

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTUDO DE HERANÇA GENÉTICA DA RESISTÊNCIA À
Macrophomina phaseolina NA CULTURA DA SOJA**

**Eduardo Henrique Bizari
Tecnólogo em Biocombustíveis**

2018

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTUDO DE HERANÇA GENÉTICA DA RESISTÊNCIA À
Macrophomina phaseolina NA CULTURA DA SOJA**

Eduardo Henrique Bizari

Orientador: Profa. Dra. Sandra Helena Unêda-Trevisoli

Coorientadora: Profa. Dra. Rita de Cássia Panizzi

Coorientador: Prof. Dr. Antonio Orlando Di Mauro

**Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de
doutor em Agronomia (Genética e
Melhoramento de Plantas)**

2018

B625e Bizari, Eduardo Henrique
Estudo de herança genética da resistência à *Macrophomina phaseolina* na cultura da soja / Eduardo Henrique Bizari. --
Jaboticabal, 2018
vii, 49 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2018
Orientador: Sandra Helena Unêda-Trevisoli
Banca examinadora: Adriana Zanin Kronka, Everlon Cid Rigobelo, Viviane Formice Vianna, Walter Maldonado Junior
Bibliografia

1. *Glycine max*. 2. Podridão de carvão. 3. Resistência genética. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.52:633.34

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: ESTUDO DE HERANÇA GENÉTICA DA RESISTÊNCIA À *Macrophomina phaseolina* NA CULTURA DA SOJA

AUTOR: EDUARDO HENRIQUE BIZARI

ORIENTADORA: SANDRA HELENA UNÊDA TREVISOLI

COORIENTADOR: ANTONIO ORLANDO DI MAURO

COORIENTADORA: RITA DE CÁSSIA PANIZZI

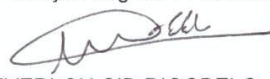
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AGRONOMIA (GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. SANDRA HELENA UNÊDA TREVISOLI
Departamento de Produção Vegetal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



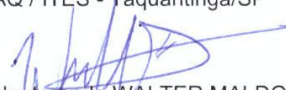
Profa. Dra. ADRIANA ZANIN KRONKA
Depto de Proteção Vegetal / FCA/UNESP - Botucatu/SP



Prof. Dr. EVERLON CID RIGOBELLO
Departamento de Produção Vegetal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. VIVIANE FORMICE VIANNA
FETAQ / ITES - Taquaritinga/SP



Pós-doutorando WALTER MALDONADO JUNIOR
Departamento de Ciências Exatas / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 20 de fevereiro de 2018

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Eduardo Henrique Bizari – nascido em 27 de novembro de 1985, em Catanduva, Estado de São Paulo. Em 2009, ingressou no curso de Tecnologia em Biocombustíveis na Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal (FATEC), Jaboticabal – SP, obtendo o título de Tecnólogo em Biocombustíveis em fevereiro de 2012. Foi bolsista de iniciação científica da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), no período de fevereiro a dezembro de 2011. Em março de 2012, iniciou o curso de Mestrado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) pela Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – SP, obtendo o título de mestre em fevereiro de 2014. Em 2012, iniciou o curso de Engenharia Agrônoma no Instituto Taquaritinguense de Ensino Superior (ITES) – Taquaritinga-SP, obtendo o título de engenheiro agrônomo em dezembro de 2016. Em março de 2014, iniciou o curso de Doutorado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) pela Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – SP, sob orientação da Profa. Dra. Sandra Helena Unêda –Trevisoli. Durante o período da realização do curso, foi inicialmente bolsista CAPES e, posteriormente, bolsista CNPq.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – SP e ao Departamento de Produção vegetal, pela estrutura e suporte.

À Profa. Dra. Sandra Helena Unêda-Trevisoli, pela oportunidade, empenho e dedicação, indispensáveis em minha formação.

À Profa. Rita de Cássia Panizzi, pela amizade e dedicação em repassar conhecimentos indispensáveis em todas as etapas do projeto.

Ao Prof. Dr. Antonio Orlando Di Mauro, pela coorientação deste trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas;

À CAPES e CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

Aos meus pais, José Eduardo Bizari e Mônica Borduque Pasqualatto Bizari por todo o suporte e pelo amor incondicional.

À toda minha família pela força e apoio nessa etapa, em especial à minha irmã Thays Bizari.

À minha namorada Carolina Franco, pelo apoio e ajuda nos momentos difíceis.

Aos amigos e colegas de Departamento: Bruno, Cléber, Eder, Fabiana, Elise, Antonio, Wallace, Aretha, Paulo e Guilherme.

Ao técnico Geraldo e auxiliar de campo Rubens (Faro), pela colaboração na execução dos trabalhos de campo.

Aos demais funcionários do Departamento pelo auxílio em tantos momentos.

Muito Obrigado!

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 A cultura da soja	3
2.2 Importância econômica	4
2.3 Melhoramento Genético da Soja	5
2.4 Doenças da soja	6
2.5 <i>Macrophomina phaseolina</i>	6
2.5.1 Aspectos gerais	6
2.5.2 Características do fungo	8
2.5.3 Sintomas da doença	9
2.6 Estudo de herança genética.....	10
3 REFERÊNCIAS	11
CAPÍTULO 2 - MÉTODOS DE INOCULAÇÃO E AVALIAÇÃO DE RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS DE SOJA A <i>Macrophomina phaseolina</i>	15
RESUMO.....	15
ABSTRACT	16
1 INTRODUÇÃO	17
2 MATERIAL E MÉTODOS	18
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4 CONCLUSÕES	28
5 REFERÊNCIAS	28
CAPÍTULO 3 - ESTUDO DE HERANÇA GENÉTICA DA RESISTÊNCIA A <i>Macrophomina phaseolina</i> NA CULTURA DA SOJA.....	30
RESUMO.....	30
ABSTRACT	31
1 INTRODUÇÃO	32
2 MATERIAL E MÉTODOS	34
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4 CONCLUSÕES	47
5. REFERÊNCIAS	47

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é a oleaginosa mais importante no Brasil, destacando-se como o principal produto agrícola exportado pelo país. No ano agrícola 2016/2017, a produção nacional foi de 114,09 milhões de toneladas, mantendo o país como o segundo maior produtor mundial de soja (CONAB, 2017).

Para o Brasil, o complexo soja tem expressiva importância econômica, pois envolve amplo número de organizações ligadas aos mais diversos setores econômicos e desempenha papel fundamental para o produto interno bruto (PIB), bem como para a geração de divisas (HIRAKURI; LAZZAROTTO, 2011).

Apesar do sucesso produtivo, o aumento da incidência de doenças tem se tornado um dos principais desafios enfrentados pelos produtores no Brasil e no mundo. Esse problema se deve principalmente pela expansão da cultura em novas áreas e a utilização de práticas inadequadas. Mesmo com o emprego de fungicidas e outras técnicas que visam o controle ou a eliminação dos patógenos, as doenças fúngicas são responsáveis por grandes prejuízos nas colheitas todos os anos.

Dentre as doenças fúngicas que afetam a cultura da soja, a podridão de carvão causada pelo patógeno *Macrophomina phaseolina* apresenta grande dificuldade de controle, pois é um fungo que ataca mais de 500 espécies de monocotiledôneas e dicotiledôneas, é habitante natural do solo, possui grande variabilidade patogênica e alta capacidade de sobrevivência sob condições adversas, sendo favorecido por condições de alta temperatura e baixa umidade do solo, ou seja, clima quente e períodos de seca (WYLLIE; CALVERT, 1969; ALMEIDA et al., 2014).

Embora seja uma doença relacionada à deficiência hídrica e altas temperaturas, é possível observar perda de rendimento de até 33% mesmo em ambientes irrigados, sugerindo que trata-se de doença importante, mesmo em um ambiente onde há umidade adequada (MENGISTU; SMITH; RAY, 2011).

A soja pode ser infectada logo após sua emergência, porém os sintomas da podridão de carvão são mais frequentemente observados na raiz e haste após o florescimento, principalmente nos estádios de desenvolvimento R5, R6 e R7 (FEHR;

CAVINESS, 1977; SHORT; WYLLIE, 1978). Como sintomas, as plantas podem apresentar murchas, morte prematura e as folhas mortas permanecem ligadas às hastes.

O fungo *Macrophomina phaseolina* pode causar grandes perdas na produção, sendo que, até o presente momento, nenhum cultivar foi identificado com resistência a esse fungo (ALMEIDA et al., 2014). Trabalhos anteriores indicam genótipos com bons níveis de resistência e que podem ser utilizados em programas de melhoramento visando à obtenção de cultivares que tolerem, mesmo que parcialmente, a ação dessa doença (MENGISTU et al., 2007; MENGISTU et al., 2013).

Com relação à esta enfermidade, não há ainda um consenso sobre os métodos de inoculação e avaliação desse patógeno e pouco se sabe quanto ao grau de resistência das cultivares de soja brasileiras. Para o desenvolvimento de genótipos resistentes a esse patógeno, é importante estabelecer métodos de inoculação e avaliação não destrutivos, visto que o melhoramento genético necessita que a planta complete o ciclo para compor nova geração. Além disso, trabalhos com *M. phaseolina* na cultura da soja em casa de vegetação são escassos e pouco se sabe sobre o comportamento do patógeno fora das condições de campo.

Para o desenvolvimento de genótipos resistentes, é importante entender o comportamento dos genes envolvidos na resistência da doença. Estudos de herança genética são importantes para definir o padrão predominante da segregação, além de descobrir quantos genes estão envolvidos na resistência. Tais dados serão importantes para nortear futuros trabalhos visando genótipos com bons atributos agronômicos e portadores da resistência a essa doença.

Mediante tais fatos, o presente trabalho teve como objetivo o estudo de diferentes métodos de inoculação e avaliação da *M. phaseolina* em genótipos de soja, definindo o grau de resistência para caracterização dos mesmos, além de avaliar a herança genética de *M. phaseolina* por meio do estudo de gerações.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura da soja

A soja pertence ao reino Plantae, divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Fabales, família Leguminosae, subfamília Papilionoideae, gênero *Glycine*, espécie *Glycine max*, sendo a forma cultivada *Glycine max* (L.) Merrill, com número de cromossomos $2n = 40$. A espécie é autógama, anual, herbácea, ereta, crescimento morfológico diversificado, com número variado de ramificações e ciclo de 80 a 150 dias, dependendo do genótipo e das condições ambientais (SEDIYAMA; TEIXEIRA; BARROS, 2009; SEDIYAMA, 2015).

A soja é cultivada em diversos ambientes, de altas a baixas latitudes. Isso se deve à inserção dos genes de juvenilidade longa que atrasam o florescimento sob fotoperíodo indutor (NOGUEIRA et al., 2015). No Brasil, tal fato permitiu a expansão do cultivo de soja por todo o território nacional, possibilitando que se tornasse o produto agrícola de maior importância para a economia brasileira (DALL'AGNOL, 2002).

A soja tem como origem o sudeste asiático, sendo cultivada na China há mais de seis mil anos, estando diretamente relacionada com a origem do povo chinês. Outros países do Sudeste asiático e do extremo oriente, sendo influenciados pela civilização chinesa, também cultivavam a soja, em maior ou menor escala. Desde então, consideram a soja como ótimo alimento humano e excelente forragem, riquíssima em proteína, substâncias oleaginosas e minerais (GOMES, 1990).

No Brasil, essa cultura foi introduzida na Bahia por Gustavo D' Ultra, em 1882 (CÂMARA, 1998). Em 1892, os primeiros estudos com a cultura da soja foram realizados no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). Na década de 1920, a Secretaria de Agricultura Paulista começou a se interessar por essa cultura, intensificando as pesquisas (GOMES, 1990).

Impulsionada pela política de subsídios ao trigo, somente a partir da década de 1960, visando autossuficiência, a soja se estabeleceu como cultura economicamente importante para o Brasil. Seu cultivo foi estabelecido inicialmente no Rio Grande do Sul, e posteriormente se expandiu para outros estados. Essa grande expansão da cultura foi possível através do desenvolvimento de cultivares

locais, onde a estratégia consistiu no desenvolvimento de plantas com crescimento determinado, semelhante às utilizadas no sul dos Estados Unidos na ocasião, com altura e ciclo adequados a estas condições (KIHLE et al., 1999).

A composição química do grão apresenta cerca de 40% de proteínas, 20% de óleos e 27% de carboidratos, tornando a soja um produto destinado ao processamento para agroindústria, indústria química e de alimentos (SEDIYAMA; TEIXEIRA; BARROS, 2009). A soja é a cultura de maior expressão na produção de grãos e em área cultivada no Brasil, produzindo mais proteína por unidade de área que qualquer outra cultura, característica essa que a tornou o alimento básico com maior potencial para a solução de problemas como a desnutrição no mundo (ARANTES; SOUZA, 1993).

2. 2 Importância econômica

Para o Brasil, o complexo soja tem expressiva importância econômica, pois envolve amplo número de organizações ligadas aos mais diversos setores econômicos, desempenha papel fundamental para o produto interno bruto (PIB), bem como para a geração de divisas (HIRAKURI; LAZZAROTTO, 2011).

O Brasil é o segundo maior produtor mundial da cultura com produção de 114,09 milhões de toneladas no ano agrícola 2016/17. Além disso, a soja é considerada uma das mais importantes *commodities* comercializadas no mundo, sendo cultivada na maioria do território brasileiro principalmente nas regiões Centro-Oeste, Sul e Sudeste. O estado do Mato Grosso, é o principal produtor, com uma produção de 30,51 milhões de toneladas (CONAB, 2017).

Os preços pagos pelos produtos do complexo soja, em geral, dependem de condições internacionais ligadas à oferta e à demanda desses produtos. Isso pode ser justificado por duas razões: a soja é uma *commodity* que apresenta grande padronização e uniformidade de produção entre os vários países produtores e, além disso, grande parte das transações comerciais com a soja e seus derivados ocorrem no mercado internacional (HIRAKURI; LAZZAROTTO, 2011).

2.3 Melhoramento Genético da Soja

O melhoramento genético da soja possui como um dos objetivos o desenvolvimento de novos genótipos visando solucionar problemas reais ou potenciais. É um processo contínuo onde a variabilidade genética é explorada geralmente por meio de hibridações, selecionando-se os caracteres desejados (ALMEIDA; KIIHL, 1998). O processo seletivo deve levar em conta os caracteres agronômicos de interesse e cabe ao melhorista escolher uma estratégia que promova o maior ganho por unidade de tempo e custo (SEDIYAMA; TEIXEIRA; REIS, 2005).

