

Herança da Resistência de Variedades Comerciais Brasileiras de Soja à Podridão Radicular de Fitóftora

Maurilio Cristiano Batista Bergamo¹, Dr. Carlos Alberto Arrabal Arias², Dr. Rafael Moreira Soares³

Resumo

O objetivo do estudo foi avaliar a herança da resistência à podridão radicular de fitóftora, causada por *Phytophthora sojae* (Kaufm. & Gerd.), presentes em variedades comerciais resistentes BRS 260, BRS 262, BRS 246RR e BRSMG 752S. Até hoje 14 genes, denominados Rps, foram descritos por conferirem resistência à PRF, os quais tem sido amplamente utilizados nos programas de melhoramento para proteção das cultivares de soja. O material experimental foi desenvolvido a partir do cruzamento das quatro cultivares entre si, totalizando seis cruzamentos. A população F₂, os parentais utilizados nos cruzamentos e a cultivar suscetível BRS 268, foram inoculados com o patógeno utilizando a metodologia de Keeling (1982), adaptada por Yorinori (1996). O teste do qui-quadrado (χ^2) foi aplicado para aceitar ou rejeitar os padrões de segregação encontrados de plantas mortas e não-mortas esperadas para a população F₂ segundo padrões mendelianos. O cruzamento BRS 260 x BRS 246RR não resultou em nenhum indivíduo morto, com isso conclui-se que os mesmos contêm um gene de resistência no mesmo loco conferindo resistência a *P. sojae*. Nos cruzamentos BRSMG 752S x BRS 260 e BRS 246RR x BRSMG 752S foram observados padrões de segregação semelhantes, correspondentes à segregação de dois genes dominantes independentes. As três combinações de cruzamentos envolvendo a cultivar BRS 262 indicam a presença de três genes segregando independentemente nesses cruzamentos. Pode-se concluir que apenas nesse grupo de quatro cultivares resistentes já existem quatro locos de resistência à *P. sojae* disponíveis para serem explorados em programas de melhoramento de soja.

Introdução

A soja é, atualmente, o principal produto da agricultura brasileira, colocando o Brasil em segundo lugar no cenário mundial em produção e exportação de grãos. Apesar do potencial produtivo das cultivares brasileiras, fatores bióticos e abióticos podem interferir nas condições naturais da lavoura, contribuindo assim para uma diminuição da produtividade. Dentre as doenças que se manifestam na cultura da soja, provocando perda acentuada no rendimento de grãos, podemos destacar a podridão radicular de fitóftora (PRF), causada por *Phytophthora sojae* (Kaufm. & Gerd.) a doença pode manifestar-se em várias espécies da família Fabaceae, no entanto a soja é o único hospedeiro de importância comercial (Costamilan et al. 2007).

Os sintomas da doença podem ser observados em todas as partes da planta de soja que apresentem susceptibilidade à infecção por *P. sojae*, desde a germinação até a maturação das plantas. No campo, provoca tombamento de plantas através do estabelecimento de uma podridão que atinge o sistema radicular e compromete a sustentação e o fluxo de nutrientes da planta. Tanto o córtex quanto o tecido vascular são colonizados por *P. sojae*, sendo que a infecção pode se espalhar rapidamente ao longo dos tecidos vasculares em cultivares suscetíveis (Tyler, 2007)

Até hoje 14 genes, denominados Rps, foram descritos por conferirem resistência à PRF, os quais tem sido amplamente utilizados nos programas de melhoramento para proteção das cultivares de soja, contra esse patógeno. Esses genes foram mapeados em oito diferentes locos, com uma série alélica em dois deles: Rps 1 (1a, 1b, 1c, 1d e 1k), Rps 2, Rps 3 (3a, 3b e 3c), Rps 4, Rps 5, Rps 6, Rps 7 e Rps 8 (Burnham et al. 2003). Já foi observado que a presença de apenas um gene de resistência (Rps) já é suficiente para conferir resistência a doença, entretanto os genes apresentam resistência raça-específica, sendo que Rps2 e Rps7 já não conferem mais resistência às raças de *P. sojae* encontradas nas lavouras mundiais (Schmitthenner 1985). Provavelmente existam vários genes, responsáveis por conferir resistência, desconhecidos dentro do amplo germoplasma da soja (Sandhu, 2005).

Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi estudar o controle genético da resistência da soja à podridão radicular de fitóftora, presente nas variedades comerciais BRS 260, BRS 262, BRS 246RR e BRSMG 752S.

Material e Métodos

¹ Mestrando em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina –UEL, Estagiário da Área de Melhoramento e Genética Vegetal – Embrapa Soja, Londrina, PR, Bolsista da CAPES. Email: mauriliobergamo@gmail.com

² Pesquisador da Área de Melhoramento e Genética Vegetal da Embrapa Soja, Londrina, PR. Email: arias@cnpsa.embrapa.br

³ Pesquisador da Área de Fitopatologia da Embrapa Soja, Londrina, PR. Email: rafael@cnpsa.embrapa.br

Apoio Financeiro: CAPES

Os genótipos que participaram desse estudo são cultivares descritas como resistentes à podridão radicular de fitóftora e que foram desenvolvidas pelos programas de melhoramento de soja da Embrapa, sendo elas:

a) BRS 260: Apresenta coloração de flor branca, hilo marrom claro e pubescência cinza. Foi obtida do cruzamento BRS 133 x CD 201.

b) BRS 262: Obtida do cruzamento Sharkey x [Hartwig x (Sel. Em Savana*2 x BR85-206)], apresenta coloração de flor branca, coloração de hilo preta e cor de pubescência marrom.

c) BRS 246RR: Cultivar de soja transgênica resistente ao glifosato, oriunda do cruzamento Embrapa 61 x (BRS 133³ x E96-246), possui flor branca, hilo marrom e pubescência marrom.

d) BRSMG 752S: Obtida do cruzamento Don Mario 43 x Suprema, apresenta coloração de flor roxa, coloração de hilo marrom e cor de pubescência marrom.

Foram utilizados como testemunhas para o experimento os parentais resistentes utilizados nos cruzamentos e a cultivar BRS 268, suscetível à PRF como padrão para avaliar a qualidade da inoculação.

O desenvolvimento do material experimental foi realizado em casa de vegetação e consistiu no cruzamento das quatro cultivares entre si, totalizando seis cruzamentos. Não foram realizados cruzamentos recíprocos pois sabe-se que a resistência à PRF não sofre efeito materno.

As plantas F1 de cada cruzamento foram autofecundadas e multiplicadas em casa de vegetação, a fim de produzir pelo menos 300 sementes. As plantas F1 foram trilhadas manualmente para minimizar a perda de sementes e evitar a mistura entre os diferentes cruzamentos.

A população F2, com tamanho variando de 77 a 151 plantas, foi inoculada com o patógeno utilizando a metodologia de Keeling (1982), adaptada por Yorinori (1996). As plantas foram inoculadas no hipocótilo através de pontas de palitos de dente contendo o micélio, 1cm abaixo do cotilédone (Fig.1A e B).



Figura 1: A: inoculo de *Phytophthora sojae* semelhante ao utilizado no experimento
B: Processo de inoculação da planta utilizado no experimento.

As plantas que constituíam a população F2 foram avaliadas 10 dias após a inoculação, sendo determinada o tipo de reação para a doença, com isso classificando os indivíduos em dois grupos: plantas não-mortas e plantas mortas. Indivíduos que não apresentaram nenhuma lesão além da ocasionada pela inserção do palito ou que apresentavam lesão no hipocótilo restrita a região do palito, mas sem murcha da planta, foram classificados como não-mortas, denominadas resistentes. Plantas que apresentavam destruição completa do hipocótilo, murcha da planta ou lesão além do local de inserção do palito foram classificadas como mortas, denominadas suscetíveis.

O teste do qui-quadrado (χ^2) foi aplicado para aceitar ou rejeitar os padrões de segregação de plantas mortas e não-mortas esperadas para a população F2 segundo padrões mendelianos. Para se estabelecer o número de indivíduos esperados por classe, foram calculadas as probabilidades de cada classe e multiplicadas pelo tamanho da amostra. As frequências observadas foram obtidas diretamente pela contagem dos dados da amostra. O Qui-quadrado foi calculado através da equação proposta por Karl Pearson, segundo Ferreira (2005).

O teste mede a probabilidade das diferenças encontradas nas classes serem ao acaso. As hipóteses testadas foram:

H0 = As frequências de segregação observadas não diferem estatisticamente das frequências esperadas;

H1 = As frequências de segregação observadas diferem estatisticamente das frequências esperadas.

