

# Ranqueamento de populações de soja quanto à resistência a *Phakopsora pachyrhizi*

---

CAMOLESE, A.C.<sup>1</sup>; BOTELHO, L.<sup>1</sup>; PINHEIRO, M.<sup>1</sup>; FRAGA, T.R.<sup>1</sup>; MAIA, M.S.<sup>1</sup>; RINCÃO, M.P.<sup>2</sup>; ABDELNOOR, R.V.<sup>3</sup> | <sup>1</sup> Universidade Estadual do Norte do Paraná; <sup>2</sup> Universidade Estadual de Londrina; <sup>3</sup> Embrapa Soja.

## Introdução

A ferrugem asiática da soja (FAS), causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. é uma importante ameaça à produtividade e à competitividade da soja nacional. A doença já foi encontrada praticamente em todas as regiões produtoras de soja no mundo, podendo causar perdas de até 80% da produção. No Brasil, essa doença é responsável por cerca de 5% do custo fixo de produção de soja, como resultado das aplicações preventivas de fungicidas. Apesar do 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 *Rpp6*. Também foram descritos genes distribuídos próximos aos previamente descritos, porém não alélicos a esses. São eles um loco na PI 594538A (próximo ao *Rpp1*, denominado *Rpp1b*) e um loco na PI 506764 (Hyuuga, próximo ao *Rpp5*). Além desses, foram descritos dois alelos recessivos no loco *Rpp2*, um alelo recessivo no loco *Rpp5*, e outros alelos dominantes nos locos *Rpp1* e *Rpp1b* (revisado em Li et al., 2012). Para todos esses 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 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; Rubiales, 2002). No programa de melhoramento da Embrapa Soja foram realizados vários cruzamentos envolvendo genes de resistência à FAS, visando a piramidar diferentes combinações desses 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 cultivares resistentes à FAS no Brasil.

## Material e Métodos

Realizou-se 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 2011 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 as avaliações e a determinação do grau de resistência seguiram o descrito por Yamanaka et al. (2011), considerando que foram avaliados de maneira quantitativa e sua relevância dada pela ordem seguinte: nível de esporulação (Sporulation level – SL) e número de urédias por lesão (Number of uredinia per lesion – NoU). Foi coletado um trifólio por planta de todas as plantas de todas as populações e mantido em freezer -80°C até a completa avaliação das populações em microscópio estereoscópico e avaliado quinze lesões por trifólio.

Concomitante às avaliações do material adaptado, ocorreu a análise das fontes de resistência (Tabela 1) a fim de utilizá-las como testemunhas. Isto se deu seguindo os parâmetros de avaliação anteriormente citados.

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

Dos critérios descritos por Yamanaka et al. (2011) para as avaliações, nível de esporulação (SL) e número de urédias por lesão (NoU) mostraram-se suficientes para a determinação da característica da planta neste trabalho. O critério NoU exerceu influência secundária sendo usado na complementação da caracterização da planta.

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

O bom desempenho dos materiais CF10-01 e CF10-02 pode ser em decorrência 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 homozigotos 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 por causa da contribuição do gene derivado da PI 587880A, que no trabalho de Yamanaka et al. (2010) apresentou-se como suscetível a dois tipos de inóculos brasileiros, mas imune ao inóculo japonês. Esse 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. Essa 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 PI 594538A, e *Rpp1*, derivado da PI 561356 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 PI 197182. 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.

Um resultado positivo quanto à classificação das populações, foi o fato de que elas superaram quase todas as fontes de resistência nos parâ-

metros analisados. Isto pode ser um indicativo do sucesso no acúmulo dos genes de resistência. No entanto tal inferência deve ser confirmada através da análise gênica desses materiais.

O baixo desempenho da PI 561356 e da população desenvolvida tendo ela como fonte de resistência (CF10-08), indica que o inóculo utilizado foi capaz de superar a resistência conferida pelo *Rpp* derivado deste genótipo.

**Tabela 1.** Classificação de resistência de materiais e índices médios obtidos para os parâmetros nível de esporulação (SL) e número de urédias por lesão (NoU), estimados conforme Yamanaka et al. (2010, 2011). Foram avaliados os indivíduos que apresentaram de 10 a 15 lesões de ferrugem no 2º ou 3º trifólio.

