



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MAURILIO CRISTIANO BATISTA BERGAMO

**“HERANÇA DA RESISTÊNCIA DA SOJA À PODRIDÃO
RADICULAR DE FITÓFTORA, EM VARIEDADES
COMERCIAIS BRASILEIRAS”**

Londrina
2012

MAURILIO CRISTIANO BATISTA BERGAMO

**“HERANÇA DA RESISTÊNCIA DA SOJA À PODRIDÃO
RADICULAR DE FITÓFTORA, EM VARIEDADES
COMERCIAIS BRASILEIRAS”**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Arrabal
Arias

Londrina
2012

MAURILIO CRISTIANO BATISTA BERGAMO

**“HERANÇA DA RESISTÊNCIA DA SOJA À PODRIDÃO RADICULAR
DE FITÓFTORA, EM VARIEDADES COMERCIAIS BRASILEIRAS”**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Alberto Arrabal Arias
Embrapa Soja – Londrina – PR

Prof. Dr. José Baldin Pinheiro
ESALQ – Piracicaba – SP

Prof. Dr. Antonio Eduardo Pípolo
Embrapa Soja – Londrina - PR

Londrina, 16 de fevereiro de 2012.

***“Felicidade não é o lugar onde se chega,
é a forma como se vai”***

***Astromar Miranda,
Movimento Mariana Braga***

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por sempre permitir a realização de todos os meus sonhos, por ser a parte mais importante da minha vida, pela fortaleza nas vezes que pensei em desistir e por me moldar em cada situação adversa, a Ele toda glória e todo louvor;

À Maria, mãe do meu Senhor e minha mãe, por estar sempre ao meu lado intercedendo junto ao Pai pelos meus sonhos;

Ao meu pai Maurilio, meu exemplo de homem, pai e esposo, por toda a dedicação e apoio nas horas de dificuldade;

À minha mãe Nilce, rocha forte e protetora, por ser o meu sustento nas horas de medo, a luz que guia o meu caminho e a proteção nas horas de tempestade;

À minha Irmã Marcella, por todo o amor, carinho, pelas alegrias e partilhas;

Ao meu orientador, Dr. Carlos Alberto Arrabal Arias, por ter me aceito como orientando, pelo profissionalismo, pelos conselhos, pelas dicas, pelos ensinamentos e por ter confiado a mim este projeto que fui muito feliz em desenvolver;

À Embrapa Soja, pela estrutura, auxílio e possibilidade de desenvolvimento do meu trabalho;

Aos laboratórios de Melhoramento e Fitopatologia por toda a ajuda empreendida no desenvolvimento desse trabalho

Ao pesquisador Dr. Rafael Moreira Soares, por toda a ajuda nas dúvidas e questionamentos referentes a este trabalho e pelas dicas e correções na qualificação;

A CAPES, pelo apoio financeiro;

À coordenação e aos professores do programa de mestrado em Genética e Biologia Molecular pelos ensinamentos e disciplinas ministradas durante o curso;

Ao Prof. Josué Maldonado Ferreira pelas dicas e correções na qualificação;

À professora Rosângela Maria Pinto Moreira pela orientação no estágio em docência;

Ao Professor Dr. José Baldin Pinheiro, Dr. Antonio Eduardo Pípolo, Dr. Romeu Afonso de Souza Kiihl e Dr. Marcelo Fernandes de Oliveira pelas sugestões e correções na defesa;

À secretária Sueli, por toda ajuda durante o período do mestrado;

A todos os alunos do programa de pós-graduação, pelos trabalhos, pelas equipes, e principalmente pela amizade, foi muito bom estudar com vocês;

À Nicole e família Menin por todo o apoio, dedicação e orações, que ajudaram pra que fosse possível a realização desse trabalho;

A todos os amigos, parceiros na vida e na evangelização, como diz aquela música: “amigo é a família que se escolhe”, amo todos vocês;

Aos meus amigos Gabriel, Rafaele e Bárbara, pela importância na minha formação pessoal e espiritual, indiretamente vocês foram muito importantes no desenvolvimento desse trabalho;

Aos meus amigos Miguel, Roger e Paulo Vinicius, vocês são os maiores presentes que Deus me deu durante a minha formação acadêmica, que nossa amizade seja eterna;

Ao Grupo de Jovens Javé Nessi, por toda a formação, pelas amizades, pelos momentos de alegria, pela acolhida, vocês fazem diferença na minha vida, é uma honra poder servir a Deus junto com vocês

Ao meu ministério de música, o ministério mais unido (hehe), pela força e por me escutarem várias vezes eu explicando o meu trabalho mesmo sem entender o que eu estava falando;

E a todos que participaram direta e indiretamente desse trabalho o meu muito obrigado!!!!

*Dedico este trabalho a Deus e a Nossa Senhora
por mais este sonho realizado;
Aos meus pais Maurilio e Nilce
que não mediram esforços para que
eu pudesse chegar até aqui
e a minha irmã Marcella
por todo o apoio e dedicação*

BERGAMO, Maurilio Cristiano Bergamo. **Herança da resistência da soja à podridão radicular de fitóftora, em variedades comerciais Brasileiras**. 2012. 52 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

RESUMO

A podridão radicular de fitóftora (PRF), causada por *Phytophthora sojae* (Kaufman & Gerdman), é uma das doenças mais destrutivas da soja podendo provocar perdas de até 100% no rendimento de grãos. No Brasil, a doença tem ocorrido com maior frequência desde a safra 2005/06, principalmente na região sul. Existem variedades resistentes, mas pouco se conhece sobre sua herança. Para estudar a herança da resistência à PRF presente nas variedades comerciais resistentes BRS 246RR, BRS 260 e BRS 262, cruzamentos entre essas as três cultivares e delas com a cultivar suscetível BRS 268 foram desenvolvidos. As populações F₂ e os parentais utilizados nos cruzamentos foram inoculados com o patógeno no estágio V1 da soja e a avaliação foi feita sete dias após a inoculação, classificando as plantas sadias como resistentes e as plantas infectadas e mortas como suscetíveis. O teste do qui-quadrado (χ^2) foi aplicado para aceitar ou rejeitar os padrões de segregação encontrados de plantas resistentes e suscetíveis esperadas para as populações F₂ segundo padrões mendelianos. Existe um gene dominante evoluindo na resistência da cultivar BRS246RR e outro gene dominante, distinto em relação ao primeiro, determinando a resistência da cultivar BRS 260 à *P. sojae*. A cultivar BRS 262 têm dois genes dominante pra a resistência à *P. sojae*, ambos em locos distintos em relação aos dois primeiros. Pode-se concluir que, para esse grupo de três cultivares, existem quatro genes *Rps*, em locos distintos, que podem ser explorados para desenvolvimento de novas cultivares resistentes a *P. sojae* em programas de melhoramento.

Palavras-chaves: *Phytophthora sojae*. Padrão de segregação. *Glicine max*.

BERGAMO, Maurilio. Cristiano. Bergamo. **Inheritance of resistance to phytophthora root rot in Brazilian soybean commercial varieties**. 2012. 52 f. Dissertation (Master's degree in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

ABSTRACT

The phytophthora root rot (PRR), caused by *Phytophthora sojae* (Kaufman & Gerdman), is one of the most destructive soybean diseases and can provoke yield losses of up to 100%. PRR has occurred more frequently in Brazil since the season 2005/06, mainly in the South region. There are some resistant commercial varieties but their inheritance remains unknown. All bi-parental crosses involving the resistant soybean varieties BRS 246RR, BRS 260 and BRS 262 among them and between them with the susceptible variety BRS 268 were developed to study the inheritance of resistance to PRR. The F₂ populations and the parental varieties used in the crosses were inoculated with the pathogen at V1 soybean stage of development. Evaluations were performed seven days after the inoculation by classifying healthy plants as resistant and infected and died plants as susceptible. The chi-square test (χ^2) was applied to accept or reject the expected Mendelian segregation ratios of resistant and susceptible plants in the F₂ population. There exist a single dominant gene determining the resistance of variety BRS 246RR and another single dominant gene, distinct in relation to the first one, determining the resistance to PRR in the variety BRS 260. The variety BRS 262 has two resistance genes to *P. sojae*, both of them positioned in distinct loci in relation to the two other studied resistance genes. It was possible to conclude that, for this group of three soybean varieties, there are four distinct Rps genes, which can be explored by the breeding programs to develop new varieties resistant to *P. sojae*.

Keywords: *Phytophthora sojae*. Segregation ratio. *Glycine max*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Meio V-8 para manutenção e teste no palito de <i>Phytophthora sojae</i>	31
Tabela 2 – Número de plantas saudias, infectadas e mortas após inoculação com <i>P. sojae</i> sobre o padrão suscetível BRS 268 e sobre as Variedades resistentes.....	39
Tabela 3 – Número de plantas saudias, infectadas e mortas após inoculação com <i>P. sojae</i> sobre os cruzamentos entre variedades resistentes com a variedade suscetível BRS 268.....	41
Tabela 4 – Número de plantas resistentes e suscetíveis observadas e esperadas de acordo com o padrão de segregação proposto para a geração F ₂ após a inoculação com <i>P. sojae</i> e teste do qui-quadrado para cada cruzamento RxS.....	41
Tabela 5 – Número de plantas saudias, infectadas e mortas após inoculação com <i>P. sojae</i> sobre os Cruzamentos entre variedades resistentes.....	43
Tabela 6 – para a geração F ₂ após a inoculação com <i>P. sojae</i> e teste do qui-quadrado (χ^2) para cada cruzamento “RxS”.....	44

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Plantas mortas circundadas por plantas sadias em local de incidência de *P. sojae*20
- Figura 2** – À direita, borda de lavoura de soja com falhas de estande devidas a podridão radicular de fitóftora20
- Figura 3** – Área compactada em borda de lavoura de soja, com falhas de estande causadas por podridão radicular de fitóftora.....21
- Figura 4** – Inóculo de *P. sojae* semelhante ao utilizado no experimento.....32
- Figura 5** – Processo de inoculação da planta que foi utilizado no experimento.....32
- Figura 6** – Reação das plantas após inoculação com *P. sojae*. (A) Plantas resistentes, (B) Plantas Infectadas e (C) Plantas mortas33

