



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LUCIANE GOMES BARROS

**MAPEAMENTO GENÉTICO DE GENE DE RESISTÊNCIA À
FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA NA PI 594756**

LUCIANE GOMES BARROS

**MAPEAMENTO GENÉTICO DE GENE DE RESISTÊNCIA À
FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA NA PI 594756**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Dra. Francismar Correa
Marcelino-Guimarães

Londrina
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Barros, Luciane Gomes.

MAPEAMENTO GENÉTICO DE GENE DE RESISTÊNCIA À FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA NA PI 594756 / Luciane Gomes Barros. - Londrina, 2019.
107 f. : il.

Orientador: Francismar Correa Marcelino-Guimarães.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2019.

Inclui bibliografia.

1. Ferrugem asiática da soja - Tese. 2. Genes de resistência - Tese. 3. Marcadores Moleculares - Tese. 4. Mapeamento genético - Tese. I. Correa Marcelino-Guimarães, Francismar. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Título.

LUCIANE GOMES BARROS

**MAPEAMENTO GENÉTICO DE GENE DE RESISTÊNCIA À FERRUGEM
ASIÁTICA DA SOJA NA PI 594756**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Francismar Correa
Marcelino Guimarães
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Ricardo Vilela Abdelnoor
Embrapa-Soja

Profa. Dra. Giseli Valentini
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Londrina, 29 de março de 2019.

Dedico aos meus pais, Maria Aparecida Gomes de Barros e Mário Gomes de Barros pelo amor, suporte e Compreensão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que é meu porto seguro e quem me fortalece a cada dia.

Aos meus pais, Maria Aparecida Gomes de Barros e Mário Gomes de Barros, pelo auxílio e amor incondicional.

A minha avó Maria Conceição Ferreira da Silva, por sempre me incentivar a seguir a diante.

Aos meus tios Reinaldo e Rosilaine pela amizade e apoio emocional e toda minha família pela proteção e por dividirem comigo mais essa etapa.

À Universidade Estadual de Londrina e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular pela oportunidade ofertada no curso de Mestrado.

Agradecer pelo suporte financeiro, no qual o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A minha orientadora, Dra. Francismar por todo conhecimento compartilhado, dedicação e sobretudo pela confiança e paciência no desenvolvimento desse trabalho.

A Embrapa-Soja, pela excelente estrutura e organização que fez toda diferença e contribuiu para o desenvolvimento desse trabalho, e principalmente aos funcionários, pesquisadores e colaboradores.

Aos meus colegas e amigos de laboratório: Everton Ferreira, Bruna Avelino, Luann Augusto, Valéria Lopes, Raphaela Bergamini, David Lucas, Luana Darben, Rafaela Cardoso, Roberta Costa e Fernanda Castanho. Aos Técnicos e Analistas: Márcia Kuwahara, Silvana Rockenbach, Adriana Brombini, Ana Avelino, Vera Pierote, César Silveira, Alvino Alves, Rogério Matsuo, Allan Flausino e em especial a Dra. Danielle Cristina Gregório da Silva, pelos ensinamentos e encorajamento com as atividades do laboratório.

“Ora, a fé é a certeza daquilo que esperamos e a prova das coisas que não vemos”.

Hebreus 11:1

BARROS, Luciane Gomes. **Mapeamento genético de gene de resistência à ferrugem asiática da soja na PI 594756. 2019.** 107 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

A ferrugem asiática da soja (FAS), causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* Syd. and P. Syd, é a principal doença que afeta a produção de soja no Brasil. A FAS pode causar perdas de até US \$1.77 milhões por ano devido as perdas da produção e gastos com a aplicação de fungicidas. Nesse sentido, a resistência genética é uma alternativa eficaz para o manejo dessa doença, minimizando riscos ambientais e econômicos. Sete locos de resistência raça-específicos foram mapeados e são conhecidos como: *Rpp1*, *Rpp2*, *Rpp3*, *Rpp4*, *Rpp5*, *Rpp6* e *Rpp7*. Entretanto, devido a alta variabilidade genética desse fungo, até o momento não há *Rpp* resistente a todos os isolados. Nesse contexto, a busca por novos genes *Rpp* e alelos é crucial para o contínuo desenvolvimento de variedades resistentes ao fungo. Com o surgimento de novas tecnologias de sequenciamento, a ampla disponibilidade de marcadores SNP e metodologias de genotipagem em larga escala, o mapeamento genético tornou-se mais rápido e viável. O presente trabalho objetivou mapear o gene *Rpp* presente na PI 594756, que confere ampla resistência à FAS. A co-segregação de resistência com marcadores previamente associados aos genes *Rpp*, permitiu mapear o *Rpp* (PI 594756) próximo à região *Rpp1*. A análise de bulks segregantes utilizando SNPs oriundos do soySNP6K confirmaram esses resultados, mapeando o gene no cromossomo 18. Por conseguinte, a genotipagem e fenotipagem de 161 indivíduos da população F₂ (PI 594756 resistente x PI 594891 suscetível), usando 14 SNPs via sequenciamento de amplicons (PlexSeq) e quatro SSR, posicionou o gene entre os marcadores Sat_064 e Stta520, num intervalo de 90,9 kb. Dentro dessa região, pelo menos cinco modelos gênicos relacionados à defesa de plantas estão presentes: Glyma.18G281600, Glyma.18G281700, Glyma.18G282100, Glyma.18G282200 e Glyma.18G282000. Com base na análise de virulência da PI 594756, em comparação com outros acessos de soja contendo *Rpp* analisados, contra 11 isolados, foi possível constatar que o alelo presente na PI é diferente dos alelos *Rpp1* e *Rpp?*. Nesse sentido, sendo um alelo diferente dos alelos com os quais foi contrastado, o *Rpp* descoberto e mapeado neste estudo, pode ser introgridido no melhoramento de materiais elite conferindo uma resistência mais durável à FAS.

Palavra-chave: Ferrugem asiática da soja. Genes de resistência. Marcadores moleculares. Mapeamento genético.

BARROS, Luciane Gomes. **Mapping of resistance genes to Asian soybean rust in PI 594756. 2019.** 107 p. Dissertation (Master's degree in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

Asian soybean rust (ASR), caused by the fungus *Phakopsora pachyrhizi* Syd. and P. Syd, is the main disease affecting soybean production in Brazil. ASR can cause losses of up to USD\$ 1.77 million per year due to the yield losses and costs with fungicides application. Genetic resistance is an effective alternative for the management of this disease, minimizing environmental and economic risks. Seven race specific resistance loci have been mapped and are known as: *Rpp1*, *Rpp2*, *Rpp3*, *Rpp4*, *Rpp5*, *Rpp6* and *Rpp7*. Given the high genetic variability of this fungus, there is no *Rpp* resistant to all isolates so far. Searching for new *Rpp* genes and alleles is crucial for the continuous development of fungus resistant varieties. With the emergence of new sequencing technologies, the wide availability of SNP markers and large-scale genotyping methodologies, genetic mapping has become faster and more feasible. This study aimed to map the *Rpp* gene present in PI 594756, which confers broad resistance to ASR. Co-segregation of resistance with markers previously associated to *Rpp* genes, allowed us to map *Rpp* (PI 594756) close to *Rpp1* region. Analysis of segregating bulks using SNPs from the soySNP6K confirmed those results by mapping the gene on the chromosome 18. Genotyping and phenotyping of 161 individuals from the F₂ population (PI 594756 resistant x PI 594891susceptible), using 14 SNPs by amplicon sequencing (PlexSeq) and four SSRs, positioned the gene between markers Sat_064 and Stta520, in an 90.9 kb-interval. Within this region, at least five gene models related to plant defense are present: Glyma.18G281600, Glyma.18G281700, Glyma.18G282100, Glyma.18G282200 e Glyma.18G282000. By means of virulence analysis of PI 594756, compared to other *Rpp*-bearing soybean accessions, against 11 isolates, we found that the allele present in PI is different from the alleles *Rpp1* and *Rpp?*. Being a different allele from the alleles with which it was contrasted, o *Rpp* discovered and mapped in this study can be introgressed into elite breeding materials to confer more durable resistance to ASR.

Key word: Asian soybean rust. Resistance genes. Molecular markers. Genetic mapping.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1 –** Ciclo de desenvolvimento da interação *P. pachyrhizi* x planta hospedeira A) Inicialmente os uredósporos germinam, dando origem ao B) tubo germinativo, que se desenvolvem no C) apressório. Essa estrutura por sua vez, é constituída em seu interior por um D) cone apressorial, seguido pelo posterior desenvolvimento da E) hifa de infecção. A hifa de infecção ao penetrar nas paredes epidérmicas do hospedeiro, promovem a morte celular dessa região e no interior do mesófilo se desenvolvem. Por fim, o ciclo é finalizado com a H) célula mãe do haustório se diferenciando em haustório, num contato direto com à célula vegetal.....24
- Figura 2 –** Tipos de respostas de reação ao fungo *P. pachyrhizi* A) Lesões RB característico de plantas resistentes, com coloração marrom- avermelhadas; B) Lesões TAN característico de plantas suscetíveis, com formação de urédias e esporos e C) Lesões IR característico de plantas imune, não apresentando sinais visíveis de infecção ao patógeno, nem a formação de ure-dósporos ou esporos26
- Figura 3 –** Etapas referentes ao modelo “zigue-zague” do sistema imunológico da planta ao processo infeccioso do patógeno. No modelo que se segue, a amplitude final de resistência ou suscetibilidade é equivalente à [PTI - ETS+ ETI]. Assim, na etapa 1, as plantas tem a capacidade de detectar os PAMPs através das proteínas receptoras de reconhecimento padrão das plantas (PRRs), desencadeando a PTI. Na etapa2 os patógenos liberam efetores “imunes” ao reconhecimento da planta, estimulando à imunidade desencadeada por efetores (ETS). Na etapa 3, um efector que apresenta um gene de avirulência (Avr) é reconhecido pela proteína (NB-LRR) da planta, na qual apresenta um gene (R) promovendo a imunidade ativada por efetores ETI – versão amplificada da PTI

–, resultando grande maioria das vezes as respostas de hipersensibilidade. Por conseguinte, na etapa 4, novos efetores “selecionados” do patógeno são encontrados, desencadeando assim, na supressão da ETI. No sentido de dar continuidade ao sistema imunológico, quando a planta está sob a ação de seleção natural, age promovendo novos alelos que reconhecem efetores recém-adquiridos, reiniciando novamente a ETI.....28

MANUSCRITO

- Figura 1 –** A) Representa a classificação do nível de esporulação de cada lesão, variando de nenhuma (0) a abundante nível de esporulação (3). B) representa a categoria de coloração de cada lesão, variando entre uma coloração mais escura (1) a uma coloração de lesão mais clara (6).....63
- Figura 2 –** Reação dos parentais PI 594756 (resistente) x PI 594891 (suscetível) ao isolado do fungo *P. pachyrhizi* (A) LPF2B07 e (B) à amostra populacional do fungo oriundo da safra 2016/17 provenientes da coleção de microrganismos da Embrapa Soja.....74
- Figura 3 –** Distribuição dos indivíduos F2 do cruzamento PI 594756 x PI 594891 nas diferentes faixas de cada parâmetro fenotípico SL, NoU, OpenNoU e LC em resposta ao isolado LPF2B07. As cores (azul e vermelho) indicadas em cada gráfico representam genótipos resistentes e suscetíveis (respectivamente), dos quais foram avaliados qualitativamente. As setas de cor verde estão indicando novos valores de cortes, obtidos para os caracteres: SL:1,4; NoU: 5,5; Open NoU: 4,0; e LC: 4,0, enquanto as setas pretas indicam os valores utilizados por Yamanaka et al. (2011) (caracteres SL: 2; NoU: 2; e % LU: 70%). Por fim, os “colchetes” apresentados nos gráficos A e B estão indicando as discrepância sentre a “classificação de Yamanaka e a fenotipagem qualitativa visual”77

Figura 4 – As imagens representam os mapas genéticos e consenso da soja, localizado em uma porção do cromossomo 18. A) Representa o mapa genético da população F2 (161 indivíduos) integrado ao loco *Rpp1* gerados com as informações da cultivar Williams82.a2 (Gmax2.0). Os números ao lado esquerdo (cor preta) do cromossomo referem-se as distância em (cM), já os números indicados em cor vermelho representam as 18 marcas polimórficas (à direita) posicionadas na região (*Rpp1*) mapeada. À uma distância de 2,3 cM e 1,6 cM encontra-se o loco *Rpp* (PI 594756) de resistência à FAS, flanqueado pelas marcas Sat_064 e Stta520, respectivamente. B) Esta porção do mapa de ligação consenso foi gerado na página da web do Soybase, mapa físico da cultivar Williams 82.a2, Soybase, (2008).....81

Figura 5 – Posição física de marcadores SSR, SNPs e genes candidatos mapeados na região do loco *Rpp1* no cromossomo 18 da soja. O intervalo de 2.178 Mpb representa a distância física entre as 18 marcas polimórficas indicadas no mapeamento genético. As posições verticais das marcas (cor rosa), numeradas de 1, 2, 3, 4, 6, 11, 12, 13, 15, 9 e 10 foram identificadas através do genoma referência da soja, utilizando o Soybase. As posições das marcas numeradas de 7, 14, e 8 (cor azul clara) foram identificadas via análise de BSA (estando todas associadas a resistência a FAS). Por outro lado, marcas verticais representadas em verde, estão indicando as respectivas posições dos microssatélites, obtidas através do Phytozome v.2. Já as setas coloridas acima (vermelho- genes NB-ARC domínio, LRR; azul - escuro gene PH domain; amarelo - proteína Serine Carboxypeptidase e roxo-proteínaTyrosine Kinase) representam os cinco dos 24 Glymas, com funções associadas a defesa, localizadas no intervalo 90,9 kb (Sat_064 e Stta520) do genoma da cultivar Williams82 (Phytozome v.2) e as setas em cinza indicam genes sem função ligadas a defesa, na região (90,9kb)84

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** – Coeficiente de correlação de Pearson entre os caracteres quantitativos estudados.....76
- Quadro 2** – Reações fenotípicas de diferentes fontes de resistência (PI) à ferrugem asiática da soja frente a diferentes isolados. Os tipos de reações são classificados em: S - reações suscetíveis (TAN) com grande quantidade de esporulação; R - reação de resistência (RB) com baixo ou nenhum nível de esporulação.; I - resposta imune, sem sinal visível de infecção; IM - intermediário. Diferentes respostas de reação ao fungo *P. pachyrhizi* podem ser observadas entre a fonte *Rpp* (PI 59 4756) e as PIs que contém os genes *Rpp1*, *Rpp1-b* indicadas em (*). (--) Indicam que os acessos não foram testados com os respectivos isolados85