Os primeiros trabalhos consistiam na manutenção de uma pequena coleção de cultivares, onde eram observadas as características botânicas e agronômicas, realizando-se com elas ensaios de competição para a avaliação de rendimento. No Brasil, o melhoramento com a cultura de soja teve início no Rio Grande do Sul, na década de 1930, na antiga Estação Experimental Fitotécnica das Colônias, localizada no município de Veranópolis. O maior desenvolvimento do programa de melhoramento de soja no Brasil aconteceu durante as décadas de 1970, 1980 e 1990, impulsionado pelo incentivo das instituições públicas e privadas de pesquisa, quando novas cultivares foram lançadas e inegavelmente contribuíram para a expansão do cultivo de soja no país (SEDIYAMA; TEIXEIRA; REIS, 2005).

Grande parte do sucesso da cultura da soja e sua expansão por todo Brasil se devem aos programas de melhoramento genético. O desenvolvimento de cultivares produtivas, resistentes a pragas e doenças, estáveis e adaptadas às diversas condições possibilitou o estabelecimento da soja como uma das principais culturas do país (KIIHL, 2006).

No processo do melhoramento de plantas, é necessária a obtenção de genótipos que sejam geneticamente divergentes obtidos pelo cruzamento entre genitores de bom desempenho, contrastantes ou por mutação induzida no germoplasma melhorado (VENCOVSKY, 1987). Esse processo pode ser dividido em três etapas principais: a) escolha de genitores e realização de hibridação; b) avanço de gerações e seleção, sendo que a base da seleção é a variação genotípica; c) avaliação das linhagens, observando as mais produtivas, mais estáveis e melhor adaptadas aos ambientes avaliados (MATTA, 2008).

2.4 Doenças da soja

Diversos são os fatores que limitam os altos rendimentos da soja, entre esses as doenças se encontram entre os mais importantes e de difícil controle. A expansão da cultura para novas áreas, a monocultura e a utilização de práticas inadequadas têm aumentado o número de doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e nematoides. Apesar do uso de fungicidas e outras técnicas que visam o controle ou a eliminação dos patógenos, as doenças fúngicas são responsáveis por grandes prejuízos nas colheitas todos os anos (SUZUKI; YUYAMA; CAMACHO, 2005).

Dentre as doenças de maior importância na cultura da soja estão a ferrugem (*Phakopsora pachyrhizi*), queima das haste e da vagem (*Diaporthe phaseolorum* var. *sojae*), pústula bacteriana (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*), septoriose (*Septoria glycines*), míldio (*Peronospora manshurica*), podridão de carvão (*Macrophomina phaseolina*), crestamento de cercospora (*Cercospora kikuchii*), oídio (*Microsphaera diffusa*), podridão vermelha (*Fusarium solani* f.sp. *glycines*) e viroses (*soybean mosaic potyvirus* e *yellow mosaic virus*). Por sua vez, as doenças de final de ciclo de maior importância são antracnose (*Colletotrichum truncatum*), mancha parda (*Septoria glycines*) e crestamento foliar de cercospora (*Cercospora kikuchii*) (KIMATI et al., 2016).

2.5 *Macrophomina phaseolina*

2.5.1 Aspectos gerais

O fungo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid, agente causal de podridões de raízes e caules, é um organismo bastante difundido e que parasita mais de 500 espécies de plantas, inclusive em culturas agronomicamente importantes (SINCLAIR; BACKMAN, 1989).

Na maioria das culturas parasitadas por *M. phaseolina*, os sintomas vão desde podridão de sementes, passando pelo tombamento de mudas, podridão de raízes e podridões de caules e morte de plantas (SHORT; WYLLIE, 1978).

O patógeno sobrevive no solo como saprófita, parasitando hospedeiros alternativos ou sob a forma de escleródios. A fonte de inóculo primário é constituída

pela semente infectada, pelo micélio do fungo colonizando restos de cultura e pelos escleródios que germinam após a quebra da dormência infectando a base do caule das plântulas (DHINGRA; SINCLAIR, 1978).

O ambiente físico, particularmente os componentes temperatura e umidade do solo, influencia fortemente a sobrevivência de microescleródios de *M. phaseolina*. Sendo assim, as condições favoráveis ao desenvolvimento da doença, são altas temperaturas e baixa umidade. Temperatura variando de 28°C a 35°C e estresse hídrico do solo com capacidade de campo menor que 50% foram relatados como favoráveis à sobrevivência do fungo (DHINGRA; SINCLAIR, 1978). Apesar de ser uma doença relacionada à deficiência hídrica e altas temperaturas, Mengistu et al. (2011) observaram perda de rendimento de até 33% mesmo em ambientes irrigados, sugerindo que trata-se de doença importante, mesmo em um ambiente onde há umidade adequada.

No Brasil, os primeiros danos expressivos foram relatados por Ferreira, Lehman e Almeida (1979), que constataram que em anos secos e quentes, as perdas em soja das cultivares tardias chegaram a 50%. Nos Estados Unidos, Sinclair e Gray (1972) e Wyllie (1974) já indicavam perdas de até 20% na produtividade. Por sua vez, Wrather e Koenning (2006) relataram que as perdas variaram com os anos, sendo a maior delas em 2003, com perdas de aproximadamente dois milhões de toneladas.

A rotação de culturas pode não ser uma alternativa eficiente no manejo do patógeno, pois se trata de um fungo polífago, capaz de sobreviver e de se multiplicar em restos de cultura (PEARSON et al., 1984).

No Brasil, nos últimos anos, o preparo do solo vem migrando do uso de técnicas convencionais para o sistema de semeadura direta, especialmente em áreas de produção de grãos. O plantio direto é caracterizado pela manutenção de restos de cultura sobre a superfície do solo. Essa prática, além de reduzir a erosão, interfere nas propriedades físicas, químicas e biológicas do solo. A palhada pode permanecer no solo por longo período, o que pode favorecer a manutenção do inóculo no local. Apesar de tal fato, Almeida et al. (2014) constataram que áreas de plantio direto apresentaram menor densidade de microescleródios que o plantio convencional, embora não tenha havido alteração significativa na produtividade.

Esse resultado é atribuído ao fato da palhada proporcionar temperatura mais amena no solo em comparação ao sistema convencional.

O método mais prático e econômico para controlar a podridão de carvão causada pelo fungo *M. phaseolina* é por meio do uso de cultivares resistentes, no entanto, existem alguns hospedeiros nos quais ainda não foram identificados níveis de resistência a esse patógeno. Na cultura da soja, onde o fungo causa enormes perdas, nenhum genótipo foi identificado com resistência a essa doença, embora a ocorrência de tolerância tenha sido relatada (ALMEIDA et al., 2014; SMITH; CARVIL, 1997).

2.5.2 Características do fungo

O fungo foi denominado por Goidanish (1947) após revisar a taxonomia do gênero *Macrophomina*, constituído por apenas uma espécie, *Macrophomina phaseolina*. Esse fungo pertence ao filo Ascomycota, família Botryosphaeriaceae (MYCOBANK, 2013).

O fungo possui micélio uninucleado, embora células das extremidades do micélio, região de crescimento, sejam usualmente multinucleadas (KNOX-DAVIES, 1967). Produz picnídios marrom-escuros, solitários ou agregados, imersos, tornando-se irrompentes com 100-200 µm de diâmetro, abrindo-se por ostíolo apical (HOLLIDAY; PUNITHALINGAN, 1970). A variação no tamanho dos picnídios parece estar associada ao substrato sobre o qual o fungo se desenvolve (DHINGRA; SINCLAIR, 1978). Os conídios são hialinos, elipsoides a ovóides, medindo 14-30 µm x 5-10 µm (HOLLIDAY; PUNITHALINGAN, 1970).

O microescleródio é a principal forma de sobrevivência do patógeno. Essas estruturas são negras e lisas, medem em torno de 100 µm de diâmetro (HOLLIDAY; PUNITHALINGAM, 1970). Os microescleródios são produzidos a partir do micélio, consistindo de estrutura multicelular, dura e resistente a condições adversas, e são facilmente encontrados sob a epiderme das raízes ou na camada externa do córtex e na região do colo. Com a decomposição desses tecidos, os microescleródios são liberados no solo e em contato com a região do colo ou da raiz da planta, germinam

e infectam as raízes. As células podem germinar em diferentes épocas, infectando plantas em diversos estádios de desenvolvimento (ALMEIDA et al., 2014).

A longevidade dos microesclerócios tende a diminuir com o tempo, porém os microesclerócios são capazes de sobreviver no solo por até quinze anos (MEYER; SINCLAI; KHARE, 1974). Estudos realizados pela Embrapa Soja na safra de 1999 demonstraram a ocorrência natural do fungo em solos de mata nativa (ALMEIDA, 2001).

2.5.3 Sintomas da doença

Os sintomas da podridão de carvão da soja podem aparecer em diferentes estádios de desenvolvimento da cultura. Durante a emergência, a infecção pode causar lesões de coloração marrom escura na região do colo da planta. A infecção é mais severa em condições de baixa umidade, alta temperatura e solo compactado (ALMEIDA; SEIXAS, 2010).

As plantas infectadas ocorrem aleatoriamente, principalmente em reboleiras, devido à desuniformidade de distribuição de microesclerócios no solo. As lesões de *M. phaseolina* não são profundas e não causam estrangulamento do hipocótilo. As plantas infectadas que sobrevivem à infecção inicial vão apresentar sintomas de amarelecimento na época de formação de vagens, similar à maturação normal. O amarelecimento é progressivo, levando à murcha. As folhas permanecem aderidas, mas ficam caídas, ao longo das hastes (ALMEIDA, et al. 2014; ALMEIDA; SEIXAS, 2010).

Em plantas infectadas, as raízes apresentam a epiderme solta, sendo facilmente destacável, possibilitando observar inúmeras pontuações negras (microesclerócios). Em casos de alta severidade é comum ver a medula com micélio cottonoso e escuro na camada externa do córtex. As sementes, em geral, não apresentam sinais de infecção (ALMEIDA, et al. 2014).

2.6 Estudo de herança genética

Para o estudo do controle genético é necessário que os genitores sejam endógamos, ou seja, que não estejam segregando, além de apresentarem reação contrastante para o caráter de interesse. Devem ser obtidas as gerações F_1 , F_2 , (podendo-se inserir demais gerações avançadas) e os retrocruzamentos (RCr e RCs). Posteriormente, toda a população obtida, incluindo os genitores, são avaliadas para o caráter de interesse para verificar a segregação fenotípica. Para caracteres com distribuição discreta, as hipóteses de segregação são avaliadas pelo teste de qui-quadrado, que verifica se os desvios entre as frequências observadas e esperadas são significativos, em determinado nível de probabilidade (RAMALHO et al., 2012).

Um dos pontos mais importantes para o estudo das características da distribuição discreta é o teste da hipótese genética que permite, com uma margem de erro, concluir a respeito do padrão predominante da segregação: se governada por um, dois ou mais genes e o tipo de interação predominante (LIU, 1997).

O teste qui-quadrado tem se mostrado bastante prático e eficiente para o teste de hipótese de padrão de segregação, uma vez que considera os desvios ocorridos entre os valores previstos e observados e o número de observações, porém o teste qui-quadrado é sensível ao tamanho da amostra, sendo que em casos onde o número de informações é reduzido, pode resultar na impossibilidade de discriminar as hipóteses genéticas (SCHUSTER; CRUZ, 2004).

A consideração inapropriada de uma hipótese genética pode resultar em problemas de interpretação. O equívoco nas conclusões, em relação à natureza da herança da característica, pode ocorrer devido ao tamanho da amostra, sendo comum encontrar na literatura populações com tamanhos amostrais não suficientes para dar respaldo a veracidade do tipo de segregação (SALGADO, 2012).

Em casos onde há muitos genes interferindo na resistência e não há padrão de segregação mendeliana, o estudo de herança não é possível de ser realizado pelo teste qui-quadrado. Nesse cenário, pode ser realizado o estudo por meio dos componentes de média e variância. Os componentes de médias permitem elaborar um modelo e estimar os parâmetros a e d , que correspondem ao afastamento de

cada homozigoto e heterozigoto da média (m), respectivamente (CRUZ; REGAZZI, 1997).

Já os componentes da variância apresentam algumas vantagens quando comparados às médias. Entre as principais implicações, encontra-se o fato de que nas estimativas de médias, o que se obtém ao final é uma soma algébrica de cada um dos locos individualmente, podendo ocorrer, por exemplo, que os genes dominantes estejam presentes, mas atuando em sentidos opostos nos vários locos (minimizando ou anulando o efeito), levando a interpretações errôneas. A utilização da variância elimina esta possibilidade, pois os efeitos de cada loco são elevados ao quadrado, sem, portanto, possibilidade dos mesmos terem seus efeitos anulados (RAMALHO; SANTOS; ZIMMERMANN, 1993).

3 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A. M. R.; SEIXAS, C. D. S.; FARIAS, J. R. B.; OLIVEIRA, M. C. N.; FRANCHINI, J. C.; DEBIASI, H.; COSTA, J. M.; GAUDÊNCIO, C. A. (2014) ***Macrophomina phaseolina* em soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2014. 55 p.

ALMEIDA, A. M. R.; SEIXAS, C. D. S. **Soja: doenças radiculares e de hastes e inter-relações com o manejo do solo e da cultura**. Primeira edição. Londrina – Embrapa Soja. P.49-63, 2010.

ALMEIDA, A. M. R. ***Macrophomina phaseolina* em soja**: sistema de semeadura, sobrevivência em restos de cultura e diversidade genética. Londrina: Embrapa Soja, 2001, 47p.

ALMEIDA, L. A.; KIIHL, R. A. Melhoramento da soja no Brasil – desafios e perspectivas. In: CÂMARA, G. M. (Coord.) **Soja: tecnologia da produção**. Piracicaba: Publique, p.40-54, 1998.

AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de fitopatologia**. Volume 2. Doenças das plantas cultivadas. Quinta edição. CERES. p.670, 2016.

ARANTES, N. E., SOUZA, P. T. M. **Cultura da soja nos cerrados**. Piracicaba: Potafós. 1993. p. 1-69.

CÂMARA, G. M. de S. **Soja: Tecnologia da Produção**. USP, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Departamento de Agricultura – Piracicaba, 1998, 293p.

CONAB – CONSELHO NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos 2016/2017**: décimo segundo levantamento. Setembro de 2017. Disponível em:

<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_09_12_10_14_36_boletim_graos_setembro_2017.pdf>. Acesso em: 15 Out. 2017.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genéticos. Viçosa. UFV, 1997, 390p.

DALL'AGNOL, A. Sem medo de competir. **Agroanalysis**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 2, p. 42-43, 2002.

DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J. B. **Biology and pathology of *Macrophomina phaseolina***. 1978. 166 f. Monografia - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

FEHR, W. R.; CAVINESS, J. A. **Stages of soybean development**. Ames : Iowa State University, 1977, 11p. (Special Report, 80).