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 SOJA	16
2.2 PODRIDÃO RADICULAR DE FITÓFTORA.....	17
2.2.1 Histórico da Doença	18
2.2.2 Etiologia.....	18
2.2.3 Sintomas	19
2.2.4 Ciclo de Vida	21
2.2.5 Tipos de Resistência	22
2.2.6 Raças de <i>P. sojae</i>	23
2.2.7 Resistência Parcial.....	24
2.2.8 Controle.....	26
3 OBJETIVOS	28
3.1 OBJETIVO GERAL.....	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 DESCRIÇÃO DOS MATERIAIS	29
4.2 DESENVOLVIMENTO DO MATERIAL EXPERIMENTAL.....	30
4.2.1 Experimento 1	30
4.2.2 Experimento 2	30
4.3 ISOLADO E PREPARAÇÃO DO INÓCULO.....	31
4.4 CONDUÇÃO DA POPULAÇÃO F2 DO EXPERIMENTO.....	31
4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	34
5 ARTIGO – HERANÇA DA RESISTÊNCIA DA SOJA À PODRIDÃO RADICULAR DE FITÓFTORA, EM VARIEDADES COMERCIAIS BRASILEIRAS	35

CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
REFERÊNCIAS	47
ANEXOS	50

1 INTRODUÇÃO

A soja é o principal produto da agricultura brasileira, colocando o Brasil, no cenário mundial, como segundo maior produtor e exportador de grãos. Estima-se que a produção de soja na safra 2010/2011 alcançará, segundo projeções, a marca de 75 milhões de toneladas em uma área total de 24,2 milhões de hectares, com produtividade média de 3.106 Kg/ha (CONAB, 2011). Essa posição de destaque deve-se à alta tecnologia aplicada à produção, e pela qualidade das variedades utilizadas, desenvolvidas por diversas instituições de pesquisa.

A podridão radicular de fitóftora (PRF), causada por *Phytophthora sojae* Kaufmann & Gerdmann, é uma das doenças mais destrutivas da soja, causando morte de plantas em diferentes estágios de desenvolvimento, apodrecimento de sementes, morte de plântulas em pré e pós-emergência e em plantas adultas, apodrecimento de raízes, especialmente em solos mal drenados, podendo levar a reduções de rendimento de grãos de até 100% em variedades altamente suscetíveis (COSTAMILAN *et al.*, 2007; SCHMITTHENNER, 1999).

Há várias décadas, uma série de genes *Rps* tem sido amplamente utilizados em soja para proteção contra esse patógeno. Até hoje, 14 alelos de resistência dominantes foram identificados e mapeados em oito locos, com uma série alélica em dois destes locos, sendo eles: *Rps1a*, *Rps1b*, *Rps1c*, *Rps1d* e *Rps1k*, *Rps2*, *Rps3a*, *Rps3b*, *Rps3c*, *Rps4*, *Rps5*, *Rps6*, *Rps7* e *Rps8* (BURNHAM *et al.*, 2003; DORRANCE & ABNEY, 2004). Já foi observado que apenas um gene de resistência é suficiente para conferir uma reação de hipersensibilidade após infecção do patógeno (SCHMITTHENNER, 1985).

Até 2009, 55 raças de *P. sojae* foram identificadas com base nas reações após a inoculação de linhagens de soja com diferentes conjuntos de genes *Rps*. No Brasil, os isolados descritos na década de 90 pertenciam a raça 1. Em 2009, 21 isolados obtidos no RS, PR, MG e MS, foram 100% incompatíveis (não causaram a doença) aos genes *Rps1a*, *Rps1c*, *Rps1k*, e 100% compatíveis aos genes *Rps1d* e *Rps7* (COSTAMILAN *et al.*, 2010). Monitorar a composição racial e dinâmica da população do patógeno é um componente chave para o desenvolvimento de variedades adaptadas, já que novas raças de *P. sojae* podem aparecer com o lançamento de variedades resistentes (ZHANG *et al.*, 2010).

A resistência genética é o principal método de controle da doença, já que o controle químico não é eficiente (COSTAMILAN *et al.*, 2010). Dentre os genes que conferem a resistência à *P. sojae*, o gene *Rps1k* é o mais amplamente utilizado em variedades comerciais, no entanto, já foram identificadas raças de *P. sojae* que provocam a infecção em variedades com *Rps1k*, em isolados de Indiana e Iowa (DARRACE & SCHMITTHENNER, 2000).

No Brasil existem variedades comerciais resistentes, muitas delas desenvolvidas para outros propósitos. Não existem trabalhos sobre a herança da resistência dessas variedades a PRF. Com isso o objetivo do estudo é avaliar o controle genético da resistência da soja à podridão radicular de fitóftora (PRF) presente nas variedades comerciais BRS 260, BRS 262 e BRS 246RR.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SOJA

A Soja é um diplóide, com número somático de cromossomos $2n=40$, pertence à classe das dicotiledôneas, família Fabaceae e subfamília Papilionoides. A espécie cultivada é a *Glycine max* Merrill. O sistema radicular é pivotante, com raiz principal bem desenvolvida e raízes secundárias em grande número, ricas em nódulos de bactérias fixadoras de nitrogênio. O caule herbáceo, ereto com porte variável de 0,60 a 1,50m, é bastante ramificado, com ramos inferiores mais alongados e todos os ramos formando ângulos variáveis com a haste principal. As folhas são alternadas, longas pecioladas, compostas de três folíolos ovalados ou lanceolados, de comprimento variável entre 0,5 a 12,5cm. Possui inflorescência do tipo racemo, axiliares e terminais, com geralmente 7 a 10 flores cada um, de coloração branca ou violácea. Os frutos são do tipo vage, achatadas e pubescentes. As sementes possuem forma arredondada, achatada ou alongada, de tamanho e coloração variada (MISSÃO, 2006).

A soja cultivada provavelmente tenha como centro de origem o nordeste da China e foi domesticada durante a dinastia Shang (1550-1027 a. C.). Foi introduzida nos Estados Unidos em 1765 onde, no início do século XX, passou a ser cultivada comercialmente. No Brasil, a primeira referência ao cultivo de soja foi elaborada por D'utra, em 1882, na Bahia, posteriormente sendo cultivada nos estados de São Paulo e do Rio Grande do Sul. A expansão da área cultivada ocorreu durante a década de 1970, devido à demanda do mercado internacional por proteína e o interesse crescente da indústria de óleo.

Por ser um grão muito versátil, a soja dá origem a produtos e subprodutos usados pela agroindústria, indústria química e de alimentos. Na alimentação humana, a soja entra na composição de vários produtos embutidos, em chocolates, temperos para saladas, entre outros produtos. Seu uso mais conhecido, no entanto, é como óleo refinado, obtido a partir do óleo bruto. Recentemente, a soja vem crescendo também como fonte alternativa de combustível. O biodiesel de soja já vem sendo testado por instituições de pesquisa, como a Embrapa, além de estar sendo testado em diferentes cidades brasileiras.

A produção de soja na safra 2010/2011 alcançará, segundo projeções, a marca de 75 milhões de toneladas em uma área de 24,2 milhões de hectares, com produtividade média de 3.106 Kg/ha (CONAB, 2011). Atualmente a soja é o principal produto da agricultura brasileira, o Brasil encontra-se em segundo lugar no cenário mundial em produção e exportação de grãos. Essa posição de destaque deve-se à alta tecnologia aplicada à produção, e pela qualidade das variedades utilizadas, desenvolvidas por diversas instituições de pesquisa.

2.2 PODRIDÃO RADICULAR DE FITÓFTORA

Vários fatores podem interferir nas condições naturais de lavoura, e assim contribuir para a redução da produtividade. Entre esses, estão os fatores bióticos como os vírus, fungos, nematóides e demais patógenos, e abióticos, que surgem de excessos ou *déficits* no ambiente químico ou físico: como chuvas, ventos, minerais, temperatura, radiação solar, dentre outros. Relacionado às doenças, a produtividade da soja depende do grau de compatibilidade entre plantas e agentes causadores das doenças, o que irá determinar a incidência e a severidade do ataque, refletindo na produtividade (CONSTAMILAN, 2000).

Dentre as doenças que se manifestam na cultura da soja, provocando perdas acentuadas no rendimento de grãos, pode-se destacar a podridão radicular de fitóftora (PRF). Esta doença é uma das mais destrutivas, causando morte de plantas em qualquer fase de desenvolvimento, sendo sua manifestação diretamente ligada à alta umidade do solo, solos mais compactados tendem a acumular mais umidade e assim aumentar a severidade da doença, podendo levar a reduções de rendimento de grãos de até 100% em variedades altamente suscetíveis (SCHIMITHENNER, 1999). Essa patologia pode causar apodrecimento de sementes, morte de plântulas em pré e pós-emergência e em plantas adultas, apodrecimento de raízes, e com isso levar à morte das mesmas (COSTAMILAN *et al.*, 2007).

2.2.1 Histórico da Doença

Os sintomas de podridão radicular de fitóftora foram observados pela primeira vez em Indiana em 1948 e em Ohio em 1951. No entanto o agente causal só foi identificado em Ohio e Carolina do Norte em 1954. Desde aquela época, a podridão de fitóftora tem sido relatada na Argentina, Austrália, Brasil, Canadá, República Popular da China, Hungria, Itália, Japão, na antiga União Soviética, e em novas áreas produtoras nos Estados Unidos (CAB INTERNATIONAL, 2006). No Brasil, a doença foi identificada pela primeira vez no Rio Grande do Sul, na safra 1994/95. Houve registros, também, em Santa Catarina, Paraná e Mato Grosso do Sul. Não houve perdas significativas no Brasil até a safra 2005/06, quando ocorreram em várias lavouras do Rio Grande do Sul e do Paraná, provocando tombamento de plantas em pós-emergência, em locais de solo compactado, levando a falhas de estande inicial, a ressemeadura de áreas extensas e a morte de plantas adultas (COSTAMILAN *et al.*, 2007).

Nos Estados Unidos, entre os anos de 1996 e 2002, a podridão radicular de fitóftora foi a segunda doença da soja que mais causou prejuízos, ficando atrás apenas das perdas por nematóide de cisto. Entre os anos de 1996 e 1998 a perda média anual estimada foi de mais de 1,2 milhões de toneladas (WRATHER *et al.*, 2001).

