

# Saturação de Regiões Genômicas da Soja Associadas a Genes de Resistência à Ferrugem Asiática

---

SOUZA, L.G. DE<sup>1,3</sup> ; SILVA, D.C.G.<sup>2</sup> DA ;  
SILVEIRA, C.A. DA<sup>3</sup> ; MARIN, S.R.<sup>3</sup> ; SANTOS, J.V.M.  
DOS<sup>4,3</sup> ; YAMANAKA, N.<sup>5</sup> ; ABDELNOOR, R.V.<sup>3</sup> ;  
<sup>1</sup>Centro Universitário Filadélfia – UNIFIL, CEP 86020-  
000, Londrina-Pr, luanags@cnpso.embrapa.br; <sup>2</sup>  
Universidade Estadual Paulista, Campus Jaboticabal –  
UNESP – Jaboticabal ; <sup>3</sup>Embrapa Soja ; <sup>4</sup>Universidade  
Estadual do Norte do Paraná, Campus Faculdade Luiz  
Meneghel – FFALM ; <sup>5</sup>Japan International Research  
Center for Agricultural Sciences – JIRCAS.

A principal doença que acomete a produção de soja no Brasil é a ferrugem asiática, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* Sydow & Sydow. (Tecnologias, 2006). A ferrugem asiática tem causado sérios prejuízos e um aumento de custos decorrente do uso de defensivos químicos para o seu controle. Uma alternativa de controle econômico e efetivo é a obtenção de cultivares com alta resistência e produtividade (Tan et al, 1983). Associado a isso faz-se necessário a identificação de marcadores moleculares ligados aos genes de resistência à ferrugem asiática.

Hoje, existem informações disponíveis na literatura a respeito de quatro genes de resistência à ferrugem asiática: *Rpp1* (identificado na PI 200692), *Rpp2* (PI 230970), *Rpp3* (PI 462312), e *Rpp4* (PI 459025) (Bromfield & Hartwig, 1980; Hartwig, 1986). Foram identificados genes de resistência em outros genótipos como o FT-2, uma cultivar brasileira. Todos esses genes eram efetivos quando a doença foi descoberta no Brasil, entretanto, em 2003, houve uma quebra da resistência conferida pelos genes *Rpp1*, *Rpp3* e pelo locus identificado na cultivar FT-2, enquanto os genes *Rpp2* e o *Rpp4* permanecem efetivos (Arias et al, 2004).

Este trabalho tem como objetivo saturar as regiões cromossômicas que contêm os genes de resistência à ferrugem asiática *Rpp2* e *Rpp4*, utilizando marcadores moleculares RAPD.

Em um trabalho realizado anteriormente (Silva et al, 2006), no qual foram mapeados os genes *Rpp2* e *Rpp4* no grupo de ligação da soja, foram utilizados dois cruzamentos: um entre a cultivar suscetível BRS184 e o genótipo PI 230970 (possuidora do gene de resistência *Rpp2*), e outro entre a BRS184 e a PI 459025 (possuidora do gene de resistência *Rpp4*). Das plantas  $F_1$  desses cruzamentos, foram obtidas populações segregantes  $F_{2:3}$ , compostas por 130 e 80 indivíduos, respectivamente. Tais populações foram inoculadas com o fungo *Phakopsora pachyrhizi*. Para identificar marcadores mais próximos ao gene da ferrugem da soja, foram construídos dois *bulks* de DNA de 12 plantas diferentes, obtidos de cada uma das populações  $F_2$  em estudo: um *bulk* de plantas homocigotas resistentes e um de plantas homocigotas suscetíveis. Esses *bulks* foram utilizados para a amplificação de marcadores RAPD (Michelmores et al, 1991).

