

IDENTIFICAÇÃO DE GERMOPLASMAS PORTADORES DO GENE DE RESISTÊNCIA À BRUSONE DO ARROZ *Pi5*

Klaus Konrad Scheuermann¹; Adriana Pereira²; Alexander de Andrade³; Ester Wickert⁴

Palavras-chave: *Pyricularia oryzae*, resistência genética, marcadores moleculares

INTRODUÇÃO

A brusone do arroz, causada pelo fungo *Pyricularia oryzae*, é responsável por uma perda estimada de cerca de 30% da produção mundial de arroz, o que seria suficiente para alimentar 60 milhões de pessoas (NALLEY et al., 2016). O controle mais eficaz e econômico da doença é obtido com o uso de cultivares resistentes (WANG & VALENT, 2017). Entretanto, devido principalmente à elevada variabilidade genética do patógeno, a resistência é superada em cerca de 3 a 5 anos após o lançamento de um novo cultivar (CORREA & ZEIGLER, 1995). Marcadores moleculares, ligados a genes de resistência à brusone, têm sido empregados no melhoramento, tornando o processo de seleção mais rápido e eficiente (YADAV et al., 2019; SCHEUERMANN & JIA, 2016). Esta técnica tornou possível o empilhamento de genes de resistência em um mesmo germoplasma, em um processo conhecido como 'piramidização', o que se acredita ser crucial para o aumento da durabilidade da resistência (SERVIN et al., 2004).

O gene *Pi5* se caracteriza por ser um gene de resistência de efeito maior ou dominante, que confere amplo espectro de resistência à brusone. Somado a isso, é um gene cuja sequência de nucleotídeos é conhecida, havendo marcadores moleculares disponíveis para seu uso em trabalhos de seleção assistida (JEON et al., 2003). No presente trabalho, realizou-se uma prospecção do banco de germoplasma de arroz da Epagri, a fim de identificar germoplasmas portadores do gene *Pi5*, que possam ser utilizados para o desenvolvimento de novas linhagens com múltiplos genes de resistência à brusone.

MATERIAL E MÉTODOS

Os DNAs das amostras de arroz do Banco de Germoplasma da Epagri (BAG), extraídos pelo método Doyle & Doyle (1987), foram analisados por PCR em reações multiplex. Foram utilizados iniciadores específicos para detecção do gene *Pi5*, Pi-5-40N23rF (tgtgaggcaacaatgctattgcg) e Pi-5-40N23rR (ctatgagttcactatgtggaggct) (JEON et al., 2003) e para detecção do gene RAc1 (actina), Rac1F (ctatgttcctggcattgct) e Rac1 R (gtactcagccttggaatcc), utilizado como controle de funcionamento das reações. Os iniciadores para o gene RAc1 foram desenvolvidos a partir da sequência X15865, depositada no gene bank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/X15865.1/>). Para cada reação de PCR utilizou-se tampão PCR 1X, 1,2 mM de MgCl₂, 0,28 mM de dNTPs, 0,25 µM de cada iniciador, 60 ng de DNA, 1 U de Taq DNA polimerase, para um volume final de 20 µL. Os ciclos de PCR foram realizados em termociclador Veriti (Applied Biosystems), programado para realizar uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94 °C, seguida de 30 ciclos de 45 s de desnaturação a 94 °C, 45 s de anelamento a 57 °C e 120 s de extensão a 72 °C, e uma extensão final de 5 minutos a 72 °C. Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,2%, e corados com brometo de etídeo. A avaliação dos resultados foi realizada em

¹ Eng. Agr. Dr. Epagri – Estação Experimental de Itajaí. Rod. Antônio Heil, 6800, Itajaí-SC, CEP: 88318-112. klaus@epagri.sc.gov.br.

² Química, M.Sc. Epagri – Estação Experimental de Itajaí. adriana@epagri.sc.gov.br

³ Eng. Agr. Dr. Epagri – Estação Experimental de Itajaí. alexanderandrade@epagri.sc.gov.br