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Valores de média, moda, mediana e desvio padrão para determinação de corte das novas classes fenotípicas65
- Tabela 2** – Identificação, posições físicas, tipo de polimorfismo e *Rpp* das 26 marcas previamente mapeadas (*Rpp1/Rpp1b*, *Rpp2*, *Rpp3* e *Rpp4*) com base no genoma referência da soja Wm82. a2 (Gmax2.0)68
- Tabela 3** – Identificação das respectivas marcas, posições físicas e tipo de polimorfismos identificado via análise de BSA e genoma referência da soja versão Wm82. a2 (Gmax2.0)70
- Tabela 4** – Descrição, Origem, e Ano de coleta dos 11 isolados monospóricos de *P. pachyrhizi* testados73
- Tabela 5** – Teste Qui-quadrado (χ^2) para análise qualitativa da população F2 e F2:3 segregantes, seguindo a hipótese 3 :1 e 1: 2: 1 respectivamente.....75
- Tabela 6** – Teste de qui-quadrado (X^2) para análise de segregação dos marcadores ligados aos genes *Rpp* previamente mapeados, para uso no mapeamento da população F2 (217 indivíduos), obtidos do cruzamento entre PI 594756 (resistente) x PI 594891 (suscetível)78
- Tabela 7** – Análise de segregação dos marcadores a partir dos resultados BSA, utilizados para mapeamento da população F2 (161 indivíduos) obtidos do cruzamento entre PI 594756 (resistente) x PI 594891 (suscetível).....80
- Tabela 8** – Identificação, posição no genoma e anotação funcional dos 24 Glymas com funções de defesa que englobam as 18 marcas polimórficas à FAS na região (2.178Mpb)83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%LU	Frequência de lesões com urédia
BSA	Bulked segregant Analysis
cM	Centimorgan
DL	Desequilíbrio de ligação
EFETORES	São moléculas que alteram a estrutura e o funcionamento da planta hospedeira
ETI	Imunidade desencadeada por efetores
ETS	Suscetibilidade desencadeada por efetores
FAS	Ferrugem asiática da soja
GBS	Genotipagem por Sequenciamento
HR	Resposta de hipersensibilidade
KB	Kilobyte
LC	Cor de lesão
Mpb	Mega pares de base
NGS	Sequenciamento de Nova Geração
NoU	Número de urédias por lesão
Open NoU	Número de urédias abertas por lesão
PAMPs	Padrões moleculares associados à patógenos
PI	Planta introduzida
PTI	Imunidade desencadeada por PAMPs
QTL	Loco de caractere quantitativo
RB	Reddish-Brown (Castanho-avermelhado)
Res	Enzima de restrição
<i>Rpp</i>	Gene de Resistência à <i>Phakopsora pachyrhizi</i>
SAM	Seleção assistida por marcadores moleculares
SL	Nível de esporulação
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
Target GBS	Sequenciamento dirigido
USDA	(United States Department of Agriculture) ou Departamento de Agricultura dos Estados Unidos
WGS	Sequenciamento do genoma inteiro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	CULTURA DA SOJA E SUA IMPORTÂNCIA ECONÔMICA.....	21
2.2	FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA (<i>PHAKOSPSORA PHACHYRHIZI</i>).....	21
2.3	CICLO INFECCIOSO	23
2.4	SINTOMATOLOGIA.....	25
2.5	RESPOSTAS E DEFESAS CONFERIDAS POR GENES DE RESISTÊNCIA.....	26
2.6	RESISTÊNCIA À FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA.....	29
2.7	MARCADORES MOLECULARES: SNP E SSR	33
2.7.1	Novas Tecnologias de Genotipagem na Identificação de SNPs.....	34
2.8	MAPEAMENTO GENÉTICO DE GENE DE RESISTÊNCIA.....	36
3	OBJETIVOS	40
3.1	OBJETIVO GERAL	40
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
	REFERÊNCIAS	41
	MANUSCRITO	54
	RESUMO	55
	ABSTRACT	56
1	INTRODUÇÃO	57

2	MATERIAL E MÉTODOS	60
2.1	DESENVOLVIMENTO DAS POPULAÇÕES SEGREGANTES F ₂ E F _{2:3}	60
2.2	TESTE DA QUALIDADE DO INÓCULO E MULTIPLICAÇÃO.....	60
2.3	INOCULAÇÃO DAS POPULAÇÕES F ₂ E F _{2:3}	61
2.4	FENOTIPAGEM QUALITATIVA DA F ₂ E F _{2:3}	62
2.5	FENOTIPAGEM QUANTITATIVA DA F ₂	62
2.6	COLETA DE AMOSTRAS E EXTRAÇÃO DE DNA DA POPULAÇÃO F ₂	66
2.7	MAPEAMENTO GENÉTICO.....	67
2.7.1	Testes de Mascas Co-segregantes para Genes <i>Rpp</i> já Mapeados.....	67
2.7.2	Análise de BSA.....	69
2.8	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	71
2.9	CARACTERIZAÇÃO PATOGÊNICA DE PI'S COM DIFERENTES ISOLADOS <i>P.</i> <i>PACHYRHIZI</i>	72
3	RESULTADOS	74
3.1	AVALIAÇÃO FENOTÍPICA QUALITATIVA DA F ₂ E F _{2:3}	74
3.2	FENOTIPAGEM QUANTITATIVA DA F ₂	75
3.3	MAPEAMENTO GENÉTICO.....	78
3.4	REAÇÃO DOS ACESSOS DE SOJA AOS DIFERENTES ISOLADOS <i>P.</i> <i>PACHYRHIZI</i>	85
4	DISCUSSÕES	86
	REFERÊNCIAS	90
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	96

APÊNDICES	97
APÊNDICE A –	A figura está representando o mapeamento genético da população F ₂ (217 indivíduos) ao longo do cromossomo 18 da soja, utilizando marcadores ligados aos genes <i>Rpp</i> previamente mapeados	98
APÊNDICE B –	As imagens representam as ampliações e genotipagens realizadas pela metodologia Taqman de 161 amostras distribuídas no eixo “x” e “y”	99
APÊNDICE C –	Eletroforese em gel de agarose (synergel) ilustrando a amplificação do microsatélite Stta520 em parte da população F ₂ (161 indivíduos) avaliada.....	100
ANEXOS	101
ANEXO A –	Marcadores microsatélites (SSR) selecionados para análise de genotipagem à população F ₂ (161 indivíduos).....	102
ANEXO B –	Identificação, posição no genoma e anotação funcional dos 94 Glymas com diferentes tipos de funções, que englobam a região de (2.178Mpb) entre as 18 marcas polimórficas à FAS.....	105

1 INTRODUÇÃO

No cenário mundial, o cultivo da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) representa grande impacto econômico e social sobre a agricultura, agropecuária entre outras grandes setores da cadeia produtiva. Por ser a cultura de grande representatividade agrícola, dentre os diversos usos de suas propriedades, valem ressaltar o elevado teor de proteína, qualidade na obtenção e fabricação de óleo, e derivados do setor alimentício e indústria animal (MISSÃO, 2016; BURANELLO, 2011).

Embora o Brasil esteja entre os grandes produtores mundiais da cultura, toda pesquisa visando o controle aos principais fatores de redução de produtividade, se fazem importantes. Nesse sentido, alguns elementos abióticos (condições climáticas) e bióticos (pragas e doenças) são conhecidos como limitantes da produtividade e qualidade final da produção da soja (SANTOS, 2010).

Dentre esses fatores, o parasitismo causado pelo fungo biotrófico *P. pachyrhizi*, causador da ferrugem asiática da soja (FAS), constitui um dos principais fatores que acometem a sanidade da cultura. No Brasil, devido às condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento do fungo, existem relatos de ocorrência de perdas de até 90% de produtividade (GODOY et al., 2016). Com isso, algumas medidas de controle são fundamentais. Dentre as várias alternativas de manejo, o tratamento químico é a estratégia mais utilizada contra a ferrugem. Entretanto, além do custo, tal medida vem oferecendo riscos ao meio ambiente e à saúde humana, pondo em risco a suscetibilidade da produção (CAMARGO, 2010). Por outro lado, o uso de cultivares resistente é a alternativa mais eficaz para reduzir os impactos ambientais e econômicos. No entanto, pelo fato dos genes *Rpp* (resistência à *P. pachyrhizi*) serem raça-específicos frente a grande variabilidade de virulência apresentada pelo fungo, estes genes são incapazes de conferir resistência a todas as populações do patógeno (PHAM et al., 2009).

Nesse contexto, a busca por novas fontes de resistência se faz necessária. Genes *Rpp* de resistência ao fungo já foram identificados em diversas introduções de plantas (PI), em sete *loci* até o presente momento: *Rpp1*(PI 200492), *Rpp2*(PI 230970), *Rpp3*(PI 462312), *Rpp4*(PI 459025B), *Rpp5*(PI 200526), *Rpp6*(PI 567102B) e *Rpp7* (PI 605823) (BROMFIELD; HARTWING, 1980; MCLEAN; BYTH,

1980; HARTWING; BROMFIELD, 1983; HARTWING, 1986; GARCIA et al., 2008; LI et al., 2012; CHILDS et al., 2018).

Com o surgimento de novas plataformas de sequenciamento e genotipagem em larga escala, tem sido possível o mapeamento e identificação de regiões que controlam características de grande importância para programas de melhoramento de modo mais rápido e eficaz. Tais metodologias se baseiam principalmente no emprego de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*), também denominados marcadores de polimorfismo de base única. Esses marcadores, de um modo geral, apresentam alto nível de polimorfismo e dispersão no genoma. Merecem destaque as plataformas de genotipagem baseadas nestes marcadores soySNP50K e soySNP6K, desenvolvidas com base nos polimorfismos de seis genótipos de soja: Essex, Evans, Archer, Minsoy, Noir 1, e Peking, fornecendo um painel de 50.000 e 6.000 SNPs, respectivamente, distribuídos ao longo do genoma da soja (SONG et al. 2013).

Dentre os parâmetros avaliados para fins de mapeamento de genes de resistência a *P. pachyrhizi*, destacam-se os que foram realizados por Bromfield, Hartwing (1980) a partir da fenotipagem qualitativa para caracterização fenotípica dos genótipos, caracterizando os tipos de pústulas produzidas pelo fungo em TAN (suscetível) e RB (red brown – castanho avermelhadas) (resistentes). Por outro lado, outros trabalhos que analisaram parâmetros quantitativos revelaram uma fenotipagem mais fina e acurada, permitindo que o mapeamento fosse conduzido diretamente na população F₂ e mapeando genes com maior precisão (YAMANAKA et al., 2010; YAMANAKA et al., 2011).

Este trabalho, objetivou conduzir o mapeamento para a resistência à FAS presente na planta introduzida PI 594756 utilizando populações F₂ e F_{2:3} oriundas de seu cruzamento com o parental suscetível PI 594891. Tal fonte de resistência (PI 594756) foi escolhida por apresentar lesões fortemente castanho-avermelhadas, características de lesões de resistência ao fungo, com pouco ou nenhum nível de esporulação e número de urédias, quando avaliados após a inoculação com 11 diferentes isolados monospóricos brasileiros e de outras origens internacionais (ARG14.1M, AS13.4M, BAND15.1M, EIJ07.1M, FL07.1M, GN13.4M, LDN2003.1M, LPF.2B07, MBA16.1M, RV14.1M, TIJ07.1M,) do fungo obtidos dos anos 2003, 2007, 2014, 2015 e 2016, assim como uma amostra populacional obtida dos campos de soja da Embrapa, na safra 2016/2017. Por fim, o mapeamento

genético foi realizado através do método BSA (Bulk Segregant Analysis), utilizando marcadores do soySNP6K, associado as fenotipagens conduzidas nas progênes F_{2:3} para confirmação do fenótipo obtido na população F₂. Nesse caso, após identificação de marcadores SNPs flanqueando a região contendo o gene, SNPs adicionais e microssatélites foram utilizados para genotipar e mapear a população F₂ (161 indivíduos).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CULTURA DA SOJA E SUA IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

A soja é uma leguminosa originária da China e pertence à família Fabaceae (BROMFIELD, 1984). Assim, por ser caracterizada como uma das culturas de maior representatividade mundial, vêm sendo amplamente cultivada como fonte de matéria prima de grande importância econômica. Dentre seus usos, destaca-se a fabricação de farelo para alimentação animal; produtos alimentícios para o consumo humano (principalmente o óleo de cozinha); a fabricação de remédios e produção de biocombustíveis (BURANELLO, 2011).

No cenário atual, liderado pelos EUA, o Brasil ocupa a segunda colocação mundial na produção de soja. Com uma produção de 119,0 milhões de toneladas, em uma área de 35,1 milhões de hectares na safra 2017/2018, o país teve um aumento de produção de aproximadamente 4% em relação aos 114 milhões de toneladas plantados em uma área de 33,9 milhões de hectares na safra 2016/2017 (USDA, 2017; UDSA, 2018). Nesse sentido, dentre os maiores estados produtores e responsáveis pelo grande aumento dessa produção nacional, encontram-se os estados do Mato Grosso, liderando com uma produção de 32,3 milhões de toneladas, seguido do Paraná, com 19,1 milhões de toneladas e do Rio Grande do Sul, com 17,1 referentes à safra 2017/2018 (CONAB, 2018).

Ainda nessa perspectiva, além de colaborar com a constante expansão da produção no país, a cultura da soja sustenta o agronegócio brasileiro. Sendo assim, responsável por gerar cerca de 72 milhões de toneladas com exportações, a cultura da soja gera direta e indiretamente renda e emprego para diversos setores socioeconômicos e contribui para a evolução da pesquisa e conhecimento global (CONAB, 2018).

2.2 FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA (*PHAKOPSORA PACHYRHIZI*)

Existem duas espécies de fungo causadores da ferrugem que atacam a soja, o fungo *Phakopsora meibomia* (Arthur) e *P. pachyrhizi*. O primeiro representa menores riscos econômicos para a cultura da soja; é originário das Américas e por isso conhecido como “ferrugem americana” (BONDE et al., 2006;

ONO; BURITICÁ; HENNEN, 1992). Já o fungo *P. pachyrhizi* é um patógeno altamente agressivo, foi inicialmente relatado em 1902 no Japão, e é o agente causador da “ferrugem asiática da soja” (CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM, 2006).

Posterior à década de 1990, a ferrugem asiática teve ocorrência por outros continentes. No entanto até esse momento, estudos indicam que a doença tenha sido limitada apenas ao hemisfério Oriental (GODOY et al., 2016). Entre os anos de 1996 e 2001, seu surgimento se deu em algumas regiões do continente Africano, e ainda em 2001 chegou à América do Sul - Brasil e Paraguai, sendo que no Brasil instalou-se inicialmente na região sul, no estado do Paraná (LEVY, 2005; YORINORI et al., 2005).

Com sua chegada ao Brasil, a doença rapidamente se espalhou para outras regiões do país, e entre as safras de 2001/2002 já havia se disseminado para os estados do RS, PR, SP MS, GO, MG e MT, onde atingiu 60% da área cultivada de soja do país (FURTADO, 2007; YORINORI; NUNES; LAZAROTTO, 2004). Assim, nos três primeiros anos de ocorrência da doença, por se tratar de um patógeno pouco conhecido, dados apontam que a ferrugem asiática tenha causado perdas de rendimento de até US \$1,22 bilhões por ano (CHAKRABORTY et al., 2009; GODOY et al., 2016). Sabe-se que quando não controlada, a doença é capaz de promover reduções de até 90% na produtividade da cultura. Logo, prejuízos de mais de US\$ 10 bilhões já foram contabilizados, relativo à perdas de produção e custos com fungicidas, desde os primeiros anos de sua ocorrência no Brasil (CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM, 2017).

