

## AVALIAÇÃO DE POPULAÇÕES SEGREGANTES DE SOJA QUANTO À RESISTÊNCIA À FERRUGEM ASIÁTICA

EVALUATION OF SOYBEAN SEGREGANT POPULATIONS FOR RESISTANCE TO RUST

SILVA, D.C.G.<sup>1</sup>; CAMOLESE, A.C.<sup>1,2</sup>; BOTELHO, L.<sup>1,2</sup>; YAMANAKA, N.<sup>3</sup>; PINHEIRO, M.<sup>1,2</sup>; FRAGA, T.R.<sup>1,2</sup>; MAIA, M.S.<sup>1,2</sup>; RINCÃO, M.P.<sup>1,4</sup>; NOVAES, R.M.L.<sup>1</sup>; ARIAS, C.A.A.<sup>1</sup>; ABDELNOOR, R.V.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Embrapa Soja, Londrina, PR; e-mail: [danielle.gregorio@cnpso.embrapa.br](mailto:danielle.gregorio@cnpso.embrapa.br)

<sup>2</sup> Universidade Estadual do Norte do Paraná;

<sup>3</sup> JIRCAS;

<sup>4</sup> Universidade Estadual de Londrina.

### Resumo

A ferrugem asiática (FAS) é uma importante doença que afeta o cultivo da soja no Brasil. Pelo menos seis genes de resistência diferentes em soja foram descobertos para a FAS. Através do acúmulo destes genes em uma única linhagem, processo chamado de piramidação, é possível se obter resistência de amplo espectro e duradoura, capaz de contornar a falha histórica dos mecanismos de resistência vertical. O presente trabalho teve por objetivo avaliar fenotipicamente a reação de populações do programa de melhoramento da Embrapa Soja, segregantes para diferentes combinações de dois genes de resistência à FAS, visando a determinar quais materiais são promissores para o desenvolvimento de variedades com resistência duradoura e de amplo espectro. Foram realizados cruzamentos com múltiplos parentais, seleção fenotípica qualitativa na geração F<sub>2</sub>, e avançadas as populações até a geração F<sub>5</sub>, na qual houve a avaliação fenotípica quantitativa de lesões de ferrugem para os seguintes caracteres: nível de esporulação, número de urédias em 15 lesões e número de urédias abertas em 15 lesões. Foi possível estimar a contribuição de cada combinação de genes *Rpp* para a resistência à ferrugem quando acumulados no germoplasma brasileiro e confrontadas com inóculo brasileiro. Apesar do claro efeito do germoplasma portador do gene de resistência sobre seu desempenho, as diferentes combinações gênicas foram preponderantes na determinação do desempenho do material.

### Introdução

A ferrugem asiática da soja (FAS), causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* Sydow & Sydow, é uma importante ameaça à produtividade e competitividade da soja nacional. A doença já foi encontrada em todas as regiões produtoras de soja no mundo, podendo gerar perdas de até 80% da produção. No Brasil, esta doença é responsável por cerca de 5% do custo fixo de produção de soja, como resultado das aplicações preventivas de fungicidas. Apesar de o controle químico ser amplamente usado como principal método de manejo, as perdas não são totalmente evitadas.

Seis genes de resistência à FAS dominantes e independentes foram identificados e denominados *Rpp1* a *6*. Também foram descritos genes distribuídos proximamente aos previamente descritos, porém não alélicos e estes. São eles um loco na PI 594538A (próximo ao *Rpp1*, denominado *Rpp1b*) e um loco na PI506764 (Hyyuga, próximo ao *Rpp5*). Além destes, foram descritos dois alelos recessivos no loco *Rpp2*, um alelo recessivo no loco *Rpp5*, e outros alelos dominantes nos locos *Rpp1* e *Rpp1b* (revisado por Li et al. 2012). Para todos estes genes se conhece a localização cromossômica aproximada e marcadores moleculares associados. As reações tipicamente associadas aos genes *Rpp* são lesões de coloração marrom-avermelhada, indicando resposta de hipersensibilidade, ou, em poucos casos, a ausência de lesões, caracterizando imunidade.