⁴ Eng. Agr. Drª. Epagri – Estação Experimental de Itajaí. esterwickert@epagri.sc.gov.br

função da presença ou ausência de amplicons específicos. A presença de um amplicon de 480 pb indica ausência do gene *Pi5*, 700 pb presença do gene *Pi5* e ambos os amplicons indica heterozigose. A presença de um amplicon de 260 pb indica a presença do gene RAc1. Como controle positivo para a presença do gene *Pi5* foi utilizado o germoplasma IRBL5-M.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisados 499 acessos para a presença do gene de resistência à brusone *Pi5*, dos quais, 255 acessos, ou seja, 51,1% foram positivos, sendo que sete destes apresentavam-se em heterozigose. Na Figura 1 é possível observar os diferentes padrões de amplificação identificados durante as análises. Apesar do gene *Pi5* ter sido identificado com uma frequência alta entre os germoplasmas analisados, observa-se que entre os principais cultivares de arroz já empregados ou em uso no Brasil, a frequência é baixa (Tabela 1). Entre os 24 cultivares de arroz desenvolvidos pela Epagri que foram analisados, somente três cultivares possuem o gene, sendo que somente o Epagri 106 e SCS119 Rubi estão em cultivo e em pequenas áreas. Entretanto, a resistência conferida por esse gene já foi superada, haja vista que o gene *Pi5* está presente em cultivares de arroz desenvolvidos pela Epagri, IRGA e Embrapa, empregados em diferentes regiões do Brasil, com algum grau de suscetibilidade à brusone já descrito. Isso indica que a utilização do gene *Pi5* trará avanços na obtenção de resistência à brusone, se empregado de forma combinada com outros genes de resistência. Jiang et al. (2019) demonstraram que a combinação do gene *Pi5* com genes como *Pigm*, resultou em um aumento significativo nos níveis de resistência à brusone, comparado as linhagens parentais que empregavam o gene isoladamente. Esse ganho no espectro de resistência à brusone tem sido demonstrado também para diversas outras combinações gênicas (MAO et al., 2021; PENG, et al., 2021). Diante disso, trabalhos de prospecção de genes de resistência à brusone são uma etapa fundamental, para a identificação de germoplasmas que contenham genes de interesse, permitindo seu uso de forma combinada, tornando possível o desenvolvimento de cultivares com maior espectro de resistência à brusone do arroz.

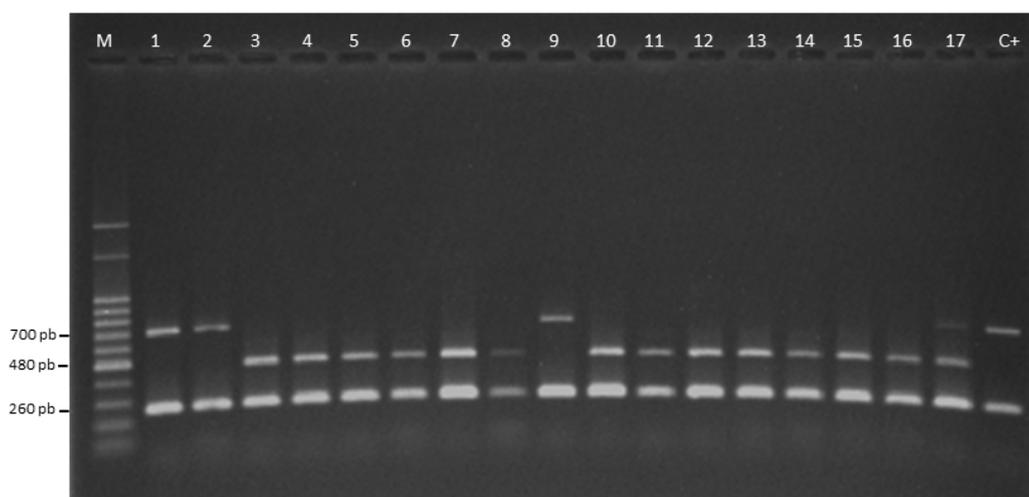


Figura 1. Cultivares de arroz analisados quanto a presença do gene de resistência à brusone *Pi5*. 1- Empasc 100, 2- Epagri 106, 3- Epagri 108, 4- Epagri 109, 5- SCS116 Satoru, 6- SCS121 CL, 7- SCS122 Miura, 8- SCS124 Sardo, 9- IRGA 422 CL, 10- IRGA 424, 11- IRGA 426, 12- IRGA 428; 13- IRGA 429; 14- BRS Pampa, 15- BRS 7 “Taim”, 16- BRS Catiana, 17- CR 4102; C+: IRBL5-M. A presença de um amplicon de 480 pb indica ausência do gene *Pi5*, 700 pb presença do gene *Pi5* e ambos os amplicons indica heterozigose. O amplicon de 260 pb indica a presença do gene RAc1 (actina).