FERREIRA, L.P.; LEHMAN, P.S.; ALMEIDA, A.M.R. **Doenças da soja no Brasil**. Londrina: EMBRAPA.CNPSO, 1979. 42 p.(EMBRAPA. CNPSO. Circular técnica,1).
GOMES, P. **A soja**. 5.ed. São Paulo: Nobel, 1990. 149 p.

HIRAKURI, M.H.; LAZZAROTTO, J.J. Evolução e perspectiva de desempenho econômico associados com a produção de soja nos contextos mundial e brasileiro. 3. ed. – Londrina: Embrapa Soja, 2011. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/download/Doc319_3ED.pdf>. Acesso em: 03 de Agosto de 2017.

HOLLIDAY, P.; PUNITHALINGAN, E. *Macrophomina phaseolina*. **CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria**, n. 275, 1970. 2 p.

KENDIG, S. R.; RUPE, J. C.; SCOTT, H. D. Effect of irrigation and soil water stress on densities of *Macrophomina phaseolina* in soil and roots of two soybean cultivars. **Plant Disease**, St. Paul, v. 84, p. 895-900, 2000.

KIIHL, R. A. S.; CALVO, E. S. A epopéia da soja no Brasil. In: International Workshop on Tropical Agriculture Development, 2006, Brasília. **Anais...**

KIIHL, R. A. S.; ALMEIDA, L. A.; SOUZA, P. I. M.; HIROMOTO, D. M.; ARANTES, N. E.; FARIAS, L. C.; MIRANDA, M. A. C.; MORCELI, A.; TAKEDA, C.; BONATO, E. R.; BERTAGNOLLI, P. F.; PRADO, E. E. **Desenvolvimento de germoplasma de soja adaptados às várias regiões ecológicas e aos vários sistemas de produção: resultados de pesquisa da Embrapa Soja** – 1999. Londrina: Embrapa Soja, 2000. p.144- 145. (Embrapa Soja. Documentos, 142).

KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de fotopatologia**. Volume 2: Doenças das plantas cultivadas. 5 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2016. Cap. 61, p. 596-618.

LIU, B. H. **Statistical Genomics: linkage mapping and QTL analysis**. Boca raton, Florida, USA: CRC Press, 1997, 610p.

KNOX-DAVIES, P.S. Mitosis and aneuploidy in the vegetative hyphae of *Macrophomina phaseoli*. **American Journal of Botany**, v. 54, p. 1290-1295, 1967.

MATTA, L. B. **Melhoramento genético da soja (*Glycine max.* (L.) Merrill) para baixo teor de ácido linolênico**. 2008. 58 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

MENGISTU, A.; ARELLI, P.; BOND, J.P.; NELSON, R.; RUPE, J.B.; SHANNON, G.J.; WRATHER, A.J. Identification of soybean accessions resistant to *Macrophomina phaseolina* by field screening and laboratory validation. 2013. **Plant Health Progress**. Disponível em: <<http://www.plantmanagementnetwork.org/php/elements/sum2.aspx?id=10618>>. Acesso em: 19 set. 2017.

MENGISTU A.; SMITH, J. R.; RAY, J. D. Seasonal progress of charcoal rot and its impact on soybean productivity. **Plant Disease**, v. 95, p.1159-1166, 2011.

MENGISTU, A.; RAY, J. D.; SMITH, J. R.; PARIS, R. L. Charcoal rot disease assessment of soybean genotypes using a colony forming unit index. **Crop Science**, v. 47, p.2453-2461, 2007.

MEYER, W. A.; SINCLAIR, J. B.; KHARE, M. N. Factors affecting Charcoal rot of soybean seedlings. **Phytopathology**, v. 64, p. 845-849, 1974.

MYCOBANK. ***Macrophomina phaseolina***. Disponível em: <<http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank>>. Acesso em: 01 ago. 2017.

NOGUEIRA, A. P. O.; SEDIYAMA, T.; OLIVEIRA, R. C. T.; GLASENAPP, J. S. Caracteres qualitativos. In: SEDIYAMA, T. **Melhoramento Genético da Soja**. Londrina: Mecenass, 2015, p. 33-56.

PEARSON, C.A.; SCHWENK, F.W.; CROWE, F.J.; KELLEY, K. Colonization of soybean roots by *Macrophomina phaseolina*. **Plant Disease**, v. 68, n. 12. p. 1086-1088, 1984.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; ABREU, A. F. B.; NUNES, J. A. R. **Aplicações da genética quantitativa no melhoramento de plantas autógamas**. Lavras: Editora UFLA, 2012. p. 522.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; ZIMMERMANN, M. J.; **Genética quantitativa em plantas autógamas**: aplicações ao melhoramento do feijoeiro. Goiânia: UFG, 1993. 271p.

SALGADO, C. C. **Abordagem sobre estudo de herança de caracteres pela genética clássica e molecular**. Viçosa. 2012. 99 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. Editora UFV. 2012.

SCHUSTER, I.; CRUZ, C.D. **Estatística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados**. Viçosa: Editora da UFV, 2004. 568p

SEDIYAMA, T. **Melhoramento Genético da Soja**. Londrina: Mecenass, 2015, p. 353.

SEDIYAMA, T.; TEIXEIRA, R. C.; REIS, M. S. Melhoramento da soja. In: BOREM, A. (Ed.) **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: Ed. UFV, 2005. 969p.

SEDIYAMA, T.; TEIXEIRA, R. C.; BARROS, H. B. Origem, Evolução e importância econômica. In: SEDIYAMA, T. **Tecnologias de produção e usos da soja**. Londrina Mecenass, 2009. p.1-5.

SHORT, G. E., WYLLIE, T. D. Inoculum potential of *Macrophomina phaseolina*. **Phytopathology**, St Paul, v. 68, p.742-6, 1978.

SINCLAIR, J. B., BACKMAN, P. A. (Eds.). **Compendium of soybean disease**. 3. ed. American Phytopathological Society. 1989, 116 p.

SINCLAIR, J.B.; GRAY, L.E. Three fungi that can reduce soybean yields. **Illinois Research**, v. 14, p. 5, 1972.

SMITH, G. S.; CARVIL, O. N. Field screening of commercial and experimental soybean cultivars for their reaction to *Macrophomina phaseolina*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 81, n. 4, p. 363-368, 1997.

SUZUKI, S.; YUYAMA, M.M.; CAMACHO, S.A. Boletim de Pesquisa de Soja 2005. Rondonópolis: Fundação Mato Grosso, 2005. 230p.

VENCOVSKY, R. Herança quantitativa. In: PATERNIANI, E.; VIEGAS, G.P. **Melhoramento e produção de milho no Brasil**. 2. ed. Campinas: Fundação Cargill, 1987.

WRATHER, J.A.; KOENNING, S.R. Estimates of diseases effects on soybean yields in the United States 2003-2005. **Journal of Nematology**, v. 38, p. 173-180, 2006.

WYLLIE, T.D. Worst soybean disease. **Crop and Soils Magazine**, v. 27, p. 10-11. 1974.

WYLLIE, T.D., CALVERT, O.H. Effect of flower and pod set on formation of sclerotia and infection of *Glycine max* by *Macrophomina phaseoli*. **Phytopathology**, Saint-Paul, v. 59, p. 1243-1245, 1969.

CAPÍTULO 2 - MÉTODOS DE INOCULAÇÃO E AVALIAÇÃO DE RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS DE SOJA A *Macrophomina phaseolina*

RESUMO

A podridão de carvão, causada pelo fungo *Macrophomina phaseolina*, tem sido uma doença de crescente importância na cultura da soja. Essa doença ocorre principalmente em regiões tropicais e subtropicais e sabe-se que sua maior incidência e severidade são observadas principalmente quando ocorrem estresse hídrico e altas temperaturas. A avaliação da resistência de plantas de soja a esse patógeno é difícil, devido à falta de métodos confiáveis e eficientes para testar os genótipos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar diferentes métodos de inoculação de *M. phaseolina* em dez genótipos de soja, além de verificar o grau de resistência dos mesmos. Foram testados os métodos de inoculação: sementes de sorgo infectada com o fungo, sementes pré-germinadas em meio de cultura colonizado e teste do palito infectado. Para se determinar a resistência dos genótipos de soja ao fungo *M. phaseolina* foram avaliadas a severidade da doença em raiz e caule e as unidades formadoras de colônias em tecidos afetados. Houve boa correlação entre as avaliações de unidades formadoras de colônias e severidade em raiz e caule (0,87). O método da semente de sorgo infectada com o fungo foi o mais eficiente para avaliar a resistência de *M. phaseolina* nos genótipos testados. O genótipo PI594302 apresentou maior resistência, pelos dois parâmetros avaliados, sendo indicada sua introdução em programas de melhoramento genético visando a resistência à podridão de carvão em soja.

Palavras-chave: *Glycine max*, podridão de carvão, resistência genética.

CHAPTER 2 - METHODS OF INOCULATION AND EVALUATION OF SOYBEAN GENOTYPES RESISTANCE TO *Macrophomina phaseolina*

ABSTRACT

Charcoal rot disease, caused by *Macrophomina phaseolina*, is a disease of significant economic importance in the soybean crop. This disease occurs mainly in tropical and subtropical regions and it is known that the incidence and severity occur mainly when there is stress of water and heat. The evaluation of this pathogen is difficult due to the lack of reliable and efficient methods for the evaluation of soybean genotypes. The present work had the objective of evaluating different methods of inoculation and evaluation in ten soybean genotypes, besides discovering the degree of resistance of the genotypes studied. Infected sorghum seeds, pre-germinated seed in culture medium and infected toothpick test were the tested methods. Colony forming units and root and stem severity were evaluated. There was good correlation between evaluations of colony forming units and root and stem severity (0.87). The infected sorghum seed method was the most efficient for inoculating the pathogen in soybean genotypes. Genotype PI594302 presented higher resistance in the two evaluated parameters, being indicated its introduction in programs of genetic improvement aiming the resistance to the charcoal rot in soybean.

Key words: *Glycine max*, charcoal rot, genetic resistance.

1 INTRODUÇÃO

A podridão de carvão, causada pelo fungo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid, é uma doença de significativa importância econômica na cultura da soja (SMITH; WYLLIE, 1999; ALMEIDA et al., 2014). Esse patógeno ocorre principalmente em regiões tropicais e subtropicais e sabe-se que a maior incidência e severidade ocorrem principalmente quando há estresse hídrico e excesso de calor (PEARSON et al. 1984; SMITH; WYLLIE, 1999). Em ambientes de estresse, a doença suprime a produção e encontra-se em sexto lugar entre as doenças de importância econômica da soja nos principais países produtores (WRATHER et al., 2010).

O fungo *M. phaseolina* é capaz de infectar centenas de espécies vegetais, entre elas o milho, sorgo, algodão e girassol. A rotação de culturas é alternativa sem grande eficácia, visto que trata-se de fungo polífago, capaz de se manter e se multiplicar em restos culturais na forma de microescleródios (PEARSON et al., 1984). No Brasil, com o aumento das áreas de plantio direto, caracterizado por manter restos culturais sobre o solo, o controle se torna ainda mais difícil.

Na cultura da soja, a infecção pode ocorrer logo após a emergência, porém os sintomas da podridão de carvão são frequentemente observados na raiz e haste após o florescimento, principalmente nos estádios de crescimento R5, R6 e R7 (FEHR et al., 1971; SHORT; WYLLIE; AMMON, 1978). Como sintomas, as plantas podem apresentar murchas, morte prematura e as folhas mortas permanecem ligadas às hastes.

Apesar de ser uma doença relacionada à deficiência hídrica e altas temperaturas, Mengistu, Smith e Ray (2011a) observaram perda de rendimento de até 33% em ambientes irrigados, sugerindo que trata-se de doença importante, mesmo em ambiente onde há umidade adequada.

A resistência genética é a maneira mais indicada para o controle da doença, porém nenhuma cultivar resistente está disponível no mercado (ALMEIDA et al., 2014). Trabalhos anteriores mostram genótipos com bons níveis de resistência e que podem ser utilizados em programas de melhoramento visando à obtenção de

cultivares que resistam, mesmo que parcialmente, à ação do patógeno (MENGISTU et al., 2007; MENGISTU et al., 2013).

Ainda não há um consenso sobre os métodos de inoculação e avaliação desse patógeno e existem poucas informações quanto ao grau de resistência das cultivares de soja brasileiras. Além disso, trabalhos com avaliações de *M. phaseolina* na cultura da soja em casa de vegetação são escassos e pouco se sabe sobre o comportamento do patógeno fora das condições de campo. Avaliações em casa de vegetação podem ser interessantes, visto que as condições podem ser controladas para o desenvolvimento ideal do patógeno, além de poder ser realizada o ano todo.

Alguns trabalhos utilizam o método proposto por Twizeyimana et al. (2012), que consiste em avaliações baseadas no corte da haste e mensuração da lesão causada pelo patógeno. No entanto, métodos não destrutivos são importantes, visto que o melhoramento genético necessita que a planta complete o ciclo para compor nova geração.

Baseado no exposto, o presente trabalho teve como objetivo testar diferentes métodos de inoculação do patógeno em genótipos de soja, além de avaliar o grau de resistência dos mesmos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizado um único isolado de *M. phaseolina* coletado em lavoura de soja na região de Jaboticabal-SP com sintomas severos da doença. O isolado foi multiplicado no Departamento de Fitossanidade da UNESP-FCAV de Jaboticabal-SP em meio BDA (batata dextrose ágar) a 25°C, sob fotoperíodo de 12 horas. Foram avaliados dois genótipos PIs (plantas introduzidas) que apresentaram os maiores níveis de resistência à podridão de carvão em estudo anterior (MENGISTU et al., 2013), além de oito cultivares comerciais brasileiras, sem informações quanto à resistência ao patógeno (Tabela 1).

Tabela 1. Genótipos de soja utilizados na avaliação para a resistência a *Macrophomina phaseolina*.

NT	Genótipo	Origem	Resistência
1	PI594302	Japão	Moderadamente Resistente
2	PI567562A	China	Moderadamente Resistente
3	BMX Apolo RR	Brasil	Não determinada
4	VMAX RR	Brasil	Não determinada
5	BRS 282	Brasil	Não determinada
6	BMX Potência RR	Brasil	Não determinada
7	BMX Energia RR	Brasil	Não determinada
8	M6410 IPRO	Brasil	Não determinada
9	M6972 IPRO	Brasil	Não determinada
10	TMG 7262 RR	Brasil	Não determinada

Três métodos de inoculação para *M. phaseolina* foram testados. O primeiro método foi o da semente de sorgo infectada com o fungo (SSI). O inóculo foi preparado com cerca de 300 g de sementes de sorgo em erlenmeyer de 1L, sendo anteriormente as sementes umedecidas e autoclavadas três dias consecutivos à 120°C por 30 min. Após resfriamento, 10 discos com um centímetro de diâmetro do meio de cultura com *M. phaseolina* foram adicionados em cada erlenmeyer. O inóculo foi mantido a 30°C por 15 dias, agitando-se diariamente o erlenmeyer para que o fungo colonizasse as sementes de forma homogênea. Para a inoculação, foram utilizadas três sementes de sorgo infectadas dispostas abaixo de cada semente de soja no momento da semeadura. Esta técnica de inoculação foi utilizada anteriormente por Mengistu et al. (2007), Mengistu et al. (2011b) e Mengistu et al. (2013), em experimentos de campo, utilizando o milheto japonês como inóculo.