Nesse segmento, devido à grande importância que a ferrugem asiática representa para a cultura da soja, algumas medidas de controle são fundamentais. No Brasil, devido à dificuldade no combate e controle da doença, desde 2004, mapas de monitoramento de ocorrência têm auxiliado produtores no acompanhamento da distribuição da doença em todo território Brasileiro (<http://www.consorcioantiferrugem.net>). Nesse caso, o Consórcio Antiferrugem visa alertar a ocorrência da doença, bem como a necessidade na intervenção de controle, incluindo: o controle químico, cultural, e uso cultivares resistentes. Dentre essas medidas, devido a perda de eficiência de controle de alguns fungicidas, da reduzida quantidade de cultivares resistentes existente, desde 2006, o vazio sanitário é uma alternativa de manejo que foi implantada e mudou o calendário de plantio da cultura (GODOY, MARCELINO-GUIMARÃES; 2016). Tal medida

compreende um período entre 60-90 dias sem o plantio de sojas no campo, ao longo da entressafra, objetivando reduzir a incidência de inóculo na cultura (CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM, 2017).

2.3 CICLO INFECCIOSO

As ferrugens são parasitas obrigatórios (biotróficos), isto é, dependem de células vivas do hospedeiro para completar seu ciclo infeccioso (BROMFIELD, 1984). O fungo *P. pachyrhizi* pode infectar pelo menos 31 espécies de 17 gêneros de leguminosas, incluindo a espécie *Glycine max*, além de outras 60 espécies de 26 gêneros, quando em condições naturais de infecção ou quando mantidas sob inoculação artificial, respectivamente (GOELLNER et al., 2010).

Havendo a presença de um hospedeiro suscetível, e condições climáticas favoráveis de no mínimo 6 horas de umidade na folha (molhamento foliar), além de temperatura variando de 10 a 28,5°C, com ótimo em torno de 23°C, o fungo inicia seu ciclo de infecção. Por outro lado, temperaturas que excedem 30°C são letais e inibem a germinação e infecção dos esporos (BROMFIELD, 1984). Em se tratando de uma doença de rápida disseminação, os urediniósporos (oriundos de urédias) são facilmente disseminados por correntes de vento. Assim, sendo capazes de “viajar” por longas distâncias a procura de um hospedeiro, quando estes encontram condições ótimas para se desenvolver, entram em contato com a superfície foliar e germinam (ROCHA et al., 2015; DA SILVA, 2008; TWIZEYIMANA; HARTMAN, 2012).

Nessa sequência, um tubo germinativo se desenvolve sob a parede celular do hospedeiro, formando em seguida um apressório de estrutura globosa, mais ou menos do tamanho de um uredósporo. Essa estrutura apresenta em seu interior um sistema afunilado, designado cone apressorial que facilita a penetração da hifa sobre as rígidas paredes epidérmicas do tecido vegetal (GOELLNER et al., 2010; KOCH et al., 1983). À vista disso, segundo Bonde et al. (1976), uredósporos são capazes de germinar 2 horas pós-inoculação (hpi), seguido da formação do apressório por volta de 2 a 5 hpi.

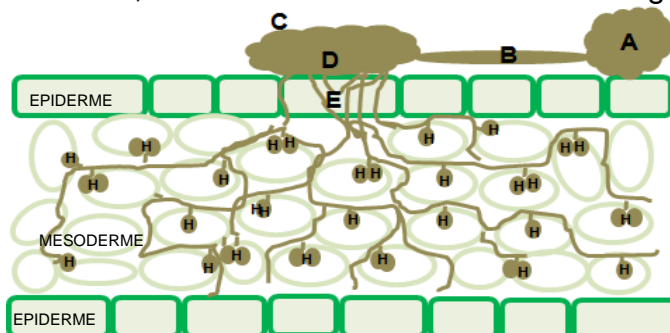
À medida que o apressório invade o hospedeiro, a célula penetrada exhibe sinais de morte celular, contudo a hifa de infecção prossegue seu

desenvolvimento através das células epidérmicas até atingir o meio intercelular do tecido vegetal (KEOGH et al., 1980; KOCH et al., 1983). Nesse contexto, de acordo com Bonde et al. (1976), esse evento pode ocorrer de 7 a 12 horas após o contato dos esporos com a superfície foliar. A partir daí as hifas primárias ramificam-se em secundárias, formando as células mãe do haustório e que darão origem ao haustório propriamente dito. Essa estrutura por sua vez, está em pleno contato com as células do mesófilo, proporcionando ampla troca de moléculas entre as células do hospedeiro e do fungo (GOELLNER et al., 2010; KOCH et al., 1983).

Logo, tendo ocorrido o contato inicial dos uredósporos com o hospedeiro suscetível, passadas 24 a 48 hpi, a formação do haustório é observada. Assim, os primeiros sintomas podem surgir dentre cinco a sete dias, seguidos da produção de esporos dentro do período que compreende de nove a doze dias do início da germinação e penetração (GOELLNER et al., 2010; KOCH et al., 1983; ZAMBOLIN, 2006).

Nesse sentido, cada urédia segue produzindo esporos por aproximadamente 21 dias. A partir de então, esses esporos estão aptos a iniciar uma nova infecção na mesma lavoura, ou irão, através do vento atingindo lavouras mais distantes. Diante disso, completado o ciclo da cultura, o fungo é capaz de sobreviver sobre plantas voluntárias, ou disseminar-se a procura de outros hospedeiros (CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM, 2006). A síntese do ciclo infeccioso pode ser observada na Figura 1.

Figura 1 – Ciclo de desenvolvimento da interação *P. pachyrhizi* x planta hospedeira. A) Inicialmente os uredósporos germinam, dando origem ao B) tubo germinativo, que se desenvolvem no C) apressório. Essa estrutura por sua vez, é constituída em seu interior por um D) cone apressorial, seguido pelo posterior desenvolvimento da E) hifa de infecção. A hifa de infecção ao penetrar nas paredes epidérmicas do hospedeiro, promovem a morte celular dessa região e no interior do mesófilo se desenvolvem. Por fim, o ciclo é finalizado com a H) célula mãe do haustório se diferenciando em haustório, num contato direto com à célula vegetal.



Fonte: Adaptado de Goellner et al. (2010).

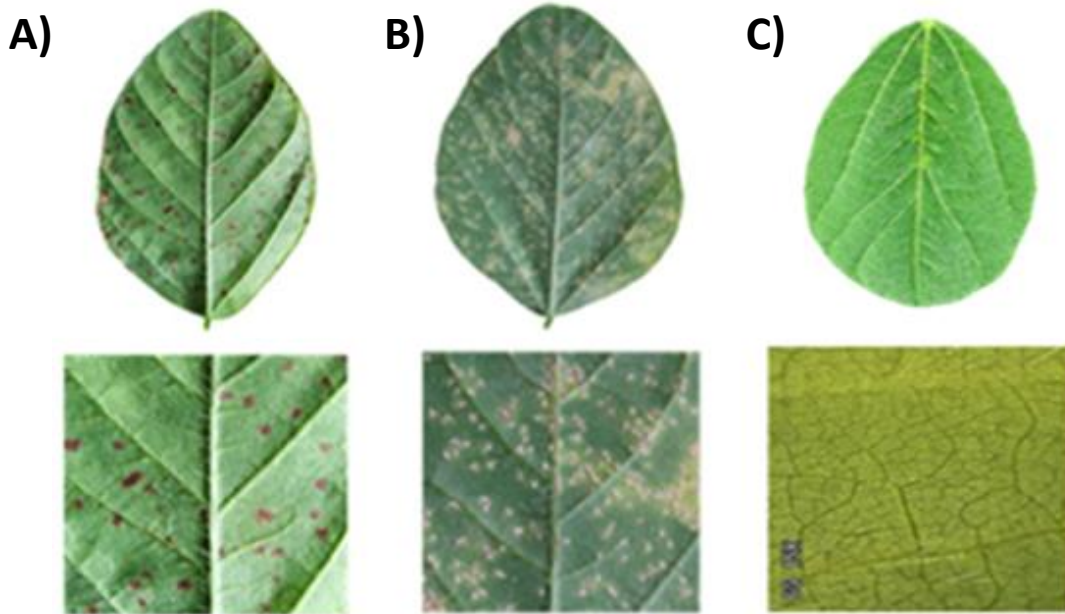
2.4 SINTOMATOLOGIA

Os sintomas da ferrugem asiática são comumente expressos em qualquer estágio de desenvolvimento da cultura. Contudo, o período que compreende o início do florescimento até o final do enchimento dos grãos corresponde as maiores taxas de ocorrência da doença (BROMFIELD, 1984). No hospedeiro, os sintomas da doença podem se desenvolver sobre algumas partes da planta, incluindo: cotilédones, hastes e principalmente sobre a área foliar (ALMEIDA et al., 2005).

Nas folhas, os sintomas de suscetibilidade iniciam-se por apresentar pequenos pontos mais escuros do que os demais tecidos saudáveis, de coloração cinza-esverdeadas a marrom-avermelhadas. Geralmente, as primeiras lesões tendem a um formato angular pequeno, entre 2 a 5 mm de diâmetro, que com o passar do tempo evoluem de tamanho, promovendo o amarelecimento e queda das folhas (ALMEIDA et al., 2005; CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM, 2006).

Por conseguinte, com a evolução da doença, pequenas saliências (urédias) podem ser observadas na face abaxial da folha. Essas urédias apresentam-se como vulcões abertos, semelhantes a pequenas feridas ou bolhas, que permitem a liberação dos uredósporos (CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM, 2006). Além disso, à medida que ocorre o avanço e desenvolvimento dos sintomas, o tecido foliar ao redor das regiões infectadas pode assumir uma coloração castanho-clara, característico de lesões TAN; apresentar lesões castanho-avermelhadas (RB), que são completamente visíveis em ambas às faces da folha, produzindo pouco ou nenhum uredósporo; ou ainda apresentar lesões característico de genótipos imune (IR), onde não são observados sinais macroscópicos da infecção do patógeno, nem a formação de uredósporos ou esporos (BROMFIELD; HARTWING, 1980; BROMFIELD, 1984; MILES et al., 2011) (Figura 2).

Figura 2 – Tipos de respostas de reação ao fungo *P. pachyrhizi*. A) Lesões RB característico de plantas resistentes, com coloração marrom-avermelhadas B) Lesões TAN característico de plantas suscetíveis, com formação de urédias e esporos e C) Lesões IR característico de plantas imune, não apresentando sinais visíveis de infecção ao patógeno, nem a formação de uredósporos ou esporos.



Fonte: Adaptado do Jircas (2018).

Diante do exposto, com os avanços finais da doença, as folhas altamente infectadas amarelecem e caem precocemente, levando à má formação de vagens e comprometimento no peso final e qualidade dos grãos (HARTMAN et al., 2015).

2.5 RESPOSTAS E DEFESAS CONFERIDAS POR GENES DE RESISTÊNCIA

Entende-se como resistência a capacidade que a planta apresenta em impossibilitar ou superar o ataque de um patógeno e/ou outros danos (AGRIOS, 1997). Dessa forma, toda célula vegetal necessita de um sistema de vigilância que confira um eficiente mecanismo de defesa nos locais de invasão pelo patógeno.

Durante o processo de infecção, as plantas são capazes de apresentar duas linhas de defesas principais: PTI “PAMP- *triggered immunity*”, e ETI “Effector- *triggered immunity*”. A resposta PTI atua no reconhecimento de padrões moleculares associados aos patógenos, denominados PAMPs. Tais moléculas são reconhecidas por proteínas receptoras presentes na membrana plasmática do

hospedeiro e que levam a ativação das respostas de defesa, de modo raça não específica (DE WIT, 2007; JONES; DANGL, 2006). Por conseguinte, no decorrer do processo evolutivo, os fitopatógenos passam a secretar proteínas efetoras específicas, que atuam na supressão do sistema de defesa basal, desencadeando os sintomas da doença (STERGIOPOULOS; DE WIT, 2009).

Por outro lado, uma segunda linha de defesa (ETI) é ativada, através do reconhecimento direto ou indireto dos efetores por proteínas de resistência da planta (DE WIT, 2007; JONES; DANGL, 2006). Para essa segunda resposta de defesa, duas teorias foram estabelecidas. A primeira é a teoria gene a gene proposta por Flor (1971). Nesta teoria, a interação patógeno-hospedeiro é determinada pela interação direta entre genes de resistência do hospedeiro (genes R) e genes de avirulência correspondentes no patógeno (genes Avr).

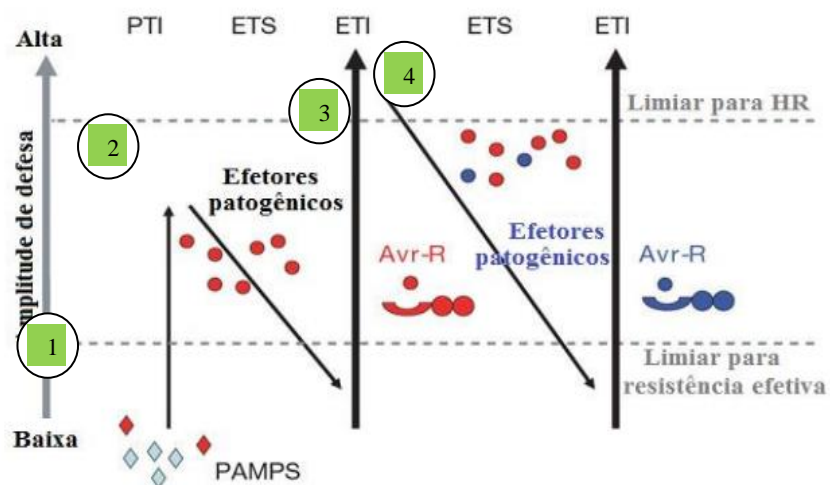
Mais recentemente uma segunda teoria foi apresentada, denominada “hipótese guarda”. Aqui, o reconhecimento entre o gene R da planta e a proteína de virulência (Avr) do patógeno ocorre de forma indireta (além do próprio gene R) através da associação entre efector e uma segunda proteína (*guardee*) (STERGIOPOULOS; DE WIT, 2009). Com isso, é estabelecido que o reconhecimento determinado por essa associação, ativa o sistema “imune” que foi desencadeada por efetores.

À medida que a resposta imune é ativada, ela estimula uma resposta de hipersensibilidade (HR) localizada, levando a morte celular no sítio de infecção, que impossibilita o subsequente ataque do patógeno nas demais áreas da planta. Em contrapartida, numa tentativa de superar o sistema imune da planta, variantes dos patógenos são selecionados, levando ao desenvolvendo de novos efetores, ao passo que o hospedeiro desenvolve novas proteínas de resistência, contra essa nova interação (DE WIT, 2007; JONES; DANGL, 2006).