2.2.2 Etiologia

O agente causador da doença é *Phytophthora sojae* Kaufmann. & Gerdemann. Tem como sinônimas, *P. megasperma* var. *sojae* Hildebrand., *P. megasperma* f. sp. *glycinea* e *P. sojae* f. sp. *glycines*. Antes de 1991, *P. sojae* era comumente referida como *P. megasperma* (FARR, *et al.*, 2007).

Os indivíduos do gênero *Phytophthora* ocupam um pequeno, mas patologicamente significativo nicho do filo Oomycota que, transferido do reino Fungi, foi colocado no reino Chromista, que atualmente é chamado de Stramenopila. Os Oomycotas possuem celulose em suas paredes e várias outras características comuns aos vegetais, tendo a análise molecular do DNA demonstrado que eles são muito aparentados com algas diatomáceas e marrons. Se por um lado o gênero *Phytophthora* possui características próprias, como o fato de apresentar centríolos,

produzir esporos flagelados tendo “pêlos” nos flagelos, que os distinguem dos chamados fungos verdadeiros (Eumycota), por outro lado guarda inúmeras similaridades biológicas, fisiológicas e morfológicas que o levam a ser chamado de “fungo” no senso comum (COSTAMILAN, 2001).

Phytophthora sojae é homotático e o micélio é cenocítico em colônias novas. A temperatura ótima de crescimento da maioria dos isolados está entre 25 e 28°C. Possui anterídios (gametângio masculino) díclinos, principalmente paráginos, Oogônios (gametângio feminino) são grandes, esféricos ou subesféricos, de paredes finas. Os esporos são formados rapidamente após a fertilização do oogônio, a temperatura ótima para a formação e germinação é 24°C. Podem germinar diretamente como esporos ou indiretamente pela extrusão de zoósporos (esporo assexual com capacidade de se locomover por flagelos). A temperatura ideal para germinação direta é de 25°C e, para germinação indireta, 14°C. Os zoósporos são ovóides, com os dois flagelos, um anterior e um posterior, sendo o posterior quatro a cinco vezes maior que o anterior. A temperatura ótima para a sua produção é de 20°C (SCHIMITHENNER, 1999)

2.2.3 Sintomas

Os sintomas da doença e sinais podem ser observados em todas as partes da planta de soja que são suscetíveis à infecção por *Phytophthora sojae*, desde a germinação das plântulas até a maturação, sendo que as mais jovens são mais suscetíveis, e são dependentes do nível de resistência da variedade. As sementes infectadas germinam lentamente e as plântulas morrem durante a emergência. Durante a emissão dos primeiros trifólios, a extremidade da raiz principal torna-se flácida e marrom e essa descoloração estende-se e envolve o hipocótilo até o nó cotiledonar, levando a um colapso do tecido. Na sequência, as folhas tornam-se amareladas, murcham e a planta seca e morre (COSTAMILAN *et al.*, 2010).

No campo, em lavouras atacadas por *P. sojae*, os sintomas da doença podem aparecer em plantas isoladas circundadas por plantas saudáveis ou em locais onde há grande acúmulo de umidade no solo com várias plantas infectadas. O comprometimento do sistema radicular provoca tombamento de plântulas de soja através do estabelecimento de uma podridão na raiz que compromete a sustentação

e o fluxo de nutrientes da planta. As folhas também podem ser infectadas como resultado de respingo de chuva ou por inoculação devido ao contato com o agente causador da doença. O tombamento é mais grave quando o clima é muito úmido e quente (25-30°C). As plantas estabelecidas podem ser infectadas quando o solo está molhado por longos períodos, especialmente se o solo é pobremente drenado. 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 variedades suscetíveis (TYLER, 2007).

Figura 1 –Plantas mortas circundadas por plantas saudias em local de incidência de *P. sojae*



Fonte: Costamilan *et al.* (2010)

Figura 2 – A direita, borda de lavoura de soja com falhas de estande devidas a podridão radicular de fitóftora. Coxilha, RS, fevereiro 2006



Fonte: Costamilan *et al.* (2007)

Figura 3 –Área compactada em borda de lavoura de soja, com falhas de estande causadas por podridão radicular de fitóftora. São Luiz Gonzaga, RS, janeiro 2006



Fonte: Costamilan *et al.* (2007)

2.2.4 Ciclo de Vida

O inóculo primário provém de solo e de resíduos culturais de soja infectados, nos quais o agente causador sobrevive na forma de oósporo por muitos anos, mesmo na ausência do hospedeiro. Grande quantidade de oósporos são formados em raízes e em hastes de variedades suscetíveis e tolerantes, sendo menor a quantidade formada em variedades resistentes. Fatores que controlam a dormência são pouco esclarecidos. Como a temperatura ideal de desenvolvimento é de 25°C, provavelmente os oósporos germinem sempre que a temperatura for próxima a essa, formando os esporângios. Esses, acumulam-se no solo até que ocorra uma maior umidade disponível, quando germinam indiretamente, formando cerca de 50 zoósporos cada um, que são liberados e disseminados (COSTAMILAN, 2001). Quando encontram o tecido vegetal, os zoósporos fixam-se, encistam, germinam e penetram diretamente, dando início à doença. Outras estruturas como micélio e esporângios também podem germinar diretamente e dar origem à doença (COSTAMILAN *et al.*, 2007).

Os zoósporos são disseminados pelo movimento da água livre no solo, embora possam se locomover por pequenas distâncias (1cm ou menos) em solos encharcados. São atraídos para os sítios de onde as sementes e raízes

liberam nutrientes, principalmente genisteína e isoflavonóides, encistando, germinando e infectando os tecidos do hospedeiro. Em solos não saturados, os zoósporos não são formados, mas a infecção pode ocorrer quando uma raiz jovem cresce adjacente a um esporângio (COSTAMILAN, 2001).

Phytophthora sojae, pode desenvolver a doença não só na espécie cultivada (*Glycine max*), mas também em sua ancestral selvagem (*Glycine soja*) e em espécies de tremoço (*Lupinus spp.*) (TYLER, 2007) . A transmissão e a disseminação do patógeno não ocorrem por sementes, sendo o solo e os restos culturais de soja contaminados as principais fontes de inóculo (COSTAMILAN *et al.*, 2010).

2.2.5 Tipos de Resistência

Existem três tipos de resistência descritas em soja para infecção com *P. sojae*:

- 1) Um gene *Rps* detectado pelo teste de inoculação do hipocótilo
- 2) Um gene único *Rps2* que causa morte intermediária ou parcial no teste do hipocótilo, mas reação de hipersensibilidade no teste da inoculação da raiz; (Thomison *et al.*, 1991)
- 3) Resistência parcial, com inoculação de raize, com poucas raízes infectadas e lentidão no desenvolvimento da doença.

Em variedades comerciais, um único gene *Rps* é um eficiente método de controle para a doença. No entanto, em muitos outros sistemas patógeno-hospedeiro a utilização de um único gene leva a uma adaptabilidade do patógeno a um específico gene *Rps*, quando isso acontece é necessário a substituição do gene *Rps* por outro que confira a resistência, ou a combinação de mais genes *Rps* na mesma variedade ou a combinação de resistência parcial com genes *Rps* são alternativas para controle da doença (GRAU *et al.*, 2004).

2.2.6 Raças de *P. sojae*

As primeiras raças de *P. sojae* foram descritas em 1965, através do uso de conjuntos diferenciais de variedades de soja, o primeiro deles composto pelas variedades D60-9647, D60-11082, FC31745, Harrel e Nansemond. Dez anos depois, um padrão de conjuntos diferenciais foram adotados por fitopatologistas e melhoristas, que incluiu as variedades Harosoy, Harosoy63, Snaga, Mack, Altona, PI 103091 e PI 171445. Esses conjuntos consistiam de variedades descritas como resistentes com o gene *Rps* conhecido e variedades suscetíveis, assim permitindo aos pesquisadores isolarem *P. sojae* de várias regiões e agrupá-los em raças fisiológicas. Atualmente, existem genes *Rps* descritos em oito locos, por isso nos últimos vinte anos, a maioria dos isolados de *P. sojae* tem sido caracterizada em diferenças de compatibilidade dos genes *Rps1a*, *Rps1b*, *Rps1c*, *Rps1k*, *Rps3a*, *Rps6* e *Rps7* (DORRANCE & ABNEY, 2004).

Em muitos casos, variedades ou linhagens de soja foram usadas como diferenciais para *P. sojae* antes da identificação do gene de resistência presente em seu genótipo. A variedade Harosoy foi utilizada como padrão de suscetibilidade nos primeiros conjuntos diferenciais, para caracterizar raças de *P. sojae* nos anos de 1960 a 1970, até que se descobriu que apresentava em seu genótipo o gene *Rps7* levando a uma mudança no padrão de classificação. Os conjuntos de diferenciais usados para classificação das raças de *P. sojae* não são uniformes para todos os pesquisadores, o que levou em alguns casos a diferenças na classificação racial do mesmo isolado de *P. sojae*. Assim, a reavaliação periódica dos diferenciais é necessária para minimizar as diferenças entre estudos que visam classificar as raças de *P. sojae*.

Através da inoculação linhagens de soja com diferentes conjuntos de genes *Rps*, até o ano de 2009, foram identificadas 55 raças de *P. sojae*, com base nas reações após a inoculação. Novas raças de *P. sojae* podem aparecer com o lançamento de variedades resistentes, no entanto a resistência genética ainda permanece como a estratégia mais eficaz para reduzir as perdas causadas pelo patógeno. Monitorar a composição racial e dinâmica da população do patógeno é um componente chave para o desenvolvimento de variedades adaptadas (ZHANG *et al*, 2010).

Nos Estados Unidos, podemos encontrar uma grande diversidade de raças de *P. sojae* nos diferentes estados. Em Iowa, as raças 1, 2, 3, 4, 8, 13, 15 e 25 são as responsáveis pelo maior número de plantas infectadas (YANG *et al.*, 1996). Em Illinois, as raças 1, 3, 4, 43, 54 e 55 são as responsáveis por grande parte das mortes por *P. sojae* (LEITZ *et al.*, 2000). No estado de Michigan, as raças 2, 25, 41 e 44 foram identificadas em amostras de solo provenientes de regiões produtoras de soja (HART *et al.*, 2001).

