

ANÁLISE DA RESISTÊNCIA GENÉTICA DE LINHAGENS DE SOJA CONTENDO GENES DE RESISTÊNCIA PARA A FERRUGEM ASIÁTICA PIRAMIDADOS

Noelle Giacomini Lemos,^{1,2} Alessandro de Lucca e Braccini,² Ricardo Vilela Abdelnoor,³ Kazuhiro Suenaga¹, Naoki Yamanaka¹

¹ Centro Internacional Japonês de Pesquisa em Ciências Agrícolas (JIRCAS), 1-1, Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8686, Japão

² Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo 5790, Maringá, Paraná 87020-900, Brasil

³ Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa da Soja (Embrapa Soja), Caixa Postal 231, Londrina, Paraná 86001-970, Brasil

Introdução

A ferrugem asiática da soja (FAS), causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* é uma das mais severas doenças que ameaçam a cultura da soja no Brasil. A FAS foi primeiramente detectada no Brasil na safra de 2001/02 afetando 60% das áreas de plantio (Yorinori, 2008). O desenvolvimento de variedades geneticamente resistentes tem sido uma estratégia de grande importância para os programas de melhoramento por ser um dos meios mais econômicos de controle e de fácil manejo (Pierozzi et al., 2008). Apesar disso, cultivares de soja atualmente disponíveis são suscetíveis a pelo menos algumas das raças de FAS (Sinclair and Hartman, 1999), e não há cultivares desenvolvidas que tenham níveis aceitáveis de resistência a todas as raças desse fungo (Monteros et al., 2007). O objetivo desse estudo foi avaliar o desempenho da resistência genética de linhagens contendo três dos cinco genes de resistência identificados para a FAS (*Rpp2*, *Rpp4* e *Rpp5*) contra cinco isolados desse fungo.

Materiais e Métodos

Preparo dos Isolados

Um isolado japonês T1-2 (Yamaoka et al., 2002) e quatro isolados brasileiros, BRP-2.1, BRP-2.5, BRP-2.6 e BRP-2.49 foram utilizados. Os isolados brasileiros foram obtidos por meio do isolamento de urédias únicas esporuladas de folhas V2 e V3 da cultivar BRS184, inoculada com uma população de fungos brasileira (BRP-2) (Yamanaka et al., 2010). A multiplicação e caracterização da virulência desses isolados foi realizada em quatorze genótipos com resistência conhecida a FAS, escolhidos de acordo com Yamaoka et al., 2002 e Yamanaka et al., 2010 incluindo os genótipos TK5, Wayne e BRS154 como controle suscetíveis.

Piramidação genética e obtenção das linhagens resistentes

A piramidação foi feita pelo cruzamento entre uma linhagem carregando dois genes para resistência, *Rpp2* e *Rpp4*, e 'Kinoshita' (*Rpp5*) (Lemos et al., 2011). A seleção dos indivíduos contendo os três locos homocigotos resistentes foi feita em 140 indivíduos F₂ utilizando-se marcadores de repetição de sequências únicas (SSR) flanqueando as regiões cromossômicas onde os locos *Rpp2*, *Rpp4* e *Rpp5* estão presentes: Satt380 e Satt620 para o *Rpp2*, Satt288 e AF162283 para o *Rpp4* e Sat275 e Sat280 para o *Rpp5* (Lemos et al., 2011). Duas plantas F₂, 'No2-4' e 'No6-12', foram identificadas contendo dois genes em homocigose e um em heterocigose e suas sementes replantadas para a obtenção de plantas F₃ contendo os três genes em homocigose. A avaliação do desempenho das linhas selecionadas foi feita em F₄ com a análise de sete características relacionadas à resistência em plantas infectadas contra os cinco isolados. A variedade BRS184, os dois parentais An76 (*Rpp2* and *Rpp4*) e Kinoshita (*Rpp5*), o genótipo PI230970 (*Rpp2*) e o PI459025 (*Rpp4*) foram incluídos em cada experimento. Os experimentos foram conduzidos separadamente para cada isolado em câmaras de crescimento controlado. As características analisadas foram: cor de lesão (LC), frequência de lesões contendo urédias (%LU), número de urédias por lesão (NoU), níveis de esporulação (SL), severidade da infecção (IFI), período de incubação (IP) e período de latência (LP). As características de resistência LC, %LU, NoU, SL e IFI foram medidas em cada genótipo a partir de 30 lesões únicas escolhidas aleatoriamente em folhas V2 duas semanas após a inoculação, utilizando-se um microscópio

