

## POSSÍVEIS GENES *Rps* EM LINHAGENS DE SOJA DA EMBRAPA TRIGO

### POSSIBLE *Rps* GENES IN SOYBEAN GENOTYPES FROM EMBRAPA TRIGO

COSTAMILAN, L.M.<sup>1</sup>; BERTAGNOLLI, P.F.<sup>1</sup>; CLEBSCH, C.C.<sup>1</sup>; SOARES, R.M.<sup>2</sup>; SEIXAS, C.D.S.<sup>2</sup>; GODOY, C.V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS

<sup>2</sup> Embrapa Soja, Londrina, PR

### Resumo

A podridão radicular de fitóftora, causada por *Phytophthora sojae*, pode causar redução de rendimento de grãos de soja de até 100% em cultivares altamente suscetíveis. A principal forma de controle da doença é o uso de cultivares com genes de resistência dominantes (*Rps*). O objetivo deste trabalho foi determinar possíveis genes *Rps* presentes em linhagens de soja desenvolvidas pela Embrapa Trigo. A caracterização da efetividade de genes *Rps* foi realizada pela técnica de inoculação do hipocótilo em plântulas das seguintes diferenciais: PI 547677 (*Rps1a*), PI 547842 (*Rps1b*), PI 547834 (*Rps1c*), PI 103091 (*Rps1d*), Williams 82 (*Rps1k*), PI 547838 (*Rps2*), PI 547862 (*Rps3a*), PI 591509 (*Rps3b*), L92-7857 (*Rps3c*), L85-2352 (*Rps4*), PI 547876 (*Rps5*), PI 591511 (*Rps6*), Harosoy (*Rps7*) e PI 399073 (*Rps8*). Considerou-se efetivo o gene da diferencial que apresentou até 30% de plantas mortas, e inefetivo, a diferencial com mortalidade de plantas acima de 70%. As linhagens desenvolvidas no programa de melhoramento genético de soja da Embrapa Trigo e testadas com o isolado Ps 2.4/07 podem possuir um ou mais dos seguintes genes dominantes de resistência à PRF: *Rps1a*, *Rps1b*, *Rps1c*, *Rps1k*, *Rps3a* e *Rps8*. Embora ainda considerados efetivos, os altos índices de mortalidade expressos pelo isolado Ps 2.4/07 a *Rps1b* e *Rps3a* não qualificariam estes genes para uso em manejo da PRF.

### Introdução

A podridão radicular de fitóftora (PRF), causada por *Phytophthora sojae* Kaufm. & Gerd., é considerada a segunda doença mais importante de soja nos Estados Unidos da América (EUA), com perda média estimada em 1,270 milhões t/ano, de 2001 a 2010 (WRATHER; KOENNING, 2010). A doença causa apodrecimento de sementes, redução de crescimento e morte de plantas em qualquer fase de desenvolvimento, podendo afetar extensas áreas de cultivo, levando a replantios ou à redução de estande e de produção. A sua manifestação está intimamente associada com alta umidade no solo. No Brasil, já foi observada nos estados do Rio Grande do Sul, de Santa Catarina, do Paraná, do Mato Grosso do Sul, de Minas Gerais, de Goiás e do Tocantins (COSTAMILAN et al., 2010) e recentemente, na safra 2011/12, em Mato Grosso. Danos devidos à PRF foram constatados durante a safra 2005/2006 no Rio Grande do Sul e no Paraná, provavelmente em consequência do uso extensivo de cultivar de soja com alta suscetibilidade ao patógeno (COSTAMILAN et al., 2010). A principal forma de controlar PRF é através do uso de cultivares com genes de resistência dominantes (*Rps*) (DORRANCE et al., 2003; 2004). Catorze genes *Rps* já foram descritos e mapeados em oito loci no genoma da soja: *Rps1a*, *Rps1b*, *Rps1c*, *Rps1d*, *Rps1k*, *Rps2*, *Rps3a*, *Rps3b*, *Rps3c*, *Rps4*, *Rps5*, *Rps6*, *Rps7* e *Rps8* (DORRANCE et al., 2004). Análises genéticas em *P. sojae* demonstraram que genes de avirulência simples dominantes (*Avr*) estão presentes no patógeno, e que os mesmos combinam com genes *Rps* (SHAN et al., 2004). *P. sojae* apresenta especialização fisiológica, desenvolvendo patótipos, também conhecidos como raças, cada um deles afetando diferentemente as combinações de genes de resistência. O gene *Rps1a* permaneceu efetivo nos EUA por aproximadamente oito anos (SCHMITTHENNER, 1985), e *Rps1k*, por quase 20 anos (DORRANCE et al., 2003, 2004). No Brasil, não há dados sobre a caracterização de genes *Rps* liberados em cultivares de soja comerciais. Esta informação é importante para a adequada indicação de uma cultivar para locais onde a doença já foi constatada.