No Brasil, os isolados descritos na década de 90 pertenciam a raça 1. Em 2008, um isolado obtido no estado do Rio Grande do Sul apresentou reação compatível (causa a doença) aos genes *Rps7* e *Rps1d*. Em 2009, 21 isolados obtidos no RS, PR, MG e MS, foram 100% incompatíveis (não causaram a doença) aos genes *Rps1a*, *Rps1c*, *Rps1k*, e 100% compatíveis aos genes *Rps1d* e *Rps7* (COSTAMILAN *et al.*, 2010).

Não existem maiores estudos sobre a ocorrência de raças de *P. sojae* em regiões específicas do país. Este tipo de estudo é importante para o desenvolvimento e indicação de variedades que contenham genes específicos em seu genótipo visando um melhor controle da doença.

2.2.7 Resistência Parcial

Resistência parcial (também chamada de resistência de campo ou tolerância) tem demonstrado ser eficaz contra todas as raças de *P. sojae*. Em variedades de soja com resistência parcial, a PRF chega a desenvolver a doença, mas com um grau de infecção menor (SCHMITTHENNER, 1985). A resistência parcial pode ser dividida em várias interações hospedeiro-patógeno, ou seja, atributos específicos da resistência, como o número reduzido de locais de infecção, expansão de lesão reduzida, período de tempo mais longo para estruturas reprodutivas se formarem, bem como a esporulação reduzida, são exemplos de mecanismos que a planta dispõe para conter o desenvolvimento da doença (PARLEVLIT, 1979).

O principal componente da resistência parcial à *P. sojae*, é a capacidade de restringir a colonização do patógeno no tecido vegetal. Tooley & Grau (1984a) relataram a partir de avaliações de campo, que existem diferenças no progresso da doença, taxa de infecção, e incidência da doença em plantas de

diferentes estágios de crescimento. Plantas em início de desenvolvimento estão mais sujeitas ao desenvolvimento da doença do que plantas que estão no final do ciclo vegetativo. Além disso, os autores afirmam que as diferenças de rendimento entre as variedades resistentes em solo com grande concentração de *P. sojae*, podem ser atribuídas ao grau de resistência parcial apresentado pelas variedades (TOOLEY & GRAU, 1984b). Em estudos com linhagens de soja, há evidências de que a resistência parcial é herdada como uma característica quantitativa (ANDERSON & BUZZELL, 1982; WALKER & SCHMITTHENNER, 1984).

A resistência parcial tem sido pouco explorada no desenvolvimento de novas variedades. Variedades de soja com resistência parcial à *P. sojae* desenvolvem podridão radicular, mas os danos são limitados em comparação às variedades suscetíveis. Assim, esses genes de resistência parcial, têm fornecido uma possibilidade de manejo para a doença sem impor grande pressão de seleção sobre a população do patógeno. À medida em que a virulência de *P. sojae* e o número de localidades de manifestação da doença em campos de produção de soja continuam aumentando, faz-se necessária a busca por novas fontes de resistência parcial e a incorporação dessa resistência em variedades comerciais para controlar esta doença de forma eficaz (DORRANCE & SCHMITTHENNER, 2000).

Atualmente, o método utilizado para identificar resistência em variedades de soja pode levar à eliminação de linhagens que apresentem um grande nível de resistência parcial já que, introduções de plantas de soja com níveis altos de resistência parcial não pode ser identificados através dos métodos tradicionais (DORRANCE & St. MARTIN, 2000).

Anderson & Buzzell (1982) propõem que a seleção para resistência parcial combinada com a seleção para genes *Rps*, seria a melhor ferramenta para proporcionar o controle da doença a longo prazo, com isso preservando os genes *Rps* por mais tempo. No entanto, é necessário identificar variedades de soja, introduções de plantas e populações com altos níveis de resistência parcial para *P. sojae*. A determinação dos componentes específicos de resistência parcial, que limitam o desenvolvimento da doença no campo, ajuda na utilização, desenvolvimento, implantação rápida deste tipo de resistência em variedades comerciais.

2.2.8 Controle

Há várias décadas, uma série de genes *Rps* tem sido amplamente utilizados em soja para proteção contra esse patógeno. Foram identificados até hoje, 14 alelos de resistência dominantes, mapeados em oito locos, dois destes apresentando uma série alélica, sendo eles: *Rps1a*, *Rps1b*, *Rps1c*, *Rps1d* e *Rps1k*, *Rps2*, *Rps3a*, *Rps3b*, *Rps3c*, *Rps4*, *Rps5*, *Rps6*, *Rps7* e *Rps8* (BURNHAM *et al.*, 2003; DORRANCE & ABNEY, 2004). Provavelmente existam muitos genes responsáveis por conferir essa resistência, ainda desconhecidos dentro do amplo germoplasma de soja (SANDHU, 2005). A presença de apenas um gene de resistência (gene *Rps*) no genótipo já é suficiente para conferir uma reação de hipersensibilidade após infecção do patógeno (SCHMITTHENNER, 1985). No entanto, como em muitos sistemas patógeno-hospedeiro, em que um único gene é amplamente utilizado, a adaptação do patógeno em relação ao hospedeiro pode levar à quebra da resistência (ABNEY *et al.*, 1997; BURNHAM *et al.*, 2003). Com isso faz-se necessária a identificação de novos genes de resistência para novas raças que venham a surgir (DORRANCE & SCHMITTHENNER, 2000).

Os diferentes genes de resistência simples dominantes (*Rps1*, *Rps2*, *Rps3*, *Rps4*, *Rps5*, *Rps6*, *Rps7* e *Rps8*) expressam-se através de uma reação de hipersensibilidade e de acúmulo da fitoalexina gliceolina. O gene *Rps2*, tem sua expressão no sistema radicular e os demais genes atuam no hipocótilo (COSTAMILAN, 2001).

A resistência genética é o principal método de controle da doença, e atua de forma raça específica. O desenvolvimento de fontes de resistência com diferentes genes, mais adaptadas às diversas regiões, se deu através de retrocruzamentos entre as diferentes fontes nativas de resistência para as variedades de soja (COSTAMILAN *et al.*, 2010).

Para a incorporação de novos alelos *Rps* em variedades de alto rendimento, vários anos são necessários, no entanto as perdas de produção devido ao aparecimento de novas raças de *P. sojae* continuarão a ocorrer durante desenvolvimento dessas novas variedades resistentes e, por isso, é importante a busca de novos genes de resistência e a indicação das variedades resistentes para áreas em que ocorram raças específicas de *P. sojae* (WILCOX & St. MARTIN, 1998). Segundo Schmitthenner (1999), o tempo de efetividade da resistência de uma

variedade de soja é de oito a quinze anos. Para que esta resistência perdure por mais tempo, são necessárias combinações ou pirâmidações de vários genes.

Dentre os genes que conferem a resistência à *P. sojae*, o gene *Rps1k* é o mais amplamente utilizado em variedades comerciais, desde o início da década de 1980. Portanto, o gene *Rps1k* confere resistência à *P. sojae* há mais de 20 anos. No entanto, já foram identificadas raças de *P. sojae* que provocam a infecção em variedades com *Rps1k*, em isolados de solo em Indiana e plantas em Iowa (DARRACE & SCHMITTHENNER, 2000). O último gene descrito, que confere resistência à *P. sojae*, foi o gene *Rps8*, identificado na PI 399073 de origem sul-coreana (BURNHAM *et al.*, 2003). Acessos de soja provenientes do centro de origem podem conter novos genes de resistência a *P. sojae* (KYLE *et al.*, 1998)

O controle químico não é eficiente para variedades de baixa tolerância, no entanto altas doses controlam a doença, exceto em condições severas. Para o tratamento de sementes, utiliza-se mefenoxam ou metalaxil (COSTAMILAN *et al.*, 2010). O tratamento do solo é mais efetivo que o tratamento de sementes e formulações secas tem um melhor resultado do que formulações líquidas, pela deposição de parte do produto no solo. O tratamento do solo apresenta limitações tais como o custo e a falta de doses eficazes estabelecidas para o controle (COSTAMILAN, 2001).

A severidade da doença é altamente relacionada com a umidade do solo. Solos com melhores condições de drenagem auxiliam no controle da doença e conseqüentemente na redução das perdas. O tipo do solo é um fator crítico, pois há uma correlação positiva entre densidade de solo e severidade da doença, solos argilosos, mal manejados, podem apresentar maior severidade no ataque da doença em relação a solos arenosos. A rotação de culturas auxilia na redução da população do patógeno no solo, embora seu efeito seja pequeno, em função da longevidade dos oósporos (COSTAMILAN, 2001; SCHMITTHERNER, 1985).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o controle genético da resistência da soja à podridão radicular de fitóftora (PRF) presente nas variedades comerciais BRS 260, BRS 262 e BRS 246RR

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Estudar o número de genes de resistência à PRF nas variedades resistentes descritas acima;
- b) Estudar o padrão de segregação em cruzamentos entre as variedades resistentes e a variedade suscetível BRS 268 pra verificar o número de locos envolvidos na resistência;
- c) Realizar testes de alelismo entre essas variedades resistentes para verificar se existe diferença nos locos envolvidos na resistência para esse grupo de variedades

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESCRIÇÃO DOS MATERIAIS

Os genótipos que constituíram este estudo foram três variedades de soja desenvolvidas pela Embrapa, resistentes à *Phytophthora sojae*, e a variedade BRS 268, suscetível a *P. sojae*, também desenvolvida pela Embrapa.