Assim, de um modo geral, o conceito de defesa das plantas contra o ataque de patógenos foi melhor estabelecida e proposta pelo modelo “zigue-zague” (JONES; DANGL, 2006). Nesse modelo, o sistema é melhor compreendido em 4 etapas. 1) Na primeira etapa, os PAMPs são reconhecidos por receptores do hospedeiro, resultando na imunidade mediada por PTI contra uma subsequente colonização por fitopatógenos; 2) os patógenos secretam efetores, que promovem a virulência do patógeno. Nessa fase, eles também são capazes de afetar na linha de defesa (PTI), desencadeando a chamada “susceptibilidade desencadeada pelo efector

(ETS); 3) um efetor é exclusivamente reconhecido por uma das proteínas que possuem domínio de ligação a nucleotídeos (NB-LRR), resultando na imunidade provocada por efetores (ETI). Por sua vez, a ETI, promoverá a resistência da doença, através da morte celular programada no ponto inicial de infecção (HR) e 4) fatores de avirulência do fitopatógeno podem extinguir a ação da ETI, ou através da alteração do gene efetor reconhecido, ou pela obtenção de genes efetores adicionais. Adicionalmente, o processo de seleção natural age promovendo novas especificidades para os genes R, de resistência da planta, na medida que a ETI possa novamente ser ativada (CASTANHO, 2017; JONES; DANGL, 2006) (Figura 3).

Figura 3 – Etapas referentes ao modelo “zigue-zague” do sistema imunológico da planta ao processo infeccioso do patógeno. No modelo que se segue, a amplitude final de resistência ou suscetibilidade é equivalente à [PTI - ETS+ETI]. Assim, na etapa 1, as plantas tem a capacidade de detectar os PAMPs através das proteínas receptoras de reconhecimento padrão das plantas (PRRs), desencadeando a PTI. Na etapa 2 os patógenos liberam efetores “imunes” ao reconhecimento da planta, estimulando à imunidade desencadeada por efetores (ETS). Na etapa 3, um efetor que apresenta um gene de avirulência (Avr) é reconhecido pela proteína (NB-LRR) da planta, na qual apresenta um gene (R) promovendo a imunidade ativada por efetores ETI - versão amplificada da PTI -, resultando grande maioria das vezes as respostas de hipersensibilidade. Por conseguinte, na etapa 4, novos efetores “selecionados” do patógeno são encontrados, desencadeando assim, na supressão da ETI. No sentido de dar continuidade ao sistema imunológico, quando a planta está sob a ação de seleção natural, age promovendo novos alelos que reconhecem efetores recém-adquiridos, reiniciando novamente a ETI.



Fonte: Adaptado de Jones e Dangl (2006).

2.6 RESISTÊNCIA À FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA

A soja apresenta três tipos de respostas à infecção causada pelo patógeno da ferrugem asiática, que estão relacionadas aos genes de resistência, sendo: imunidade completa ou resposta imune (IR), na qual ocorre ausência de lesões visíveis; resistência que apresentam lesões marrom-avermelhadas (RB), com baixo ou nenhum nível de esporulação e susceptibilidade, que apresentam coloração castanho-claro (TAN), com maiores índices de esporulação em relação as lesões tipo RB (MILES et al., 2011).

A resistência da planta ao patógeno é conferida pelos genes de resistência a *P. pachyrhizi* (*Rpp*), e até o presente momento sete desses genes foram identificados no genoma da soja: *Rpp1* (McLEAN; BYTH, 1980), *Rpp2* (BROMFIELD; HARTWIG, 1980), *Rpp3* (HARTWIG; BROMFIELD, 1983), *Rpp4* (HARTWIG, 1986), *Rpp5* (GARCIA et al., 2008), *Rpp6* (LI et al., 2012) e *Rpp7* (CHILDS et al., 2018). Contudo, pelo fato desses genes *Rpp* serem raça-específicos frente a grande variabilidade de virulência apresentada pelo fungo *P. pachyrhizi*, estes são incapazes de conferir resistência à todas as populações do patógeno (PHAM et al., 2009).

O gene *Rpp1* foi descoberto e mapeado na PI 200492 em um intervalo de 0,8 cM (149,6 kb) entre os marcadores microssatélites Sct_187 e Sat_064 no cromossomo 18, conferindo resposta de imunidade ao isolado monospórico Q-1 oriundo da Austrália (McLEAN; BYTH, 1980; HYTEN et al., 2007). Tal gene foi capaz de conferir resistência a populações de fungo dos EUA por alguns anos. Entretanto, quando aplicado para outras regiões, apresentou-se suscetível para muitos isolados. Nesse mesmo sentido, estudos realizados por Camargo (2010) na análise do cruzamento entre duas populações distintas: Pintado x PI 561356 e BRS133 x PI 594754 identificaram e mapearam um possível gene de resistência à FAS na mesma região do locus *Rpp1*, no cromossomo 18 da soja. Posteriormente, Harris et al. (2015), aplicando a metodologia de BSA, observaram nas PI 417120, PI 423958 e PI 518295 um conjunto de SNPs mapeados à uma região de 5 cM do loco *Rpp1*, dos quais apresentaram sintomas semelhantes à PI 200492 (*Rpp1*), quando testadas com o mesmo painel de nove isolados de *P. pachyrhizi*: CO04-2, HW98-1, IN73-1, SA01-1, TW72-1, LA04-3, ZM01-1 e VT05-1. Tal autor concluiu que estas PI compartilham de um mesmo alelo no loco *Rpp1*.

Em alternativa, Chakraborty et al. (2009) mapearam e confirmaram na PI 594538A um segundo alelo de resistência na mesma região que o loco *Rpp1*, denominado (*Rpp1-b*). Esse novo alelo foi mapeado a 1,9 cM (445 kb) do loco *Rpp1*, entre os SNPs BARC-010495-00656 e BARC-014379-01337, promovendo resistência ao isolado ZM01-1 oriundo do Zimbabue e às populações de fungo no Brasil, Paraguai, Tailândia e Nigéria. Porém expressou respostas de suscetibilidade à populações de ferrugem nos EUA. Com isso, por apresentar diferentes reações aos isolados de *P. pachyrhizi* em relação ao apresentado pela PI 200492 (*Rpp1*), foi proposto se tratar de um alelo do gene *Rpp1*, que foi nomeado de *Rpp1-b*. Posteriormente, Ray et al. (2009), em estudos realizados com as PI 587886 e PI 587880A, mapearam dois genes de resistência na mesma região que o loco *Rpp1*, à 1,88 Mpb entre os microssatélites Satt191 e o Sat_064. Todavia, quando tais acessos foram desafiados com oito diferentes isolados de *P. pachyrhizi*, estes revelaram um fenótipo diferente ao apresentado pelo loco *Rpp1* na PI 200492, com os isolados *TW72-1* e *ZM01-1*, e também ao do loco *Rpp1-b* na PI 594538A quando desafiada com o isolado australiano *AU79-1*. Deste modo, tal estudo levou a elucidação de que o loco *Rpp* presente entre os acessos (PI 587886 e PI 587880A) fosse de um novo *Rpp* alternativo, denominado *Rpp1-?*. Outros acessos de soja contendo gene de resistência nas regiões *Rpp1*, foram identificados via mapeamento de ligação (PI 594766) e análise de bulks segregantes (PI 594760B) em estudos realizados por Gilli et al. (2013) e Garcia et al. (2011), respectivamente, dos quais posicionaram o gene *Rpp* nessa mesma região. Adicionalmente, outros acessos contendo o locus *Rpp1* foram identificados via mapeamento de ligação, teste de alelismo e testes de patogenicidade: PI 561356, PI 587905, PI 594760B, PI 594767A e PI 587855 (KIM et al., 2012.; HOSSAIN et al., 2014; ROCHA et al., 2015; YAMANAKA et al., 2016).

Para o locus *Rpp2* de resistência, o mapeamento se deu na PI 230970 a 7,3 cM do microssatélite Sat_255 e a 5,6 cM do Sat_620, num intervalo de 12,9 cM ao longo do cromossomo 16 (DA SILVA et al. 2008). De forma adicional, os genes das PI 224270 e PI 417125 também foram identificados com o mesmo gene no locus *Rpp2*. Entretanto, na PI 224270 respostas de resistência a quatro isolados brasileiros do fungo foram descritas, enquanto que na PI 230970, respostas de suscetibilidade foram observadas para os mesmos isolados, indicando a possível presença de um alelo alternativo (YAMANAKA; HOSSAIN; YAMAOKA, 2015).

Em sequência, o locus *Rpp3* foi identificado na PI 462312, conferindo resistência ao isolado IN73-1, que havia sido imune para *Rpp1* (HARTWING; BROMFIELD, 1983). Por conseguinte, tal loco foi mapeado num intervalo de 1,4 cM (688 kb) entre os microssatélites Sat_460 e Sat_163 no cromossomo 6 (HYTEN et al., 2009). Adicionalmente, Monteros et al. (2007) mapeou um gene de resistência na cultivar japonesa Hyuuga na mesma região no cromossomo 6 como sendo *Rpp3*. Contudo, o gene *Rpp3* da PI 462312 apresentou-se suscetível a população de ferrugem asiática do Brasil no ano de 2002, enquanto a cultivar Hyuuga desenvolveu uma reação de resistência ao patógeno (GARCIA et al., 2008). Ainda, investigando a fonte de resistência da cultivar *Hyuuga*, esta foi selecionada novamente num estudo contra oito isolados *P. pachyrhizi*, nos quais foram coletados em diversas regiões do mundo, revelando que possivelmente a cultivar carregue dois genes de resistência, sendo um no cromossomo 6, próximo do locus *Rpp3*, e um segundo gene no cromossomo 3 próximo do loco *Rpp5* (KENDRICK et al., 2011). Nesse segmento, acredita-se que o uso de dois ou mais genes, quando piramidados em um único genótipo seja uma ferramenta efetiva para garantir maior resistência a *P. pachyrhizi* (LE MOS et al., 2011; YAMANAKA et al., 2013).

O quarto gene (*Rpp4*) controlando a resistência a *P. pachyrhizi* foi mapeado por Da Silva et al. (2008) e por Garcia et al. (2008) na PI 459025B a 1,9 cM do microssatélite Satt288 e a 12,8 cM do AF162283 no cromossomo 18, aproximadamente 26 cM do loco *Rpp1*. A partir deste mapeamento, a análise funcional de modelos gênicos estruturalmente similares a genes de resistência presentes no intervalo mapeado na PI 459025B foi conduzida utilizando estratégias de silenciamento gênico transiente, sendo possível identificar o provável modelo gênico responsável pela resistência à ferrugem asiática da soja neste genótipo (MEYER et al., 2009). No entanto, alguns estudos indicam que mais de um alelo responsável pela resistência a esse patógeno está presente na PI 459025B. Nessa mesma região, um segundo locus (*Rpp4-b*) foi recentemente identificado na PI 423972, a uma distância de 187, 5 kb entre o SNP GSM0543 e GSM0387 do cromossomo 18, aproximadamente 5 cM do loco *Rpp4* presente na PI 459025B (KING et al., 2017). De acordo com Childs et al. (2017), tal loco condicionou resistência à um menor número de isolados avaliados. Todavia, quando comparada a resistência com o gene *Rpp4* para um mesmo isolado americano, este novo gene

foi capaz de reduzir de forma mais significativa a esporulação de isolados *P. pachyrhizi*, indicando que provavelmente *Rpp4-b* tenha uma origem diferente de *Rpp4*.

Em posteriores estudos, Garcia et al. (2008) identificaram o locus *Rpp5* que confere resistência simultânea a três PIs (PI200456, PI200526, PI200487 e a cultivar 'Hyuuga') quando inoculado com um isolado brasileiro, no qual havia sido virulento para os genes *Rpp1* e *Rpp3*. Para tanto, o locus *Rpp5* foi mapeado em um intervalo de 4,2 cM (2,8 Mb) entre Sat_275 e Sat_280 do cromossomo 3 na PI 200526. O locus *Rpp5* da PI 200526 mostrou boa resistência às populações do fungo *P. pachyrhizi* na América do Sul, mas que, no entanto, apresentou-se suscetível aos isolados dos EUA (AKAMATSU et al., 2013; WALKER et al., 2011; WALKER et al., 2014). Em continuidade, o locus *Rpp6* foi identificado e mapeado na PI 567102B, numa posição inicial de 23,7 cM (4Mb) entre o Sat_324 e o Sat_394 no cromossomo 18, aproximadamente 40 cM do locus *Rpp4* (LI et al., 2012), e posteriormente a uma região de 45 Kb (KING et al., 2015). O loco *Rpp6* apresentou boa resistência a isolados nos EUA e para algumas populações de ferrugem na América do Sul (MILES et al., 2008; WALKER et al., 2014). Finalmente, esse mesmo loco foi mapeado nas PI 567104B e PI 567068A (LIU et al., 2016; KING et al., 2015).

Mais recentemente, se deu o mapeamento do gene *Rpp7* presente na PI 605823 conferindo resistência ao isolado GA12 de *P. pachyrhizi*. O gene foi mapeado no intervalo de 0,8 cM (154 kb) entre os marcadores GSM0547 e GSM0548, no cromossomo 19 (CHILDS et al., 2017).

O uso de cultivares resistente constitui uma ferramenta de extrema utilidade no controle da FAS, de modo que a identificação e mapeamento de novos genes e alelos é de extrema importância aos Programas de Melhoramento. Contudo, devido à ampla variabilidade do patógeno, cultivares apresentando um único gene *Rpp*, tendem a ser facilmente perdidas, devido a seleção de variantes resistentes nas populações naturais do fungo (BROMFIELD, 1984; DA ROSA, 2015; HARTMAN; MILES; FREDERICK, 2005). Com isso, um dos grandes desafios para os programas de melhoramento é o desenvolvimento de variedades resistentes com amplo aspecto de resistência, por exemplo, via piramidação de genes (HARTMAN; MILES; FREDERICK, 2005; PEDERSEN; LEATH, 1988).

2.7 MARCADORES MOLECULARES: SNP E SSR

Os marcadores moleculares são constituídos por segmentos de DNA, no qual possibilitam caracterizar polimorfismos específicos, quando associados à características de importância entre indivíduos contrastantes de uma população (BORÉM; MIRANDA, 2009). Tais marcadores auxiliam em diferentes tipos de estudos, tais como o de diversidade genética; na identificação e mapeamento de características qualitativas e quantitativas de interesse; e conseqüentemente na construção de mapas genéticos, sendo amplamente utilizados em programas de melhoramento através da seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) (PEREIRA et al., 2016; CAIXETA et al., 2016).

Nos dias de hoje, os principais marcadores moleculares aplicados no mapeamento genético e na SAM são os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) e os SSR, denominado (*Simple Sequence Repeats*) (FERREIRA, 2006). Os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) são caracterizados por apresentarem variações em um único nucleotídeo, podendo ser atribuídos a qualquer troca que ocorra entre as bases A, T, C e G no genoma (CAIXETA et al., 2016). Desse modo, quando correlacionado duas sequências de DNA, esses marcadores apresentam-se bialélicos e com comportamento codominante, ou seja, quando na presença de heterozigose, ambos os alelos são identificados (BORÉM; FRITSCHÉ-NETO, 2013).

Em espécies vegetais esses marcadores são amplamente encontrados, apresentando abundantes níveis de polimorfismos tanto em regiões expressas como não expressas do genoma (CAIXETA et al., 2016). Estima-se que no genoma das plantas sua frequência seja da ordem de um SNP a cada 21 bases, mutação esta, capaz de promover alterações fenotípicas em uma característica (EDWARDS et al., 2008; BORÉM; MIRANDA, 2009).