estereoscópico. As características IP e LP foram avaliadas checando-se o período de aparecimento dos primeiros sintomas (IP) e o período da primeira esporulação (LP), observados na face abaxial das folhas.

Resultados e Conclusões

Desenvolvimento de linhagens resistentes

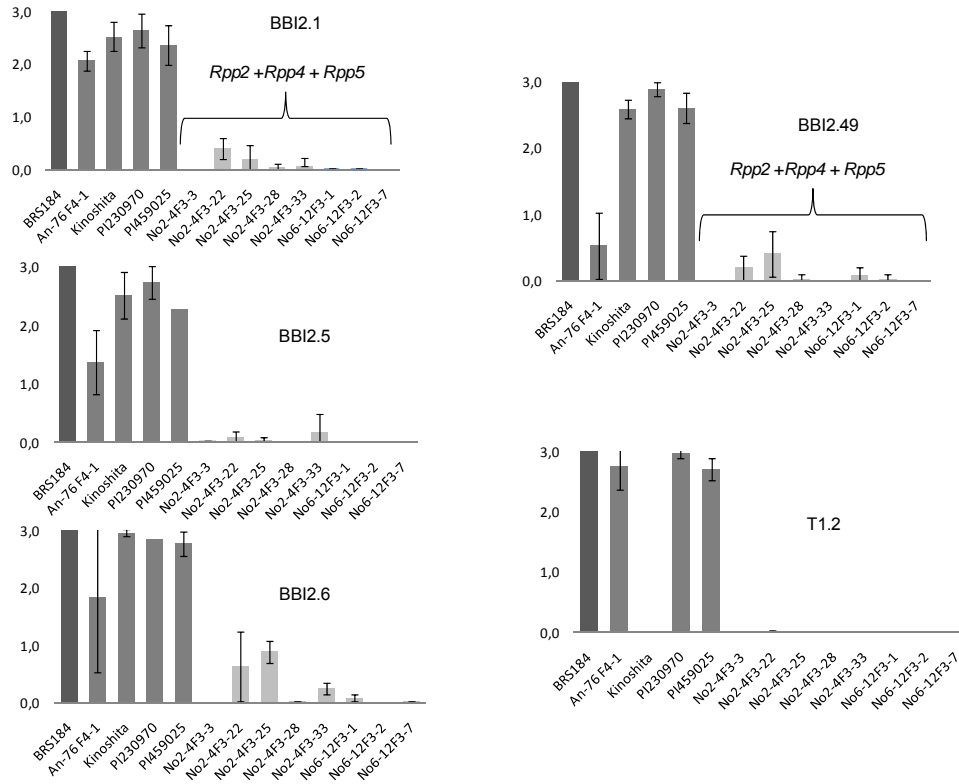
A partir da análise de 140 indivíduos F_2 por marcadores moleculares, 10 plantas apresentaram heterozigose em todos os loci, 14 homozigose para um dos locus, 4 homozigose para dois locus e 112 plantas apresentaram algum locus em suscetibilidade ou recombinação em F_2 . Dois genótipos em F_2 , No2-4 e No6-12, o primeiro carregando *Rpp2* e *Rpp4* como homozigoto resistente e *Rpp5* como heterozigoto resistente (*Rpp2Rpp2Rpp4Rpp4Rpp5rpp5*), e o segundo carregando *Rpp4* e *Rpp5* homozigoto resistente e *Rpp2* como heterozigoto (*Rpp2rpp2Rpp4Rpp4Rpp5Rpp5*) foram selecionados e a partir deles sementes F_3 foram obtidas. Utilizando-se marcadores para os locos em heterozigose obteve-se em F_3 oito plantas com os três genes em homozigose, 5 do genótipo 2-4 (No2-4F3-3, No2-4F3-22, No2-4F3-25, No2-4F3-28, No2-4F3-33) e 3 do genótipo 6-12 (No6-12F3-1, No6-12F3-2 e No6-12F3-7).