Variedades resistentes à *P. sojae*:

a) BRS 260: Obtida do cruzamento BRS 133 x CD 201, é uma cultivar de soja convencional com maior potencial de produção em regiões abaixo de 800m. É resistente ao cancro haste, à podridão radicular de fitóftora, à mancha "olho de rã", ao mosaico comum da soja e ao nematóide ramo (*Meloidogyne incognita*). É moderadamente resistente à podridão caule escuro e ao nematóide ramo (*M. javanica*). O hilo é marrom claro, a flor é branca e a pubescência cinza. Sementeira desta cultivar deve ser realizada a partir de 15/10 e durante o mês de Novembro, e quando semeadas em Outubro, ele deve ser corrigido em, bem fertilizado solos. Sementeira pode estender entre 15/10 e 05/12, e sua maturação é considerado semi-precoce.

b) BRS 262: Obtida do cruzamento Sharkey x [Hartwig x (Savana² x BR85-206)]. A BRS 262 é uma cultivar de soja convencional com melhor adaptação em regiões abaixo de 800m. É resistente ao cancro da haste, à mancha "olho de rã" e ao nematóide de cisto (Raças 1 e 3). A cor do hilo é preta, a cor da flor é branca e a pubescência marrom. A semeadura dessa cultivar deve ser realizada, preferencialmente, a partir de 20/10 e durante o mês de novembro em solos de média a alta fertilidade. A época de semeadura estende-se de 15/10 a 10/12. Essa cultivar é considerada de ciclo médio. Possui resistência à podridão radicular de fitóftora;

c) BRS 246RR: Oriunda do cruzamento Embrapa 61 x (BRS 133³ x E96-246), é uma cultivar de soja geneticamente modificada para resistência ao herbicida glyphosate (soja transgênica). A cor do hilo é marrom, a flor branca e a pubescência marrom. É resistente ao cancro da haste, à podridão radicular de fitóftora, à mancha "olho de rã", à podridão parda da haste e ao vírus da necrose da

haste. A época de semeadura estende-se de 15/10 a 10/12. A maturação é considerada semi-precoce.

d) BRS 268: Obtida do cruzamento FT86-309 x FT86-195. BRS 168 é uma cultivar de soja convencional com alto potencial produtivo, recomendada para solos de médias e alta fertilidade. É resistente ao mosaico comum da soja doença pústula bacteriana, ao cancro caule, à mancha "olho de rã" e suscetível à podridão radicular de fitóftora . Apresenta cor de flor branca, pubescência cinza e cor de hilo marrom claro;

4.2 DESENVOLVIMENTO DO MATERIAL EXPERIMENTAL

4.2.1 Experimento 1

Consistiu no cruzamento das variedades comerciais resistentes com a variedade comercial suscetível, totalizando três cruzamentos. Esse experimento visa identificar se cada variedade apresenta um ou mais genes de resistência em seu genótipo.

As plantas F_1 de cada um destes cruzamentos foram autofecundadas e multiplicadas em casa-de-vegetação, a fim de produzir populações de aproximadamente 100-200 plantas F_2 . As plantas F_1 foram trilhadas manualmente para minimizar a perda de sementes.

4.2.2 Experimento 2

Foram desenvolvidos cruzamentos entre as três variedades comerciais resistentes a fim de determinar se a resistência das variedades são controladas por genes de um mesmo loco ou se são provenientes de locos diferentes, totalizando três cruzamentos.

As plantas F_1 de cada um destes cruzamentos foram autofecundadas e multiplicadas em casa-de-vegetação, a fim de produzir populações de aproximadamente 100-200 plantas F_2 . As plantas F_1 foram trilhadas manualmente para minimizar a perda de sementes.

4.3 ISOLADO E PREPARAÇÃO DO INÓCULO

O inóculo foi obtido junto ao laboratório de fitopatologia da Embrapa Soja. O meio de cultura utilizado foi o V8. Os componentes do meio podem ser vistos na tabela 1. Para a confecção desse meio ferve-se o suco V8 + carbonato de cálcio + 1000ml de água, para a dissolução do carbonato, posteriormente acrescenta-se os demais ingredientes e leva-se a autoclave por 15 minutos a 127 °C.

Com o meio autoclavado, transfere-se o meio líquido para placas-de-petri contendo palitos de madeira e espera-se o meio endurecer. Posteriormente são transferidos nove discos de 0,5cm de diâmetro, de uma cultura de *P. sojae* fazendo-se assim a repicagem do patógeno.

O isolado utilizado para a inoculação tem comportamento semelhante a raça 3, sendo compatível com os genes *Rps1d* e *Rps7*.

Tabela 1 – Meio V-8 para manutenção e teste no palito de *Phytophthora sojae*

Produto	Quantidade
Suco V-8	40 ml
Carbonato de cálcio	0,6 g
Sacarose	1,0 g
Extrato de levedura	0,2 g
Agar	20 g
Água destilada	1000 ml

4.4 CONDUÇÃO DA POPULAÇÃO F₂ DO EXPERIMENTO

Na população F₂, foram avaliadas um total de 100 a 200 plantas, a fim de se conhecer o padrão de segregação de cada população. As sementes de cada população F₂ com os respectivos parentais envolvidos nos cruzamentos foram semeados em vaso na casa-de-vegetação sob um delineamento inteiramente casualizado. Os vasos utilizados eram do tamanho médio com capacidade para 4kg e continham uma mistura de terra, areia e esterco em uma proporção de 3:1:1.

A população F_2 foi inoculada com o patógeno (Figura 1) utilizando a metodologia de Keeling (1982), adaptada por Yorinori (1996). As plantas serão inoculadas no hipocótilo, em estágio e desenvolvimento V_1 , através de palitos de madeira contendo o micélio, 1 cm abaixo do cotilédone (Figura 2)

Figura 4 – inoculo de *P. sojae* semelhante ao utilizado no experimento.



Figura 5 – Processo de inoculação da planta que foi utilizado no experimento.



As plantas foram avaliadas sete dias após a inoculação, sendo determinado o tipo de reação para a doença. Plantas que não apresentavam

nenhum tipo de lesão no hipocótilo, somente o calo de inserção do palito, foram classificadas como saudáveis (S) e consideradas resistentes. Indivíduos cujo hipocótilo apresentava lesão além do local de inserção do palito ou coloração marrom no hipocótilo, mas sem morte da planta, foram classificadas como infectadas (I). Plantas que desenvolveram a doença, levando a completa destruição do hipocótilo e morte da planta, foram classificadas como mortas (M). Tanto plantas infectadas quanto as plantas mortas foram classificadas como suscetíveis para fins de análise

Figura 6 –Reação das plantas após inoculação com *P. sojae*. (A) Plantas resistentes, (B) Plantas Infectadas e (C) Plantas mortas.



4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O teste do Qui-Quadrado (χ^2) foi aplicado para aceitar ou rejeitar os padrões de segregação de plantas resistentes e suscetíveis esperadas para a geração F₂ segundo os hipótese mendeliana. Primeiramente os dados foram agrupados em classes ou grupos independentes. Para estabelecer o número de indivíduos esperado por classe, calculam-se as probabilidades de cada classe e multiplica-se pelo tamanho da amostra. As freqüências observadas foram obtidas diretamente pela contagem dos dados da amostra (FERREIRA, 2005).

O Qui-quadrado foi calculado através da equação proposta por Karl Pearson, segundo Ferreira (2005):

$$\chi^2 = \frac{\sum(\text{Observado} - \text{Esperado})^2}{\text{Esperado}}$$

O teste mede a probabilidade das diferenças encontradas nas classes serem ao acaso.

Hipóteses a serem testadas:

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

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

Se o valor calculado para o teste de Qui-Quadrado for maior do que o valor tabelado ao nível de 5% de probabilidade (P < 0,05), rejeita-se H₀.

5 ARTIGO

**HERANÇA DA RESISTÊNCIA DA SOJA À PODRIDÃO RADICULAR DE
FITÓFTORA, EM VARIEDADES COMERCIAIS BRASILEIRAS**

HERANÇA DA RESISTÊNCIA DA SOJA À PODRIDÃO RADICULAR DE FITÓFTORA, EM VARIEDADES COMERCIAIS BRASILEIRAS

Resumo

A podridão radicular de fitóftora (PRF) é uma das doenças mais destrutivas da soja podendo provocar perdas de até 100% no rendimento de grãos. No Brasil, a doença tem ocorrido com maior frequência desde a safra 2005/06, principalmente na região sul. Existem variedades resistentes, mas pouco se conhece sobre a herança da resistência a doença. O objetivo do estudo foi avaliar a herança da resistência à PRF, presentes nas variedades comerciais resistentes BRS 260, BRS 262, BRS 246RR. As populações experimentais foram desenvolvidas a partir do cruzamento das três variedades entre si, e delas com a variedade suscetível BRS 268. As populações F₂ e os parentais utilizados nos cruzamentos, foram inoculados com o patógeno. O teste do qui-quadrado (χ^2) foi aplicado para se verificar a hipótese de segregação mendeliana para as populações F₂ segundo padrões mendelianos. Nas três variedades comerciais resistentes, existem quatro genes envolvidos na determinação da resistência, um na variedade BRS 260, outro na BRS 246RR e dois na variedade BRS 262, todos apresentando dominância completa em relação aos alelos de suscetibilidade.

Palavras-chaves: *Phytophthora sojae*. Padrão de segregação. *Glycine Max*.

INTRODUÇÃO

A soja é o principal produto da agricultura brasileira, colocando o Brasil em segundo lugar no cenário mundial em produção e exportação de grãos. A produção de soja na safra 2010/2011 alcançará, segundo projeções, a marca de 75 milhões de toneladas em uma área de 24,2 milhões de hectares, com produtividade média de 3.106 Kg/ha (CONAB, 2011). Essa posição de destaque deve-se à alta tecnologia aplicada à produção, e pela qualidade das variedades utilizadas, desenvolvidas por diversas instituições de pesquisa.

A podridão radicular de fitóftora (PRF), causada por *Phytophthora sojae* Kaufm. & Gerd, é uma das doenças mais destrutivas da soja, causando morte de plantas em diferentes estágios de desenvolvimento, apodrecimento de sementes, morte de plântulas em pré e pós-emergência e em plantas adultas, apodrecimento de raízes, especialmente em solos mal drenados, podendo levar a reduções de rendimento de grãos de até 100% em variedades altamente suscetíveis (COSTAMILAN *et al.*, 2007; SCHIMITTANNER, 1999).

Os primeiros sintomas foram observados em Indiana em 1948 e em Ohio em 1951, no entanto o agente causal só foi identificado em Ohio e Carolina do Norte em 1954. Desde aquela época, a podridão de fitóftora tem sido relatada em diversos países do mundo. Nos Estados Unidos, tem sido a segunda doença da soja que mais causa prejuízos. Entre 1996 e 1998, a perda média anual estimada foi de mais de 1,2 milhões de toneladas. No Brasil, a doença foi identificada pela primeira vez no Rio Grande do Sul, na safra 1994/95. As primeiras perdas significativas no Brasil foram observadas na safra 2005/06, em várias lavouras do Rio Grande do Sul e do Paraná, em locais de solo compactado. (COSTAMILAN *et al.*, 2007, COSTAMILAN *et al.*, 2010).

