

T64 - MAPEAMENTO DE GENES DE RESISTÊNCIA À FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA.

Silva, DCG da^{1, 2, 3*}; Yamanaka, N^{1, 4}; Polizel, AM^{1, 5}; Brogin, RL¹; Pereira, S dos S^{1, 2}; Nogueira, LM^{1, 2}; Passianotto, AL de L^{1, 2}; Catelli, LL^{1, 3}; Arias, CAA¹; Nepomuceno, AL¹ e Abdelnoor, RV¹

¹Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Soja), Rod. Carlos João Strass, Distrito de Warta, Cxp. 231, 86001-970, Londrina, Paraná, Brasil. Fone: 55 43 3371 6098 – Fax: 55 43 3371 6100, daniellegregorio@yahoo.com.br ²Fundação Faculdades Luiz Meneghel - FFALM. ³Universidade Estadual Paulista, Campus Jaboticabal (UNESP-Jaboticabal). ⁴Japan International Research Center for Agricultural Sciences (JIRCAS) ⁵Universidade Estadual de Londrina

Palavras-chave: *Glycine max*, microssatélites, *Phakopsora pachyrhizi*.

INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja e um dos poucos com potencial de aumentar a produção no futuro, dado a existência de áreas ainda não cultivadas e a crescente demanda mundial por produtos de soja (FRANÇA NETO 2004). Entre os problemas que afetam a produção de soja no Brasil, a ferrugem asiática, doença causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* Sydow & Sydow, tem causado enormes danos econômicos. Perdas de produtividade maiores que 75% já foram observadas quando nenhuma medida de controle da doença foi aplicada (YORINORI *et al.* 2005).

Até o momento, não existem cultivares de soja resistentes a ferrugem asiática e, portanto, é imprescindível a identificação de materiais e o desenvolvimento de variedades resistentes. Quatro genes de resistência a ferrugem asiática dominantes e independentes foram descritos na literatura: *Rpp1* (PI 200692), *Rpp2* (PI 230970), *Rpp3* (PI 462312) e *Rpp4* (PI 459025) (BROMFIELD e HARTWIG 1980, MCLEAN e BITH 1980, HARTWIG e BROMFIELD 1983, HARTWIG 1986). Genes de resistência também foram identificados em outros genótipos, como a FT-2, uma cultivar brasileira (ARIAS *et al.* 2004). Quando a doença foi primeiramente detectada no Brasil todos estes genes eram efetivos. Entretanto, em 2003, uma nova raça de *P. pachyrhizi* quebrou a resistência conferida pelos genes *Rpp1*, *Rpp3* e pelo locus identificado na cultivar FT-2, aqui chamado de *Rpp*(FT-2). Em virtude dessa quebra de resistência, não foi possível a realização de experimentos para determinar se o *Rpp*(FT-2) é um alelo de *Rpp1* ou *Rpp3*; entretanto, a genealogia desta cultivar sugere que este gene seja *Rpp1* (POLIZEL, 2005). Atualmente, dos genes descritos na literatura, somente o *Rpp2* e o *Rpp4* permanecem resistentes (ARIAS *et al.* 2004).

Considerando a atual necessidade de desenvolvimento de variedades de soja resistentes à ferrugem, esse trabalho teve por objetivo identificar marcadores moleculares de microssatélites ligados aos genes *Rpp2*, *Rpp4* e *Rpp*(FT-2), possibilitando o seu mapeamento nos grupos de ligação da soja.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para o mapeamento dos genes *Rpp2* e *Rpp4* foram utilizados cruzamentos entre a cultivar “BRS-184” e as PIs 230970 e 459025, respectivamente, enquanto que para *Rpp*(FT-2), foi utilizado o cruzamento entre as cultivares FT-2 e Davis. Das plantas F₁ destes cruzamentos, foram obtidas populações segregantes F_{2:3}, F₂ e F_{2:4}, compostas por 130, 80 e 116 indivíduos, para o mapeamento dos genes *Rpp2*, *Rpp4* e *Rpp*(FT-2), respectivamente. Tais populações foram inoculadas com o fungo *P. pachyrhizi* e avaliadas fenotipicamente quanto a resistência mediante a identificação de lesões RB, características de genótipos resistentes, e de lesões TAN, características de genótipos suscetíveis.