Os marcadores SNPs tornaram-se amplamente utilizados em razão dos atuais avanços em tecnologias de genotipagem e no sequenciamento do DNA, no qual possibilitou a análise de um elevado número de marcadores e populações em um único ensaio. Em plantas, esses marcadores exibem vantagens em relação aos demais, e tendo em vista sua alta densidade e polimorfismo no genoma, essa ferramenta é facilmente aplicável aos estudos genéticos de plantas e na construção de mapas genéticos de alta resolução, através da seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) (CAIXETA et al., 2016).

Adicionalmente, os marcadores SSR, denominados (*Simple Sequence Repeats* ou *Sequências Simples Repetidas*), são curtas sequências de DNA repetidas em tandem, e consistem de dois a cinco nucleotídeos baseados na amplificação de locos microssatélites (LITT; LUTY, 1989). Tais marcadores são individualmente amplificados via PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando pares de primers específicos, contendo de 20 a 30 pb complementares as sequências que flanqueiam regiões repetidas em tandem (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Dentre as diversas características apresentadas por esses marcadores, estes são considerados altamente polimórficos, codominantes, apresentam alta taxa de mutação, são multialélicos, são bastante numerosos em genomas eucarióticos, nos quais apresentam boa distribuição (CAIXETA; FERRÃO; MACIEL-ZAMBOLIM, 2013; TAUTZ, 1989). Na cultura da soja, uma grande quantidade de locos de SSR já foram identificados e mapeados ao longo do genoma e encontram-se disponibilizados na base de dados do Soybase (<http://www.soybase.org>) (CREGAN et al., 1999; SONG et al., 2004, HWANG et al., 2009).

2.7.1 Novas Tecnologias de Genotipagem na Identificação de SNPs

Ao longo dos últimos anos, pôde-se perceber um significativo avanço e desenvolvimento de novas tecnologias de sequenciamento. Tais tecnologias impulsionaram a identificação de polimorfismos de uma base e, deste modo, o desenvolvimento de metodologias de genotipagem em larga escala (GIUSTI; KETTENER; FUCHS-FERRAZ, 2016; TURCHETTO-ZOLET et al., 2017). Dentre essas diferentes metodologias de genotipagem, podemos destacar: a) tecnologias de genotipagem baseadas em sequenciamento de nova geração, e b) tecnologias de genotipagem baseadas em hibridização.

As tecnologias baseadas em sequenciamento de nova geração (NGS- Next Generation Sequencing) são caracterizadas por seu alto rendimento de automatização e baixo custo para obtenção de dados. Além disso, tem sido motivo de grande importância para uso e integração com a área da bioinformática (LEÃO, 2017; PABINGER et al., 2014). Nesse contexto, dentre as técnicas e métodos utilizados para esse estudo, destacam-se: WGS, GBS e Target GBS.

O WGS (whole genome shotgun sequencing) é a técnica de genotipagem que consiste no sequenciamento do genoma completo de interesse. Esse método é capaz de fragmentar o genoma em diversas sequências menores, e em seguida promover o sequenciamento individual de cada parcela, visando à construção final de uma biblioteca genômica de clones (SHENDURE et al., 2017; GRIFFITHS et al., 2008). Seguindo esse contexto, cada fragmento obtido dos curtos seguimentos aleatórios são sobrepostos e alinhados, através da montagem do genoma. Assim, após essa sobreposição, cada fragmento é lido e reconstituído através de programas computacionais da bioinformática (GRIFFITHS et al., 2008; TIWARY, 2015).

Outra técnica abordada e utilizada nas plataformas de NGS é a técnica de genotipagem por sequenciamento (GBS). Essa técnica de sequenciamento possibilita a redução da complexidade do genoma por meio da utilização de enzimas de restrição. Assim, após a clivagem do DNA pela atuação das enzimas, adaptadores comuns e adaptadores específicos (barcodes) são adicionados às amostras para facilitar a identificação de cada genótipo permitindo o sequenciamento simultâneo de muitas amostras. Assim, esses barcodes são capazes de identificar cada genótipo específico dentre múltiplos ensaios (ELSHIRE et al., 2011). Nesse sentido, a metodologia GBS possibilita encontrar centenas e até milhares de SNPs no conjunto de genótipos observados. Dessa forma, após o sequenciamento, uma série de seleções são aplicadas aos SNPs com o intuito de selecionar aqueles que sejam úteis e apresentem dados favoráveis. Esse processo leva à uma considerável redução no número de SNPs obtidos. Porém, no final do procedimento ainda é possível atingir uma significativa quantidade de marcadores SNPs (milhares), com alto grau de polimorfismo (SILVA, 2012).

Mais recentemente, outra técnica de genotipagem foi aplicada ao sequenciamento de nova geração, denominada Target GBS ou sequenciamento de amplicons utilizando novas metodologias de genotipagem (ROCHA, 2017). Segundo essa autora, trata-se de uma metodologia utilizada de sequenciamento dirigido às regiões específicas do genoma, baseado nos alvos fornecidos pelo cliente. Logo, diferente das demais, ela representa uma alternativa mais econômica de aplicação direta nos Programas de Melhoramento. Em outras palavras, o target GBS trabalha no desenvolvimento de iniciadores que flanqueiam especificamente o polimorfismo de interesse. Assim, uma vez amplificado, tais fragmentos são ligados a iniciadores

universais de sequenciamento e barcodes, que permitem a identificação de cada SNP ou amostra, dependendo da forma desejada de se multiplexar.

Por fim, em complementariedade ao NGS, existem as tecnologias de genotipagens baseadas em hibridização. Dentre essas tecnologias, destacam-se as plataformas baseadas nos Chips soySNP50K e soySNP6K, desenvolvidas por Song et al. (2013, 2015) que em soja exploram os polimorfismos de base única (SNP) e a plataforma Affymetrix (*AxiomSoyaSNP Array*) (LEE et al., 2015).

De início, a execução dessa plataforma soySNP50K consistiu do uso de seis genótipos americanos: Essex, Evans, Archer, Minsoy, Noir1 e Peking, para obtenção de 50.000 SNPs polimórficos visando o desenvolvimento de uma genotipagem de alto rendimento, denominada BeadChip soySNP50K. Por conseguinte, um subconjunto de 6.000 SNPs foram selecionados do soySNP50K baseado na qualidade de polimorfismos e distribuição de SNPs, objetivando redução de custos na geração do BeadChip soySNP6K (SONG et al., 2015). De um modo geral, o soy50K possibilita maior acesso a informações do genoma da soja e em trabalhos realizados por Song et al. (2015) a grande aplicação em larga escala do uso dessa plataforma, foi a genotipagem de toda a coleção de acessos de *Glycine max* presente nos bancos de germoplasma do USDA (aproximadamente 19.652 mil acessos), e a posterior disponibilização dos polimorfismos destes genótipos em base de dados públicas “Soybase” (<http://www.soybase.org/>).

Adicionalmente, ZHOU et al. (2015) realizando o resequenciamento de 302 acessos de soja utilizando a plataforma Illumina HiSeq 2000, identificaram 9.790.744 SNPs. A partir daí, seguiu-se o resequenciamento de 47 acessos de soja que possibilitou a identificação de 4,83 milhões de marcadores SNPs de alta qualidade, dos quais 180,961 mil foram empregados na criação da plataforma Affymetrix (*AxiomSoyaSNP array* para genotipagem de *Glycine max* (LEE et al., 2015).

2.8 MAPEAMENTO GENÉTICO DE GENES DE RESISTÊNCIA

Desde a década de 80, com o surgimento dos marcadores de DNA, a utilização do mapeamento genético tornou-se ilimitado a todas as espécies vegetais (BOSTEIN et al., 1980). Dessa forma, nos últimos anos o mapeamento

genético apresentou-se como um instrumento de extrema importância para os geneticistas, e com os avanços na utilização dessa ferramenta seu uso tem sido amplamente aplicado em diversas áreas da genética (CARNEIRO; VIEIRA, 2002). Para tanto, estabelecem importantes informações em pesquisas mais aprofundadas, tais como: mapeamento de genes de interesse relacionados a características qualitativa ou quantitativa (QTL's), integração com mapas físicos para clonagem de genes, e na seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) (FERREIRA, 1995; PEREIRA et al., 2016).

Objetivando a construção de mapas genéticos, a escolha entre genitores contrastantes e uma população segregante são fundamentais. Nesse sentido, diferentes populações estruturadas, originadas de um cruzamento biparental: F_2 , F_3 , duplos haplótipos e populações derivadas de retrocruzamento, são empregadas por apresentarem o máximo de desequilíbrio de ligação (DL) (PEREIRA et al., 2016; SCHUSTER, 2017). De acordo com Schuster (2017), o DL apresenta-se como a ligação física entre alelos de diferentes locos, num mesmo cromossomo. Ou seja, ele representa a base da ligação genética entre marcadores e os fenótipos de interesse. Em contrapartida, a recombinação gênica é um fator capaz de reduzir a extensão do DL. Nesse caso, indivíduos que apresentam baixos índices de recombinação, conseqüentemente apresentam alto DL, como é o caso de populações estruturadas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 2006; SCHUSTER, 2017). Assim, havendo pouca recombinação em consequência da forte associação em desequilíbrio, mesmo marcadores posicionados a longas distâncias de regiões de interesse, poderão estar ligados a elas, resultando em um mapeamento genético de menor resolução (SCHUSTER, 2017).

O princípio fundamental do mapeamento genético baseia-se na frequência de recombinação para determinar a distância relativa entre duas características ligadas. Com isso, a distância entre dois genes ligados é estabelecida pela unidade de um centiMorgan (cM), que é equivalente a 1% de recombinação. Entretanto, quando genes se encontram mais distantes, essa proporção é alterada devido à ocorrência de crossing-over (CATELLI, 2009; RAMALHO et al., 2008). Diante desse contexto, funções de mapeamento tem sido desenvolvidas para conversão dessas unidades e construção dos mapas, tais como as funções de Haldane (HALDANE, 1919) e Kosambi (KOSAMBI, 1944). A primeira função admite que a ocorrência de permuta se dê de forma independente, enquanto a função de

Kosambi considera a existência de permutas próximas de modo não independente, levando em consideração a ocorrência de interferência (BATISTA, 2008).

Ainda nesse sentido, de acordo com Bearzoti (2000), os caracteres mapeados devem apresentar uma distribuição conforme a segregação mendeliana e este padrão pode ser confirmado através do teste de Qui- quadrado (χ^2). Logo, na maioria das vezes é recomendado o descarte dos locos que apresentam distorções da segregação mendeliana para não prejudicar a qualidade do mapa. Nesse sentido, de posse das estimativas de frequências de recombinação, busca-se encontrar marcadores ligados. Assim, dois marcadores são considerados ligados quando a frequência de recombinação entre eles for inferior a um determinado limite e, ou apresentar um valor de LOD score (Logaritmo dos Nós), também inferior a um determinado limite. Logo, em programas de mapeamento, valor de LOD score 3, está indicando que a ocorrência de ligação é mil vezes mais provável que a de segregação independente (BEARZOTI, 2000; DA SILVA, 2008; SCHUSTER; CRUZ, 2004).

De modo adicional à utilização dos mapas genéticos de ligação, no final da década de 90, diversos sequenciamentos ou mapas físicos foram sendo publicados, tais como o genoma da soja (SCHMUTZ et al., 2010). Assim, através do mapeamento físico disponível, uma relação entre distâncias genética e física foi possível ser estabelecida. No caso especial da soja, com o sequenciamento de seu genoma, foi possível prever aproximadamente 46. 430 mil genes em uma correlação média de 197 Kb para 1 cM, nas regiões de eucromatina e 3,5 Mb para 1 cM, em regiões de heterocromatina (SCHMUTZ et al., 2010).

Deste modo, com a possibilidade de se integrar mapas genéticos e físicos, o mapeamento fino de genes tem se tornado mais comum. Logo, realizando o mapeamento de toda região genômica, seguido do mapeamento fino, é passível um maior estreitamento da região de interesse (PAPACHISTOU; LIN, 2006).

O mapeamento fino, também denominado “fine mapping”, consiste em delimitar de uma forma mais precisa a região em que o gene de interesse se encontra, bem como identificar genes que estejam próximos a marcadores ligados aos QTL. Nesse último caso, a técnica aplicada é a utilização de uma maior quantidade de marcadores próximos às regiões onde os QTLs se encontram (ALMEIDA et al., 2009).

De acordo com Boopathi (2013), o mapeamento fino representa o

mapeamento de QTL de alta resolução que auxilia em diferentes tipos de estudos. Tal estratégia consiste em posicionar os QTLs entre um ou mais marcadores, objetivando reduzir o intervalo da região de interesse em busca de maior resolução no mapa. Nesse aspecto, cromossomos que dispõem de regiões recombinantes são altamente informativos, assim como o desenvolvimento de informações acerca das sequências completas do genoma da soja, para identificação de marcadores e escolha de primers específicos.

Para o mapeamento fino, marcadores SNPs são os mais utilizados por apresentarem maior disponibilidade nos genomas. Todavia, independente do tipo de marcador utilizado, a relação (distância física x genética) é determinante para uma boa eficiência de mapeamento e identificação de genes candidatos. Estudos adicionais realizados por Pham et al. (2013), relatam o sucesso dessa técnica de mapeamento, que teve por objetivo a utilização do mapeamento fino visando identificação do gene candidato capaz de promover resistência ao nematóide de galhas nas PI 96354 de soja.

Visto a importância do uso de mapas físicos ao mapeamento fino, um passo decisivo para sua aplicação é a disponibilidade de grandes inserções de DNA genômico para o sequenciamento de última geração. Nesse caso, resultados de sequenciamento são estabelecidos em conjuntos, denominados “contigs” onde a partir de então, o mapa físico completo do genoma é preparado. De forma complementar, o mapa físico é comparado com o mapa genético, onde novos marcadores SNPs podem ser obtidos do mapa físico para um mapeamento preciso da região genômica alvo (QTL) ao mapa genético (BOOPATHI, 2013).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho visa realizar o mapeamento genético do gene que confere resistência ao fungo *P. pachyrhizi*, presente na fonte PI 594756, bem como a identificação de marcadores SSR e/ou SNPs ligados, para uso na seleção assistida em programas de melhoramento.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Identificar um isolado de *P. pachyrhizi* capaz de diferenciar os acessos PI 594756 resistente da PI 594891 suscetível ao fungo, progenitores da população de mapeamento utilizada neste estudo;
- b) Desenvolver populações segregantes F_2 e $F_{2:3}$ derivadas do cruzamento dos acessos PI 594756 x PI 594891.
- c) Avaliar qualitativamente as populações F_2 e $F_{2:3}$ e quantitativamente a população F_2 segregante, quanto a sua reação ao isolado (LPF 2B07) e a população de *P. pachyrhizi* da Embrapa-Soja, respectivamente;
- d) Genotipar as populações segregantes através da análise de Target GBS, sondas de hidrólise, SSR e sondas Taqman;
- e) Combinar os dados genotípicos e fenotípicos das populações F_2 e $F_{2:3}$, respectivamente, para o mapeamento do loco de resistência à FAS através de dois métodos simultaneamente:
 - Investigação de ligação a locos previamente associados à resistência a FAS.
 - Análise de bulks segregantes

REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 4th Edition. New York: Academic Press, 1997.