Há várias décadas, uma série de genes *Rps* tem sido amplamente utilizados em soja para proteção contra esse patógeno. Até hoje, 14 alelos de resistência dominantes foram identificados e mapeados em oito locos, com uma série alélica em dois destes locos, sendo eles: *Rps1a*, *Rps1b*, *Rps1c*, *Rps1d* e *Rps1k*, *Rps2*, *Rps3a*, *Rps3b*, *Rps3c*, *Rps4*, *Rps5*, *Rps6*, *Rps7* e *Rps8* (BURNHAM *et al.*, 2003; DORRANCE & ABNEY, 2004). Já foi observado que apenas um gene de resistência é suficiente para conferir uma reação de hipersensibilidade após infecção do patógeno (SCHMITTHENNER, 1985). No entanto, como em muitos sistemas patógeno-hospedeiro, em que um único gene é amplamente utilizado, a adaptação do patógeno em relação ao hospedeiro pode levar à quebra da resistência (ABNEY *et al.*, 1997; BURNHAM, *et al.*, 2003). Com isso faz-se necessária a identificação de novos genes de resistência para novas raças que venham a surgir (DORRANCE & SCHMITTHENNER, 2000).

Até 2009, 55 raças de *P. sojae* foram identificadas com base nas reações após a inoculação de linhagens de soja com diferentes conjuntos de genes *Rps*. No Brasil, os isolados descritos na década de 90 pertenciam a raça 1. Em 2009, 21 isolados obtidos no RS, PR, MG e MS, foram 100% incompatíveis (não causaram a doença) aos genes *Rps1a*, *Rps1c*, *Rps1k*, e 100% compatíveis aos genes *RPS1d* e *Rps7* (COSTAMILAN *et al.*, 2010). Monitorar a composição racial e dinâmica da população do patógeno é um componente chave para o desenvolvimento de variedades adaptadas, já que novas raças de *P. sojae* podem aparecer com o lançamento de variedades resistentes (ZHANG *et al.*, 2010).

A resistência genética é o principal método de controle da doença, já que o controle químico não é eficiente (COSTAMILAN *et al.*, 2010). Dentre os genes

que conferem a resistência à *P. sojae*, o gene *Rps1k* é o mais amplamente utilizado em variedades comerciais, no entanto, já foram identificadas raças de *P. sojae* que provocam a infecção em variedades com *Rps1k*, em isolados de Indiana e Iowa (DARRACE & SCHMITTHENNER, 2000). O último gene descrito, que confere resistência à *P. sojae*, foi o gene *Rps8*, identificado na PI 399073 de origem sul-coreana (BURNHAM *et al*, 2003)

No Brasil, existem variedades comerciais resistentes, muitas delas desenvolvidas para outros propósitos. Não existem trabalhos sobre a herança da resistência dessas variedades a PRF. Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar a herança da resistência a PRF presente nas variedades comerciais de soja BRS 246RR, BRS 260 e BRS 262.

MATERIAL E MÉTODOS

Os genótipos que constituíram este estudo foram as variedades resistentes BRS 246RR, BRS 260 e BRS 262, resistentes à *Phytophthora sojae*, e a variedade BRS 268, suscetível. Foram realizados cruzamentos entre as variedades resistentes (RxR), e entre as variedades resistentes e a variedade BRS 268 (RxS). As plantas F₁ de cada um destes cruzamentos foram autofecundadas e multiplicadas em casa-de-vegetação, a fim de produzir populações de aproximadamente 100-200 plantas F₂. As plantas F₁ foram trilhadas manualmente para minimizar a perda de sementes.

A preparação do inóculo foi realizada no laboratório de fitopatologia da Embrapa Soja. O meio de cultura utilizado foi o V-8 (40 ml de Suco V-8, 0,6g de Carbonato de cálcio, 1g de sacarose, 0,2g de extrato de levedura, 20g de Agar e 1000 ml de água destilada), após a mistura dos componentes, o meio foi autoclavado por 15 minutos a 127 °C em seguida transferido para Placas de Petri de tamanho médio contendo os palitos de madeira. Após o endurecimento do meio foi inserido em cada placa nove discos de 0,5cm de diâmetro contendo o patógeno. O período de desenvolvimento do inóculo nas placas foi de 10 dias.

As sementes de cada população F₂, junto com os parentais envolvidos em cada cruzamento, foram semeadas em vasos de 4 kg, em casa-de-vegetação, sob delineamento inteiramente casualizado. As plantas foram inoculadas no hipocótilo sete dias após a semeadura, em estágio de desenvolvimento V1,

através de palitos de madeira contendo o micélio, 1 cm abaixo do cotilédone. Cada população F₂ foi inoculada com o patógeno utilizando a metodologia de Keeling (1982), adaptada por Yorinori (1996). A variedade BRS 268 foi avaliada em todos os experimentos independente de ser parental em algum cruzamento já que, por ser suscetível a PRF, foi utilizada como padrão de suscetibilidade, para avaliar a eficácia da inoculação.

As plantas foram avaliadas sete dias após a inoculação, sendo determinado o tipo de reação para a doença. Plantas que não apresentavam nenhum tipo de lesão no hipocótilo, somente o calo de inserção do palito, foram classificadas como sadias (S) e consideradas resistentes. Indivíduos cujo hipocótilo apresentava lesão além do local de inserção do palito ou coloração marrom no hipocótilo, mas sem morte da planta, foram classificadas como infectadas (I). Plantas que desenvolveram a doença, levando a completa destruição do hipocótilo e morte da planta, foram classificadas como mortas (M). Tanto plantas infectadas quanto as plantas mortas foram classificadas como suscetíveis para fins de análise. O teste do Qui-Quadrado (χ^2) foi aplicado para aceitar ou rejeitar os padrões de segregação de plantas resistentes e suscetíveis esperadas para a geração F₂ segundo os padrões mendelianos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise dos Parentais e Padrão Suscetível

Em condições ideais, espera-se que nenhuma planta das variedades resistentes desenvolva a doença e que nenhuma planta da variedade BRS 268 apresente-se sadia. Os dados referentes a essas variedades estão na tabela 2.

Tabela 2 – Número de plantas sadias, infectadas e mortas após inoculação com *P. sojae* sobre o padrão suscetível BRS 268 e sobre as Variedades resistentes

Variedade	Sadias	%S	Infectadas	Mortas	%IM	Total
BRS 268	39	0,21	128	23	0,79	190
BRS 260	22	1,00	0	0	0,00	22
BRS 262	49	0,98	1	0	0,02	50
BRS 246RR	42	0,86	5	2	0,14	49

* %S: porcentagem de plantas sadias, %IM: porcentagem de plantas infectadas mais mortas

A variedade suscetível BRS 268 apresentou no experimento 21% de plantas sadias e, conseqüentemente, a eficiência da inoculação (% de plantas mortas e infectadas) foi de 79%. Esse resultado está dentro da normalidade encontrada em estudos envolvendo *P. sojae* devido à dificuldade de se trabalhar com esse patógeno. Isso indica que o método utilizado para inoculação não é o ideal para trabalhos qualitativos, no entanto é o que apresenta resultados mais representativos, segundo avaliações desenvolvidas na Embrapa Soja.

A variedade BRS 268 apresentou um grande número de plantas classificadas como infectadas. Uma das dificuldades encontradas nos experimentos é a classificação das plantas infectadas. Plantas infectadas são aquelas que, no momento da avaliação, apresentam sintomas da doença, mas não apresentam destruição total do hipocótilo, sendo assim a planta continua viva. Existe uma dificuldade em classificar essas plantas, pois algumas podem sobreviver mesmo com a infecção de *P. sojae*. Sendo assim as plantas infectadas serão classificadas como suscetíveis já que o patógeno conseguiu se estabelecer mesmo não levando à morte.

Com exceção da variedade BRS 260, as variedades resistentes apresentaram algumas plantas mortas e/ou infectadas quando inoculadas com *P. sojae*. A variedades BRS 262 não apresentou indivíduos mortos, mas apresentou um indivíduo infectado. Para essas duas variedades, o percentual de plantas sadias esteve próximo do ideal (100% e 98%, respectivamente) esperado para variedades resistentes.

A variedade BRS 246RR apresentou indivíduos mortos e infectados após a inoculação, apresentando um percentual de plantas sadias de 86%, o que indica que o gene de resistência presente nessa variedade não foi tão estável quanto aqueles presentes nas outras duas variedades. Mesmo com a presença de plantas mortas e infectadas a variedade BRS 246RR pode ser considerada uma variedade resistente devido à grande frequência de indivíduos sadios (86%).

Cruzamentos do tipo “Resistente x Suscetível (RxS)”

Para determinar o número de genes presentes em cada uma das variedades utilizadas no estudo, a população F₂ de cada cruzamento entre uma variedade resistente e a variedade BRS 268 foi analisada seguindo os mesmos

padrões dos parentais descritos acima. Os resultados estão representados na tabela 3.

Tabela 3 – Número de plantas saudias, infectadas e mortas após inoculação com *P. sojae* sobre os cruzamentos entre variedades resistentes com a variedade suscetível BRS 268

Cruzamento	Sadias	%S	Infectadas	Mortas	%IM	Total
BRS 246RR x BRS 268	81	0,81	8	11	0,19	100
BRS 260 x BRS268	106	0,71	33	11	0,29	150
BRS 262 x BRS 268	109	0,92	6	4	0,08	119

* %S: porcentagem de plantas saudias, %IM: porcentagem de plantas infectadas mais mortas

Todos os cruzamentos envolvendo as três variedades apresentaram resultados semelhantes, com um maior número de plantas saudias em relação a plantas mortas e infectadas, isso indica que provavelmente a resistência tenha origem em genes que apresentam dominância completa e/ou maior número de genes envolvidos na resistência.

Os números observados de plantas resistentes e suscetíveis na população F_2 , os números esperados segundo o modelo de segregação mendeliano, os valores de χ^2 e suas probabilidades estão resumidos na tabela 4.

Tabela 4 – Número de plantas resistentes e suscetíveis observadas (F_o) e esperadas (F_e) de acordo com o padrão de segregação proposto para a geração F_2 após a inoculação com *P. sojae* e teste do qui-quadrado para cada cruzamento RxS.