O processo de acúmulo de diferentes genes de resistência em uma linhagem é conhecido como piramidação. A piramidação pode resultar em uma resistência mais estável, capaz de contornar a falha histórica de muitos mecanismos de resistência monogênica em

plantas, especialmente aqueles envolvidos na resposta de hipersensibilidade (Niks e Rubiales, 2002). No programa de melhoramento da Embrapa Soja foram realizados vários cruzamentos envolvendo genes de resistência à FAS, visando a piramidar diferentes combinações destes genes num único material. O objetivo deste trabalho é avaliar fenotipicamente a reação de populações segregantes derivadas destes cruzamentos, visando a determinar quais materiais são promissores para o desenvolvimento de variedades resistentes à FAS no Brasil.

### **Material e Métodos**

Foram realizados cruzamentos com múltiplos parentais na safra 2009/2010 (Tabela 1). Foram cruzados genótipos do programa de melhoramento da Embrapa Soja, adaptados às condições de cultivo brasileiras, os quais haviam sido, em alguma geração, cruzados com as fontes de resistência e vinham sendo selecionados fenotipicamente para a resistência à ferrugem através de avaliação qualitativa de sintomas característicos. Tais cruzamentos resultaram em oito combinações dois a dois, de seis genes de resistência à FAS conhecidos.

As  $F_1$  resultantes dos cruzamentos, di-híbridas, foram desenvolvidas em casa de vegetação e conduzidas à geração  $F_2$  no inverno de 2010. Na safra 2010/2011, parte das populações  $F_2$  foi plantada, selecionada quanto à resistência à ferrugem e, os indivíduos selecionados, avançados à geração  $F_3$ , enriquecendo tais populações em proporção de homocigotos portadores dos alelos de resistência à ferrugem. As populações  $F_3$  foram conduzidas de abril a julho de 2011 à geração  $F_4$ , de agosto a novembro de 2011 à geração  $F_5$ , e em dezembro de 2012 estas últimas foram semeadas, em três baterias de plantas com espaço de tempo de duas semanas cada, para facilitar os cruzamentos que viriam a seguir. Tais populações foram novamente enriquecidas com os alelos de resistência por meio da seleção baseada em avaliações fenotípicas. Os critérios para tais avaliações foram os mesmos descritos por Yamanaka et al. (2010), tendo sido avaliados os seguintes parâmetros: nível de esporulação, número de urédias em 15 lesões, número de urédias abertas em 15 lesões. Para a classificação, foi gerado um índice de resistência com base na soma das médias obtidas para os três caracteres em cada indivíduo. Trifólios de cada planta foram coletados e mantidos em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  até a completa avaliação das populações em microscópio estereoscópico.

O inóculo de *P. pachyrhizi* utilizado foi originalmente obtido de campos experimentais no Mato Grosso, desenvolvido nos anos subsequentes em diferentes genótipos de soja, sendo hoje uma população composta por mistura de raças fisiológicas do patógeno. Inóculo de origem semelhante foi utilizado por Yamanaka et al. (2010) na avaliação de diversos genótipos de soja (população BRP-2), tendo apresentado maior agressividade em comparação com outros inóculos (BRP-1 e JRP).

### **Resultados e Discussão**

Com base nas avaliações fenotípicas foi possível estimar a contribuição de cada combinação de genes *Rpp* para a resistência à ferrugem (Tabela 1) quando acumulados no germoplasma brasileiro e confrontados com inóculo brasileiro. Com base em tais avaliações foram realizados cruzamentos entre os materiais, com vistas à produção de linhagens com três ou quatro genes diferentes acumulados.

O bom desempenho dos materiais CF10-01 e CF10-02 pode se dever ao fato da fonte Hyuuga ser uma pirâmide natural, tendo alelos de resistência nos locos *Rpp3* e *Rpp5*. Assim, o material CF10-01 tem potencialmente três genes de resistência segregando, enquanto o material CF10-02 deve apresentar maior frequência de genótipos homocigotos positivos para o *Rpp5*. O bom desempenho do material CF10-03 em relação ao material CF10-08, ambos com forte participação do background genético da Sambaíba e tendo a G10428 como uma das fontes de resistência, deve ser devido à contribuição do gene derivado da PI587880A, que no trabalho de Yamanaka et al. (2010) apresentou-se como suscetível a dois tipos de inóculos brasileiros, mas imune ao inóculo japonês. Este fato demonstra que a escolha de um gene a ser introduzido no programa de melhoramento não deve se basear simplesmente em seu comportamento isolado no genótipo que o porta, pois quando introduzido em outros materiais pode haver interação mais ou menos favorável. Esta também deve ser uma das causas do

