

Melhoramento e biotecnologia: ferrugem da soja

C.A.A. Arias¹; J.F.F. de Toledo¹; L.A. de Almeida¹; A.E. Pipolo¹; G.E. de S. Carneiro¹; R.V. Abdelnoor¹; B.F. Rachid²; A.S. Ribeiro²; A.L. Nepomuceno¹

A despeito dos diversos problemas envolvendo clima, preço e aumento do custo de produção para o controle de doenças, a cultura da soja tem mantido posição de destaque no Brasil. Na safra 2004/05, apesar da ocorrência de deficiência hídrica em algumas regiões, o Brasil produziu mais de 51 milhões de toneladas de grãos de soja em área de 23,3 milhões de hectares (Anuário, 2005). Sob condições normais de clima, principalmente disponibilidade de água, a tecnologia disponível tem permitido alcançar níveis de produtividade satisfatórios e competitivos, mundialmente. O Brasil tem, frequentemente, apresentado médias para a produtividade de grãos em soja superiores às dos Estados Unidos, o maior produtor mundial. Para manter a competitividade tecnológica será preciso fortalecer a rede de pesquisa já estabelecida, além de desenvolver competência em novas tecnologias para dar sustentabilidade ao processo de desenvolvimento de novos produtos.

O processo de desenvolvimento de variedades de soja adaptadas às diversas regiões brasileiras envolve diversas áreas da pesquisa, destacando-se as áreas de melhoramento, fitotecnia, genética, fitopatologia, entomologia, solos, entre outras. Dentre as principais contribuições da pesquisa para o complexo soja no Brasil, destaca-se o desenvolvimento de variedades com adaptação às baixas latitudes e resistentes às principais doenças. A resistência genética tem solucionado problemas sérios de doenças, como a mancha olho-de-rã (*Cercospora sojina*), o cancro da haste (*Diaporthe phaseolorum* f.sp. *meridionalis*), o oídio (*Microsphaera diffusa*) e o nematóide de cisto (*Heterodera glycines*). A ferrugem asiática, cau-

sada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, até então presente apenas nos continentes do velho mundo, foi relatada no Brasil em 2001 (Yorinori et al., 2002), provocando perdas de produtividade nos estados das regiões Sul e Centro-Oeste. Mais recentemente, em 2004, foi também detectada nos Estados Unidos. Considerando-se apenas os municípios de Chapadão do Sul (MS), Costa Rica (MS) e Chapadão do Céu (GO), que representam cerca de 220.000 ha de soja, as perdas estimadas alcançaram a cifra de US\$ 13 milhões e as lavouras mais atingidas apresentaram quebras de 70%, com produtividade de apenas 840-900 kg/ha. A expectativa inicial de que a doença ocorreria mais severamente nas regiões mais chuvosas e nas regiões altas dos cerrados, onde há abundante formação de orvalho no verão, vem se confirmando e induzindo os agricultores à aplicação antecipada de fungicidas.

A estratégia mais eficiente e sustentável para o controle da ferrugem da soja é o uso de variedades resistentes. Para desenvolver variedades resistentes, é preciso inicialmente encontrar variabilidade genética para o caráter, seja dentro da própria espécie, seja em qualquer ser vivo onde seja possível encontrar genes de resistência. Além disso, é necessário que um método eficiente de avaliação esteja disponível para separar genótipos resistentes e suscetíveis. Trabalhos de conhecimento básico sobre o fungo foram desenvolvidos e permitiu adequar os métodos de produção de esporos e de inoculação, viabilizando o processo de seleção de genótipos de soja resistentes.

Em trabalhos de prospecção de novos genes de resistência, cerca de 150 genótipos

¹ Pesquisador da Embrapa Soja; Caixa Postal 231, 86001-970, Londrina, PR; arias@cnpso.embrapa.br

² Estagiário da Embrapa Soja; Caixa Postal 231, 86001-970, Londrina, PR.

de soja citados pela literatura como possíveis fontes de resistência foram avaliados em casa-de-vegetação após inoculação com o isolado presente no Brasil. Trinta e cinco destes genótipos apresentaram reação do tipo RB (reação de resistência do tipo *reddish brown*) para o isolado de 2001 presente no estado do Paraná. Adicionalmente, todos os acessos (cerca de 6.500) do Banco Ativo de Germoplasma de soja da Embrapa Soja (BAG-soja) foram avaliados em condições de casa-de-vegetação quanto à reação à ferrugem asiática. Desses acessos, 50 apresentaram reação do tipo resistente (RB) e, portanto, tem potencial para uso nos programas de melhoramento. As principais fontes selecionadas estão listadas na Tabela 1. A maioria dessas fontes são pouco adaptadas para as condições brasileiras e nada se sabe sobre a herança e, principalmente, se seus genes de resistência seriam os mesmos citados na literatura, o que dificulta o uso direto das mesmas no melhoramento.