O segundo método testado foi o de sementes pré-germinadas em meio de cultura colonizado com *M. phaseolina* (SPG). Tal método consistiu no contato direto da semente com meio de cultura colonizado pelo fungo. As sementes de cada tratamento passaram por desinfestação superficial sendo imergidas em álcool 70% (15 segundos) e hipoclorito de sódio 2% (NaClO) (15 segundos). Posteriormente, as sementes foram lavadas rapidamente em água corrente e dispostas em placas de Petri sobre papel de filtro umedecido. As sementes foram mantidas em temperatura ambiente até a emissão da radícula e foram transferidas para placas de Petri com

meio BDA colonizado por *M. phaseolina*. Após 10 horas em contato com o fungo, as sementes foram semeadas nos vasos.

O terceiro método utilizado foi do palito-de-dente infectado (PDI). Trata-se de um método adaptado de Keeling (1982), utilizado para avaliação de cancro da haste em soja. O fungo foi cultivado em meio BDA, onde foram colocados cerca de 70 palitos-de-dente por placa de Petri. Os palitos utilizados eram de madeira de pinus, de formato cilíndrico. Inicialmente foram fervidos com duas trocas de água, a fim de eliminar a resina. Após secar, foram cortados em $\frac{1}{4}$ do tamanho normal e apontados em uma das extremidades. Os palitos foram espetados em uma folha de papel sulfite no formato da placa de Petri. Posteriormente, esses foram colocados nas placas de Petri e esterilizados em autoclave por 30 min a 120°C e 1 atm. O meio BDA foi vertido na placa contendo os palitos e a quantidade de meio de cultura foi distribuída de forma que apenas 3 a 4 mm da extremidade afinada do palito, na posição vertical, ficassem fora do meio. Após resfriar, o fungo foi repicado sobre o BDA e os palitos foram incubados à temperatura de 30°C durante 10 dias, até serem totalmente colonizados pelo fungo. Após 15 dias da germinação das sementes nos vasos, ocorreu a inoculação, espetando-se o palito-de-dente colonizado cerca de 1cm abaixo do nó cotiledonar. O palito foi inserido na haste até que pôde ser sentido do outro lado da haste, porém, sem atravessá-lo totalmente.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação com controle de fotoperíodo e temperatura. O substrato utilizado seguiu a proporção de três partes de terra de barranco para uma parte de vermiculita. O substrato foi autoclavado para a completa eliminação de patógenos e nematoides. A temperatura foi mantida entre 28 e 35°C sob fotoperíodo de 12,5 horas. Foram aplicados 5g de adubo 2-20-20 logo após a semeadura. Após 15 dias, também foram aplicados 3g de uréia por vaso, previamente diluída em água. Essa aplicação foi necessária devido à esterilização do solo ter eliminado os microorganismos responsáveis pela fixação biológica de nitrogênio.

Apesar da homogeneidade do ambiente em casa de vegetação, foi adotado o delineamento de blocos ao acaso para redução da influência do efeito ambiental, além de arranjo fatorial 10x3, sendo 10 genótipos e três métodos de inoculação. Cada tratamento foi constituído de cinco repetições e cada parcela foi composta pela

média dos resultados de três plantas de cada vaso. Além dos três métodos de inoculação, dois tipos de controles (testemunhas) foram utilizados, totalizando 250 vasos. O primeiro controle consistiu na semeadura convencional das sementes em vaso sem ferimento nas plantas e no segundo controle, foram feitos ferimentos com os palitos-de-dente sem o inóculo. Os controles foram utilizados somente para confirmar a ausência do patógeno nas plantas, além de verificar se o ferimento não as levaria à morte. Os dados não fizeram parte da análise estatística.

Após a maturação, no estágio R8, as plantas foram cuidadosamente colhidas e a avaliação da doença foi realizada por meio de dois métodos. O primeiro foi o método SRC (severidade na raiz e caule) descrito por Mengistu et al. (2007). Tal método consistiu na divisão longitudinal do tronco e da raiz principal de cada planta sendo avaliada a SRC, que consistiu na classificação visual da intensidade de coloração, assim como da quantidade de microescleródios que cobria o tecido da planta. A classificação consistiu em utilizar uma escala de notas de 1 a 5, onde 1 = nenhum microescleródio visível no tecido e 5 = tecido vascular escurecido devido ao elevado número de microescleródios. A escala de notas foi dividida em quatro classificações: resistente (valores até 1), moderadamente resistente (valores > 1 e ≤ 2), moderadamente suscetível (valores > 2 e < 3) e suscetível (valores de 3 a 5) (PARIS et al., 2006).

O método final de avaliação da doença foi baseado em UFC (unidades formadoras de colônias). As amostras que foram avaliadas para SRC também foram usadas para determinar UFC. As amostras foram constituídas de haste e raízes inferiores, incluindo as raízes laterais e fibrosas de cada planta, cortando o caule e as raízes logo abaixo do nó cotiledonar. Partes da haste e raízes de cada amostra foram cuidadosamente lavadas em água para remover o solo, secas ao ar e armazenadas a 25°C. As partes foram trituradas com moinho de amostras modelo MR304 (Metalúrgica Roma) e passadas em peneira de 28 mesh (600 μm). O moinho foi completamente limpo entre amostragens com dispositivo de sucção e pincel. Para cada amostra, foram colocados 0,005 g de tecido moído em becker com 100 mL de NaClO a 0,525%, agitando-se por 3 minutos e posteriormente sendo recolhidos sobre peneira de 325 mesh (45 μm). Lavou-se então o produto triturado com água destilada esterilizada e depois este foi adicionado a 100 mL de BDA

autoclavado arrefecido a 60°C e com adição de rifampicina (100 mg L⁻¹) e tween (0,01 mL) (PEARSON et al., 1984; SMITH; WYLLIE, 1999). Após 3 a 4 dias de incubação a 30°C, foram contadas as UFC de *M. phaseolina* e convertida em UFC por grama de tecidos de raiz e de caule.

Os resultados das avaliações foram submetidos à análise de variância, correlação e comparados pelo método de Scott-Knott (1974). As análises foram realizadas pelo pacote estatístico AgroEstat (BARBOSA; MALDONADO JÚNIOR, 2015). Os dados de UFC foram convertidos em $\sqrt{x+1}$. Os resultados foram plotados em histogramas onde cada cor representa diferença pelo teste Scott-Knott. Nos gráficos, também foram plotados os erros padrões de cada média.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com análise de variância, para a variável UFC, houve valores significativos para os efeitos de genótipo, inoculação e interação genótipo x inoculação (Tabela 2). Por sua vez, para a variável SRC, houve diferenças significativas para os efeitos de genótipo, inoculação, interação genótipo x inoculação a 1% e efeito de bloco a 5% de probabilidade (Tabela 3). Após a análise de variância, houve o desdobramento da interação genótipo e métodos de inoculação para avaliação de UFC e SRC.

Tabela 2. Análise de variância para a variável unidades formadoras de colônias (UFC) de *Macrophomina phaseolina* a partir de tecidos de genótipos de soja inoculados com o fungo.

FV	GL	SQ	QM	F	P
Genótipo (A)	9	4,9202	0,5467	6,95**	< 0,0001
Inoculação (B)	2	22,9448	11,4724	145,85**	< 0,0001
Interação AxB	18	7,7244	0,4291	5,46**	< 0,0001
Tratamentos	29	35,5895	-	-	-
Blocos	4	0,7513	0,1878	2,39 ^{ns}	0,055
Resíduo	116	9,1243	0,0786	-	-
Total	149	45,4651			

FV: fatores de variação; GL: graus de liberdade; SQ: soma de quadrados; QM: quadrado médio, F: teste F; P: significância do teste F; ^{ns}: não significativo; * significativo a 5%; ** significativo a 1%.

Tabela 3. Análise de variância para a variável severidade de raiz e caule (SRC) na avaliação de resistência de genótipos de soja à *Macrophomina phaseolina*.

FV	GL	SQ	QM	F	P
Genótipo (A)	9	11,9322	1,3258	9,77 ^{**}	< 0,0001
Inoculação (B)	2	37,1009	18,5505	136,65 ^{**}	< 0,0001
Interação AxB	18	12,6057	0,7003	5,16 ^{**}	< 0,0001
Tratamentos	29	61,6389	-	-	-
Blocos	4	1,4043	0,3511	2,59 [*]	0,0405
Resíduo	116	15,7477	0,1357	-	-
Total	149	78,7909			

FV: fatores de variação; GL: graus de liberdade; SQ: soma de quadrados; QM: quadrado médio, F: teste F; P: significância do teste F; ^{ns}: não significativo; ^{*} significativo a 5%; ^{**} significativo a 1%.

Para o método SSI, todos os genótipos apresentaram UFC, indicando não haver genótipo completamente resistente ao patógeno (Figura 1). Com exceção do genótipo 1 (PI594302), todos os demais não diferiram entre si, apresentando valores entre 2.240 e 4.600 UFC/g de raiz. O genótipo 1 apresentou o menor valor de UFC (880), indicando ser o mais resistente, no presente estudo. Mengistu et al. (2013) também concluíram que tal genótipo apresentava o melhor nível de resistência dentre 628 acessos de soja avaliados em cinco ambientes.

O método SSI permitiu separar os genótipos quanto aos níveis de resistência, além de distribuir os valores de forma adequada, visto que se trata de doença controlada por caráter quantitativo. Além de proporcionar os melhores resultados de inoculação, trata-se de um método rápido e de fácil execução, sendo indicado em casos onde se deseja avaliar número grande de genótipos.

Para o método SPG, os genótipos 3 e 4 apresentaram os maiores valores para UFC. Por sua vez, os genótipos 5, 8 e 9, que apresentaram valores elevados no método SSI, nessa situação não mostraram valores consistentes de UFC. Tal fato pode ser explicado pelo tempo de contato da semente com o meio de cultura. Esse comportamento diferencial indica que, para esse método de inoculação, os genótipos respondem de forma diferente quanto ao tempo necessário para que ocorra a infecção das sementes.

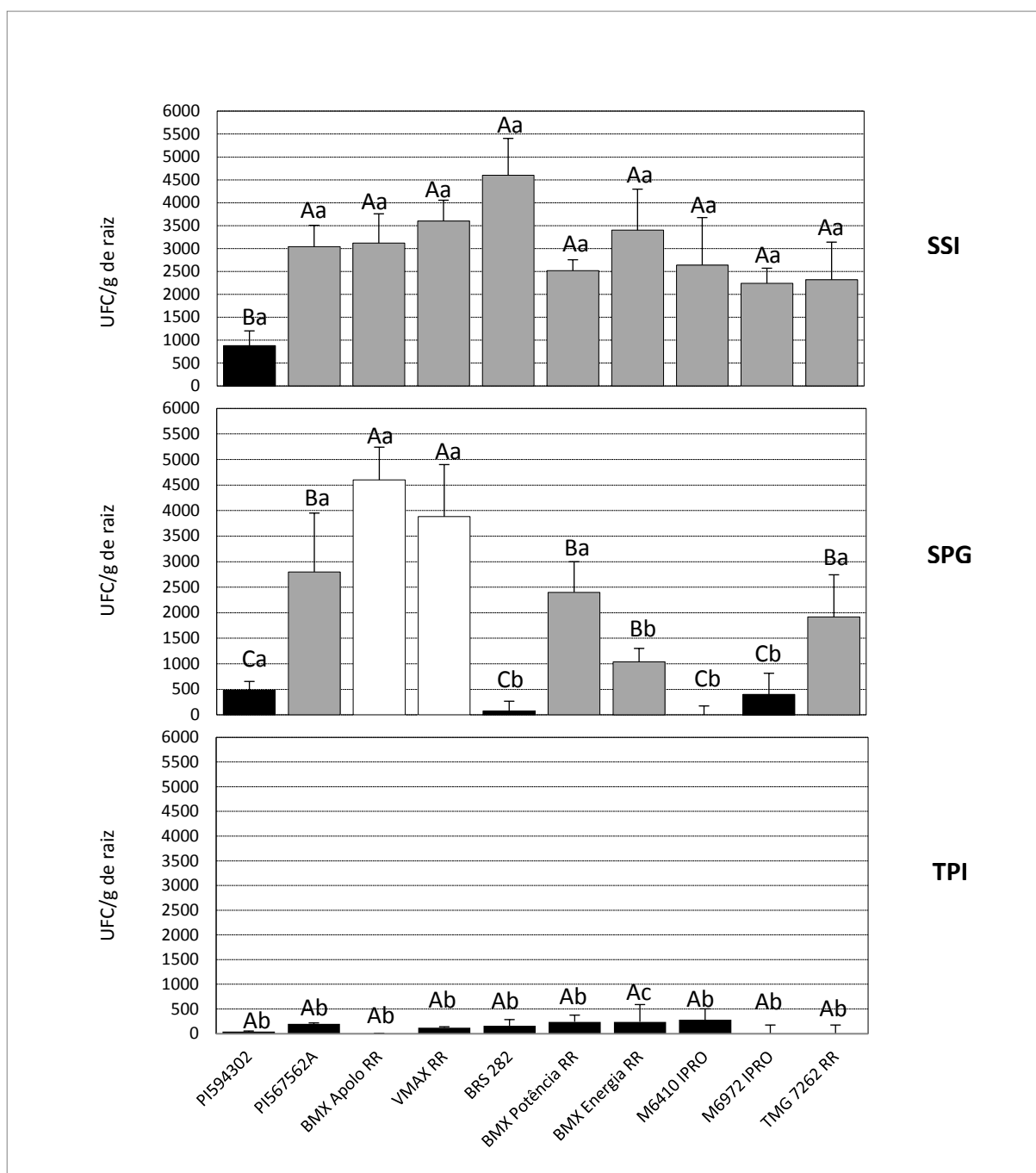


Figura 1. Avaliação de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *M. phaseolina* agrupadas pelo teste Scott -Knott para os métodos de inoculação Semente de Sorgo Infectada (SSI), Sementes Pré Germinadas em Meio de Cultura (SPG) e Teste do Palito Infectado (TPI) em diferentes genótipos de soja. Médias seguidas da mesma letra minúscula na vertical, para inoculação, e médias seguidas da mesma letra maiúscula na horizontal, para genótipo, não diferem significativamente pelo teste Scott-Knott.