Se o qui-quadrado calculado for maior do que o tabelado ao nível de 5% de probabilidade ($P < 0,05$), rejeita-se H0.

Resultados e Discussão

Com base na análise dos parentais (Tabela 1), verificou-se que todas as quatro cultivares estudadas apresentam resistência completa a PRF, já que nenhum indivíduo manifestou sinais da doença, concordando com os dados descritos na literatura. Já para a cultivar suscetível, observou-se um resultado diferente do esperado já que 33% das plantas inoculadas não desenvolveram a doença mesmo sendo suscetíveis, indicando que a inoculação obteve 67% de eficiência, no entanto a eficiência está dentro do normal devido a dificuldade de se trabalhar com *P.sojae*. Vários fatores podem interferir no resultado esperado, como: má colocação do palito, temperaturas muito altas dentro da casa de vegetação, falta de umidade no micélio que está sobre o palito inoculado, dentre outras. Melhorias estruturais de casa de vegetação tais como no sistema de refrigeração e aquecimento no sistema de nebulização podem auxiliar na manutenção da temperatura e umidade ideais para aumentar a eficiência da inoculação.

Tabela 1: Número de plantas mortas e não-mortas após inoculação com *P. sojae* sobre o padrão suscetível BRS 268 e sobre as Variedades resistentes

Variedades	Plantas não-mortas	Plantas mortas	N
BRS 268	49	97	146
BRS 260	37	0	37
BRS 262	32	0	32
BRSMG 752S	28	0	28
BRS 246RR	38	0	38

* N: Tamanho da população

Apesar da eficiência da inoculação não ter sido 100 por cento, o desvio da eficiência não é suficiente para alterar o padrão de segregação sugerido. Mesmo considerando um escape de 33% sobre a frequência observada de plantas mortas, observa-se que o padrão de segregação testado não rejeitado pelo teste de qui-quadrado seria o mesmo. Também o fato de contar com resultados de cruzamentos envolvendo todas as combinações entre os quatro parentais resistentes facilita a interpretação dos padrões de segregação por necessariamente apresentarem coerência dos resultados de um para outro cruzamento envolvendo o mesmo parental. Essa complementaridade de informação aumenta a robustez das conclusões.

Através da avaliação dos indivíduos que constituíam a população referente aos seis cruzamentos obtidos para o experimento e a realização do teste de qui-quadrado, pode-se verificar que existem diferenças no número de genes envolvidos na resistência à PRF, entre os cruzamentos analisados, já que a frequência de plantas mortas e não mortas se ajustaram a padrões de segregação diferentes entre os cruzamentos. Schmitthenner (1985) afirma que um único gene Rps já é suficiente para conferir resistência à doença.

Tabela 2: Número de plantas mortas e não-mortas observadas (Fo) e esperadas (Fe) de acordo com o padrão de segregação proposto para a geração F2 após a inoculação com *P. sojae* e teste do qui-quadrado para cada cruzamento

Cruzamento	Plantas não-mortas		Plantas mortas		N	Padrão de Segregação Testado (R:S)	• ² cal.	P
	Fo	Fe	Fo	Fe				
BRS 260 x BRS 246RR	147	147	0	0	147	1:0	0	1,00
BRSMG 752S x BRS 260	72	72,19	5	4,81	77	15:1	0,01	0,93
BRS 246RR x BRSMG 752S	144	141,56	7	9,44	151	15:1	0,67	0,41
BRS 260 x BRS 262	141	139,78	1	2,22	142	63:1	0,68	0,41
BRS 246RR x BRS 262	145	144,71	2	2,29	147	63:1	0,04	0,85
BRS 262 x BRSMG 752S	140	138,8	1	2,20	141	63:1	0,67	0,41

* P: Probabilidade, N: Tamanho da População

O cruzamento BRS 260 x BRS 246RR não apresentou nenhum indivíduo morto, com isso podemos concluir que os mesmos contêm um gene de resistência no mesmo loco conferindo resistência a *P. sojae* já que não ocorreu segregação entre seus alelos, com isso o •²calculado apresenta valor igual a zero com probabilidade máxima. A cultivar BRS 133 utilizada como parental para desenvolvimento das duas cultivares, apresenta

suscetibilidade a PRF e é utilizada como padrão de suscetibilidade para estudos envolvendo *P. sojae*. Isto indica que a provável origem da resistência venha de outro parental utilizado no desenvolvimento das duas cultivar