AKAMATSU, H.; YAMANAKA, N.; YAMAOKA, Y.; Soares, R.M.; MOREL, W.; IVANONICH, A.J.G.; BOGADO, A.N.; KATO, M.; YORINORI, J.T.; SUENAGA, K. Pathogenic diversity of soybean rust in Argentina, Brazil, and Paraguay. **Journal of General Plant Pathology**, v. 79, p. 28-40, 2013.

ALMEIDA, D. B.; MOREIRA, H. L. M.; COSTA, M. A. P.; VAZ, B. S.; MOREIRA, C. G. A.; OLIVEIRA, P. A.; SILVA, J. C.; TAVARES, R. A.; BASSINI, L. N. Loci de Caracteres Quantitativos (QTL) em Peixes. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR**, v.12, n.2, p. 175-186, 2009.

ALMEIDA, A. M. R.; FERREIRA, L. P.; YORINORI, J. T.; SILVA, J. F. V.; HENNING, A. A.; GODOY, C. V.; COSTAMILAN, L. M.; MEYER, M. C. Doenças de soja. In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4 ed. São Paulo: Ceres, 2005. p. 569-588.

BATISTA, C. E. A. **Mapeamento de genes associados à resistência da soja a ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*)**. 2008. 56p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

BEARZOTI, E. Mapeamento de QTL. In: PINHEIRO, J.B.; CARNEIRO, I.F (Ed.). **Análise de QTL no melhoramento de plantas**. Goiânia: FUNAPE, 2000. p.63-223.
BONDE, M. R.; MELCHING, J. S.; BROMFIELD, K. R. Histology of the susceptible-pathogen relationship between Glycine max and *Phakopsora pachyrhizi* the cause of soybean rust. **Phytopathology**, v. 66, p. 1290-1294, 1976.

BONDE, M. R.; NESTER, S. E.; AUSTIN, C. N.; STONE, C. L.; FREDERICK, R. D.; HARTMAN, G. L.; MILES, M. R. Evaluation of virulence of *Phakopsora pachyrhizi* and *P. meibomia* isolates. **Plant Disease**, v. 90, n.6, p.708-716, 2006.

BOOPATHI, N. M. Need for Fine Mapping or High-Resolution Mapping. In: BOOPATHI, N. M. **Genetic mapping an marker assisted selection: Basics, practice and benefits**. India: Springer, 2013. p. 165-172.

BORÉM, A.; FRITSCHÉ-NETO, R. (Ed). **Biotecnologia aplicada ao melhoramento de plantas**. Viçosa, MG: Produção Independente, 2013. 335 p.

BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. Marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; MIRANDA, G. V (Ed.). **Melhoramento de plantas**. 5. ed. Viçosa: UFV, 2009. p. 434–458.

BOSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal Human Genetics**, v. 32, n. 3, p. 314-331, 1980.

BROMFIELD, K. R. **Soybean rust**. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1984. 65 p.

BROMFIELD, K. R.; HARTWIG, E. E. Resistance to soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) and mode of inheritance. **Crop Science**, v. 20, n. 2, p. 254-555, 1980.

BURANELLO, R. M. **Sistema privado de financiamento do agronegócio**. São Paulo: Quartier Latin do Brasil, 2011. 728 p.

CAIXETA, E. T.; FERRÃO, L. F. V.; MACIEL-ZAMBOLIM, E. Marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; FRITSCHÉ-NETO, R. **Biotechnologia aplicada ao melhoramento de plantas**: Viçosa, MG: Suprema, 2013. p. 336.

CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B. de.; BRITO, G. G. de.; SAKIYAMA, N. S. Tipos de Marcadores Moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (Ed.). **Marcadores moleculares**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2016. p. 9–94.

CAMARGO, P. O. **Estudo da herança de caracteres quali-quantitativos e mapeamento genético de alelos resistentes à ferrugem asiática da soja presentes nas PI561356 e PI594754**. 2010. 80p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

CARNEIRO, M. S.; VIEIRA, M. L. C. Mapas genéticos em plantas. **Bragantia**, v. 61, n. 2, p. 89-100, 2002.

CASTANHO, F. M. **Caracterização estrutural e polimorfismo de genes candidatos à efetores de *Phakopsora pachyrhizi***. 2017. 68p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual do Norte do Paraná, Campus Luiz Meneghel, Bandeirantes-PR, 2017.

CATELLI, L.L. **Resistência da soja à ferrugem asiática e ao oídio: herança de caracteres quali-quantitativos e mapeamento genético**. 2009. 95p. Tese

(Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal, Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, Jaboticabal-SP, 2009.

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 *Rpp1* from soybean PI 594538A conferring RB lesion-type resistance to soybean rust. **Crop Science**, v. 49, p. 783-790, 2009.

CHILDS, S. P.; BUCK, J. W.; LI, Z. Breeding soybeans with resistance to soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*). **Plant Breeding**, v. 137, n. 3, p. 250–41, 2018.

CHILDS, S. P.; KING, Z. R.; WALKER, D. R.; HARRIS, D. K.; PEDLEY, K. F.; BUCK, J. W.; BOERMA, H. R.; LI, Z. Discovery of a seventh Rpp soybean rust resistance locus in soybean accession PI 605823. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 131, p. 27–41, 2017.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento de safra brasileira de grãos, v.5. Safra 2017/18, n.10 – Décimo levantamento. 2018. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>> Acesso em: 12 jul. 2018.

CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM. **Cartilha – palestra sobre ferrugem asiática da soja**. 2006. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/56144/1/ID-26146.pdf>>. Acesso em: 20 jul. 2018.

CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM. **Parceria público privada no combate à ferrugem asiática da soja**. 2017. Disponível em: <<http://www.consorcioantiferrugem.net/portal/>>. Acesso em: 30 jul. 2018.

CREGAN, P. B.; JARVIK, T.; BUSH, A. L.; SHOEMAKER, R. C.; LARK, K. G.; KAHLER, A. L.; KAYA, N.; VANTOAI, T. T.; LOHNES, D. G.; CHUNG, L.; SPECHT, J. E. An integrated genetic linkage map of the soybean genome. **Crop Science**, Madison, v. 39, n. 5, p. 1464-1490, 1999.

DA ROSA, C. R. E. **Identificação de marcadores SNP (Single Nucleotide Polymorphism) associados ao gene de resistência Rpp4 da soja (Glycine max L. Merr.) a ferrugem (Phakopsora pachyrhizi Sydow)**. 2015. 89 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós Graduação em Agronomia, Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

DA SILVA, D. C. G. **Mapeamento de genes de resistência da soja à ferrugem asiática e análise transcricional na interação patógeno-hospedeiro**. 2008. 167p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Campus de Jaboticabal, 2008.

DA SILVA, D. C. G.; YAMANAKA, N.; BROGIN, R. L.; ARIAS, C. A. A.; NEPOMUCENO, A. L.; DI MAURO, A. O.; PEREIRA, S. S.; NOGUEIRA, L. M.; PASSIANOTTO, A. L. L.; ABDELNOOR, R. V. Molecular mapping of two loci that confer resistance to Asian rust in soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, V. 11, p. 57-63, 2008.

DE WIT, P. J. G. How plants recognize pathogens and defend themselves. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.64, n. 21, p. 2726-2732, 2007.

EDWARDS, D.; FORSTER, J. W.; COGAN, N. O. I.; BATLEY, J. ; CHAGNÉ, D. Single Nucleotide Polymorphism Discovery. In: ORAGUZIE, N. C.; RIKKERINK, E. H. A.; GARDINER, S. E.; de SILVA, H. N. **Association mapping in plants**. Springer New York, 2008. p. 53-76.

ELSHIRE, R. J.; GLAUBITZ, J. C.; SUN, Q.; POLAND, J. A.; KAWAMOTO, K.; BUCKLER, E. S.; MITCHELL, S. E. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. **Plos one**. v. 6, n. 5, p. 1-10, 2011.

FERREIRA, E. M.; GRATTAPAGLIA, D. Mapeamento físico e clonagem posicional em plantas. In: BOREM, A. **Marcadores moleculares**. (Ed.). Viçosa: UFV, 2006. 231-272.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA, CENARGEM, 1998.

FERREIRA, D. F. **Eficiência de métodos de mapeamento de locos quantitativos (QTLs) e da seleção assistida por marcadores moleculares**. 1995. 209 p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1995.

FLOR, H. H. Current status of gene-a-gene concept. **Annual Review of Phytopathology**, v. 9, n. 1, p. 275-296, 1971.

FURTADO, G. Q. **Ferrugem asiática da soja: métodos de preservação dos urediniósporos e fatores relacionados à infecção do hospedeiro**. 2007. 79 p.

Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

GARCIA, A.; CALVO, É. S.; DE SOUZA KIIHL, R. A.; 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**, v. 117, n. 4, p. 545–553, 2008.

GARCIA, A.; CALVO, É. S.; KIIHL, R. A. D. S.; SOUTO, E. R. D. Evidence of a susceptible allele inverting the dominance of rust resistance in soybean. **Crop Science**, v. 51, p. 32-40, 2011.

GILLI, J.; LUCÍA, A. DE.; GHIONE, C.; HEINZ, R.; BERNARDI, C.; VELLICCE, G. **Mapeo molecular de la resistencia a la roya asiática de la soja em el genotipo PI 594766**. 2013.

GIUSTI, J.; KETTNER, K.; FUCHS-FERRAZ. Influência do sequenciamento de nova geração no futuro da genética da conservação. **Revista RG News**, Brasília, v. 2, n. 2, p. 88-89, 2016.

GODOY, C. V.; SEIXAS, C. D. S.; SOARES, R. M.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.; MEYER, M. C.; COSTAMILAN, L. M. Asian soybean rust in Brazil: Past, present, and future. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 51, n. 5, p. 407–421, 2016.

GODOY, C. V.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. Riscos e oportunidades: ferrugem da soja. *In*: PICCOLI, G. V.; DALCIN, E.; LOPES, M. A. **Desafios do Cerrado, como sustentar a expansão da produção com produtividade e competitividade**. Mato Grosso: Casa da Árvore, 2016. p. 117-147.

GOELLNER, K.; LOEHRER, M.; LANGENBACH, C.; CONRATH, U.; KOCH, E.; SCHAFFRATH, U. *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust: Pathogen profile. **Molecular Plant Pathology**, v. 11, n. 2, p. 169–177, 2010.

GRIFFITHS, A. J. F.; WESSLER, S. R.; LEWONTIN, R. C.; CARROLL, S. B. **Introdução à genética**. 9. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 712 p.

HALDANE, J.B.S. The combination of linkage values, and the calculation of distance between the loci of linked factors. **Journal of Genetics**, v. 8, p. 299-309, 1919.

HARRIS, D. K.; KENDRICK, M. D.; KING, Z. R.; PEDLEY, K. F.; WALKER, D. R.; CREGAN, P. B.; BUCK, J. W.; PHILLIPS, D. V.; LI, Z.; BOERMA, H. R. Identification of Unique Genetic Sources of Soybean Rust Resistance from the USDA Soybean Germplasm Collection. **Crop Science**, v. 55, n. 5, p. 2161-2176, 2015.

HARTMAN, G. L.; SIKORA, E. J.; RUPE, J. C. Rust. In: HARTMAN, G. L.; RUPE, J. C.; SIKORA, E. J.; DOMIER, L. L.; DAVIS, J. A.; STEFFEY, K. L. (ED.). **Compendium of soybean diseases and pests**. 5. ed. St. Paul, Minnesota: APS Press, 2015. p. 56-58.

HARTMAN, G. L.; MILES, M. R.; FREDERICK, R. D. Symposium Breeding for resistance to soybean rust. **Plant Disease**, v. 89, n. 6, p. 664-666, 2005.

HARTWIG, E. E.; BROMFIELD, K. R. Relationships among three genes conferring specific resistance to rust in soybeans. **Crop Science**, v. 23, n. 2, p. 237-239, 1983.

HARTWIG, E. E. Identification of a fourth major genes conferring resistance to soybean rust. **Crop Science**, v. 26, p. 1135-1136, 1986.

HOSSAIN, M. M.; AKAMATSU, H.; MORISHITA, M.; MORI, T.; YAMAOKA, Y.; SUENAGA, K.; YAMANAKA, N. Molecular mapping of Asian soybean rust resistance in soybean landraces PI 594767A, PI 587905 e PI 416764. **Plant Pathology**, v. 64, p. 147-156, 2014.

HYTEN, D. L.; HARTMAN, G. L.; NELSON, R. L.; FREDERICK, R. D.; CONCIBIDO, V. C.; NARVEL, J. M.; CREGAN, P. B. Map location of the Rpp1 locus that confers resistance to soybean rust in soybean. **Crop Science**, v. 47, n. 2, p. 837-838, 2007.

HYTEN, D. L.; SMITH, J. R.; FREDERICK, R. D.; TUCKER, M. L.; SONG, Q.; CREGAN, P. B. Bulk segregant analysis using the GoldenGate assay to locate the Rpp3 locus that confers resistance to soybean rust in soybean. **Crop Science**, v. 49, p. 265-271, 2009.

HWANG, T.Y.; HWANG, T.Y.; SAYAMA, T.; TAKAHASHI, M.; TAKADA, Y.; NAKAMOTO, Y. High-density integrated linkage map based on SSR markers in soybean. **DNA Research**, Oxford, v.16, p. 213–225, 2009.

JIRCAS, Japan International research center for agriculture science. **Laboratory manual for studies on soybean rust** resistance. 2017. Disponível em : <http://www.jircas.affrc.go.jp/English/manual/soybean_rust/soybean_rust.html>. Acesso em: 22 ago. 2018.

JONES, J. D.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v.444, n. 7117, p.323-329, Nov. 2006.

KENDRICK, M. D.; HARRIS, D. K.; HA, B. K.; HYTEN, D. L.; CREGAN, P. B.; FREDERICK, R. D.; BOERMA, H. R.; PEDLEY, K. F. Identification of a second Asian soybean rust resistance gene in Hyuuga soybean. **Phytopathology**, v. 101, n. 5, p. 535-543, 2011.

KEOGH, R. C.; DEVERALL, B. J.; MCLEOD, S. Comparison of histological and physiological responses to *Phakopsora pachyrhizi* in resistant and susceptible soybean. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 74, n. 2, p. 329-333, 1980.

KIM, K. S.; UNFRIED, J. R.; HYTEN, D. L.; FREDERICK, R. D.; HARTMAN, G. L.; NELSON, R. L.; DIERS, B. W. Molecular mapping of soybean rust resistance in soybean accession PI 561356 e SNP haplotype analysis of the *Rpp1* region in diverse germplasm. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 125, p.1339-1352, 2012.

KING, Z. R.; HARRIS, D. K.; PEDLEY, K. F.; SONG, Q.; WANG, D.; WEN, Z.; BOERMA, H. R. A novel *Phakopsora pachyrhizi* resistance allele (*Rpp*) contributed by PI567068A. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 129, n. 3, p. 517-534, 2015.

KING, Z. R.; CHILDS, S. P.; HARRIS, D. E.; PEDLEY, K. F.; BUCK, J. W.; BOERMA, H. R.; LI, Z. A new soybean rust resistance allele from PI 423972 at the *Rpp4* locus. **Molecular Breeding**, v. 37, n. 5, p. 62, 2017.

KOCH, E.; EBRAHIM, N. F.; HOPPE, H. H. Light and electron microscopic studies on the development of soybean rust (*Phakospora pachyrhizi*) in susceptible soybean leaves. **Phytopathologische Zeitschrift - Journal of Phytopathology**, v. 106, n. 4, p. 302-320, 1983.