O método TPI apresentou os menores valores de UFC. Nesse método, os genótipos não apresentaram diferença entre si, indicando que o método não foi eficiente para diferenciar os genótipos quanto à resistência a *M. phaseolina*. Ao contrário de outras culturas como o morango (AVILÉS et al., 2008) e melão (COHEN; ELKABETZ; EDELSTEIN, 2016), o método não apresentou resultados satisfatórios quando comparado aos outros métodos testados.

Para o fator inoculação (letras minúsculas), todos os genótipos apresentaram diferenças no comportamento de UFC em pelo menos um método de inoculação. O genótipo 7 (BMX Energia RR) apresentou comportamento diferencial para UFC em todos os métodos de inoculação (Figura 1).

Para a avaliação de SRC, o método SSI foi eficiente na distribuição dos genótipos e avaliação quanto aos níveis de resistência (Figura 2). O genótipo 1 (PI594302) também apresentou o menor valor de SRC, diferindo-se dos demais pelo método Scott Knott, indicando ser o genótipo mais resistente também pela nota visual. O valor para esse genótipo foi de 1,36, próximo ao encontrado por Mengistu et al. (2013) em condições de campo (1,6). Os demais genótipos não diferiram pelo método de Scott Knott, apresentando valores entre 2,54 e 3,12.

Segundo a escala proposta por Paris et al. (2006), o genótipo 1 (PI594302) foi considerado moderadamente resistente, pois apresentou valor de severidade entre 1 e 2. De acordo com a mesma escala, o genótipo 5 (BRS 282) apresentou valor de severidade superior a 3, valor atribuído a genótipo suscetível. Já os demais genótipos, foram considerados moderadamente suscetíveis, apresentando valores entre 2 e 3.

Para o método SPG, os menores valores de SRC foram obtidos para os genótipos 1, 5, 8 e 9. Assim como ocorreu na análise de UFC, esses genótipos apresentaram valores baixos de SRC, mesmo apresentando valores elevados no método SSI. Isso se deve provavelmente ao fato desses genótipos necessitarem de um maior tempo de contato com o meio para ser infectado pelo fungo. Por sua vez, os genótipos 2, 3, 4 e 6 apresentaram valores próximos, porém abaixo dos encontrados no método SSI (Figura 2).

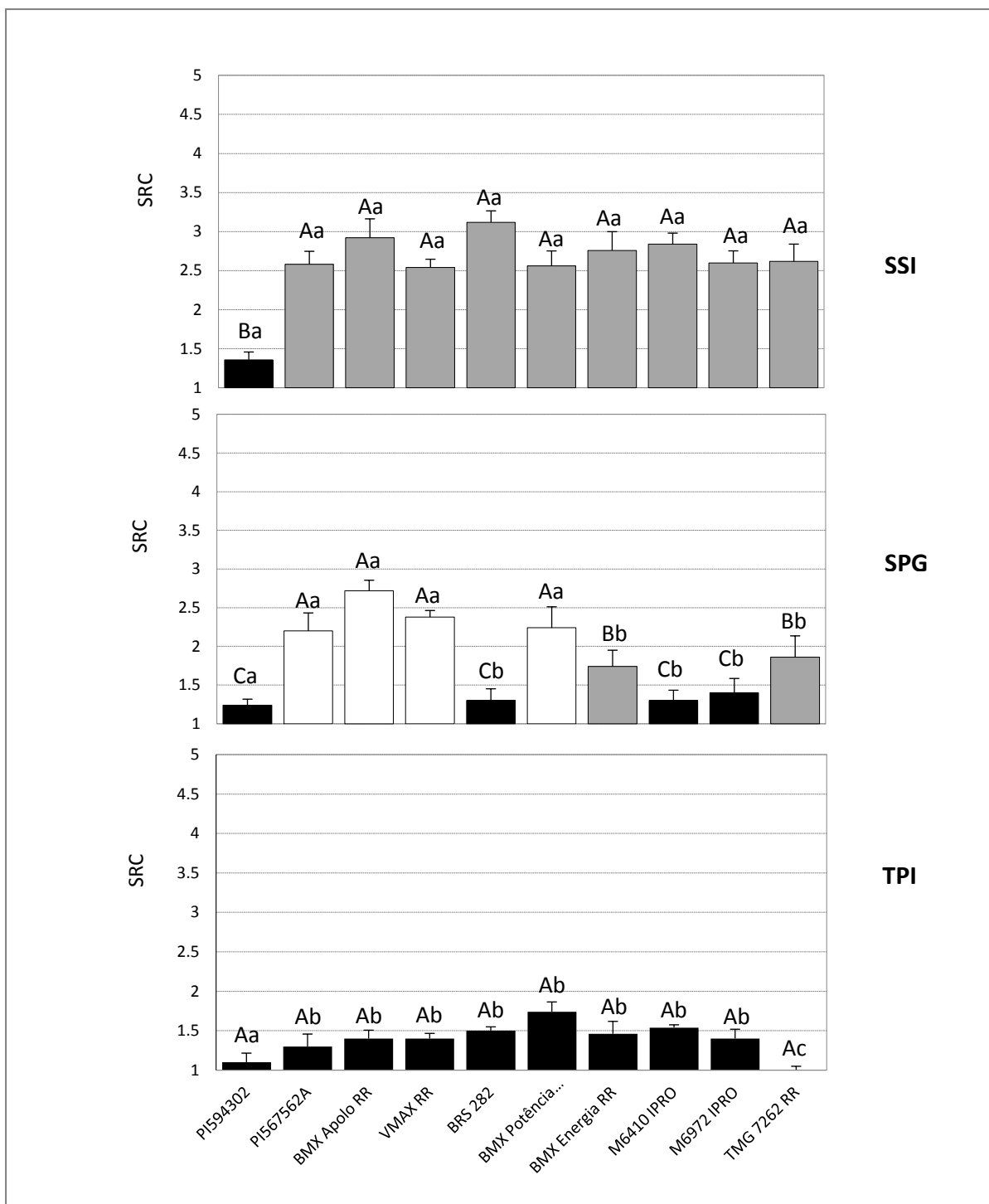


Figura 2. Avaliação de Severidade em Raíz e Caule (SRC) agrupadas pelo teste Scott -Knott para os métodos de inoculação Semente de Sorgo Infectada (SSI), Sementes Pré Germinadas em Meio de Cultura Colonizado com o fungo (SPG) e Teste do Palito Infectado (TPI) em diferentes genótipos de soja. Médias seguidas da mesma letra minúscula na vertical, para inoculação, e médias seguidas da mesma letra maiúscula na horizontal, para genótipo, não diferem significativamente pelo teste Scott-Knott.

Assim como ocorreu na análise de UFC, a análise de SRC não conseguiu separar os genótipos pelo método TPI, além dos valores de manifestação da doença ficarem abaixo dos demais métodos de inoculação. Esses resultados confirmam que esse método não é eficiente para detectar a resistência ao patógeno em estudo.

Para o fator inoculação na avaliação de SRC, o genótipo 1 (PI594302) não apresentou comportamento diferencial entre os métodos. Por sua vez, o genótipo 10 (TMG 7262 RR) apresentou comportamento diferencial em todos os métodos de inoculação. Os demais genótipos apresentaram pelo menos um comportamento diferencial entre os métodos (Figura 2).

Os métodos de avaliação UFC e SRC apresentaram correlação de 0,87. Esse resultado indica que apesar do método UFC ser considerado mais eficiente, o método SRC apresentou resultados consistentes e pode ser usado em programas de melhoramento, visto que é uma avaliação mais fácil e rápida de se ser feita. Mengistu et al. (2007) observaram correlação de 0,69 e 0,71 entre os métodos SRC e Índice baseado na UFC em dois anos agrícolas. Baseado no exposto, o método de avaliação SRC é indicado em situações onde há necessidade de avaliar um número elevado de genótipos.

De modo geral, o método de inoculação SSI proporcionou os melhores resultados e possibilitou observar os genótipos mais resistentes e suscetíveis a partir das análises de UFC e SRC. Já o método TPI não permitiu diferir os genótipos e apresentou os menores valores em ambas as avaliações, se mostrando ineficiente.

O método SPG proporcionou o aparecimento de sintomas apenas em alguns genótipos, mostrando que não deve ser usado para todos. Essa resposta variável entre os genótipos mostra que há necessidade de estudos complementares quanto ao tempo de contato das sementes com o meio de cultura infectado. Além disso, os genótipos com sintomas apresentaram valores de UFC e SRC inferiores ao método SSI.

Com exceção do genótipo 1 (PI594302) na avaliação de SRC, todos os demais genótipos apresentaram comportamento diferencial em pelo menos um método de inoculação. Tal fato indica haver interação genótipo x métodos de inoculação, tanto para UFC quanto para SRC.

O genótipo 2 (PI567562A), apesar de ter apresentado elevado grau de resistência em trabalho anterior (MENGISTU et al., 2013) não apresentou a resistência esperada no presente estudo. Em contrapartida, o genótipo 1 (PI594302) apresentou maior resistência nos dois parâmetros avaliados, sendo indicado sua introdução em programas de melhoramento genético como fonte de resistência à podridão de carvão em soja.

4 CONCLUSÕES

Foi observada correlação positiva e significativa entre as avaliações de unidades formadoras de colônias e severidade em raiz e caule para *Macrophomina phaseolina* em genótipos de soja.

O método da semente de sorgo infectada é, entre os testados, o mais eficiente para avaliação de resistência a *M. phaseolina* em genótipos de soja.

O genótipo PI594302 apresenta maior resistência a *M. phaseolina*, sendo indicado sua introdução em programas de melhoramento genético como fonte de resistência à podridão de carvão em soja.

5 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A. M. R.; GAUDÊNCIO, C. A.; SEIXAS, C. D. S.; DEBIASI H.; COSTA, J. M.; FARIAS, J. R. B.; FRANCHINI, J. C.; OLIVEIRA, M. C. N. (2014) *Macrophomina phaseolina* em soja. Londrina: Embrapa Soja, 2014, 55 p.

AVILÉS M.; CASTILLO, S.; BASCON, J.; ZEA-BONILLA, T.; MARTÍN-SÁNCHEZ, P. M.; PÉREZ-JIMÉNEZ, R. M. First report of *Macrophomina phaseolina* causing crown and root rot of strawberry in Spain. **Plant Pathology**, v. 57, p. 382, 2008.

BARBOSA, J. C.; MALDONADO JÚNIOR, W. **Experimentação agronômica e AgroEstat: sistema para análises estatísticas de ensaios agronômicos**. Jaboticabal, SP. Multipress, 2015.

COHEN, R.; ELKABETZ, M.; EDELSTEIN, M. Variation in the responses of melon an watermelon to *Macrophomina phaseolina*. **Crop Protections**, v.85, p. 46-51, 2016.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E.; BURMOOD, D. T.; PENNINGTON, J. S. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. **Crop Science**, v. 11, p. 929-931, 1971.

KEELING, B. L. A seedling test for resistance to soybean stem canker caused by *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*. **Phytopatology**, v. 72, p. 807-809, 1982.

MENGISTU, A.; BOND, J.; NELSON, R.; RUPE, J.; SHANNON, G.; ARELLI, P.; WRATHER, A. Identification of soybean accessions resistant to *Macrophomina phaseolina* by field screening and laboratory validation. Online. **Plant Health Progress**, doi: 10.1094/PHP-2013-0318-01-RS, 2013.

MENGISTU, A.; SMITH, J. R.; RAY, J. D. Seasonal progress of charcoal rot and its impact on soybean productivity. **Plant Disease**, v. 95, p. 1159-1166, 2011a.

MENGISTU, A.; ARELLI, P. A.; BOND, J. P.; SHANNON, G. J.; WRATHER, A. J.; RUPE, J. B.; CHEN, P.; LITTLE, C. R.; CANADAY, C. H.; NEWMAN, M. A.; PANTALONE, V. R. Evaluation of soybean genotypes for resistance to charcoal rot. Online. **Plant Health Progress** doi:10.1094/PHP-2010-0926-01-RS, 2011b.

MENGISTU, A.; RAY, J. D.; SMITH, J. R.; PARIS, R. L. Charcoal rot disease assessment of soybean genotypes using a colony forming unit index. **Crop Science**, v. 47, p. 2453-2461, 2007.

PARIS, R. L.; MENGISTU, A.; TYLER, J. M.; SMITH, J. R. Registration of soybean germplasm line DT97-4290 with moderate resistance to charcoal rot. **Crop Science** p. 46, p. 2324–2325, 2006.

PEARSON, C. A. S, SCHWENK, F. W.; CROWE, F. J.; KELLY, K. Colonization of soybean roots by *Macrophomina phaseolina*. **Plant Disease**, v. 68, p. 1086–1088, 1984.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometric**, v. 30, p. 507-512, 1974.

SHORT, G. E.; WYLLIE, T. D.; AMMON, V. D. Quantitative enumeration of *Macrophomina phaseolina* in soybean tissues. **Phytopathology** 68:736–741, 1978.

SMITH, G. S.; WYLLIE, D. Charcoal rot. p. 29–31. In HARTMAN, G. L.; SINCLAIR, J. B.; RUPE, J. C. (ed.) **Compendium of soybean disease**. 4th ed. American Phytopathological Society, St. Paul, MN, 1999.

TWIZEYIMANA, M.; HILL, C. B.; PAWLOWSKI, M.; PAUL, C.; HARTMAN, G. L. A cut-stem inoculation technique to evaluate soybean for resistance to *Macrophomina phaseolina*. **Plant Disease**, v. 96, p. 1210-1215, 2012.

WRATHER, A.; SHANNON, G.; BALARDIN, R.; CARREGAL, L.; ESCOBAR, R.; GUPTA, G. K.; MA, Z.; MOREL, W.; PLOPER, D.; TENUTA, A. Diseases effects on soybean yields in the top eight soybean-producing country es in 2006. Online. **Plant Health Progress** doi:10.1094/PHP-2010-0125-01-RS, 2010.

