 e 2010/2011.

PROGÊNIES	2009/2010	2010/2011
Populações com pressão de seleção em gerações iniciais		
BRS-231 x GC84058-21-4	35.66 c	38.20 c
BRS-231 x GC84051-9-1	44.68 a	29.04 d
BRS-231 x KINOSHITA	33.18 c	26.18 d
BRS-184 x GC84058-21-4	45.22 a	42.18 b
BRS-184 x NOVA SANTA ROSA	48.37 a	38.75 c
BRAS99-10553 X GC84058-21-4	34.45 c	35.61 c
Padre x BRS 232	44.53 a	49.95 a
EMBRAPA-48 X (BRS-231 X PI-230970)	44.03 a	39.75 c
PRI05-317 X BRS- 231	43.58 a	44.62 b
Populações sem pressão de seleção		
BRI01-21893 x BRS 231	40.54 a	37.78 c
(GC84058-21-4 X BRS 134) X BRI01-7316	44.14 a	44.52 b
BRI01-22350 x BRS 231*3 OI	39.12 b	38.14 c
BRI01-7316 X BRS 184*3 OI	45.84 a	44.65 b
(GC84058-21-4 X BRS 134) X RI 133	44.42 a	41.63 b

De acordo com os resultados apresentados, há grande evidência que usando a pressão de seleção ou seleção natural em gerações iniciais favorece a presença e expressão de genes maiores, apresentados na variável tipo de lesão. Porém, quando se considera a variável severidade, governada por genes menores, a pressão de seleção não evidencia redução na severidade das populações avaliadas, mostrando que a condução de populações sob pressão de doença não mostra resultados satisfatórios na redução da ferrugem asiática.

Agradecimentos

À EMBRAPA Soja e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento da bolsa de pós doutorado.

Referências

Bergamin Filho A, Kimati H, Amorim L (1995) **Manual de fitopatologia**: princípios e conceitos. São Paulo: Ceres.

Canteri MG, Godoy CV (2003) Escala diagramática para avaliação da severidade da soja. **Summa Phytopathologica**, 29:89.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/SojaSerieHist.xls>>. Acesso em 05 de abril de 2010.
Lewontin R. *The triple helix*. Cambridge, Harvard University Press, 2000.

Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE (2001) **Biologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
Ribeiro AS, Toledo JFF, Ramalho MAP (2009a) Interference of genotypes x environments interaction in the genetic control of resistance to Asian rust soybean. **PAB**, 44(9):1160-1167.

Ribeiro AS, Toledo JFF, Ramalho MAP (2009b) Selection strategies of segregant soybean populations for resistance to Asian rust. **PAB**, 44(11):1452-1459.

Ribeiro AS, Moreira JUV, Pierozzi PHV, Rachid BF, Toledo JFF, Arias, CAA, Godoy CV (2007) Genetic control of Asian rust in soybean, **Euphytica** 157: 15-25.
Toledo JFF, Ribeiro AS, Oliveira, MF (2009) Genetic analyses of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] resistance to the Asian rust (*Phakopsora pachyrhizi* H. Sydow & P. Sydow). **VIII World Soybean Research Conference**.