A amplificação dos loci foi realizada de acordo com o método descrito por Williams et al. (1990). As reações de PCR foram compostas de Tris a 10 mM e pH 8,5, KCl a 50 mM,  $Mg^{2+}$  a 2,4 mM, dNTPs a 100  $\mu$ M, *primers* a 0,4  $\mu$ M, o DNA genômico a 10 ng e 1 unidade de Taq DNA polimerase, em um volume total de 25  $\mu$ L. As condições de amplificação consistiram de um período inicial de desnaturação do DNA de cinco minutos a 94 °C, seguido de 40 ciclos térmicos, com cada um deles incluindo as etapas de desnaturação do DNA por 30 segundos a 94 °C, anelamento dos *primers* por 45 segundos a 35 °C e extensão por 60 segundos a 72 °C. Após os ciclos térmicos, um período final de extensão de sete minutos a 72 °C foi realizado. A eletroforese dos fragmentos amplificados foi feita em géis de agarose 1,3 %, corados com brometo de etídeo.

Foram testados 20 *primers* aleatórios de RAPD (Operon Technologies). Alguns *primers* geraram polimorfismo entre os *bulks*, entretanto, para vários deles, a reação controle sem DNA (branco) apresentou banda,

sugerindo sua contaminação com DNA. A maioria dos primers selecionados apresentou-se contaminada com DNA, não sendo confiável a sua utilização no presente trabalho. Devido a isso, foi alterada a estratégia do trabalho, com o uso de marcadores tipo AFLP, que têm como vantagem o grande número de fragmentos que são gerados e resolvidos em um único gel. No momento, a metodologia de AFLP está sendo implementada e testada no laboratório para ser usada na identificação de polimorfismos entre os *bulks* de DNA. Os marcadores AFLP polimórficos serão usados para a saturação das regiões genômicas contendo os alelos *Rpp2* e *Rpp4*.

## Referências

ARIAS, C.A.A.; RIBEIRO, A. S.; YORINORI, J. T.; BROGIN, R. L.; OLIVEIRA, M. F.; TOLEDO, J.F.F. de. Inheritance of resistance of soybean to rust (*Phakopsora pachyhizi* Sidow). In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 7.; INTERNATIONAL SOYBEAN PROCESSING AND UTILIZATION CONFERENCE, 4.; CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 3., 2004, Foz de Iguaçu. **Abstracts of contributed papers and posters**. Londrina: Embrapa Soybean, 2004. p. 100 (Embrapa Soja. Documentos, 228). Editado por Flávio Moscardi, Clara Beatriz Hoffmann-Campo, Odilon Ferreira Saraiva, Paulo Roberto Galerani, Francisco Carlos Krzyzanowski, Mercedes Concosdia Carrão-Panizzi.

BROMFIELD, K.R.; HARTWIG, E.E. Resistance to soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) and mode of inheritance. **Crop Science**, v. 20, 1980. p.254-255.

Tecnologias para a produção de soja – região central do Brasil – 2007. Londrina: Embrapa Soja; Embrapa Cerrados; Embrapa Agropecuária Oeste, 2006, 225p. Disponível em < <http://www.cnpso.embrapa.com.br> > Acesso em dezembro de 2006.

HARTWIG, E.E. Identification of a 4th Major Gene Conferring Resistance to Soybean Rust. **Crop Science**, v.26, p.135-1136, 1986

MICHELMORE, R.W.; Paran, I.; Keselli, V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregant populations. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.88 p.9828-9832, 1991.

SILVA, D.C.G.; YAMANAKA, N.; BROGIN, R.L., PEREIRA, S. dos S.; NOGUEIRA, L.M.; PASSIANOTTO, A.L.; CATELLI, L.L.; ARIAS, C.A.A.; NEPOMUCENO, A.L.; ABDELNOOR R.V. **Mapeamento de genes de resistência à ferrugem asiática da soja**. In: 3º Congresso de Soja do Mercosul – Mercosoja, p 253, 2006.

TAN, Y.J.; Yu, Z..L.; Liu, J.L. Studies on the epidemic regulation and control of soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* Sydow. **INTSOY International Soybean Program series**,1983 p. 169-174.

WILLIAMS J.; Kubelik A.; Livak K.; Rafalski J.; Tingey S. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research** v.18, p.6531-6535, 1990.