Material	Parental recorrente de maior contribuição		Genes de resistência combinados (Fontes de resistência) <sup>1</sup>		SL	NoU	Característica
SHIRANUI	-	-	<i>Rpp5</i>	-	0	0	Resistente
PI 587880A	-	-	<i>Rpp1</i>	-	0,91	1,55	Intermediário
HYUUGA	-	-	<i>Rpp3</i>	<i>Rpp5</i>	1,06	2,56	Intermediário
PI 594538A	-	-	<i>Rpp1b</i>	-	1,13	2,44	Intermediário
PI 459025A	-	-	<i>Rpp4</i>	-	1,48	3,15	Intermediário
PI 197182	-	-	<i>Rpp2</i>	-	1,78	2,16	Intermediário
PI 561356	-	-	<i>Rpp1</i>	-	2,2	6,87	Susceptível
CF10-01	BRS262	Invernada	<i>Rpp2</i> (PI 197182)	<i>Rpp3/5</i> (Hyuuga)	0,26	0,43	Resistente
CF10-02	Invernada	BRS232	<i>Rpp3/5</i> (Hyuuga)	<i>Rpp5</i> (Shiranui)	0,33	0,49	Resistente
CF10-03	Sambaiba	Sambaiba	<i>Rpp1</i> (PI 587880A)	<i>Rpp4</i> (G10428)	0,35	0,62	Resistente
CF10-04	BRS262	BRS232	<i>Rpp2</i> (PI 197182)	<i>Rpp5</i> (Shiranui)	0,45	0,74	Resistente
CF10-05	Invernada	BRSMG751SRR	<i>Rpp1b</i> (PI 594538A)	<i>Rpp3/5</i> (Hyuuga)	0,46	0,95	Resistente
CF10-06	BRS284	BRS232	<i>Rpp4</i> (PI 459025A)	<i>Rpp5</i> (Shiranui)	0,50	1,15	Resistente
CF10-07	BRSMG751SRR	BRS262	<i>Rpp1b</i> (PI 594538A)	<i>Rpp2</i> (PI 197182)	0,55	0,92	Resistente
CF10-08	Sambaiba	Sambaiba	<i>Rpp1</i> (PI 561356)	<i>Rpp4</i> (G10428)	1,15	2,03	Intermediário

<sup>1</sup> Referências: PI 594538A (Chakraborty et al., 2009); PI 561356 (Camargo, 2010); PI 587880A (Ray et al., 2011); PI 197182 (Laperuta et al., 2008); Hyuuga (PI 506764 - Monteros et al., 2007); PI 459025A (Embrapa, 2004); G 10428 (Embrapa, 2004); Shiranui (PI 200526 - Garcia et al., 2008).

## Conclusões

Apesar do efeito do germoplasma portador do gene de resistência sobre seu desempenho, nesse trabalho as diferentes combinações gênicas foram preponderantes na determinação do desempenho do material para resistência a FAS, ficando evidenciado que quase todos dos materiais adaptados mostram-se resistentes ao inóculo.

As fontes de resistência que mais contribuíram com o germoplasma brasileiro foram: Hyuuga, pois materiais que dela descendiam demonstraram menor índice SL, certamente em consequência ao fato da mesma possuir dois locos de resistência, acompanhada por Shiranui e a PI 197182. 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 PI 594538A, e *Rpp1*, derivado da PI 561356, para a resistência a FAS causada por um inóculo brasileiro foram as menores entre os seis genes testados. Esse fato pode indicar que o inóculo conseguiu quebrar a resistência do gene *Rpp1* proveniente dessas PIs.

Com base nesses 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. No entanto esses são dados preliminares e posteriormente serão analisados estatisticamente e a presença desses 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 PI 561356 e PI 594754.** 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 *Rpp* 1 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**, Heidelberg, 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**, Berlin, online first, 28 de fevereiro de 2012. 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, v. 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.; PAS-SIANOTTO, 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, v. 35, n. 3, p. 153-162, May-June, 2010.

YAMANAKA, N. **Laboratory manual for the studies on soybean rust resistance**. Version 5. JIRCAS, Tsukuba, Oct. 2011, 28pp.