Todos os anos, também são avaliados, em casa-de-vegetação, os genótipos que participam das avaliações preliminares e finais, incluindo linhagens convencionais e transgênicas com tolerância ao glifosato. Essas linhagens são adaptadas e, após serem re-testadas para ferrugem, são incluídas em novas baterias de cruzamentos, dando continuidade ao processo.

No melhoramento é importante se conhecer a herança da resistência à ferrugem para

racionalizar o processo de desenvolvimento de cultivares. Existe relato de quatro genes dominantes para a resistência à ferrugem, denominados Rpp1 a Rpp4, identificados em introduções de plantas (PI's) e cultivares (Bromfield & Hartwig, 1980; Bromfield & Melching, 1982; Hartwig, 1986; McLean & Byth, 1980). Na Embrapa Soja, em Londrina, PR, foram realizados diversos testes com a ferrugem e observou-se que as variedades BRS 134, BRSMS Bacuri, CS 201, FT-17, FT-2, IACp11, KIS 601 e OCEPAR 7, apresentaram lesões do tipo RB. Com base na genealogia desse grupo de variedades, observou-se que a resistência é derivada da variedade FT-2, e determinada por um gene dominante (Arias et al., 2003). Entretanto, ainda não foi possível definir se esse gene corresponde a um dos quatro genes já citados na literatura. Um novo isolado do fungo, obtido a partir de amostras tomadas no estado do Mato Grosso em 2003, quebrou a resistência da FT 2 e de mais duas fontes descritas na literatura (Rpp1 e Rpp3). A resistência derivada de FT-2 chegou a ser muito utilizada nos programas de melhoramento, mas infelizmente essa resistência já não é mais efetiva contra a doença.

Além das fontes primárias Rpp1, Rpp3 e FT-2, o novo isolado também quebrou a resistência de 12 dos genótipos listados na tabela 1 (PI 398507, BR86-448, PI 339866, PI 398781, PI398561, IPB77-257, PI 398513, PI 398526, PI 407912, PI 340050, PI 424473 e BRS 134). Nos

Tabela 1. Listagem dos genótipos de soja avaliados para a reação à ferrugem asiática.

1 Abura	13 PI 203406	25 PI 398781	37 PI 417503
2 BR86-448	14 PI 224270	26 PI 407912	38 PI 423956
3 FT87-17893	15 PI 230971	27 PI 407980	39 PI 423966
4 GC84051-9-1	16 PI 274453	28 PI 408205	40 PI 424473
5 GC84058-18-4	17 PI 339866	29 PI 408251	41 PI 471904
6 GC84058-21-4	18 PI 340050	30 PI 416764	42 Shiranui
7 Hyunga	19 PI 379618 TC1	31 PI 416810	43 PI 547875 (Rpp1)
8 IPB77-257	20 PI 398507	32 PI 416819	44 PI 224270 (Rpp2)
9 Nova Santa Rosa	21 PI 398513	33 PI 417074	45 PI 562312 (Rpp3)
10 PI 197182	22 PI 398526	34 PI 417115	46 PI 459025 (Rpp4)
11 PI 200455	23 PI 398561	35 PI 417125	47 FT-2
12 PI 200487	24 PI 398777	36 PI 417421	48 BRS 134

ensaios de campo com populações derivadas de cruzamentos com algumas dessas fontes, foi possível observar a ausência de plantas com reação de resistência, comprovando a quebra de resistência observada em condições de casa-de-vegetação. Essa informação é importante para os programas de melhoramento, que podem investir mais naquelas fontes de resistência vertical ainda efetivas, aumentando as chances de sucesso. Vale ressaltar que existe grande possibilidade de que as fontes cujas resistências foram quebradas sejam similares em pelo menos um dos genes presentes nas fontes com Rpp1, Rpp3 e FT-2, pois todos foram vencidos simultaneamente. Este fato também comprova a grande capacidade do fungo em gerar variabilidade genética, uma vez que um novo isolado foi capaz de quebrar a resistência de pelo menos dois locos independentes.