Cruzamento	Resistente		Suscetível		χ^2	P	Padrão de segregação
	F_o	F_e	F_o	F_e			
BRS 246RR x BRS 268	81	75	19	25	1,92	0,17	<u>03:01</u>
BRS 260 x BRS 268	106	112,5	44	37,5	1,50	0,22	<u>03:01</u>
BRS 262 x BRS 268	109	111,56	10	7,44	0,94	0,33	<u>15:01</u>

* F_o : Frequência observada; F_e : Frequência esperada; P: probabilidade

Para realização do teste de qui-quadrado, as classes infectadas e mortas foram agrupadas e classificadas como suscetíveis, assim assumimos que todas as plantas que desenvolvem a doença são suscetíveis.

Os dados obtidos foram testados para diferentes padrões de segregação e o que melhor se enquadrou nos resultados observados foi assumido como o correto, levando em consideração os cruzamentos entre as três variedades, os cruzamentos RxS e o desempenho dos parentais no experimento.

Os cruzamentos BRS 246RR x BRS 268 e BRS 260 x BRS268 apresentaram um valor de qui-quadrado não significativo quando testados para o padrão de segregação de três resistentes para cada planta suscetível (03R:01S), indicando a presença de um gene dominante conferindo a resistência a *P. sojae* nesses dois cruzamentos.

Analisando a genealogia desses dois cruzamentos, é possível observar que ambos apresentam a variedade BRS 133 como um dos ancestrais. A variedade BRS 133 é suscetível à *P. sojae*, por isso a provável origem da resistência a *P. sojae* seja proveniente do outro parental.

A variedade BRS 246RR, foi originada do cruzamento Embrapa 61 x (BRS 133^s x E96-246). As variedades BRS 66, BRS 133, Embrapa 61 são consideradas variedades irmãs, pois o mesmo cruzamento (FT Abyara x BR83-147) deu origem as três variedades. No entanto somente as variedades BRS 66 e Embrapa 61 são resistentes a *P. sojae*, com isso podemos afirmar que um dos parentais utilizados no desenvolvimento apresenta resistência a *P. sojae*, mas essa resistência foi herdada somente por alguns de seus descendentes. A diferença na resistência entre essas variedades deve-se ao fato de que essas variedades não foram selecionadas para a resistência a *P. sojae* durante o desenvolvimento. Sendo assim, a provável herança da resistência da variedade BRS 246RR seja a variedade Embrapa 61, pois essa é descrita como resistente a PRF.

A variedade BRS 260, foi obtida do cruzamento BRS 133 x CD 201, como se sabe que a variedade BRS 133 não apresenta resistência a *P. sojae*, a provável origem da resistência é a variedade CD 201. A variedade CD 201, foi desenvolvida do cruzamento Ocepar 4 Iguazu x Willians 20, através de estudos realizados anteriormente na Embrapa Soja, sabe-se que a variedade Willians 20 não apresenta resistência a PRF. A variedade Ocepar 4 iguaçu, foi desenvolvida do cruzamento Davis x (Davis x Bragg), quando submetidos ao teste com *P. sojae*, a variedade Bragg não apresentou resistência a PRF e a variedade Davis apresentou uma resistência desuniforme com 30% de plantas sadias e 70% de plantas

infectadas e mortas. Infere-se portanto que a resistência presente na variedade BRS 260 tem origem da variedade CD 201.

No caso da variedade BRS 260, sabe-se que a variedade CD 201 é resistente à essa raça de fitóftora, enquanto no caso da BRS 246RR, a Embrapa 61 seria a fonte de resistência.

No cruzamento BRS 262 x BRS 268 o padrão de segregação mendeliano de 03R:01S foi rejeitado ($P= 0,00$, valores não apresentados) indicando que mais de um gene deve estar envolvido na resistência da variedade BRS 262. O padrão de segregação que melhor se enquadra nos dados observados é o de 15 resistentes para cada planta suscetível (15R:01S), indicando que existe a segregação independente de dois genes de resistência dominantes. Através de uma busca realizada no banco de dados do *Germplasm Resources Information Network's* (GRIN), pode-se verificar que a variedade Sharkey, um dos parentais da variedade BRS 262, apresenta os genes *Rps1c* e *Rps3* em seu genótipo, sendo assim, essa é a provável origem dos dois genes de resistência presentes nessa variedade.

Cruzamentos do tipo “Resistente x Resistente (RxR)”

Nos cruzamentos do tipo “RxR” foi possível verificar a independência entre os genes de resistência, atestada pela presença de indivíduos suscetíveis na população F_2 e, no caso de confirmar a segregação, determinar se o padrão de segregação indicado nos cruzamentos “RxS” se aplica para os cruzamentos RxR. Os dados da Tabela 5 representam a proporção de plantas sadias, infectadas e mortas da população F_2 após a inoculação com *P. sojae*.

Tabela 5 – Número de plantas sadias, infectadas e mortas após inoculação com *P. sojae* sobre os Cruzamentos entre variedades resistentes.

Cruzamento	Sadias	%S	Infectadas	Mortas	%IM	Total
BRS 246RR x BRS 260	136	0,93	11	0	0,07	147
BRS 246RR x BRS 260	139	0,96	1	5	0,04	145
BRS 246RR x BRS 262	140	0,97	0	5	0,03	145
BRS 260 x BRS 262	149	0,99	1	0	0,01	150

* %S: porcentagem de plantas sadias, % IM: porcentagem de plantas infectadas mais mortas

Todos os cruzamentos foram submetidos ao mesmo critério de inoculação e avaliação dos experimentos anteriores. O cruzamento BRS 246RR x BRS 260 foi avaliado duas vezes pela disponibilidade de sementes. Os dados referentes ao teste do qui-quadrado podem ser vistos na tabela 6.

Tabela 6 – Número de plantas resistentes e suscetíveis observadas (F_o) e esperadas (F_e) de acordo com o padrão de segregação proposto para a geração F_2 após a inoculação com *P. sojae* e teste do qui-quadrado (χ^2) para cada cruzamento “RxS”.

Cruzamento	Resistentes		Suscetíveis		χ^2	P	Padrão de segregação
	F_o	F_e	F_o	F_e			
BRS 246RR x BRS 260	136	137,81	11	9,19	0,38	0,54	15:01
BRS 246RR x BRS 260	139	135,94	6	9,06	1,10	0,29	15:01
BRS 246RR x BRS 262	140	142,73	5	2,26	3,35	0,07	63:01
BRS 260 x BRS 262	149	147,66	1	2,34	0,78	0,38	63:01

* F_o : Frequência observada; F_e : Frequência esperada; P: probabilidade

Para o cruzamento BRS 246RR x BRS 260 foram identificados uma grande quantidade de infectados na primeira avaliação, mas nenhum morto, no entanto na segunda avaliação houve uma mudança na distribuição dessas classes com um maior número de indivíduos mortos. O padrão de segregação de 15R:01S não foi rejeitado pelo teste de qui-quadrado ($P < 0,05$), compatível com a presença de dois genes de resistência dominantes, segregando nesse cruzamento. Como houve segregação de dois genes, podemos concluir que a variedade BRS 246RR têm um gene de resistência a *P. sojae* diferente da variedade BRS 260.

Os cruzamentos BRS 246RR x BRS 262 e BRS 260 x BRS 262 apresentaram um padrão e segregação de 63 plantas resistentes para cada planta suscetível (63R:01S). Esse padrão de segregação indica a presença de três genes de resistência segregando independentemente, sendo dois em uma variedade e um em outra. Com base nos dados dos cruzamentos RxR, podemos concluir que os genes pertencentes à variedade BRS 262 estão em locos distintos em relação aos locos de cada uma das variedades BRS 246RR e BRS 260.

CONCLUSÃO

Com base nos dados obtidos nos experimentos pode-se concluir que para esse grupo de três variedades, existem quatro genes *Rps* segregando independentemente que podem ser explorados para desenvolvimento de novas variedades resistentes a *P. sojae*, um em BRS 246RR, outro em BRS 260 e mais dois na BRS 262.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para identificar quais são os genes presentes nessas variedades, teste de alelismo entre as variedades e as fontes de resistência descritas devem ser feitos, facilitando assim o uso racional desses genes para o controle genético da doença devido a característica raça-específica do patógeno.

Pode-se ressaltar que não existem maiores informações sobre a ocorrência e prevalência das raças de *P. sojae* nas diversas regiões do Brasil. Estudos nesse sentido devem ser feitos para o desenvolvimento de variedades específicas para determinadas regiões.

Além das variedades apresentadas nesse trabalho a variedade BRSMG 752S também foi avaliada para a resistência a *P. sojae*, no entanto os resultados apresentados por essa variedade não foram satisfatórios. A variedade BRSMG 752S é descrita como resistente a PRF, mas quando testada não apresentou uniformidade nos resultados. Em um primeiro teste, a variedade mostrou-se resistente, sugerindo a segregação de um gene dominante, com um alto número de plantas infectadas, o que não demonstrava clareza nos dados. Quando testado pela segunda vez, a variedade mostrou-se resistente, contudo a segregação dos cruzamentos “RxS” e “RXR” sugeria a segregação de um gene recessivo. Segundo Dorrance & Abney (2004), todos os genes de resistência são dominantes o que exclui a possibilidade da resistência a PRF presente na variedade BRSMG 752S ser originada de um gene recessivo. Novos testes serão feitos com essa variedade para determinar a herança da resistência.