desempenho contrastante dos materiais CF10-01, CF10-04 e CF10-07, todos segregantes para o gene *Rpp2*. As contribuições dos genes *Rpp1b*, derivado da PI594538A, e *Rpp1*, derivado da PI561356 para a resistência do germoplasma brasileiro confrontado com inóculo brasileiro, foram as menores entre os seis genes testados. O alelo de resistência que apresentou a maior contribuição foi o *Rpp3/5* derivado da fonte Hyuuga, em segundo lugar o *Rpp5* derivado da fonte Shiranui, seguido do *Rpp2* derivado da fonte PI197182. Lemos et al. (2011) relataram o acúmulo dos locos *Rpp2*, *Rpp4* e *Rpp5* numa única linhagem mediante seleção assistida por marcadores SSR. De modo similar aos resultados aqui apresentados, no trabalho de Lemos et al. (2011) todos os três genes influenciaram os fenótipos de caracteres quantitativos que compõem a reação à ferrugem asiática, contudo, o *Rpp5* teve a maior contribuição, seguido do *Rpp2*, o qual foi considerado pelos autores estar sob forte influência do *background* genético.

**Tabela 1.** Índices de resistência de materiais, estimados conforme Yamanaka et al. (2010, 2011). Quanto menor o valor, maior a resistência do material. Os valores correspondem às somatórias das médias do nível de esporulação e número de urédias total e abertas. Foram avaliados os indivíduos que apresentaram de 10 a 15 lesões de ferrugem no 2º ou 3º trifólio.

Código do Material	Parental recorrente de maior contribuição		Genes de resistência combinados (Fontes de resistência) <sup>1</sup>		N. de indivíduos avaliados	Índice médio
CF10-01	BRS262	Invernada	<i>Rpp2</i> (PI197182)	<i>Rpp3/5</i> (Hyuuga)	73	<b>1,04</b>
CF10-02	Invernada	BRS232	<i>Rpp3/5</i> (Hyuuga)	<i>Rpp5</i> (Shiranui)	64	<b>1,24</b>
CF10-03	Sambaiba	Sambaiba	<i>Rpp1</i> (PI587880A)	<i>Rpp4</i> (G10428)	50	<b>1,45</b>
CF10-04	BRS262	BRS232	<i>Rpp2</i> (PI197182)	<i>Rpp5</i> (Shiranui)	56	<b>1,78</b>
CF10-05	Invernada	BRSMG7515RR	<i>Rpp1b</i> (PI594538A)	<i>Rpp3/5</i> (Hyuuga)	52	<b>2,13</b>
CF10-06	BRS284	BRS232	<i>Rpp4</i> (PI459025A)	<i>Rpp5</i> (Shiranui)	66	<b>2,19</b>
CF10-07	BRSMG7515RR	BRS262	<i>Rpp1b</i> (PI594538A)	<i>Rpp2</i> (PI197182)	64	<b>2,51</b>
CF10-08	Sambaiba	Sambaiba	<i>Rpp1</i> (PI561356)	<i>Rpp4</i> (G10428)	49	<b>4,91</b>

<sup>1</sup> Referências: PI594538A (Chakraborty et al., 2009); PI561356 (Camargo, 2010); PI 587880A (Ray et al., 2011); PI197182 (Laperuta et al., 2008); Hyuuga (PI506764 - Monteros et al., 2007); PI459025A (Embrapa, 2004); G 10428 (Embrapa, 2004); Shiranui (PI200526 – Garcia et al., 2008).

## Conclusões

- Apesar do claro efeito do germoplasma portador do gene de resistência sobre seu desempenho, as diferentes combinações gênicas foram preponderantes na determinação do desempenho do material para resistência a FAS.
- A fonte de resistência que mais contribuiu com o germoplasma brasileiro foi a Hyuuga, provavelmente devido ao fato da mesma possuir dois locos de resistência. Em segundo lugar foi a fonte Shiranui, seguida da PI197182. Assim, os genes derivados de tais fontes devem ser o foco da estratégia de melhoramento visando à piramidação dos genes. Já as contribuições dos genes *Rpp1b*, derivado da PI594538A, e *Rpp1*, derivado da PI561356, para a resistência a FAS causada por um inóculo brasileiro foram as menores entre os seis genes testados.
- Com nestes resultados, plantas com melhor fenótipo de resistência foram selecionadas e cruzamentos entre elas foram realizados para produção de linhagens com três ou quatro genes diferentes acumulados. A presença destes genes nos materiais segregantes será confirmada através de seleção assistida por marcadores moleculares.