KOSAMBI, D.D. The estimation of map distance from recombination values. **Annuaire of Eugenetics**, v. 12, p. 172-175, 1944.

LEÃO, D. P. **Sequenciamento de nova geração: Explorando aplicações clínicas de dados de targeted gene panel e whole exome sequencing**. 2017. 66p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

LEMONS, N. G.; DE E BRACCINI, A. L.; ABDELNOOR, R. V.; DE OLIVEIRA, M. C. N.; SUENAGA, K.; YAMANAKA, N. Characterization of genes *Rpp2*, *Rpp4*, and *Rpp5*

for resistance to soybean rust. **Euphytica**, v. 182, n. 1, p. 53–64, 2011.

LEE, Y. G.; JEONG, N.; KIM, J. H.; LEE, K.; KIM, K. H.; PIRANI, A.; HA, B. K.; KANG, S. T.; PARK, B. S.; MOON, J. K.; KIM, N.; JEONG, S. C. Development, validation and genetic analysis of a large soybean SNP genotyping array. **Plant Journal**, v. 81, n. 4, p. 625-636, 2015.

LEVY, C. Epidemiology and Chemical Control of Soybean Rust in Southern Africa. **Plant Disease**, v. 89, n. 6, p. 669–674, 2005.

LI, S.; SMITH, J. R.; RAY, J. D.; FREDERICK, R. D. Identification of a new soybean rust resistance gene in PI567102B. **Theoretical Applied Genetics**, v.125, p.133-142, 2012.

LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetic**, Chicago, v. 44, p. 398-401, 1989.

LIU, M.; LI, S.; SWAMINATHAN, S.; SAHU, B. B.; LEANDRO, L. F.; CARDINAL, A. J.; CIANZIO, S. R. Identification of a soybean rust resistance gene in PI 567104B. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 129, n. 5, p. 863-877, 2016.

MCLEAN, R. J.; BYTH, D. E. Inheritance of Resistance To Rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Soybeans. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 31, n. 5, p. 951–956, 1980.

MEYER, J. D. F.; SILVA, D. C. G.; YANG, C.; PEDLEY, K. F.; ZHANG, C.; VAN de MORTEL, M.; HILL, J. H.; SHOEMAKER, R. C.; ABDELNOOR, R. V.; WHITHAM, S. A.; GRAHAM, M. A. Identification and analyses of candidate genes for Rpp4-mediated resistance to Asian soybean rust in soybean. **Plant Physiology**, v. 150, n.1, p. 295–307, 2009.

MILES, M. R.; BONDE, M. R.; NESTER, S. E.; BERNER, D. K.; FREDERICK, R. D.; HARTMAN, G. L. Characterizing resistance to *Phakopsora pachyrhizi* in soybean. **Plant Disease**, v. 95, n. 5, p. 577-581, 2011.

MILES, M. R.; MOREL, W.; RAY, J. D.; SMITH, J. R.; FREDERICK, R. D.; HARTMAN, G. L. Adult plant evaluation of soybean accessions for resistance to *Phakopsora pachyrhizi* in the field and greenhouse in Paraguay. **Plant Disease**, v. 92, p. 96-105, 2008.

MISSÃO, M. R. Soja: origem, classificação, utilização e uma visão abrangente do mercado. **Revista de Ciências Empresariais**, v. 3, p. 7-15, 2016.

MONTEROS, M. J.; ALI, M.; MISSAOUI, D. V.; PHILIPS, D. R.; WALKER.; BOERMA, H. R. Mapping and confirmation of the 'Hyyuga' red-brown lesion resistance gene for Asian soybean rust. **Crop Science**, v. 47, n. 2, p. 829–836, 2007.

ONO, Y.; BURITICÁ, P.; HENNEN, J. F. Delimitation of *Phakopsora*, *Physopella* and *Cerotelium* and their species on Leguminosae. **Mycological Research**, v. 96, n. 10, p. 825–850, 1992.

PABINGER, S.; DANDER, A.; FISCHER, M.; SNAJDER, R.; SPERK, M.; EFREMOVA, M.; KRABICHLER, B.; SPEICHER, M. R.; ZSCHOCKE, J.; TRAJANOSKI, Z. A survey of tools for variant analysis of next-generation genome sequencing data. **Briefings in Bioinformatics**. v.15, n. 2, p.256-278, Mar. 2014.

PAPACHRISTOU, C.; LIN, S. A comparison of methods for intermediate fine mapping. **Genetic Epidemiology**, v. 30, n. 8, p. 677-689, 2006.

PEDERSEN, W. L.; LEATH, S. Resistance To Maintain Residual Effects *. **Review Literature And Arts Of The Americas**, v. 26, p. 369–378, 1988.

PEREIRA, M. G.; RAMOS, H. C. C.; PEREIRA, T. N. S.; BATISTA, F. R. da C. Marcadores moleculares no pré-melhoramento. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (Ed.). **Marcadores moleculares**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2016. p. 94–128.

PHAM, T. a; MILES, M. R.; FREDERICK, R. D.; HILL, C. B.; HARTMAN, G. L. Differential responses of resistant soybean entries to isolates of *Phakopsora pachyrhizi*. **Plant Disease**, v. 93, n. 3, p. 224–228, 2009.

PHAM, ANH-TUNG.; McNALLY, K.; ABDEL-HALLEM, H.; BOERMA, H. R.; LI, Z. Fine mapping and identification of candidate genes controlling the resistance to southern root-knot nematode in PI 96354. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 126, n. 7, p. 1825-1838, 2013.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B. P. Ligação, permuta genética e pleiotropia. In: RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B. P. **Genética na Agropecuária**. 4.ed.Lavras: UFLA, 2008. p. 179-206.

RAY, J. D.; MOREL, W.; SMITH, J. R.; FREDERICK, R. D.; MILES, M. R. Genetics and mapping of adult plant rust resistance in soybean PI 587886 e PI 587880A. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 119, n. 2, p. 271-280, 2009.

ROCHA, G. A. DE FREITAS. **Validação de sistema de target GBS para sanidade na cultura da soja [*Glycine max* (L.) Merr.]**. 2017. 19 p. (Pós-doutorado) – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Londrina, 2017.

ROCHA, C. M. L. .; VELLICCE, G. R. .; GARCÍA, M. G. .; PARDO, E. M. .; RACEDO, J. .; PERERA, M. F. .; DE LUCÍA, A. .; GILLI, J. .; BOGADO, N. .; BONNECARRÈRE, V. .; GERMAN, S. .; MARCELINO, F. .; LEDESMA, F. .; REZNIKOV, S. .; PLOPER, L. D. .; WELIN, B. .; CASTAGNARO, A. P. Use of AFLP markers to estimate molecular diversity of *Phakopsora pachyrhizi*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 6, p. 439–444, 2015.

SANTOS, J. V. M. **Mapeamento de QTLs de características sob influência da ferrugem asiática da soja**. 2010. 107p. Dissertação (Mestrado) – Programa de pós graduação em Genética e Biologia molecular, Universidade Estadual de Londrina.

SILVA, P. I. T. **Descoberta e validação de marcadores SNPs por sequenciamento de alta performance do genoma estrutural e por genotipagem por sequenciamento (GBS) de arroz de sequeiro (*Oryza sativa* spp. Japônica)**. 2012. 153 p. Dissertação (Mestrado) – Curso de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

SCHMUTZ, J.; CANNON, S. B.; SCHLUETER, J.; MA, J.; MITROS, T.; NELSON, W.; HYTEN, D. L.; SONG, Q.; THELEN, J. J.; CHENG, J.; XU, D.; HELLSTEN, U.; MAY, G. D.; YU, Y.; SAKURAI, T.; UMEZAWA, T.; BHATTACHARYYA, M. K.; SANDHU, D.; VALLIYODAN, B.; LINDQUIST, E.; PETO, M.; GRANT, D.; SHU, S.; GOODSTEIN, D.; BARRY, K.; FUTRELL-GRIGGS, M.; ABERNATHY, B.; DU, J.; TIAN, Z.; ZHU, L.; GILL, N.; JOSHI, T.; LIBAULT, M.; SETHURAMAN, A.; ZHANG, X. C.; SHINOZAKI, K.; NGUYEN, H. T.; WING, R. A.; CREGAN, P.; SPECHT, J.; GRIMWOOD, J.; ROKHSAR, D.; STACEY, G.; SHOEMAKER, R. C.; JACKSON, S. A. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. **Nature**, v. 463, n. 7278, p. 178–183, 2010.

SCHUSTER, I. Mapeamento Genético. *In*: SILVA, F.; BORÉM, A.; SEDIYAMA. T.; LUDKE, W. **Melhoramento da Soja**. (Ed.). Viçosa: UFV, 2017. p. 322-347.

SCHUSTER, I.; CRUZ, C. D. **Estatística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados**. Viçosa MG: UFV, 2004. 568 p.

SHENDURE, J.; BALASUBRAMANIAN, S.; CHURCH, G. M.; GILBERT, W.; ROGERS, J.; SCHLOSS, J. A.; WATERSTON, R. H. DNA sequencing at 40: Past, present and Future. **Nature**, v. 550, n. 7676, p. 345-353, 2017.

SONG, Q.; HYTEN, D. L.; JIA, G.; QUIGLEY, C.V.; FICKUS, E. W.; NELSON, R. L.; CREGAN, P. B. Development and avaluation of SoySNP50K, a high-density genotyping array for soybean. **Plos one**. v. 8, n. 1, p.1-12, 2013.

SONG, Q.; JIA, G.; HYTEN, D. L.; JENKINS, J.; HWANG, E. Y.; SCHROEDER, S. G.; OSORNO, J. M.; SCHMUTZ, J.; JACKSON, S. A.; McCLEAN, P. E.; CREGAN, P. B. SNP Assay development for linkage map construction, anchoring whole-genome sequence, and other genetic and genomic applications in common bean. **Genes, Genomes, Genetics**, v. 5, n.11, p. 2285-2290, 2015.

SONG, Q. J.; MAREK, L. F.; SHOEMAKER, R. C.; LARK, K. G.; CONCIBIDO, V. C.; DELANNAY, X.; SPECHT, J. E.; CREGAN, P. B. A new integrated genetic linkage map of the soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 109, n. 1, p. 122-128, 2004.

STERGIOPOULOS, I.; DE WIT, P. J. G. M. Fungal effector proteins. **Annual Review Phytopathology**, v. 47, p. 233–263, 2009.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acid Research**, v. 17, n. 16, p. 6463-6471, 1989.

TIWARY, B. K. Next-Generation Sequencing and Assembly of Plant Genomes. In: BARH, D.; KHAN, M. S.; DAVIES, E. (Ed.). **PlantOmics: The Omics of Plant Science**, New Delhi: Springer, 2015. p. 53-64.

TURCHETTO-ZOLET, A. C.; TURCHETTO, C.; GUZMAN, F.; SILVA-ARIAS, G. A.; SPERB-LUDWING, F.; VETO, N. M. Polimorfismo de nucleotídeo único (SNP): metodologias de identificação, análise e aplicações. In: TURCHETTO-ZOLET, A. C.; TURCHETTO, C.; ZANELLA, C. M.; PASSAIA, G. (Ed.). **Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologia e Aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017. p. 132-171.

TWIZEYIMANA, M.; HARTMAN, G. L. Pathogenic variation of *Phakopsora pachyrhizi* isolates on soybean in the United States from 2006 to 2009. **Plant Disease**, v. 96, p. 75-81, 2012.

USDA. **Commodity intelligence report**. 2017. Disponível em <<http://www.ipad.fas.usda.gov/highlights/2017/09/Brazil/index.htm>>. Acesso em: 07 Jul. 2018.

USDA. **World agricultural production**. 2018. Disponível em <<http://www.ipad.fas.usda.gov/cropexplorer/>>. Acesso em: 07Jul. 2018.

WALKER, D. R.; BOERMA, H. R.; PHILIPS, D. V.; SCHNEIDER, R. W.; BUCKLEY, J.B.; SHIPE, E. R.; NELSON, R. L. Evaluation of USDA soybean germplasm accessions for resistance to soybean rust in the southern United States. **Crop Science**, v. 51, n. 2, p. 678– 693, 2011.

WALKER, D. R.; HARRIS, D. K.; KING, Z. R.; Li, Z.; PHILLIPS, D. V.; BUCK, J. W.; BOERMA, H. R. Reactions of soybean germplasm accession seedlings to soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) isolates from Georgia. **Crop Science**, v. 54, p.1433–1447, 2014.

YAMANAKA, N.; HOSSAIN, M. M.; YAMAOKA, Y. Molecular mapping of Asian soybean rust resistance in Chinese and Japanese soybean lines, Xiao Jing Huang, Himeshirazu, and Iyodaizu B. **Euphytica**, v. 205, n. 2, p. 311-324, 2015.

YAMANAKA, N.; LEMOS, N. G.; AKAMATSU, H.; YAMAOKA, Y.; SILVA, D. C. G.; PASSIANOTTO, A. L. L.; ABDELNOOR, R. V.; SOARES, R. M.; SUENAGA, K. Soybean breeding materials useful for resistance to soybean rust in Brazil. **Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ**, v. 45, n. 4, p. 385-395, 2011.

YAMANAKA, N.; LEMOS, N. G.; UNO, M.; AKAMATSU, H.; YAMAOKA, Y.; ABDELNOOR, R. V.; BRACCINI, A. L.; SUENAGA, K. Resistance to Asian soybean rust in soybean lines with the pyramided three Rpp genes. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 75–82, 2013.

YAMANAKA, N.; MORISHITA, M.; MORI, T.; MURAKI, Y.; HASEGAWA, M.; HOSSAIN, M. M.; KATO, M. The locus for resistance to Asian soybean rust in PI 587855. **Plant Breeding**, v. 135, n. 5, p. 621-626, 2016.

YAMANAKA, N.; YAMAOKA, Y.; KATO, M.; LEMOS, N. G.; PASSIANOTTO, A. L. de L.; DOS 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**, v. 35, n. 3, p. 153-162, 2010.

YORINORI, J. T.; NUNES, J. J.; LAZZAROTTO, J. J. Ferrugem asiática da soja no Brasil: evolução, importância econômica e controle. In: **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Documentos 247, Embrapa Soja, 2004, p. 36.

YORINORI, J. T.; PAIVA, W. M.; FREDERICK, R. D.; COSTAMILAN, L. M.; BERTAGNOLLI, P. F.; HARTMAN, G. L.; GODOY, C. V.; NUNES, J. Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. **Plant Disease**, v. 89, n. 6, p. 675-677, 2005.

ZAMBOLIN, I. **Manejo integrado da ferrugem asiática da soja**. In: ZAMBOLIN, L. (Ed.). Ferrugem asiática da soja. Viçosa MG: Suprema, 2006. 139 p.

ZHOU, Z.; JIANG, Y.; WANG, Z.; GOU, Z.; LYU, J.; LI, W.; YU, Y.; SHU, L.; ZHAO, Y.; MA, Y.; FANG, C.; SHEN, Y.; LIU, T.; LI, C.; LI, Q.; WU, M.; WANG, M.; WU, Y.; DONG, Y.; WAN, W.; WANG, X.; DING, Z.; GAO, Y.; XIANG, H.; ZHU, B.; LEE, S. H.; WANG, W.; TIAN, Z. Resequencing 302 wild and cultivated accessions identifies genes related to domestication and improvement in soybean. **Nature Biotechnology**, v. 33, p.408-414, 2015.