A melhor estratégia é utilizar todos os genes disponíveis e suas possíveis combinações, junto com outras fontes de tolerância ou de resistência horizontal. Para tanto, estão sendo conduzidos estudos de alelismo para verificar se os genes de resistência presentes em diversos acessos do banco de germoplasma estão localizados em algum dos *loci* já descritos ou se correspondem a genes diferentes e que, portanto, tem maior utilidade para os programas de melhoramento. Essa informação sobre a disponibilidade de outros genes de resistência, além dos quatro já descritos para a ferrugem, e a identificação dos genótipos portadores desses genes será primordial para que os programas de melhoramento estabeleçam suas estratégias de combate à doença, através de variedades resistentes. Também dará subsídios para outras pesquisas na área de genética molecular, pois representa o primeiro passo rumo à prospecção de genes úteis para a agricultura. Esses genes poderão ser isolados, seqüenciados e estudados quanto aos seus mecanismos de ação não apenas no controle da ferrugem mas também sobre outras doenças, particularmente aquelas que compõem o complexo "doenças de final de ciclo da soja" (*Septoria glycines* e *Cercospora kikuchii*) entre outras.

Embora a maioria dos genes derivados das diferentes fontes esteja se comportando como genes dominantes, com dominância direcional para a resistência, existem alguns genes que não seguem exatamente essa regra, podendo apresentar outro tipo de relação de dominância em função do *background* genético onde está inserido, o que caracteriza a presença de alguns efeitos genéticos complicadores como epistasia, por exemplo. Apesar disso, a reação dos genótipos homozigotos tem se mostrado estável, o que é importante nos processos de seleção e desenvolvimento de cultivares. As diferentes relações de dominância encontradas, em geral prejudicam a seleção nas gerações precoces de avanço após cruzamento e também dificultam a introgressão desses genes através do método tradicional de retrocruzamentos, exigindo modificações.

Normalmente as fontes citadas acima e selecionadas em casa-de-vegetação apresentam reação de resistência do tipo RB (*reddish brown*) condicionadas por genes maiores e herança simples e que, segundo a experiência mundial, são facilmente quebradas pelo fungo a curto ou médio prazo, transformando genótipos resistentes em suscetíveis. Outro tipo de resistência, difícil de ser verificada em condições de casa-de-vegetação, é a resistência horizontal ou de campo. Esse tipo de resistência caracteriza-se por apresentar diferentes níveis de resistência ou suscetibilidade dentro dos materiais genéticos, cujo mecanismo normalmente é explicado por variações no período de latência, número de lesões, número de esporos por lesão e viabilidade de esporos, entre outros fatores epidemiológicos. Esses fatores tem sido estudados isoladamente em casa-de-vegetação sobre variedades brasileiras, mas muito ainda precisa ser feito nessa linha de pesquisa. Como as características epidemiológicas são quantitativas, espera-se que um maior número de genes esteja envolvido, o que explicaria a existência de níveis ou de classes de resistência pouco distintas. Linhagens tolerantes, aquelas com menor redução da produtividade de grãos mesmo na presença da doença, também são de grande interesse para o melhoramento e si-

milarmente à resistência horizontal, tem herança complexa e sua efetividade dependente dos níveis de doença em cada ambiente. Em geral, mecanismos de resistência horizontal e de tolerância são desejáveis e devem estar confundidos nas linhagens superiores, onde o método de avaliação é que vai dar o foco sobre uma ou outra característica.

As fontes de resistência do tipo horizontal têm sido detectadas nos ensaios de adaptação, nos ambientes onde ocorre alta incidência de ferrugem e nos ensaios de caracterização de variedades nas vitrines tecnológicas, em parcelas tratadas e não tratadas com fungicidas. O método de seleção contempla genótipos com resistência horizontal e/ou com tolerância, pois se baseia na severidade da doença e no rendimento de grãos. Na safra 2004/05, na Região Sul do Brasil, a seca prejudicou esse tipo de avaliação. Alternativamente, a resistência horizontal foi avaliada em ensaios de covas sob irrigação, constituído por 5.700 parcelas plantadas em duas épocas de semeadura, de onde foram selecionadas 33 progênies F3 mais resistentes que o padrão de resistência horizontal e em ensaios em casa-de-vegetação onde variedades são caracterizadas quanto ao potencial de resistência, mesmo apresentando lesões do tipo TAN. Dados preliminares sobre o mecanismo genético envolvido nesse tipo de resistência comprovaram a existência de efeitos genéticos aditivos entre os componentes de média e de variância, demonstrando que a seleção pode ser efetiva.

Já na Região Central do Brasil, principalmente na rede de ensaios desenvolvidos pelas parcerias da Embrapa nos estados de Goiás, Minas Gerais e Mato Grosso, algumas variedades se destacaram por apresentarem menor severidade da doença em estádios mais avançados da soja. Essas avaliações estão sendo refeitas para verificação dos resultados. Anualmente, mais de 1000 novas combinações de cruzamentos e retrocruzamentos envolvendo fontes de genes maiores e menores de resistência à ferrugem asiática são efetuadas, gerando populações de plantas com variabilidade genética para ser explorada no melhoramento. O manejo sobre essas populações é realizado de forma

a permitir uma pressão de seleção obtida pela presença de níveis de doença capazes de provocar perdas quantitativas e qualitativas, permitindo eliminar os materiais mais suscetíveis. Essa estratégia de se trabalhar com populações grandes e permitindo a ação da seleção natural sobre essas populações tem sido usada no programa de desenvolvimento de germoplasma com resistência a insetos e tem se mostrado efetiva.