Avaliação da resistência das linhagens com os três locos em homozigose contra FAS

A avaliação do desempenho das linhagens contendo os três genes de resistência indicou que todas as 8 linhagens foram altamente resistentes contra os 5 isolados. Foi observado um decréscimo significativo (teste t a $p > 0.5$) nas características SL, NoU e %LU em todas as 8 linhagens em relação a variedade BRS184 e seus ancestrais An-76, Kinoshita, PI230970 (*Rpp2*) e PI459025 (*Rpp4*). Essas três características apresentaram níveis de correlação de Pearson altos ($r \geq 0.9$) a $p < 0001$ em todos os isolados testados. As características SL e NoU foram reduzidas a níveis próximos de zero e zero para quase todas as linhagens contendo os três genes contra todos os isolados, e todas elas apresentaram SL e NoU zero contra o isolado japonês T1-2 (Figura 1). Diferenças não significativas ocorreram entre as linhagens e seus ancestrais para as características de LC, IP e LP e IFI. Pela observação do desempenho dentro de cada grupo das linhagens No2-4 e No6-12, detectou-se que o *background* genético ainda está influenciando o desempenho no grupo da linhagem No2-4F3 como pode ser observado, por exemplo, nos níveis de esporulação (Figura 1, a).

A característica SL é uma das mais importantes para a resistência porque a quantidade de esporos produzidos influencia diretamente na multiplicação da doença (Yamanaka et al., 2010). As linhagens desenvolvidas nesse estudo, apesar de apresentarem diferenças não significativas e relação aos seus ancestrais e controle para a maioria das características estudadas são bons recursos genéticos para o controle da FAS. A estratégia de piramidação pela seleção assistida por marcadores SSR foi eficiente para a obtenção de linhagens resistentes a todos os 5 isolados de FAS.

A)



B)