CAPÍTULO 3 - ESTUDO DE HERANÇA GENÉTICA DA RESISTÊNCIA A *Macrophomina phaseolina* NA CULTURA DA SOJA

RESUMO

A podridão de carvão, causada pelo fungo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid, tem sido uma doença de crescente importância na cultura da soja. Essa doença ocorre principalmente em regiões tropicais e subtropicais e sabe-se que sua maior incidência e severidade são observadas principalmente quando há estresse hídrico e altas temperaturas. Na tentativa de compreender o comportamento da resistência desse patógeno, objetivou-se o estudo da herança genética por meio de uma abordagem quantitativa, sendo utilizada uma análise de componentes de médias e variâncias. O experimento foi conduzido em casa de vegetação no delineamento inteiramente casualizado utilizando as seis gerações de estudo (P_1 , P_2 , F_1 , F_2 , RC_r e RC_s). As populações foram inoculadas com o fungo *Macrophomina phaseolina* por meio de sementes de sorgo infectadas. Após o estágio R_8 , as plantas foram avaliadas utilizando como critério a Severidade em Raiz e Caule (SRC). Foram estimados componentes de média (por meio do método dos mínimos quadrados ponderados), além das variâncias e parâmetros genéticos associados. Foi confirmado o caráter quantitativo da herança da resistência, com estimativa de 5,62 genes envolvidos na resistência. O modelo aditivo-dominante foi adequado, assim como a estimativa de parâmetros genéticos, havendo predominância de efeitos gênicos aditivos, tanto nos modelos de médias como nos de variância.

Palavras-chave: *Glycine max*, podridão de carvão, resistência genética.

CHAPTER 3 - STUDY OF GENETIC INHERITANCE OF RESISTANCE TO *Macrophomina phaseolina* IN SOYBEAN

ABSTRACT

Charcoal rot, caused by the fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid, has been a disease of growing importance in the soybean crop. This disease occurs mainly in tropical and subtropical regions and it is known that its higher incidence and severity are observed mainly when there is water stress and high temperatures. To understand the resistance of this pathogen, a quantitative approach was used to study the genetic inheritance through the analysis of components of means and variances. The experiment was conducted in a completely randomized design using the six generations (P_1 , P_2 , F_1 , F_2 , RC_r and RC_s). The populations were inoculated with the *M. phaseolina* by infected sorghum seeds method. After stage R8, the plants were evaluated using Root and Stem Severity (RSS) as criteria. The mean components (by means of the weighted least squares method), associated variances and genetic parameters were estimated. The quantitative character of the resistance inheritance was confirmed, with an estimate of 5.62 genes involved in the resistance. The additive-dominant model was adequate, as was the estimation of genetic parameters, with a predominance of additive gene effects in both the mean and variance models.

Key words: *Glycine max*, charcoal rot, genetic resistance.

1 INTRODUÇÃO

A podridão de carvão, causada pelo fungo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid, é uma doença de significativa importância econômica na cultura da soja (SMITH; WYLLIE, 1999; ALMEIDA et al., 2014). Essa doença ocorre principalmente em regiões tropicais e subtropicais e sabe-se que a maior incidência e severidade ocorrem principalmente quando há estresse hídrico e excesso de calor (PEARSON et al. 1984; SMITH; WYLLIE et al., 1999).

O fungo *M. phaseolina* é capaz de infectar centenas de espécies vegetais, entre elas o milho, sorgo, algodão e girassol. A rotação de culturas é alternativa sem grande eficácia, visto que trata-se de fungo polífago, além de ser capaz de se manter e se multiplicar em restos culturais na forma de microescleródios (PEARSON et al., 1984). No Brasil, com o aumento das áreas de plantio direto, caracterizado por manter restos culturais sobre o solo, o controle se torna ainda mais difícil.

A soja pode ser infectada logo após sua emergência, porém os sintomas da podridão de carvão são mais frequentemente observados na raiz e haste após o florescimento, principalmente nos estádios de crescimento R5, R6 e R7 (SHORT; WYLLIE; AMMON, 1978). Como sintomas, as plantas podem apresentar murchas, morte prematura e as folhas mortas permanecem ligadas às hastes.

A resistência genética é a maneira mais indicada para o controle da doença, porém nenhuma cultivar resistente está disponível no mercado (ALMEIDA et al., 2014). Trabalhos anteriores apresentam genótipos com bons níveis de resistência e que podem ser utilizados em programas de melhoramento visando à obtenção de cultivares que resistam, mesmo que parcialmente, à ação dessa doença (MENGISTU et al., 2007; MENGISTU et al., 2013).

Nesse contexto, é importante o estudo de herança da resistência genética. Por meio da análise de gerações, é possível avaliar a natureza e magnitude de efeitos gênicos envolvidos na resistência ao patógeno, fornecendo ao melhorista informações importantes na seleção e predição do comportamento das gerações segregantes.

O estudo genético para caracteres qualitativos (distribuição discreta) é usado quando poucos genes estão envolvidos na resistência e podem ser estudados por

meio de herança mendeliana (VAN DER PLANK, 1968). No entanto, devido ao comportamento do fungo *M. phaseolina* na cultura da soja, existe um indicativo que a herança envolvida seja de caráter quantitativo. A partir desta suposição, modelos de genética quantitativa, como componentes genéticos de média, variância e covariância podem ser utilizados (RAMALHO; FERREIRA; OLIVEIRA, 2005; CRUZ; VIANA; CARNEIRO, 2004; MATHER; JINKS, 1984).

Os componentes de média são normalmente obtidos por meio dos quadrados mínimos ponderados, onde são estimados a média fenotípica entre genótipos homozigotos (m), o afastamento do valor fenotípico dos genitores em relação à média (a) e o afastamento do valor fenotípico do heterozigoto em relação à média (d). Estas estimativas permitem o fornecimento do grau de dominância para o loco, sendo estimado pela razão entre o valor fenotípico dos genitores em relação à média e o afastamento do valor fenotípico do heterozigoto em relação à média. Quando se consideram vários locos, tem-se o somatório dos respectivos desvios, o que pode ocasionar uma pequena estimativa do grau de dominância (MATHER; JINKS, 1984, CRUZ; VIANA; CARNEIRO, 2004, BERNARDO, 2002).

Por sua vez, nos componentes de variância, os efeitos individuais dos locos são elevados ao quadrado, sendo uma estatística de segunda ordem, embora erros associados elevados possam ser encontrados devido à elevação ao quadrado dos desvios (RAMALHO et al., 2012). As estimativas de variância genética aditiva e de dominância permitem a obtenção da herdabilidade (h^2), que é definida como a proporção da variância genética presente na variância total. Neste caso, trata-se da confiabilidade do valor fenotípico como indicador de valor reprodutivo (RAMALHO et al., 2012, LANA; CARDOSO; CRUZ, 2003).

Baseado no exposto, o presente trabalho teve como objetivo o estudo de herança genética da podridão de carvão causada pelo patógeno *Macrophomina phaseolina* na cultura da soja, por meio de componentes de médias e variâncias.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados genótipos contrastantes para a resistência à *Macrophomina phaseolina*, sendo considerado o genótipo mais suscetível, a cultivar BRS 282 e mais resistente, a PI594301. Tais genótipos foram testados e classificados no capítulo anterior do presente trabalho. O genótipo PI594302 também foi observado por Mengistu et al. (2013) e reportado pela Embrapa Soja como adequado para o uso em programas de melhoramento visando resistência à podridão de carvão (ALMEIDA et al., 2014). Foi realizada a hibridação artificial entre a cultivar BRS 282 e o genótipo PI594302, obtendo-se as gerações F_1 , F_2 , RC_s e RC_r .

As hibridações foram realizadas em condições de casa de vegetação no departamento de Produção Vegetal da FCAV/UNESP Jaboticabal-SP, seguindo os tratamentos culturais para a cultura da soja. Cada botão floral foi devidamente etiquetado com a data de realização do cruzamento, e o nome dos progenitores masculino e feminino. Foi utilizado como parental feminino o genótipo BRS282, que possui flor branca, facilitando a confirmação dos cruzamentos, já que a PI594302 possui flor roxa (dominante).

Parte das sementes da geração F_1 foi semeada para obtenção da geração F_2 , por meio da autofecundação natural. A outra porção das sementes F_1 foi utilizada para os retrocruzamentos com os parentais.

Para o experimento final, foram semeadas as gerações P_1 , P_2 , F_1 , F_2 , RC_r , RC_s . O delineamento experimental foi o delineamento inteiramente casualizado (DIC). Foram semeadas três sementes por vaso, sendo algumas plantas desbastadas após a emergência, mantendo-se duas plantas por vaso. Cada planta compõe uma unidade experimental.

Foi utilizado um único isolado de *M. phaseolina* coletado em lavoura de soja na região de Jaboticabal-SP com sintomas severos da doença. O isolado foi multiplicado no Departamento de Fitossanidade da UNESP-FCAV de Jaboticabal-SP em meio BDA (batata dextrose ágar) a 25°C sob fotoperíodo de 12 horas.

O método de inoculação utilizado foi o da semente de sorgo infectada com o fungo. O inóculo foi preparado com cerca de 300 g de sementes de sorgo em erlenmeyer de 1L, sendo umedecidas e autoclavadas três dias consecutivos a 120°C

por 30 min. Após resfriar, 10 discos com um centímetro de diâmetro do meio de cultura com *M. phaseolina* foram adicionados em cada erlenmeyer. O inóculo foi mantido a 30°C por 15 dias, agitando-se diariamente o erlenmeyer para que o fungo colonizasse as sementes de forma homogênea. Para a inoculação, foram utilizadas três sementes de sorgo infectadas dispostas abaixo de cada semente de soja no momento da semeadura. Esta técnica de inoculação foi utilizada anteriormente por Mengistu et al. (2007), Mengistu et al. (2011) e Mengistu et al. (2013), em experimentos de campo utilizando o milho japonês como inóculo.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação com controle de fotoperíodo e temperatura. O substrato utilizado seguiu a proporção de três partes de terra de barranco para uma parte de vermiculita. O substrato foi autoclavado para a completa eliminação de patógenos e nematoides. A temperatura foi mantida entre 28 e 35°C sob fotoperíodo de 12,5 horas. Foram aplicados 5g de adubo 2-20-20 logo após a semeadura. Após 15 dias, também foram aplicados 3g de uréia por vaso, previamente diluída em água. Essa aplicação foi necessária devido à esterilização do solo ter eliminado os microorganismos responsáveis pela fixação biológica de nitrogênio.

No período de maturação, no estágio R₈ (FEHR; CAVINESS, 1977), as plantas foram cuidadosamente colhidas e a avaliação da doença foi realizada por meio do método SRC (severidade na raiz e caule) descrito por Mengistu et al. (2007). Tal método consistiu na divisão longitudinal do tronco e da raiz principal de cada planta sendo avaliada a SRC por meio da classificação visual da intensidade de coloração, assim como da quantidade de microescleródios que cobria o tecido da planta. A classificação consistiu em utilizar uma escala de notas de 1 a 5, onde 1 = nenhum microescleródio visível no tecido e 5 = tecido vascular escurecido devido ao elevado número de microescleródios. A escala de notas foi dividida em quatro classificações: resistente (valores até 1), moderadamente resistente (valores > 1 e ≤ 2), moderadamente suscetível (valores > 2 e <3) e suscetível (valores de 3 a 5) (PARIS et al., 2006).

Foram estimados os componentes de médias e variâncias do caráter estudado com base nas médias das plantas, que compunham cada unidade experimental, sendo utilizadas as diferentes gerações. As estimativas destes

componentes permitiram estimar a variância ambiental, bem como os componentes de variância genética e fenotípica das gerações.

Os componentes de médias permitem elaborar um modelo e estimar os parâmetros a e d , que correspondem ao afastamento de cada homozigoto e heterozigoto da média (m), respectivamente (CRUZ; VIANA; CARNEIRO, 2004).

Inicialmente, a análise foi feita levando-se em conta o modelo completo, cujos parâmetros são estimados a partir do método dos quadrados mínimos ponderados. Neste modelo, as variações nas médias são atribuídas aos efeitos de m , a , d , aa , ad , dd , considerando-se que:

m : média de todos possíveis homozigotos, considerando-se todos os genes que controlam o caráter;

a : medida dos efeitos aditivos de todos os genes que controlam o caráter;

d : medida dos desvios da dominância de todos os genes que controlam o caráter;

aa : medida de todas as interações aditivas x aditivas entre dois genes, considerando-se todos os genes que controlam o caráter;

ad : medida de todas interações aditiva x dominante entre dois genes, considerando-se todos os genes que controlam o caráter;

dd : medida de todas as interações dominante x dominante entre dois genes, considerando-se todos os genes que controlam o caráter.

O sistema de equações, estabelecido pelas médias de cada geração, pode ser representado na forma matricial $Y=X\beta + \varepsilon$, em que:

$$Y = \begin{bmatrix} \bar{P}_1 \\ \bar{P}_2 \\ \bar{F}_1 \\ \bar{F}_2 \\ \overline{RC_r} \\ \overline{RC_s} \end{bmatrix}; \quad X = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 1 & -1 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 1 \\ 1 & 0 & 1/2 & 0 & 0 & 1/4 \\ 1 & 1/2 & 1/2 & 1/4 & 1/4 & 1/4 \\ 1 & -1/2 & 1/2 & 1/4 & -1/4 & 1/4 \end{bmatrix}; \quad \beta = \begin{bmatrix} m \\ a \\ d \\ aa \\ ad \\ dd \end{bmatrix} \quad \varepsilon = \begin{bmatrix} e_1 \\ e_2 \\ e_3 \\ e_4 \\ e_5 \\ e_6 \end{bmatrix}$$

Sendo:

Y : vetor de médias de gerações;

X : matriz de coeficientes;

β : vetor de parâmetros genéticos a serem estimados;

ε : vetor de erros associados a cada média.