Tabela 1. Análise da presença do gene de resistência à brusone *Pi5* nos principais cultivares de arroz já cultivados ou em uso no Brasil

Cultivar	<i>Pi5</i>	Cultivar	<i>Pi5</i>
Empasc 100	+	IRGA 421	-
Empasc 101	-	IRGA 422 CL	+
Empasc 102	-	IRGA 424	-
Empasc 103	-	IRGA 425	-
Empasc 104	-	IRGA 426	-
Empasc 105	-	IRGA 427	-
Epagri 106	+	IRGA 428	-
Epagri 107	-	IRGA 429	-
Epagri 108	-	BRS 7 “Taim”	-
Epagri 109	-	BRS Firmeza	+
SCSBRS 111	-	BRS Bojuru	+
SCS 112	-	BRS Pelota	-
SCS114 Andosan	-	BRS Colosso	+
SCS 115 CL	-	BRS Querência	-
SCS116 Satoru	-	BRS Fronteira	-
SCS117 CL	-	BRS Soberana	+
SCS118 Marques	-	BRS Aroma	+
SCS119 Rubi	+	BRS Aimoré	+
SCS120 Ônix	-	BRSMG Predileta	-
SCS121 CL	-	BRSMG Curinga	+
SCS122 Miura	-	BRSMG Seleta	-
SCS123 Pérola	-	BRSMG Relâmpago	+
SCS124 Sardo	-	BRSMG Caravera	+
SCSBRS Piracema	-	BRS Jaçanã	-
IRGA 408	-	BRS Pampa	-
BR/IRGA 410	-	BRS Formoso	-
BR/IRGA 412	-	BRS Alvorada	-
BR/IRGA 414	-	BRS Tropical	-
BR/IRGA 415	-	BRS Atalanta	-
IRGA 416	-	BRS Primavera	-
IRGA 417	+/-	BRS Catiana	-
IRGA 418	-	Puitá Inta CL	-
IRGA 419	-		

+: Presença do gene *Pi5*; -: ausência do gene; +/-: gene em heterozigose.

CONCLUSÃO

O gene *Pi5* apresenta uma alta frequência entre os germoplasmas analisados, porém sua frequência é baixa entre os principais cultivares de arroz já empregados ou em uso no Brasil.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina – FAPESC, pelo auxílio financeiro, processo 2021TR001438. A técnica de laboratório Patrícia Zardo Pasanski, pelo auxílio nas análises moleculares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CORREA-VICTORIA, F. J.; ZEIGLER, R. S. Stability of partial and complete resistance in rice to *Pyricularia grisea* under rainfed upland conditions in eastern Colombia. **Phytopathology**, v.85, p.977-982, 1995.

DOYLE, J.J.T.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1987.

JEON, J.S.; CHEN, D., YI, G.H. Genetic and physical mapping of *Pi5(t)*, a locus associated with broad-spectrum resistance to rice blast. **Molecular Genetics and Genomics**, v.269, p.280-289, 2003.

MAO, T.; ZHU, M.; AHMAD S. et al. Superior japonica rice variety YJ144 with improved rice blast resistance, yield, and quality achieved using molecular design and multiple breeding strategies. **Molecular Breeding**, n. 41 v.65, p.1-18, 2021. doi: 10.1007/s11032-021-01259-4.

NALLEY, L.L.; TSIBOE, F.; DURANT-MORAT, A. et al. Economic and Environmental Impact of Rice Blast Pathogen (*Magnaporthe oryzae*) Alleviation in the United States. **Plos One**, v.11: e0167295, 2016. doi:10.1371/journal.pone.0167295

PENG, M.; LIN, X.; XIANG, X. et al. Characterization and Evaluation of Transgenic Rice Pyramided with the *Pi* Genes *Pib*, *Pi25* and *Pi54*. **Rice**, n.14, v.1, p.78, 2021. doi: 10.1186/s12284-021-00512-w.

SCHEUERMANN, K.K.; JIA, Y. Identification of a *Pi9*-containing rice germplasm with a newly developed robust marker. **Phytopathology**, v.106, p.871-876, 2016.

SERVIN, B.; MARTIN, O.C; MÉZARD, M. et al. Toward a Theory of marker-assisted gene pyramiding. **Genetics**, v.168, p.513-523, 2004.

WANG, G.-L.; VALENT, B. Durable resistance to rice blast. **Science**, v.355, p.906-907, 2017.

YADAV, M.K.; ARAVINDAN, S.; NGANGKHAM, U. et al. Blast resistance in Indian rice landraces: Genetic dissection by gene specific markers. **PLoS ONE**, n.14 v.1: e0211061, p-1-19, 2019. doi.org/10.1371/journal.pone.0211061.