O objetivo deste trabalho foi determinar possíveis genes de resistência presentes em linhagens de soja desenvolvidas pela Embrapa Trigo.

## Material e Métodos

O isolado de *P. sojae* utilizado para as inoculações foi obtido de plantas de soja sintomáticas (escurecimento da porção inferior de haste principal e laterais, com murcha da parte aérea) coletadas no campo experimental da Embrapa Trigo, em Passo Fundo, RS, no ano de 2007. O isolado foi obtido de ramos secundários, apresentando transição entre tecido escurecido pela doença e tecido sadio. Os ramos foram cortados, restando 5 cm para cada lado da zona de transição, e lavados em água corrente. Após, passaram por assepsia em câmara de fluxo com álcool etílico a 70% por 10 segundos, seguindo-se enxágue em água destilada esterilizada, retirando-se o excesso com papel filtro. O tecido sadio foi cortado até a medula escurecida, de onde pequenas lascas foram retiradas e plaqueadas em meio PBNIC (SCHMITTHENNER; BHAT, 1994), com algumas modificações: extrato de tomate foi usado em lugar de suco V-8, no mesmo volume (40 mL); CaCO<sub>3</sub> (0,6 g); bacto-extrato de levedura (0,2 g); sacarose (1,0 g); bacto-agar (20,0 g); água destilada (1000 mL); benomil (0,0050 g); pentacloronitrobenzeno (0,0405 g); iprodiona (0,0200 g); sulfato de neomicina (0,1000 g); e cloranfenicol (0,0100 g). O disco de meio de cultura foi então invertido na placa, de modo que os pedaços ficaram em contato com o fundo da mesma. As placas assim preparadas foram levadas à câmara de incubação, à temperatura de 25 °C. Após três ou quatro dias, colônias de *P. sojae* (identificadas por sua cor branca e pela produção de oosporos) foram repicadas para o meio acima descrito, sem adição de fungicidas e antibióticos. O isolado monozoopríco obtido foi denominado Ps 2.4/07. Cópias do mesmo foram armazenadas em nitrogênio líquido, preparadas segundo Tooley (1988).

A caracterização da efetividade de genes *Rps* com este isolado foi realizada pela técnica de inoculação do hipocótilo (SCHMITTHENNER; BHAT, 1994). Utilizou-se o macerado obtido pela passagem forçada de meio de cultura e micélio de 15 dias de idade por seringa de 20 mL de capacidade. Com o auxílio de agulha de 18-gauge acoplada à seringa, foi realizado um ferimento no hipocótilo de, aproximadamente, 5 mm, localizado a 1 cm abaixo dos cotilédones, em cada plântula de 10 dias de idade. Foram depositados 0,2 mL a 0,4 mL do macerado em 15 plântulas para cada diferencial inoculada: PI 547677 (*Rps1a*), PI 547842 (*Rps1b*), PI 547834 (*Rps1c*), PI 103091 (*Rps1d*), Williams 82 (*Rps1k*), PI 547838 (*Rps2*), PI 547862 (*Rps3a*), PI 591509 (*Rps3b*), L92-7857 (*Rps3c*), L85-2352 (*Rps4*), PI 547876 (*Rps5*), PI 591511 (*Rps6*), Harosoy (*Rps7*) e PI 399073 (*Rps8*). As plântulas foram levadas para ambiente com elevada umidade relativa, onde permaneceram por 48 h, retornando após para casa de vegetação. A leitura da reação (porcentagem de plantas mortas em cada diferencial) foi realizada sete dias após a inoculação. Considerou-se efetivo o gene da diferencial que apresentou até 30% de plantas mortas, e inefetivo, a diferencial com mortalidade de plantas acima de 70%.