Trifólios dos genótipos parentais e dos indivíduos das populações segregantes foram coletados e submetidos à extração de DNA, conforme KEIM *et al.* (1988). A amplificação dos locos de microssatélites foi realizada de acordo com a metodologia descrita por

AKKAYA *et al.* (1995). A análise dos fragmentos amplificados foi realizada mediante eletroforese em géis de agarose/synergel (Diversified Biotech, Boston, MA, USA) 3% ou poliacrilamida 10%. Os géis foram corados com brometo de etídio, visualizados sob luz ultravioleta e a captação de imagens foi realizada utilizando o sistema digital Kodak de fotodocumentação (Kodak, Rochester, NY, USA). Inicialmente, os primers de microssatélites foram testados nos parentais para verificar polimorfismo. Para o mapeamento do *Rpp2* e do *Rpp4*, foi utilizada a estratégia de bulks segregantes. Os marcadores polimórficos entre os bulks foram testados nas populações F_2 e a informação genotípica gerada foi cruzada com a informação fenotípica oriunda da avaliação de resistência para a confirmação da ligação. Para o mapeamento do *Rpp*(FT-2) os primers polimórficos entre os parentais foram amplificados em 11 indivíduos homocigotos resistentes e 11 indivíduos suscetíveis da geração F_2 (escolhidos com base nos resultados da avaliação fenotípica). Após verificação de uma provável ligação dos marcadores ao caráter, foi genotipado o restante dos indivíduos da população F_2 . A informação genotípica gerada foi cruzada com a informação fenotípica oriunda da avaliação de resistência para a confirmação da ligação.

A proporção de segregação para os marcadores e para a resistência a doença foi analisada pelo teste de χ^2 . Para a análise de ligação, o programa Mapmaker/EXP 3.0 (LANDER *et al.*, 1987) foi utilizado com opção da função de mapeamento de Kosambi, LOD score mínimo de 3,0 e distância máxima de 37,2cM.

RESULTADOS

As cultivares BRS-184 e Davis apresentaram somente lesões TAN enquanto a FT-2 e as PIs 230970 e 459025 apresentaram somente lesões RB. Em todas as populações segregantes foi verificado pelo teste de χ^2 a correspondência com a segregação de um único loco com ação dominante para resistência. Das 130 famílias $F_{2,3}$ componentes da população de mapeamento do *Rpp2*, 102 foram resistentes (77 heterocigotas e 25 homocigotas) e 28 foram suscetíveis ($\chi^2 \cong 4,569$ e $P=0,102$); dos 80 indivíduos componentes da população de mapeamento do *Rpp4*, 61 foram resistentes e 19 foram suscetíveis ($\chi^2 \cong 0,067$ e $P=0,796$), e; das 116 famílias $F_{2,4}$ da população de mapeamento de *Rpp*(FT-2), 92 foram resistentes (50 heterocigotas e 42 homocigotas) e 24 foram suscetíveis ($\chi^2 \cong 1,15$ e $P=0,28$).

Foram testados 242 marcadores microssatélites para verificar o polimorfismo entre os parentais FT-2 e Davis, e dentre eles, somente 38 foram polimórficos. Entre os parentais BRS-184 e PI230970 foram testados 171 marcadores e destes 72 foram polimórficos. Entre os parentais BRS-184 e PI459025, foram testados os mesmos 171 marcadores e destes 64 foram polimórficos. Houve, portanto, um percentual de polimorfismo muito mais alto entre as combinações BRS-184 e PI230970 e BRS-184 e PI459025, indicando que estas linhagens são mais distantes geneticamente que as cultivares Davis e FT-2. De fato, a BRS-184 é uma cultivar brasileira enquanto que as PIs são materiais asiáticos introduzidos; já a Davis e FT-2 são cultivares que apresentam vários parentais em comum em sua genealogia (POLIZEL 2005). Não houve distorção de segregação significativa para nenhum dos loci de microssatélites analisados de acordo com o teste de χ^2 ($P>0,05$).

A análise de ligação mapeou o locus *Rpp2* a 8,6 cm do marcador Sct001 e 9,9 cM do marcador Satt366, no grupo de ligação J. O locus *Rpp4* foi mapeado a 21,8 cM e 1,6cM dos microssatélites Satt191 e Satt288, respectivamente, no grupo de ligação G e o locus *Rpp*(FT-2) foi mapeado às distâncias de 20,3 cM e 7,8 cM dos microssatélites Satt460 e Satt079, respectivamente, indicando sua localização no grupo de ligação C2 da soja (Figura 1).