REFERÊNCIAS

- ABNEY, T. S.; MELGAR, J. C.; RICHARDS, T. L.; SCOTT, D. H.; GROGAN, J.; YOUNG, J. New races of *Phytophthora sojae* with *Rps1d* virulence. **Plant Disease**, v. 81, p. 653-655, 1997
- ANDERSON, T. R., BUZZELL, R. L. Efficacy of metalaxyl in controlling *Phytophthora* root and stalk rot of soybean variedades differing in field tolerance. **Plant Disease**, v. 66, p. 1144-1145, 1992.
- BURNHAM, K. D.; DORRANCE, A. E.; FRANCIS, D. M.; FIORITTO, R. J.; ST. MARTIN, S. K. *Rps8*, a new locus in soybean for resistance to *Phytophthora sojae*. **Crop Science**, v. 43, p. 101-105, 2003.
- BURNHAM, K. D., DORRANCE, A. E., VAN TOAI, T. T., AND ST. MARTIN, S. K. Quantitative trait loci for partial resistance to *Phytophthora sojae* in soybean. **Crop Science**, v.43 p. 1610-1617, 2003.
- CAB INTERNATIONAL. **Crop protection compendium. 2006.**
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB, **Série Histórica de Área Plantada, Produtividade e Produção (Safras 1976/77 a 2010/11)**, 2011.
- COSTAMILAN, L. M. A podridão radicular de raiz e haste de soja. In: LUZ, E. D. M. N.; SANTOS, A. F. dos; MATSUOKA, K.; BEZERRA, J. L. (Ed.). **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**. Campinas: Rural, p. 678-730, 2001.
- COSTAMILAN, L. M. Estresses ocasionados por doenças e por nematóides. In: BONATO, E. R. (ed) **Estresses da soja**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 254 pp, 2000.
- COSTAMILAN, L. M.; BERTAGNOLLI, P. F.; MORAES, R. M. A. de. **Podridão radicular de fitóftora em soja**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 23p, 2007. html. (Embrapa Trigo. Documentos Online, 79).
- COSTAMILAN, L. M.; SOARES, R. M.; BERTAGNOLLI, P. F. Podridão radicular de fitóftora (*Phytophthora sojae*). In: ALMEIDA, A. M. R.; SEIXAS, C. D. S. (Ed.). Soja: Doenças Radiculares e de Hastes e Inter-relações com o Manejo do Solo e da Cultura. Londrina: Embrapa Soja, p. 105-126, 2010
- DORRANCE, S. E.; JIA, H.; ABNEY, T. S. Evaluation of soybean differentials for their interaction with *Phytophthora sojae*. **Plant Health Progress**, 2004.
- DORRANCE, A. E., SCHMITTHENNER, A. F. New sources of resistance to *Phytophthora sojae* in the soybean plant introductions. **Plant Disease**, v. 84, N° 12, 2000.
- FARR, D. F.; ROSSMAN, A. Y.; PALM, M. E.; MCCRAY, E. B. **Fungal databases, systematic mycology and microbiology laboratory, ARS, USDA**. 2007.
- FERREIRA, D. F. **Estatística básica**. Lavras: Editora UFLA, 2005. 664p.

- GRAU, C. R., DORRANCE A. E; BOND, J., AND RUSSIN, J. S. Phytophyhora Root and Stem Rot *In*: BOERMA, H. R. & SPECHT, J. E. **Soybeans: Improvement, Production, and Uses**, Agronomy Monograph, p. 689-696, 2004
- HART, L. P., KAITANY, R. C., SAFIR, G. R. Virulence Composition of *Phytophthora sojae* in Michigan. **Plant Disease**, v. 85, n. 10p. 1103-1106, 2001.
- KEELING B. L. A seedling test for resistance to soybean stem canker caused by *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*. **Phytopathology**, v. 72, p.807-809, 1982.
- KYLE D. E.; NICKELL, C. D.; NELSON, R. L.; PEDERSEN, W. L. Response of soybean accessions from provinces in southern China to *Phytophthora sojae*. **Plant Disease**, v. 82 p. 666-559, 1998.
- LEITZ, R. A., HARTMAN, G. L., PEDERSEN, W. L., NICKELL, C. D. Races of *Phytophthora sojae* on soybean in Illinois . **Plant Disease**, v.84 p.487, 2000.
- MISSÃO, M. R. Soja: origem, classificação, utilização e uma visão abrangente do mercado. **Maringá Management: Revista de Ciências Empresariais**, v. 3, n.1 – p. 7-15, jan./jun. 2006.
- PARLEVILET, J. E. Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. **Annual Review Phytopathology**, v.17, p.203-222, 1979.
- SANDHU D., SCHALLOCK K. G., RIVERA-VELEZ N., LUNDEEN P., CIANZIO S., BHATTACHARYYA M. K.; Soybean *Phytophthora* resistance gene Rps8 maps closely to the Rps3 region. **Journal of Heredity**, 2005.
- SCHMITTHENNER, A. F. Phytophthora rot. In: HARTMAN. G. L., SINCLAIR, J. B.; RUPE, J. C. (Ed). **Compendium of soybean diseases**. 4 ed. Saint Paul: APS Press, p. 39-42, 1999.
- SCHMITTHENNER, A. F.. Problems and progress in control of Phytophthora root rot of soybean. **Plant Disease**, v.69, p. 362–368, 1985.
- TOOLEY, P. W., GRAU, C. R.. Field characterization of rate-reducing resistance to *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* in soybean. **The American Phytopathological Society**. v. 74, n. 10, p. 1201-1208, 1984a.
- TOOLEY, P. W. and GRAU, C. R. The relationship between rate-reducing resistance to *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea* and yield of soybean. **The American Phytopathological Society**. v. 74, n. 10, p. 1209-1216, 1984b.
- TYLER, B. M. *Phytophthora sojae*: root rot pathogen of soybean and model oomycete. **Molecular Plant Pathology**, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2007.
- WALKER, A. K., SCHMITTHENNER, A. F. Heritability of tolerance to *Phytophthora* rot in soybean. **Crop Science**, v. 24, p. 490-491, 1984.
- WHATHER, J. A.; STIENSTRA, W. C.; KOENNING, S. R. Soybean diseases loss estimates for the United States from 1996 to 1998. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 23, p. 122-131, 2001.

WILCOX, J. R.; ST. MARTIN, S. K. Soybean genotypes resistant to *Phytophthora sojae* and compensation for field losses of susceptible isolines. **Plant Disease**, v. 82, p. 303-306, 1998.

YANG, X. B.; RUFF, R. L.; MENG, X. Q., WORKNEH, F. Races of *Phytophthora sojae* in Iowa Soybean Fields. **Plant Disease**, v.80, n.12, p. 1418-1420, 1996.

YORINORI J. T. **Cancro da haste da soja: epidemiologia e controle**. Londrina: Embrapa Soja, 1996. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 14).

ZHANG, S.; XUE, A. G. Population biology and management strategies of *Phytophthora sojae* causing *Phytophthora* root. **CAB international**, p. 318-328, 2010

ANEXOS

ANEXO A – Número de plantas resistentes e suscetíveis 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 (χ^2) para o cruzamento BRS 246RR x BRS 268.

Cruzamento	Resistentes		Suscetíveis		χ^2	P	Proporção
	Fo	Fe	Fo	Fe			
BRS 246RR x BRS 268	81	75,00	19	25,00	1,92	0,17	03:01
BRS 246RR x BRS 268	81	93,75	19	6,25	27,74	0,00	15:01
BRS 246RR x BRS 268	81	98,44	19	1,56	197,69	0,00	63:01

* Fo: Frequência observada; Fe: Frequência esperada; P: probabilidade

ANEXO B – Número de plantas resistentes e suscetíveis 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 (χ^2) para o cruzamento BRS 260 x BRS 268.

Cruzamento	Resistentes		Suscetíveis		χ^2	P	Proporção
	Fo	Fe	Fo	Fe			
BRS 260 x BRS268	106	112,50	44	37,50	1,50	0,22	03:01
BRS 260 x BRS268	106	140,63	44	9,38	136,41	0,00	15:01
BRS 260 x BRS268	106	147,66	44	2,34	752,12	0,00	63:01

* Fo: Frequência observada; Fe: Frequência esperada; P: probabilidade

ANEXO C – Número de plantas resistentes e suscetíveis 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 (χ^2) para o cruzamento BRS 262 x BRS 268.

Cruzamento	Resistentes		Suscetíveis		χ^2	P	Proporção
	Fo	Fe	Fo	Fe			
BRS 262 x BRS 268	109	89,25	10	29,75	17,48	0,00	03:01
BRS 262 x BRS 268	109	111,56	10	7,44	0,94	0,33	15:01
BRS 262 x BRS 268	109	117,14	10	1,86	36,21	0,00	63:01

* Fo: Frequência observada; Fe: Frequência esperada; P: probabilidade

ANEXO D – Número de plantas resistentes e suscetíveis 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 (χ^2) para o cruzamento BRS 246RR x BRS 260.

Cruzamento	Resistentes		Suscetíveis		χ^2	P	Proporção
	Fo	Fe	Fo	Fe			
BRS 246RR x BRS 260	136	110,25	11	36,75	24,06	0,00	03:01
BRS 246RR x BRS 260	136	137,81	11	9,19	0,38	0,54	15:01
BRS 246RR x BRS 260	136	144,70	11	2,30	33,50	0,00	63:01

* Fo: Frequência observada; Fe: Frequência esperada; P: probabilidade

ANEXO E – Número de plantas resistentes e suscetíveis 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 (χ^2) para o cruzamento BRS 246RR x BRS 260.

Cruzamento	Resistentes		Suscetíveis		χ^2	P	Proporção
	Fo	Fe	Fo	Fe			
BRS 246RR x BRS 260	139	108,75	6	36,25	33,66	0,00	03:01
BRS 246RR x BRS 260	139	135,94	6	9,06	1,10	0,29	15:01
BRS 246RR x BRS 260	139	142,73	6	2,27	6,25	0,01	63:01

* Fo: Frequência observada; Fe: Frequência esperada; P: probabilidade

ANEXO F – Número de plantas resistentes e suscetíveis 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 (χ^2) para o cruzamento BRS 246RR x BRS 262.

Cruzamento	Resistentes		Suscetíveis		χ^2	P	Proporção
	Fo	Fe	Fo	Fe			
BRS 246RR x BRS 262	140	108,75	5	36,25	35,92	0,00	03:01
BRS 246RR x BRS 262	140	135,94	5	9,06	1,94	0,16	15:01
BRS 246RR x BRS 262	140	142,73	5	2,27	3,35	0,07	63:01

* Fo: Frequência observada; Fe: Frequência esperada; P: probabilidade

ANEXO G – Número de plantas resistentes e suscetíveis 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 (χ^2) para o cruzamento BRS 260 x BRS 262.

Cruzamento	Resistentes		Suscetíveis		χ^2	P	Proporção
	Fo	Fe	Fo	Fe			
BRS 260 x BRS 262	149	112,50	1	37,50	47,37	0,00	03:01
BRS 260 x BRS 262	149	140,63	1	9,38	7,98	0,00	15:01
BRS 260 x BRS 262	149	147,66	1	2,34	0,78	0,38	63:01

* Fo: Frequência observada; Fe: Frequência esperada; P: probabilidade