## Resultados e Discussão

Após inoculação com o isolado Ps 2.4/07 de *P. sojae*, as diferenciais que apresentaram até 30% de plantas mortas possuíam os genes *Rps1a* (12% de mortalidade), *Rps1b* (30%), *Rps1c* (13%), *Rps1k* (13%), *Rps3a* (28%) e *Rps8* (0%). Embora ainda considerados efetivos, os altos índices de mortalidade expressos pelo isolado Ps 2.4/07 a *Rps1b* e *Rps3a* não qualificariam estes genes para uso em manejo da PRF.

As diferenciais que apresentaram mortalidade acima de 30% foram *Rps1d* (87%), *Rps2* (93%), *Rps3b* (72%), *Rps3c* (80%), *Rps4* (80%), *Rps5* (88%), *Rps6* (75%) e *Rps7* (100%). Tais genes não têm possibilidade de sucesso no controle da doença.

O conhecimento da variabilidade genética de *P. sojae* é fundamental na estratégia de melhoramento para locais específicos, com elevada incidência de PRF.

## Conclusão

- As linhagens desenvolvidas no programa de melhoramento genético de soja da Embrapa Trigo e testadas com o isolado de *P. sojae* Ps 2.4/07 podem possuir um ou mais dos seguintes genes dominantes de resistência à podridão radicular de fitóftora: *Rps1a*, *Rps1b*, *Rps1c*, *Rps1k*, *Rps3a* e *Rps8*.

## Referências

- COSTAMILAN, L. M.; SOARES, R. M.; BERTAGNOLLI, P. F. Podridão radicular de fitóftora (*Phytophthora sojae*). In: ALMEIDA, A. M. R.; SEIXAS, C. D. S. (Ed.). **Soja: doenças radiculares e de hastes e inter-relações com o manejo do solo e da cultura**. Londrina: Embrapa Soja, 2010. p. 105-126.
- DORRANCE, A. E.; McCLURE, S. A.; SILVA, A. de. Pathogenic diversity of *Phytophthora sojae* in Ohio soybean fields. **Plant Disease**, St. Paul, v. 87, p. 139-146, 2003.
- DORRANCE, A. E.; JIA, H.; ABNEY, T. S. Evaluation of soybean differentials for their interaction with *Phytophthora sojae*. **Plant Health Progress**. 2004. Disponível em <<http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/research/2004/psojae>>. Acesso em: 5 mar. 2012.
- SCHMITTHENNER, A. F. Problems and progress in control of *Phytophthora* root rot of soybean. **Plant Disease**, St. Paul, v. 69, p. 362-368, 1985.
- SCHMITTHENNER, A. F.; BHAT, R. G. **Useful methods for studying *Phytophthora* in the laboratory**. Wooster: Ohio Agricultural Research and Development Center, 1994. (Special circular, 143). 10 p.
- SHAN, W.; CAO, M.; LEUNG, D.; TYLER, B. M. The *Avr1b* locus of *Phytophthora sojae* encodes an elicitor and a regulator required for avirulence on soybean plants carrying resistance gene *Rps1b*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 17, n. 4, p. 394-403, 2004. Disponível em <<http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/MPMI.2004.17.4.394>>. Acesso em: 6 mar. 2012.
- TOOLEY, P. W. Use of uncontrolled freezing for liquid nitrogen storage of *Phytophthora* species. **Plant Disease**, St. Paul, v. 72, p. 680-682. 1988.
- WRATHER, J. A.; KOENNING, S. **Soybean disease loss estimates for the United States, 1996-2010**. Columbia: University of Missouri - Delta Research Center - Agricultural Experiment Station, [2010]. Disponível em: <<http://aes.missouri.edu/delta/research/soyloss.stm>>. Acesso em: 5 mar. 2012.