Os cruzamentos BRSMG 752S x BRS 260 e BRS 246RR x BRSMG 752S, apresentaram padrões de segregação semelhantes e seguem o padrão 15R:1S. O padrão de segregação de 15:1 corresponde à segregação de dois genes dominantes independentes. Nesses cruzamentos, como os dois parentais envolvidos são resistentes, cada gene veio de um dos parentais. Como o gene presente nas cultivares BRS 260 e BRS 246RR é o mesmo, podemos concluir, baseados no padrão de segregação encontrado para esses dois cruzamentos, que existe um gene presente nas cultivares BRS 260 e BRS 246RR e outro gene independente ou em diferente loco na cultivar BRSMG 752S.

As três combinações de cruzamentos envolvendo a cultivar BRS 262, apresentaram um padrão de segregação diferente dos demais. Em todos os cruzamentos envolvendo essa cultivar como parental, o padrão de segregação foi de 63R:1S, indicando que existem três genes segregando independentemente nesses cruzamentos. Como já foi observado nos cruzamentos já analisados que os parentais BRS 260, BRS 246RR e BRSMG 752S tem apenas um loco de resistência, infere-se que a cultivar BRS 262 tenha necessariamente dois locos de resistência à *P. sojae*. Com base no teste de qui-quadrado, verificou-se que o modelo se ajusta perfeitamente ($P > 0,05$) aos dados observados.

Através de uma busca realizada no banco de dados do *Germplasm Resources Information Network's* (GRIN), pode-se verificar que a cultivar Sharkey, um dos parentais da cultivar BRS 262, apresenta os genes Rps 1c e Rps 3 em seu genótipo, sendo assim, essa é a provável origem dos dois genes de resistência presentes no genótipo da cultivar BRS 262. Testes de alelismo em relação às fontes de resistência estão sendo desenvolvidos para comprovar a origem desses genes.

Resumidamente, pode-se concluir que apenas nesse grupo de quatro cultivares resistentes já existem quatro locos de resistência à *P. sojae* disponíveis para serem explorados em programas de melhoramento de soja. A utilização de um mesmo gene como fonte de resistência para diferentes cultivares pode levar a uma adaptação do patógeno ao hospedeiro, com isso levando à quebra da resistência (BURNHAM, et al., 2003), por isso faz-se necessária uma rotação das fontes utilizadas para controle da doença, em áreas que ocorrem raças específicas de *P. sojae*, assim diminuindo a chance de quebra da resistência (WILCOX & St. MARTIN, 1998).

Referências

Burnham KD, Dorrance AE, Francis DM, Fioritto RJ and St. Martin SK (2003) Rps8, a new locus in soybean for resistance to *Phytophthora sojae*. **Crop Science** 43:101-105.

Costamilan LM, Bertagnolli PF and Moraes, RMA (2007) Podridão radicular de fitóftora em soja. Passo Fundo Embrapa Trigo. 23p. (Embrapa Trigo. Documentos Online, 79)

Ferreira DF (2005) **Estatística básica**. Editora UFLA, Lavras, 664p.

Keeling BL (1982) A seedling test for resistance to soybean stem canker caused by *Diaporthe phaseolorum* var. caulivora. **Phytopathology** 72:807-809.

Sandhu D, Schallock KG, Rivera-Velez N, Lundeen P, Cianzio S and Bhattacharyya MK (2005) Soybean *Phytophthora* resistance gene Rps8 maps closely to the Rps3 region. **Journal of Heredity**.

Schmitthenner AF (1985). Problems and progress in control of *Phytophthora* root rot of soybean. **Plant Disease** 69:362–368.

Tyler BM (2007) *Phytophthora sojae*: root rot pathogen of soybean and model oomycete. **Molecular Plant Pathology** 8:1-8.

Wilcox JR and St. Martin SK (1998) Soybean genotypes resistant to *Phytophthora sojae* and compensation for field losses of susceptible isolines. **Plant Disease** 82:303-306.

Yorinori JT (1996) Cancro da haste da soja: epidemiologia e controle. Londrina: Embrapa Soja. 75p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 14).