Assim, são estimados:

$$\hat{m} = \frac{1}{2}\bar{P}_1 + \frac{1}{2}\bar{P}_2 + 4\bar{F}_2 - 2\bar{RC}_r - 2\bar{RC}_s$$

$$\hat{a} = \frac{1}{2}\bar{P}_1 - \frac{1}{2}\bar{P}_2$$

$$\hat{d} = -\frac{3}{2}\bar{P}_1 - \frac{3}{2}\bar{P}_2 - \bar{F}_1 - 8\bar{F}_2 + 6\bar{RC}_r + 6\bar{RC}_s$$

$$\hat{aa} = -4\bar{F}_2 + 2\bar{RC}_r + 2\bar{RC}_s$$

$$\hat{ad} = -\bar{P}_1 + \bar{P}_2 - \bar{F}_1 + 2\bar{RC}_r - 2\bar{RC}_s$$

$$\hat{dd} = \bar{P}_1 + \bar{P}_2 + 2\bar{F}_1 + 4\bar{F}_2 - 4\bar{RC}_r - 4\bar{RC}_s$$

A significância da hipótese de cada parâmetro é nulo, isto é, $H_0: \beta_i=0$, é avaliada pelo teste t, dado por:

$$t = \frac{\hat{\beta}_i - \beta_i}{\sqrt{\hat{V}(\hat{\beta}_i)}}, \text{ se } H_0: \beta_i=0, \text{ então } t = \frac{\hat{\beta}_i}{\sqrt{\hat{V}(\hat{\beta}_i)}}$$

A variância de cada efeito é obtida aplicando-se as propriedades de variância em cada expressão do estimador do respectivo parâmetro genético e admitindo-se que as médias das famílias são independentes:

$$\hat{V}(\hat{m}) = \frac{1}{4}\hat{V}(\bar{P}_1) + \frac{1}{4}\hat{V}(\bar{P}_2) + 16\hat{V}(\bar{F}_2) + 4\hat{V}(\bar{RC}_r) + 4\hat{V}(\bar{RC}_s)$$

$$\hat{V}(\hat{a}) = \frac{1}{4}\hat{V}(\bar{P}_1) + \frac{1}{4}\hat{V}(\bar{P}_2)$$

$$\hat{V}(\hat{d}) = \frac{9}{4}\hat{V}(\bar{P}_1) + \frac{9}{4}\hat{V}(\bar{P}_2) + \hat{V}(\bar{F}_1) + 64\hat{V}(\bar{F}_2) + 36\hat{V}(\bar{RC}_r) + 36\hat{V}(\bar{RC}_s)$$

$$\hat{V}(\hat{aa}) = 16\hat{V}(\bar{F}_2) + 4\hat{V}(\bar{RC}_r) + 4\hat{V}(\bar{RC}_s)$$

$$\hat{V}(\hat{ad}) = \hat{V}(\bar{P}_1) + \hat{V}(\bar{P}_2) + 4\hat{V}(\bar{RC}_r) + 4\hat{V}(\bar{RC}_s)$$

$$\hat{V}(\hat{dd}) = \hat{V}(\bar{P}_1) + \hat{V}(\bar{P}_2) + 4\hat{V}(\bar{F}_1) + 16\hat{V}(\bar{F}_2) + 16\hat{V}(\bar{RC}_r) + 16\hat{V}(\bar{RC}_s)$$

A soma de quadrados de parâmetros associada ao modelo completo é composta em somas de quadrados atribuídas a cada efeito individual, ajustadas

para os demais efeitos. As estimativas desta soma podem ser obtidas pelo método de Eliminação de Gauss, que consiste em obter, por operações elementares nas linhas, as matrizes T e W, em que T é triangular superior e W um vetor de dimensão equivalente à Y, ou seja:

$$[X'D^{-1}X \mid X'D^{-1}Y] \sim \dots \sim [T \mid W]$$

~: Símbolo que significa operações elementares nas linhas. Assim, obtém-se:

$$SQ(\hat{\beta}_n / \hat{\beta}_1, \dots, \hat{\beta}_{n-1}) = \frac{(W_n)^2}{t_{nn}}$$

Em que:

t_{nn} : elemento de ordem n x n da matriz T;

W_n : elemento de ordem n do vetor W.

Também foi realizada a análise levando-se em conta o modelo aditivo dominante, em que são considerados apenas os efeitos m, a e d. Neste caso, os parâmetros são estimados por meio do método dos mínimos quadrados ponderados. O vetor de efeitos genéticos é assim estimado:

$$\hat{\beta} = (X'FF'X)^{-1} X'FF'Y = (X'D^{-1}X)^{-1} X'D^{-1}Y$$

sendo:

D: Matriz diagonal, cujos elementos não nulos são as variâncias das médias de cada família; e

F: matriz dada pela raiz quadrada de D^{-1} .

A soma de quadrados de parâmetros associada ao modelo reduzido é também decomposta em somas de quadrados atribuídas a cada efeito individual, ajustadas para os demais efeitos, pelo Método de Eliminação de Gauss.

Por meio da análise conjunta são obtidas as estimativas dos valores esperados para as médias. Posteriormente, os valores observados e esperados foram comparados por um teste de Qui-quadrado (χ^2).

Para a decisão de se aceitar ou não a hipótese de nulidade (H_0), o valor de χ^2 calculado foi comparado com o valor de χ^2 tabelado ao nível de 5% de significância, e grau de liberdade igual a k-1. Se o teste for não significativo, isto indica que o modelo proposto é suficiente para explicar o que está contido no valor fenotípico médio de cada população, caso contrário podem ser incluídos novos parâmetros ao

modelo, como os relativos às interações epistáticas (RAMALHO; SANTOS; ZIMMERMANN, 1993).

Para análise dos componentes de variâncias das gerações, foram obtidas as seguintes estimativas (CRUZ; VIANA; CARNEIRO, 2004):

a) Variância ambiental: $\hat{\sigma}_e^2 = \frac{\hat{\sigma}_{F_1}^2 + \hat{\sigma}_{P_1}^2 + \hat{\sigma}_{P_2}^2}{3}$

b) Variância fenotípica: $\hat{\sigma}_f^2 = \hat{\sigma}_{F_2}^2$

c) Variância genotípica: $\hat{\sigma}_g^2 = \hat{\sigma}_{F_2}^2 - \hat{\sigma}_e^2$

d) Variância aditiva: $\hat{\sigma}_a^2 = 2\hat{\sigma}_{F_2}^2 - (\hat{\sigma}_{RCr}^2 + \hat{\sigma}_{RCs}^2)$

e) Variância devida aos desvios de dominância: $\hat{\sigma}_d^2 = \hat{\sigma}_g^2 - \hat{\sigma}_a^2$

f) Herdabilidade no sentido amplo: $h_a^2 = \frac{\hat{\sigma}_g^2}{\hat{\sigma}_{F_2}^2} = \frac{\hat{\sigma}_f^2 - \hat{\sigma}_e^2}{\hat{\sigma}_{F_2}^2}$

g) Erro da estimativa da herdabilidade no sentido amplo:

$$s(h_a^2) = \left\{ \left(\frac{2}{9} \left[\left(\frac{1}{(\hat{\sigma}_{F_2}^2)^2} \right) \left(\frac{(\hat{\sigma}_R^2)^2}{n_1 + 2} + \frac{(\hat{\sigma}_{P_2}^2)^2}{n_2 + 2} + \frac{(\hat{\sigma}_{F_1}^2)^2}{n_3 + 2} \right) + \left(\frac{1}{n_4 + 2} \right) (3 - h_a^2)^2 \right] \right)^{1/2} \right\}$$

h) Herdabilidade no sentido restrito: $h_r^2 = \frac{\sigma_a^2}{V_{F_2}} = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_a^2 + \sigma_d^2 + \sigma_e^2}$

i) Erro da estimativa da herdabilidade no sentido restrito :

$$s(h_r^2) = \left\{ \left(\frac{2}{9} \left[\frac{1}{V_{F_2}^2} \left(\frac{(V_{RC1})^2}{n_5 + 2} + \frac{(V_{RC2})^2}{n_6 + 2} \right) + \left(\frac{1}{n_4 + 2} \right) (2 - h_r^2)^2 \right] \right)^{1/2} \right\}$$

j) Grau médio de dominância (baseado em médias): $GMD = \frac{2\bar{F}_1 - (\bar{P}_1 + \bar{P}_2)}{\bar{P}_1 - \bar{P}_2}$

l) Número de genes envolvidos na determinação do caráter (η):

$$\eta = \frac{R^2(1 + 0,5 GMD^2)}{8V_{GF_2}}$$

Onde, R=amplitude total do caráter na F_2 .

m) Ganho por seleção: $GS = DSh_f^2$

em que: $DS = \bar{X}_s - \bar{X}_0$

Sendo:

DS: diferencial de seleção;

$\bar{X}_s$: Média dos indivíduos selecionados em F_2 ;

$\bar{X}_0$: Média da população F_2 ;

Para as análises estatísticas, foi utilizado o aplicativo computacional Genes (CRUZ, 2013).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Até o momento, não existe no mercado brasileiro, cultivares com resistência à podridão de carvão. A PI594302, que foi utilizada como parental resistente, apesar de não possuir resistência completa, apresenta resultados promissores, sendo considerada moderadamente resistente. Por sua vez, a cultivar BRS282 apresenta valores de SRC superiores a 3, indicando suscetibilidade ao patógeno.

Houve variabilidade genética quanto ao comportamento das gerações em relação à resistência à *Macrophomina phaseolina*, sendo este um pré-requisito para estudo de controle genético, o que permite a estimação de parâmetros genéticos nas populações do presente trabalho. Essa variabilidade genética entre os parentais já havia sido observada no estudo anterior.

No presente estudo, as populações segregantes apresentaram distribuição contínua assimétrica e a população F_2 apresentou praticamente todas as classes quanto aos níveis de resistência. Essa característica indica o comportamento quantitativo da herança da resistência (Figura 1).

A variância da geração F_2 foi superior à variância observada nos genitores, o que é explicado pela recombinação gênica que contribuiu para o aumento da variabilidade fenotípica (Tabela 1). Essa variabilidade fenotípica é atribuída aos efeitos da variância ambiental, variância aditiva e variância de dominância.

As médias de F_1 foram intermediárias aos parentais, com tendência de dominância no sentido da resistência. Foram observados maiores valores de variância nas gerações F_2 e RC_r . Esse fato pode ser atribuído à maior segregação

dos genes e recombinação gênica nessas gerações. Os genitores e a geração F_1 apresentaram os menores valores de variância. Fato esperado, uma vez que todos os indivíduos nessas gerações possuem o mesmo genótipo, portanto, as variações observadas são devido ao efeito do ambiente. As variações dentro dos genitores e F_1 , não influenciaram na interpretação quanto à resistência e à suscetibilidade, já que os genótipos apresentaram os valores esperados e próximos aos encontrados no capítulo anterior (Tabela 1).

Tabela 1. Médias e variâncias para resistência à *Macrophomina phaseolina* avaliadas a partir de plantas de soja das gerações P_1 , P_2 , F_1 , F_2 , RC_r e RC_s utilizando como critério de avaliação a severidade em raiz e caule (SRC).

Geração	Número de Plantas	Média	Variância
P_1	25	1,51	0,0833
P_2	25	3,32	0,2892
F_1	37	2,08	0,1321
F_2	280	2,37	0,6160
RC_r	28	1,96	0,5542
RC_s	27	2,81	0,3875

A herdabilidade no sentido amplo foi estimada em 72,69% e a herdabilidade no sentido restrito foi estimada em 44,20% (Tabela 2). A diferença encontrada entre os valores de herdabilidade no sentido amplo e restrito indica que há influência ambiental sobre o caráter e influência dos efeitos não aditivos na herança genética. A herdabilidade é uma propriedade do caráter, sendo válida apenas para a população e as condições ambientais a que os indivíduos foram submetidos. A herdabilidade no sentido restrito é mais importante, pois é baseada nos efeitos aditivos. Valores baixos de herdabilidade são um indicativo de que a herança genética da resistência é complexa e demanda maior trabalho em programas de melhoramento.

A variância genotípica observada na geração F_2 pode ser atribuída principalmente aos efeitos de aditividade e de dominância dos genes. A variância aditiva apresentou valor de 0,27 e a variância dominante apresentou valor de 0,17 (Tabela 1).

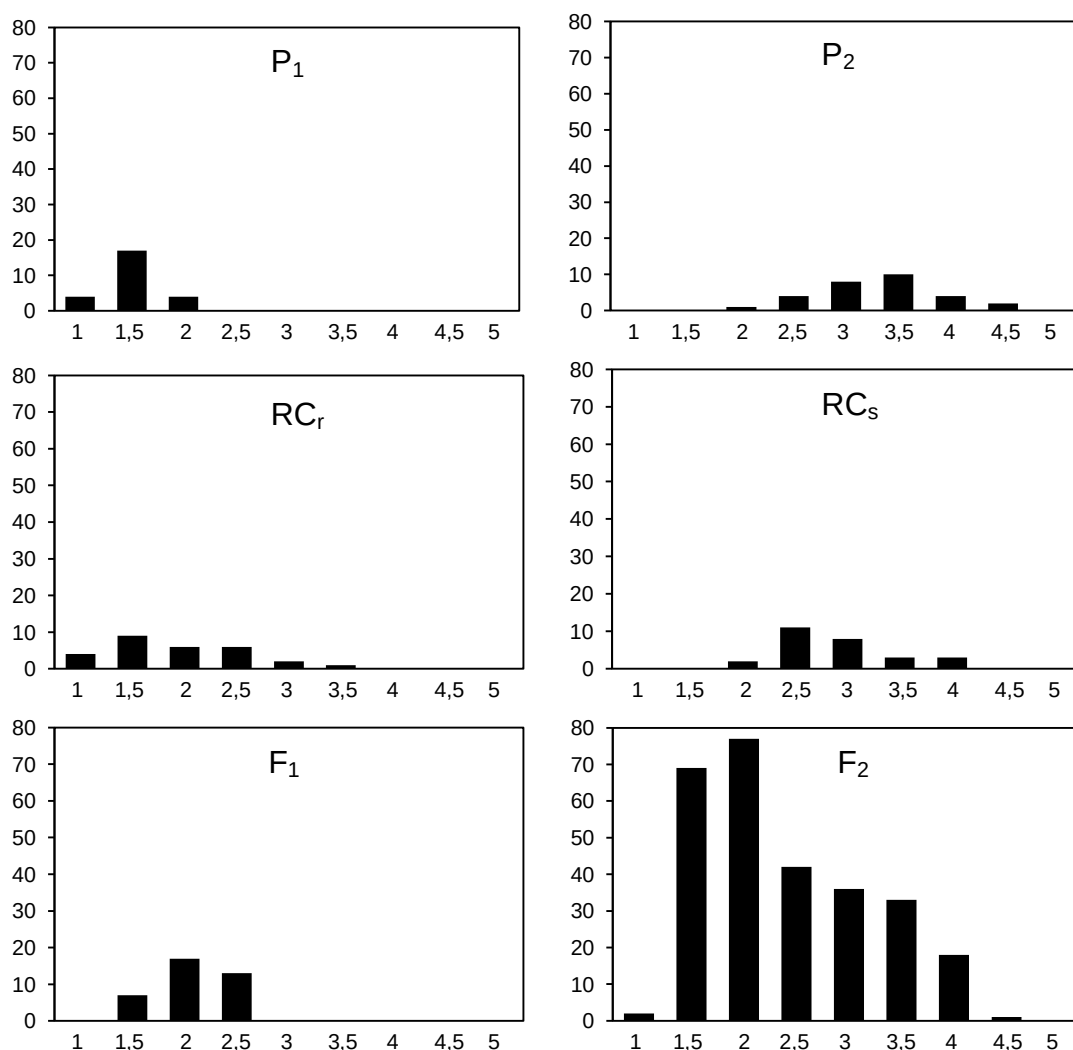


Figura 1. Distribuição de frequência de severidade em raiz e caule da podridão de carvão causada por *Macrophomina phaseolina* das seis gerações, sendo realizado o cruzamento entre os genótipos de soja PI594302 (P₁) e BRS282 (P₂).