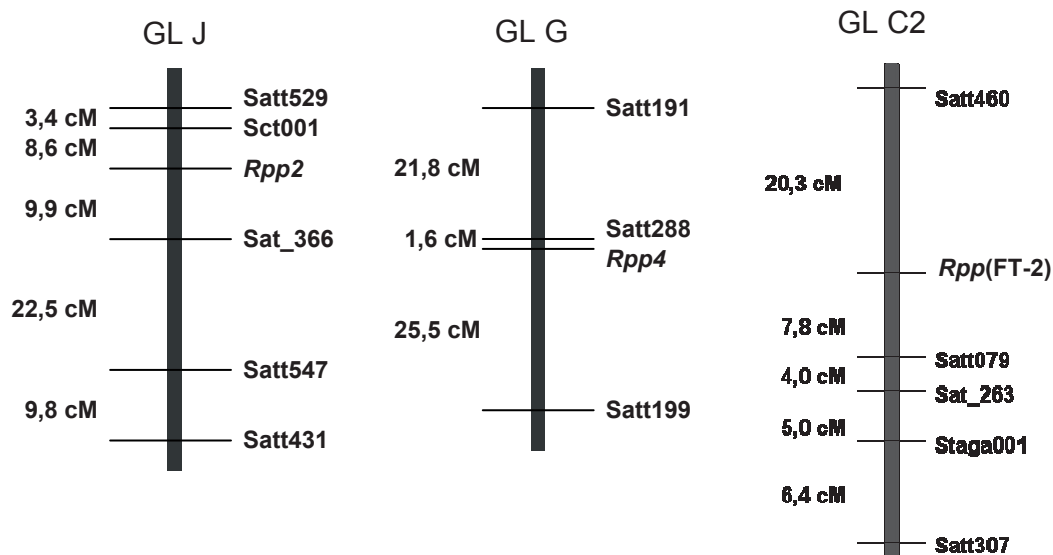


Figura 1. Mapas dos grupos de ligação (GL) J, G e C2 evidenciando as regiões de localização dos genes *Rpp2*, *Rpp4* e *Rpp(FT-2)*. Do lado esquerdo de cada mapa estão as distâncias em cM e do lado direito os marcadores microssatélites identificados.

CONCLUSÃO

Os marcadores identificados neste estudo encontram-se a distâncias ainda altas dos respectivos genes de resistência para serem utilizados em programas de seleção assistida. Portanto, no momento, os esforços deste trabalho estão sendo direcionados para a saturação destas regiões com outros marcadores. Outros genes de resistência à ferrugem asiática foram recentemente identificados pelo grupo de pesquisa em melhoramento genético da Embrapa Soja, e no momento estão sendo mapeados. Com o mapeamento de todos esses genes de resistência, a introdução conjunta dos mesmos em variedades comerciais será grandemente facilitada pelo uso da seleção assistida por marcadores moleculares (SAMM).

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi parcialmente financiado pelo Jircas (Projeto Internacional – Estudos Compreensivos em Melhoramento, Produção e Utilização da Soja na América do Sul), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP). D.C.G. da Silva recebeu Bolsa de Doutorado Sanduíche Empresarial (CNPq), A. Polizel, S. dos S. Pereira e L.M. Nogueira receberam bolsa de iniciação científica da Embrapa e A.L. de L. Passianoto recebeu bolsa do JIRCAS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akkaya Ms, Shoemaker Rc, Specht Je, Bhagway Aa, Cregan Pb, 1995. Integration of simple sequence repeat DNA markers into a soybean linkage map. *Crop Science*: 35, 1439-1445.
- Arias Caa, Ribeiro As, Yorinori Jt, Brogin Ri, Oliveira Mf, Toledo Jff, 2004. Inheritance of resistance of soybean to rust (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow). In: F. MOSCARDI *et al.* (Ed.), Abstracts of Contributed Papers and Posters, VII World Soybean Research Conference, Embrapa Soybean, Londrina, p. 100.
- Bromfield Kr, Hartwig Ee, 1980. Resistance to soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) and mode of inheritance. *Crop Science* 20: 254-255.
- Cregan Pb, Jarvik T, Bush Al, Shoemaker Rc, Lark Kg, Kahler Al, Vantoai Tt, Lohnes Dg, Chung J, Specht Je, 1999. An integrated genetic linkage map of the soybean genome. *Crop Science*: 39, 1464–1490.
- França Neto Jb, 2004. Perspectivas futuras da cultura da soja no Brasil – produção, produtividade, expansão de área. In: F. Moscardi *et al.* (Ed.), Proceedings, III Congresso Brasileiro de Soja, Embrapa Soybean, Londrina, pp. 1203-1209.
- Hartwig Ee, Bromfield Kr, 1983. Relationships among three genes conferring specific resistance to rust in soybeans. *Crop Science* 23: 237-239.

- Hartwig Ee, 1986. Identification of a fourth major gene conferring resistance to soybean rust. *Crop Science* 26: 1135-1136.
- Keim P, Olson Tc, Shoemaker Rc, 1988. A rapid protocol for isolating soybean DNA. *Soybean Genetics Newsletter*: 15, 150-152.
- Lander Es, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly Jm, Lincoln Se, Newberg L, 1987. Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics*: 1, 174-181.
- Mclean Rj, Byth D, 1980. Inheritance of resistance to rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in soybean. *Australian Journal of Agricultural Research* 31: 951-956.
- Polizel A, 2005. Identificação de novos marcadores ligados ao gene de resistência à ferrugem asiática da soja na cultivar 'FT-2'. Monografia, Fundação Faculdades Luís Meneghel, 51p.
- Yorinori Jt, Paiva Wm, Frederick Rd, Costamilan Lm, Bertagnoli Pf, Hartman Gl, Godoy Cv, Nunes Jj, 2005. Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. *Plant Disease* 89: 75-677.