## Referências

CAMARGO, P. O. **Estudo da herança de caracteres quali-quantitativos e mapeamento genético de alelos resistentes à ferrugem asiática da soja presentes nas PI561356 e PI594754.** Londrina, 2010. 80 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina

CHAKRABORTY, N.; CURLEY, J.; FREDERICK, R. D.; HYTEN, D. L.; NELSON, R. L.; HARTMAN, G. L.; DIERS, B. W. Mapping and confirmation of a new allele at *Rpp1* from soybean PI 594538A conferring RB lesion type resistance to soybean rust. **Crop Science**, Madison, v. 49, p. 783–790, 2009.

EMBRAPA, 2004. **Ferrugem asiática da soja no Brasil: evolução, importância econômica e controle**. Documentos, 447. Londrina: Embrapa Soja. Dezembro, 2004. 36p.

GARCIA, A.; CALVO, E. S.; KIIHL, R. A. S.; HARADA, A.; HIROMOTO, D. M.; VIEIRA, L. G. E. Molecular mapping of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) resistance genes: Discovery of a novel locus and alleles. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.117, n. 4, 545-553, Ago 2008.

LAPERUTA, L. D. C.; ARIAS, C. A. A.; RIBEIRO, A. S.; RACHID, B. F.; PIEROZZI, P. H. B., TOLEDO, J. F. F.; PÍPOLO, A. E.; CARNEIRO, G. E. S. 2008. New genes conferring resistance to Asian soybean rust: allelic testing for the *Rpp2* and *Rpp4* loci. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, n.12, p.1741-1747, Dez. 2008

LEMONS, N.G.; BRACCINI, A. DE L. E; ABDELNOOR, R. V.; OLIVEIRA, M. C. N DE; SUENAGA, K.; YAMANAKA, N. Characterization of genes *Rpp2*, *Rpp4*, and *Rpp5* for resistance to soybean rust. **Euphytica**, Heildeberg, v. 182, n. 1, p. 53-64, Jun 2011.

LI, S.; SMITH, J. R.; RAY, J. D.; FREDERICK, R. D. Identification of a new soybean rust resistance gene in PI 567102B. **Theoretical and Applied Genetics**, online first. Disponível em: < <http://www.springerlink.com/content/0330681857h0q628/>>. Acesso em: 27 de março de 2012.

MONTEROS, M. J.; MISSAOUI, A. M.; PHILLIPS, D. V.; WALKER, D. R.; BOERMA, H. R. Mapping and confirmation of the 'Hyyuga' red-brown lesion resistance gene for asian soybean rust. **Crop Science**, Madison, 47, n. 2, p. 829-834, Mar-Apr 2007.

NIKS, R. E.; RUBIALES, D. Potentially durable resistance mechanisms in plants to specialized fungal pathogens. **Euphytica**, Wageningen, v. 124, n. 2, p. 201-216, Mar 2002.

RAY, J. D.; SMITH, J. R.; MOREL, E.; BOGADO, N.; WALKER, D. R. Genetic resistance to soybean rust in PI 567099A is at or near the *Rpp3* locus. **Journal of Crop Improvement**, v. 25, p.219–231, 2011.

YAMANAKA, N.; YAMAOKA, Y.; KATO, M.; LEMOS, N. G.; PASSIANOTTO, A. L. L.; SANTOS, J. V. M.; BENITEZ, E. R.; ABDELNOOR, R. V.; SOARES, R. M.; SUENAGA, K. Development of classification criteria for resistance to soybean rust and differences in virulence among Japanese and Brazilian rust populations. **Tropical Plant Pathology**, Viçosa, vol. 35, n. 3, p. 153-162, May-June, 2010.

YAMANAKA, N.; LEMOS, N. G.; AKAMATSU, H.; YAMAOKA, Y.; SILVA, D. C. G.; PASSIANOTTO, A. L. DE L.; ABDELNOOR, R. V.; SUENAGA, K. Soybean breeding materials useful for resistance to soybean rust in Brazil. **JARQ**, Tsukuba, v. 45, n. 4, p. 385-395, Oct. 2011.