Com a seleção de 20% das plantas F₂ superiores para o parâmetro SRC foi possível obter um ganho de seleção de 22,67% (Tabela 2). Valores negativos indicam que a seleção é realizada no sentido de diminuir o valor do caráter avaliado (menores valores de SRC). A média predita para o primeiro ciclo de seleção (MPPCS) foi de 1,97, valor atribuído a genótipos moderadamente resistentes, segundo escala de Paris et al. (2006). Observou-se, assim, um incremento significativo mensurado pelo ganho genético, pela seleção das plantas superiores para o caráter avaliado.

Tabela 2. Estimativas dos parâmetros genéticos da análise de variância para resistência à *Macrophomina phaseolina* em plantas de soja das gerações P₁, P₂, F₁, F₂, RC_r e RC_s a partir da avaliação de severidade em raiz e caule.

VF	0,6160
VG	0,4478
VA	0,2723
VD	0,1755
VE	0,1682
NG	5,62
GDM	0,36
GS(%)	22,67
MPPCS	1,97
$h^2a + sh^2a$	72,69% $\pm$ 1,96%
$h^2r + sh^2r$	44,20% $\pm$ 3,56%

VF= Variância fenotípica; VG= Variância genotípica; VA= Variância aditiva; VD= Variância dominante; VE= Variância ambiental; NG= Número de genes; GMD= Grau médio de dominância; GS= Ganho de seleção; MPPCS= Média predita para o primeiro ciclo após seleção; sh^2a = Erro associado às estimativas da herdabilidade no sentido amplo; sh^2r = Erro associado às estimativas da herdabilidade no sentido restrito.

O grau médio de dominância (baseado em médias) foi de 0,36. Esse valor indica a existência de locos com dominância, dominância parcial e outros com apenas efeito aditivo, não podendo, neste caso, afirmar a exclusiva existência de dominância incompleta dos genes que conferem resistência no presente estudo (Tabela 2).

A estimativa do número de genes que são responsáveis pelo controle da resistência foi de 5,62. Esse valor não pode ser tomado de forma absoluta, mas pode ser um indicativo do tipo de herança do caráter estudado. O valor encontrado nesse estudo indica assim, a natureza quantitativa do caráter de herança da resistência estudado (Tabela 2).

Os resultados do teste de escala conjunta indicam que as médias dos genótipos ajustam-se ao modelo aditivo-dominante. Além disso, não há evidência de interação epistática entre os genes que condicionam a resistência (Tabela 3).

Não houve segregação transgressiva na geração F₂ para suscetibilidade e nem mesmo para resistência. O valor máximo e mínimo de SRC na geração F₂ foi de 4,5 e 1,0, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3. Número de plantas inoculadas com *Macrophomina phaseolina*, médias observadas e médias esperadas para cada uma das gerações no modelo aditivo-dominante para resistência à podridão de carvão determinada pela severidade em raiz e caule, avaliada nas gerações P₁, P₂, F₁, F₂, RC_r e RC_s.

Geração	Número de plantas	Média Observada	Média Esperada	Desvios
P ₁	25	1,51	1,5351	-0,0351
P ₂	25	3,32	3,4186	-0,0986
F ₁	37	2,08	2,1491	-0,0680
F ₂	280	2,38	2,3130	0,0655
RC _r	28	1,96	1,8423	0,1221
RC _s	27	2,81	2,7839	0,0309
r		0,9928		
R ²		0,9857		
		$X^2=0,016^{ns}$		

X^2 tabelado=7,82 (P=5%)

Foi observada heterose para SRC, ou seja, superioridade da geração F₁ (2,08) em relação à média dos genitores (2,42). Esse fato pode ocorrer devido à complementação gênica (FU; DOONER, 2002).

A avaliação do ajustamento do modelo aditivo-dominante foi realizada por meio do coeficiente de determinação (R²) e pelo teste de qui-quadrado (X²) dos valores médios estimados e observados. O teste de escala conjunta para modelo aditivo-dominante demonstrou que este modelo é suficiente para explicar os desvios dos valores fenotípicos de cada geração com valor de X² estimado em 0,016 (Tabela 4), além da correlação entre as médias estimadas pelo modelo e as médias obtidas nas gerações serem altas (r=0,9928 e R²=0,9895) (Tabela 3).

O modelo aditivo-dominante foi considerado eficiente em trabalhos anteriores em estudos de herança da resistência à mancha bacteriana em tomateiro (LOBO; GIORDANO; LOPES, 2005) e nematoide do cisto na cultura da soja (TEIXEIRA, 2016).

A partir da decomposição não ortogonal da soma dos quadrados de parâmetros, considerando o modelo completo (modelo aditivo-dominante-epistasia) foi confirmado que o ajuste ao modelo aditivo-dominante foi adequado. O modelo aditivo-dominante explicou 99,71% da variação. O efeito aditivo foi responsável por grande parte desta variação com valor de 87,17 (Tabela 4).

No modelo completo, apesar de não significativos, os efeitos epistáticos contribuíram com percentagem mínima nas variações fenotípicas observadas (0,29%). A maior parte desse valor se deve ao efeito epistático dominante-dominante (dd) com 0,2467% (Tabela 4). Brim; Cockerham (1961) e Arias (1986) afirmam que efeitos de dominância e suas interações epistáticas são menores nas espécies autógamas, como é o caso da soja.

Tabela 4. Coeficiente de determinação (R^2) pela decomposição não ortogonal da soma de quadrados de parâmetros para o modelo completo (m, a, d, aa, ad, dd) avaliados em plantas de soja nas gerações P_1 , P_2 , F_1 , F_2 , RC_r e RC_s do cruzamento realizado entre os genótipos de soja PI594302 (P_1) e BRS282 (P_2).

FV	GL	SQ	$R^2(\%)$
m	1	31,8985	12,5082
a	1	222,3087	87,1727
d	1	0,0797	0,0312
subtotal	3		99,71
aa	1	0,0112	0,0044
ad	1	0,0933	0,0366
dd	1	0,6293	0,2467
Subtotal Epistasia	3		0,29
Total	6	255,0209	100

m: média, a: efeito aditivo, d: efeito de dominância, aa: efeito aditivo-aditivo, ad: efeito aditivo-dominante, dd: efeito dominante-dominante.

Observou-se que, para o modelo aditivo-dominante, por meio da decomposição não ortogonal da soma dos quadrados de parâmetros ajustados, a média foi o parâmetro de maior estimativa, explicando 88,37% da variabilidade existente. Os efeitos aditivos apresentam maior importância ($[a]= 11,05\%$) na determinação do caráter quando comparado ao efeito de dominância ($[d] = 0,57\%$). Pela decomposição não ortogonal, é possível afirmar que os efeitos aditivos apresentam maior importância na determinação do caráter no cruzamento estudado (Tabela 5).

O predomínio de efeitos aditivos no modelo analisado indica facilidade de seleção de genótipos geneticamente superiores, os quais podem proporcionar maiores ganhos (CRUZ; VIANA; CARNEIRO, 2004).

Tabela 5. Decomposição não ortogonal da soma dos quadrados de parâmetros ajustados para resistência à *Macrophomina phaseolina*, determinada pela severidade em raiz e caule (SRC), avaliados nas gerações P_1 , P_2 , F_1 , F_2 , RC_r e RC_s na cultura da soja.

FV	GL	Estimativa	SQ	R ²
m	1	2,4768	2301,42	88,37
a	1	-0,9417	287,8146	11,05
d	1	-0,3277	14,9549	0,57
Total	3		2604,19	100

m: média, a: efeito aditivo, d: efeito dominante.

Pelo teste t verificou-se que somente o efeito genético de aditividade foi significativo para o modelo completo (aditivo-dominante-epistático). Tal fato indica a possibilidade de sucesso na seleção em população segregante, havendo a possibilidade de a característica ser fixada com a seleção nas gerações seguintes (Tabela 6). Efeitos aditivos são desejáveis em plantas autógamas, pois possibilita ganhos genéticos satisfatórios.

Tabela 6. Estimativa dos parâmetros genéticos, variâncias e teste t para o modelo completo (aditivo-dominante-epistático), ajustados com base na severidade em raiz e caule (SRC) das seis gerações (P_1 , P_2 , F_1 , F_2 , RC_r e RC_s).

FV	Estimativa	Variância	t
m	2,3661	0,1755	5,6479
a	-0,9100	0,0037	-14,9100**
d	0,3349	1,4071	0,2823
aa	0,0439	0,1717	0,1059
ad	0,1189	0,1514	0,3056
dd	-0,6199	0,6107	-0,7933

m – média, a – efeito aditivo, d- efeito de dominância, aa – efeito aditivo-aditivo, ad- efeito aditivo-dominante, dd- efeito dominante-dominante.

As estimativas do efeito aditivo foram negativas, o que pode ser explicado pelo fato de que o genitor P_2 e o retrocruzamento RC_s se referem ao genótipo com maior expressão do caráter que, nesse caso, é o genótipo de maior suscetibilidade à doença (Tabela 6).

É importante salientar que os resultados encontrados são um indicativo da herança da resistência no presente cruzamento e são válidos somente para a

população avaliada. Estudos complementares da herança da podridão de carvão devem ser realizados, explorando novas populações contrastantes visando ao melhor entendimento da herança genética, que consiste em importante estratégia na busca de genótipos com resistência à essa doença.

4 CONCLUSÕES

O modelo aditivo dominante foi suficiente para explicar o caráter resistência a *M. phaseolina* no presente estudo.

Foi observada a predominância de efeitos gênicos aditivos, tanto nos modelos de médias como nos de variância.

Existe o indicativo da natureza quantitativa para o caráter da herança da resistência a *M. phaseolina*, em função do número de genes observado no controle do caráter.

Em função do indicativo de natureza quantitativa, considera-se que a resistência a *M. phaseolina* apresenta elevada influência ambiental e baixa herdabilidade.

5. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A. M. R.; GAUDÊNCIO, C. A.; SEIXAS, C. D. S.; DEBIASI H.; COSTA, J. M.; FARIAS, J. R. B.; FRANCHINI, J. C.; OLIVEIRA, M. C. N. (2014) *Macrophomina phaseolina* em soja. Londrina: Embrapa Soja, 2014, 55 p.

ARIAS, E.R.A. **Teste de escala conjunta na estimação de parâmetros genéticos em soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. 1986. 86p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 1986.

BEIGULMAN, B. **Curso prático de bioestatística**. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2006. 272p.

BERNARDO, R. **Breeding for quantitative traits in plants**. Woodbury: Minnessota, 2002. 368 p.

BRIM, C.A.; COCKERHAM, C.C. Inheritance of quantitative characters in soybeans. **Crop Science**, Madison, v. 1, p.187-190, 1961.

CRUZ, C.D. GENES: A software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013.

CRUZ, C.D.; VIANA, J.M.S.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: Editora UFV, 2004. 480p.

FEHR, W. R.; CAVINESS, J. A. **Stages of soybean development**. Ames : Iowa State University, 1977, 11p. (Special Report, 80).

FU, H.; DOONER, H.K. Intraspecific violation of genetic colinearity and its implications in maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 99, n. 14, p.9573-9578, 2002.

LANA, A. M. Q.; CARDOSO, A. A.; CRUZ, C. D. Herdabilidades e correlações entre caracteres de linhagens de feijão obtidas em monocultivo e em consórcio com o milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 6, p. 1031-1037, 2003.

LOBO, V. L. S.; GIORDANO, L. B.; LOPES, C. A. Herança da resistência à mancha bacteriana em tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**. v.30, n.4, p.343-349, 2005.

MATHER, K.; JINKS, L.L. **Introdução à genética biométrica**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1984. 242p.

MENGISTU, A.; BOND, J.; NELSON, R.; RUPE, J.; SHANNON, G.; ARELLI, P.; WRATHER A. Identification of soybean accessions resistant to *Macrophomina phaseolina* by field screening and laboratory validation. Online. **Plant Health Progress**, doi: 10.1094/PHP-2013-0318-01-RS, 2013.

MENGISTU, A.; ARELLI, P. A.; BOND, J. P.; SHANNON, G. J.; WRATHER, A. J.; RUPE, J. B.; CHEN, P.; LITTLE, C. R.; CANADAY, C. H.; NEWMAN, M. A.; PANTALONE, V. R. Evaluation of soybean genotypes for resistance to charcoal rot. Online. **Plant Health Progress** doi:10.1094/PHP-2010-0926-01-RS, 2011.

MENGISTU, A.; RAY, J. D.; SMITH, J. R.; PARIS, R. L. Charcoal rot disease assessment of soybean genotypes using a colony forming unit index. **Crop Science**, v. 47, p.2453-2461, 2007

PARIS, R. L.; MENGISTU, A.; TYLER, J. M.; SMITH, J. R. Registration of soybean germplasm line DT97-4290 with moderate resistance to charcoal rot. **Crop Science** p. 46, p. 2324–2325, 2006.

PEARSON, C. A. S, SCHWENK, F. W.; CROWE, F. J.; KELLY, K. Colonization of soybean roots by *Macrophomina phaseolina*. **Plant Disease**, v. 68, p. 1086–1088, 1984.

RAMALHO, M. P.; SANTOS, J. B. D.; PINTO, C. A. B. P.; SOUZA, E. A.; GONÇALVES, F. M. A.; SOUZA, J. C. D. **Genética na agropecuária**. 5. ed. revisada. Lavras, MG: Editora UFLA, 2012. 566 p.

RAMALHO, M.A.P.; FERREIRA, D.F.; OLIVEIRA, A.C. **Experimentação em genética e melhoramento de plantas**. Lavras: UFLA, 2005. 303p.

RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B. dos; ZIMMERMANN, M.H. de O. **Genética quantitativa em plantas autógamas** – aplicações ao melhoramento do feijoeiro. Goiânia: Editora da UFG, 1993. 271p.

ROWE, K.E.; ALEXANDER, W.L. Computations for estimating the genetic parameters in joint-scaling test. **Crop Science**, v.20, n.1, p.109-110, 1980.

SHORT, G. E.; WYLLIE, T. D.; AMMON, V. D. Quantitative enumeration of *Macrophomina phaseolina* in soybean tissues. **Phytopathology** 68:736–741, 1978.

SMITH, G. S.; WYLLIE, D. Charcoal rot. p. 29–31. In HARTMAN, G. L.; SINCLAIR, J. B.; RUPE, J. C. (ed.) **Compendium of soybean disease**. 4th ed. American Phytopathological Society, St. Paul, MN, 1999.

TEIXEIRA, L. C. A. A. **Estudo genético de populações de soja com fonte de resistência à *Heterodera glycines* (raça 3) oriundas de topocruzamentos tipo alimento x tipo grão**. 2016. Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Jaboticabal, 2016.

VAN DER PLANK, J.E. **Plant Diseases: Epidemics and Control**. New York: Academic Press, 1968. 206p.