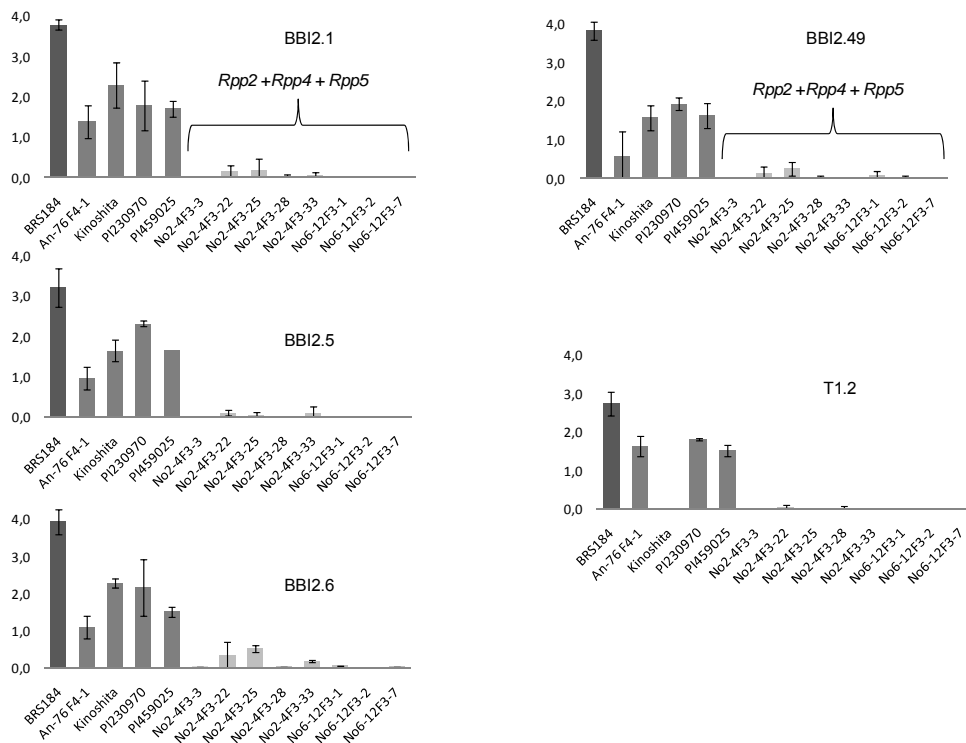


Figura 1. Gráficos de frequência de distribuição das características a) SL e b) NoU para todos os genótipos analisados nesse estudo contra os 5 isolados de FAS.

Agradecimentos

Os autores agradecem Ms. Akiko Takahashi, Mio Morishita e Tomomi Mori do Centro Internacional Japonês de Pesquisa em Ciências Agrícolas (JIRCAS), pela assistência nesse trabalho. Este estudo foi financiado pelo projeto JIRCAS, "Identification of Stable Resistance to Soybean Rust for South America".

Referências Bibliográficas

- LEMOS NG, BRACCINI A de L, ABDELNOOR RV, OLIVEIRA MCN, SUENAGA K and YAMANAKA N. (2011) Characterization of genes *Rpp2*, *Rpp4*, and *Rpp5* for resistance to soybean rust. *Euphytica*, online. DOI 10.1007/s10681-011-0465-3.
- MONTEROS, M.J., MISSAOUI, A.M., PHILLIPS, D.V., WALKER, D.R. and BOERMA, H.R. (2007) Mapping and confirmation of the 'Hyyuga' red-brown lesion resistance gene for Asian soybean rust. *Crop Science*, 47, 829-836.
- PIEROZZI PHB, RIBEIRO AS, MOREIRA JUV, LAPERUTA LDC, RACHID BF, LIMA WF, ARIAS CAR, OLIVEIRA MF, TOLEDO JFF (2008) New soybean (*Glycine max* Fabales, Fabaceae) sources of qualitative genetic resistance to Asian soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* (Uredinales, Phakopsoraceae). *Genetics and Molecular Biology* 31, 2:505-511
- SINCLAIR, J.B., and G.L. HARTMAN 1999. Soybean rust. p. 25-26. In G.L. Hartman et al. (ed.) *Compendium of soybean diseases*. 4th ed. Am. Phytopatholo. Soc., St. Paul, MN.
- YAMAOKA, Y.; FUJIWARA, Y.; KAKISHIMA, M.; KATSUYA, K.; YAMADA, K.; HAGIWARA, H. (2002) Pathogenic races of *Phakopsora pachyrhizi* on soybean and wild host plants collected in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 68: 52-56.
- YAMANAKA, N.; YAMAOKA, Y.; KATO, M.; LEMOS, N.G.; PASSIANOTTO, A.L.; DOS SANTOS, J.V.M.; BENITEZ, E.R.; ABDELNOOR, r.v.; SOARES, r.m.; SUENAGA, k (2010) Development of classification criteria for resistance to soybean rust and differences in virulence among Japanese and Brazilian rust populations. *Tropical Plant Pathology* 35:153-162.
- YORINORI, JT. Soybean Germplasm with Resistance and Tolerance to Asian Rust and Screening Methods (2008) Jircas Working Report: Facing the Challenge of Soybean Rust in South America, n.58. Japan International Research Center for Agricultural Sciences (JIRCAS), Tsukuba, Ibaraki, Japan.