Das ferramentas biotecnológicas disponíveis, o uso de marcadores moleculares para genes de resistência a ferrugem é a que mais tem sido utilizada. Marcadores moleculares do tipo SSR ligados aos genes de resistência derivados da variedade FT-2 e das PIs com os genes Rpp1 a Rpp4 estão sendo desenvolvidos. Com a caracterização fenotípica, realizada para o cruzamento com a variedade FT-2, em um estudo para a septoriose, foi possível encontrar marcadores SSR ligados ao gene da variedade FT-2. Hoje é possível saber se este gene está presente ou não com o auxílio desses marcadores e estudar as possíveis interações desse gene com outros genes de resistência, o que seria impraticável através das avaliações fenotípicas. Não foi possível realizar o mesmo para os genes Rpp1 e Rpp3, hoje quebrados e sem marcadores. Para os genes Rpp2 e Rpp4, foi possível o mapeamento com o auxílio de populações obtidas a partir de 2002. Marcadores também estão sendo utilizados para QTLs (locos de caracteres quantitativos) envolvidos na resistência horizontal.

Algumas técnicas biotecnológicas para transformação de plantas promoveram a quebra das barreiras reprodutivas, permitindo a troca de genes entre espécies distantes e possibilitaram o desenvolvimento de novos produtos com qualidades e características nunca antes imaginadas segundo os métodos tradicionais. Processos eficientes de transformação não tem utilidade se genes de interesse, como os de resistência à ferrugem da soja, não estiverem isolados e clonados para esse fim. As questões sobre quais genes ou qual promotor ou peptídeo sinal ou terminador utilizar, vão depender não só de aspectos ligados à eficiência do gene em

expressar a resistência mas, também, de questões ligadas à biossegurança e de direitos de proteção sobre genes, promotores e processos. Alguns genes candidatos como é o caso do peptídeo anti-microbiano (defensina) de soja, estão tendo seus níveis de expressão analisados pela técnica de PCR em tempo real, visando identificar possíveis diferenças entre genótipos sensíveis e tolerantes. Amostras de RNAm obtidas de genótipos suscetíveis e tolerantes, submetidos a condições de controle e de infecção por ferrugem, estão sendo utilizadas na construção de bibliotecas subtrativas, de onde poderão sair novos genes candidatos. Outras atividades como o isolamento de compostos ativos para testes contra a ferrugem e obtenção de plantas transgênicas com peptídeos antimicrobianos tem sido desenvolvidas pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e atendem a objetivos de médio e longo prazos.

Referências

- ANUÁRIO BRASILEIRO DA SOJA. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2005. 136p.
- ARIAS, C. A. A.; BROGIN, R. L.; YORINORI, J. T.; KIIHL, R. A. de S.; TOLEDO, J. F. F. Um gene dominante determinando a resistência da cultivar FT-2 à ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2., 2003, Porto Seguro. [Anais.]. Porto Seguro: SBMP, 2003. Trabalho 164. 1 CD-ROM.
- BROMFIELD, K. R.; HARTWIG, E. E. Resistance to soybean rust and mode of inheritance. **Crop Science**, v. 20, n. 2, p. 254-255, 1980.
- BROMFIELD, K. R.; MELCHING, J. S. Sources of specific resistance to soybean rust. (Abstr.) **Phytopatology**, v. 72, p. 706, 1982.
- HARTWIG, E. E. Identification of a fourth major genes conferring to rust in soybeans. **Crop Science**, v. 26, p. 1135-1136, 1986.
- McLEAN, R. J.; BYTH, D. E. Inheritance of resistance to rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in soybeans. **Australian Journal Agricultural Research**, v. 31, p. 951-956, 1980.
- YORINORI, J. T.; PAIVA, W. M.; FREDERICK, R. D.; FERNANDEZ, F. T. Ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi*) no Brasil e no Paraguai nas safras 2000/01 e 2001/02. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 2.; MERCOSOJA 2002, 2002, Foz do Iguaçu. **Perspectivas do agronegócio da soja: resumos...** Londrina: Embrapa Soja, 2002. p. 94. (Embrapa Soja. Documentos, 181). Organizado por Odilon Ferreira Saraiva, Clara Beatriz Hoffmann-Campo.