MANUSCRITO

Manuscrito a ser submetido à publicação na revista Theoretical and Applied Genetic

Mapeamento genético de gene de resistência à ferrugem asiática da soja na PI 594756

Luciane G. Barros · Francismar C. Marcelino-Guimarães

L. G. Barros

EMBRAPA-SOJA, Laboratório de Biotecnologia Vegetal,
Flávio Ferreira dos Santos, 210, Residencial José Bastos de Almeida, Londrina, Paraná
86041828, Brasil.

F. C. Marcelino-Guimarães

EMBRAPA-SOJA, Departamento Genética Molecular de Plantas,
Rod. Carlos Strass, Distrito de Warta, Londrina, Paraná 86001-970, Brasil
Tel: +55 (43) 3371-6265; e-mail: francismar.marcelino@embrapa.br.

RESUMO

A ferrugem asiática da soja (FAS), causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* Syd. e P. Syd, é a principal doença da cultura da soja no Brasil, afetando significativamente a produtividade da cultura. Dentre as principais estratégias de controle à FAS, destaca-se o desenvolvimento de cultivares resistentes. Até o momento, pelo menos 7 loci contendo genes de resistência raça-específicos já foram identificados e mapeados: *Rpp1*, *Rpp2*, *Rpp3*, *Rpp4*, *Rpp5*, *Rpp6* e *Rpp7*. Entretanto, nenhum deles oferece resistência durável e ampla a todos os isolados do fungo. Deste modo, o presente trabalho objetivou o mapeamento genético do gene de resistência à FAS presente na PI 594756 utilizando populações F₂ e F_{2:3} oriundas de seu cruzamento com a PI 594891 (suscetível), quando inoculada com o isolado LPF2B07, assim como uma amostra populacional do patógeno obtido na safra 2016/2017, ambos armazenados na coleção da Embrapa-Soja. Com base na análise de virulência da PI 594756 em comparação com outros acessos de soja já mapeados e testados com 11 diferentes isolados, foi possível concluir que o alelo presente na PI é diferente dos alelos *Rpp1* e *Rpp?*. O mapeamento genético utilizando marcas previamente identificadas a partir dos genes *Rpp* já mapeados, revelou a co-segregação do gene com as marcas ligadas ao gene *Rpp1*. Na análise de BSA, utilizando os SNPs do soySNP6K houve confirmação dos resultados, mapeando o gene no cromossomo 18. Por fim, a genotipagem da F₂ (161 indivíduos), a partir de 14 SNPs obtidos via sequenciamento de amplicons e quatro SSR, posicionou o gene *Rpp* (PI 594756) na região contendo o gene *Rpp1*, entre os marcadores Sat_064 e Stta520, num intervalo de (90,9 kb) com LOD score 3.

Palavra-chave: Ferrugem asiática da soja, genes de resistência, marcadores moleculares, mapeamento genético.

ABSTRACT

Asian soybean rust (ASR), caused by the fungus *Phakopsora pachyrhizi* Syd. and P. Syd is the most important disease for the soybean crop in Brazil, significantly affecting crop productivity. Among the main control strategies for ASR, the development of resistant cultivars stands out. So far, seven race-specific resistance genes have already been identified and mapped: *Rpp1*, *Rpp2*, *Rpp3*, *Rpp4*, *Rpp5*, *Rpp6* e *Rpp7*. However, none of them offers durable and broad resistance against all the isolates of the fungus. Therefore, the present study aimed to conduct the genetic mapping of the resistance gene to ASR present in the PI 594756 using F₂ and F_{2:3} populations derived from their crossing with the PI 594891 (susceptible), when inoculated with the isolate LPF2B07, as well as a pathogen sample population obtained in the crop season in the year 2016/2017, both storage in the Embrapa-Soja Collection. Based on the virulence analysis of PI 594756 compared to other soybean accessions already mapped, and tested with 11 different isolates, it was possible to conclude that the allele present in the PI is different from the alleles *Rpp1* and *Rpp?*. The genetic mapping using markers previously identified from the *Rpp* genes already mapped revealed the co-segregation of the gene with markers linked to the *Rpp1* gene. In the BSA analysis, using SNPs from the soySNP6K, the results were confirmed, mapping the gene on chromosome 18. Finally, F₂ genotyping and phenotyping (161 individuals) using 14 SNPs via amplicon sequencing and four SSRs, positioned the *Rpp* gene (PI 594756) in the region containing the *Rpp1*, between the markers Sat_064 and Stta520 in a region spanning of 90.9 kb, and with a LOD score 3.

Key word: Asian soybean rust, resistance genes, molecular markers, genetic mapping.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a soja representa uma das principais culturas de importância econômica para o Brasil, sendo que o país figura como o segundo maior produtor mundial dessa cultura (USDA, 2018). No entanto, alguns agentes bióticos e abióticos têm afetado negativamente a produtividade no decorrer das últimas safras no país. Dentre os fatores bióticos, a ferrugem asiática da soja (FAS), doença causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, é o principal fator (DUHATSCHEK; SANTOS; FARIA, 2018). A doença foi detectada no país em 2001, sendo inicialmente instalada no Sul do Brasil, no estado do Paraná (LEVY, 2005; YORINORI et al., 2005). Desde então, se espalhou para as principais áreas produtoras, chegando a gerar perdas de até 90% de produtividade em campos intensamente infectados (GODOY et al., 2016).

Algumas medidas de manejo podem ser adotadas como prática direta no combate a ferrugem, dentre essas medidas destacam-se: o controle químico (aplicação de fungicida), a semeadura precoce, visando à antecipação do ciclo da cultura, a utilização de cultivares precoces e o controle cultural (vazio sanitário), visando à eliminação de plantas de soja e/ou plantas voluntárias na entressafra (CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM, 2017). Todavia, devido a grande variabilidade genética do patógeno, nenhuma dessas medidas utilizadas de forma isolada é capaz de garantir o manejo da doença de forma sustentável. Desse modo, alternativamente, os Programas de Melhoramento Genético também têm focado no desenvolvimento de cultivares resistentes ao fungo, através da introgressão de genes *Rpp* (*Resistance to Phakopsora pachyrhizi*) em materiais elite de soja.

Atualmente, cultivares resistentes estão disponíveis no mercado brasileiro, sendo desenvolvidas principalmente pelas empresas de melhoramento Embrapa Soja e Tropical Melhoramento e Genética (TMG). Embora nenhuma cultivar apresentando ampla resistência tenha sido relatada, linhas avançadas portando até três genes *Rpp* piramidados em um único acesso: *Rpp2*, *Rpp4* e *Rpp5*, têm sido descritas como conferindo maiores níveis de resistência ao fungo *P. pachyrhizi* (LEMOS et al., 2011). Nesse sentido, se faz necessário a contínua busca por novas fontes de resistência e seu mapeamento, para fornecimento de novos locus e/ou alelos aos Programas de Melhoramento.

Até o momento, sete genes *Rpp* foram identificados e mapeados no genoma da soja: *Rpp1*(PI200492), *Rpp2*(PI230970), *Rpp3*(PI462312), *Rpp4*(PI459025B), *Rpp5*(PI200456, PI200526, PI200487), *Rpp6*(PI567102B) e *Rpp7*(PI605823), descritos por (BROMFIELD; HARTWING, 1980; MCLEAN; BYTH, 1980; HARTWING; BROMFIELD, 1983; HARTWING, 1986; GARCIA et al., 2008; LI et al., 2012; CHILDS et al., 2018). No entanto, estes genes não são efetivos contra todas as populações do patógeno.

A variação natural para a resistência a doenças tem sido explorada por meio da seleção em larga escala de fontes de resistência em bancos de germoplasma, associado com o emprego de marcadores moleculares e/ou a clonagem posicional. No caso de *P. pachyrhizi*, uma análise de acessos de soja, compondo o banco de germoplasma do governo americano (USDA) com 4 diferentes isolados do fungo, identificou uma lista de pelo menos 805 materiais potencialmente portadores de genes *Rpp*. Contudo, nenhuma fonte com amplo espectro de resistência, para todos os isolados de *P. pachyrhizi* testados, foi identificada (MILES et al., 2008). Ainda, muitas destas fontes não foram caracterizadas quanto aos possíveis genes que possuem, e tampouco foram avaliadas com isolados presentes nos campos no Brasil. Alguns desses acessos, potencialmente portadores de genes de resistência, são comumente utilizados como parentais para cruzamentos em programas de melhoramento genético no Brasil, mesmo sem ainda terem sido caracterizados quanto aos possíveis genes *Rpp* que possuem. Dentre estas destaca-se a PI 594756, caracterizada neste trabalho como apresentando uma ampla resistência à diferentes isolados brasileiros e de outros países.

Atualmente novas metodologias de genotipagem em larga escala têm permitido aos melhoristas a rápida identificação de novos genes ou alelos de resistência, assim como a sua introgressão em variedades elite nos Programas de melhoramento via seleção assistida (SAM). Tais metodologias exploram as variações do tipo polimorfismo de base única (SNP). No caso da soja, merecem destaque os chips soySNP50K e soySNP6K, os quais possibilitam a genotipagem em um painel de 50.000 e 6.000 SNPs respectivamente, e contribuíram para a caracterização da variabilidade alélica presente em 19 mil acessos de soja, disponi-

bilizados no banco de dado público “Soybase” (SONG et al. 2013; SONG et al., 2015).

Nesse sentido, este estudo teve como objetivo o mapeamento genético do gene de resistência *Rpp* presente na PI 594756, utilizando uma população F₂ (161 indivíduos) originados do cruzamento entre PI 594756 (resistente) x PI 594891 (suscetível), através da investigação de ligação a locos previamente associados à resistência a FAS, e a análise por BSA utilizando a metodologia soySNP6K.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 DESENVOLVIMENTO DAS POPULAÇÕES SEGREGANTES F₂ E F_{2:3}

Para o desenvolvimento e obtenção de indivíduos F₂ segregantes, foi conduzido o cruzamento entre os acessos PI 594756 (resistente) x PI 594891 (suscetível). A resistência presente na PI 594756 foi reportada pelo Programa de Melhoramento da Embrapa-Soja, e os parentais testados no laboratório de Biotecnologia Vegetal da unidade, com o isolado LPF2B07 e uma população oriunda dos campos experimentais da Embrapa safra 2016/2017.

Para confirmação do sucesso do cruzamento, dois SNPs polimórficos entre os pais, obtidos da plataforma soySNP50K- ss715594488 e ss715632303 - foram testados nas plantas F₁. Nesse caso, tomando-se por base a população F₁ contrastante, uma subsequente triagem foi realizada para obtenção da geração F₂. Uma população de 295 sementes F₂ foram originadas e selecionadas, das quais após serem plantadas, produziram 226 plantas F₂. Posteriormente, as vagens geradas por essas plantas foram debulhadas, e as sementes F_{2:3} obtidas, foram armazenadas em Banco de Germoplasma da Embrapa-Soja, sendo posteriormente desenvolvidas um total de 11 plantas por famílias de apenas 161 famílias F_{2:3} em uma repetição de 3 blocos.

2.2 TESTE DA QUALIDADE DO INÓCULO E MULTIPLICAÇÃO

Um isolado de *P. pachyrhizi* (LPF2B07) oriundo de uma única lesão monouredinial, coletado nos campos experimentais de Passo Fundo-RS na safra 2007, foi selecionado para diferenciar os parentais utilizados no mapeamento. Por serem armazenados em pequena quantidade, esses esporos foram sucessivamente multiplicados em folha destacada do genótipo suscetível COODETEC 219 RR (CD219 RR).

Inicialmente foi estabelecido o teste de germinação do inóculo no laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa. Para isso, foi realizada, uma diluição da solução de inoculação até uma concentração final de 4×10^4 esporos/mL de água destilada, além do inóculo e 0,5 mL de álcool 70% em um tubo de 2mL. Por conseguinte, a solução foi aplicada na câmara de contagem (Neubauer). Para a

determinação da viabilidade dos esporos, esta solução contendo o isolado LPF2B07 foi transferida para uma placa de petri, onde permaneceu durante 24 horas encubadas e envoltas por papel alumínio. Após esse período, foi realizado a contagem de % de esporos germinados viáveis, utilizando a contagem de 100 esporos (DARBEN, 2013).

Após o teste de germinação, foi realizado a multiplicação dos esporos em folhas destacadas. Para isso, as folhas foram inoculadas e armazenadas em câmara de crescimento com temperatura em torno de 23° C, 60% de umidade e 14 horas de fotoperíodo. Seguidos 15 dias, novos esporos foram coletados, sendo parte deles reinoculados em novas folhas, e a outra parte mantida em microtubo de 2mL. Estes foram armazenados em dessecador por 24 horas, visando a desidratação dos esporos e em seguida armazenados em ultrafreezer a -80°C, até o momento da inoculação (CASTANHO, 2017). Por fim, foi realizado o teste do inóculo com as populações de fungo oriundos da coleção de microrganismos da Embrapa na safra 2016/2017 e aplicado aos parentais desse estudo. Visto que sua utilização foi capaz de promover a diferenciação entre eles, tais populações fúngicas foram inoculadas nas famílias F_{2:3}, visando a confirmação da avaliação fenotípica, realizada na população F₂.

2.3 INOCULAÇÃO DAS POPULAÇÕES F₂ E F_{2:3}

Para avaliação fenotípica da população segregante F₂, 295 sementes foram plantadas em casa-de-vegetação da Embrapa-Soja, sob condições controladas de temperatura (20°C a 28°C), em um delineamento inteiramente casualizado, onde duas sementes por vaso foram mantidas. Aos 20 dias após a semeadura, as plantas foram inoculadas com uma solução do isolado LPF2B07 contendo 4x10⁴ esporos/mL, com o auxílio de um pulverizador manual. A inoculação em casa-de-vegetação foi realizada no estágio V₂ de desenvolvimento (segundo trifólio) e ocorreu no final da tarde, fugindo dos horários de maior insolação e temperaturas elevadas, prejudiciais ao desenvolvimento do patógeno. Posteriormente, objetivando a continuidade e o avanço na população F_{2:3}, onze plantas por família de 161 famílias F_{2:3} oriundas de 226 plantas F₂, foram desenvolvidas numa repetição em 3 blocos, inoculadas com a população de fungos

oriundos da Embrapa safra 2016/2017, sob as mesmas condições controladas de temperatura realizadas no plantio da F₂.

2.4 FENOTIPAGEM QUALITATIVA DA F₂ E F_{2:3}

A fenotipagem qualitativa foi iniciada 14 dias após a inoculação. Com as plantas em casa de vegetação, foram avaliadas as reações ao isolado *P. pachyrhizi* (LPF2B07) na população F₂ e posteriormente as reações ao inóculo de uma população de fungos coletado na Embrapa, safra 2016/2017 e testados na população F_{2:3}. Em ambas populações (F₂ e F_{2:3}) cada trifólio foi avaliado a olho nu, onde foram estabelecidas proporções fenotípicas entre as lesões resistentes (RB) e as lesões suscetíveis (TAN).

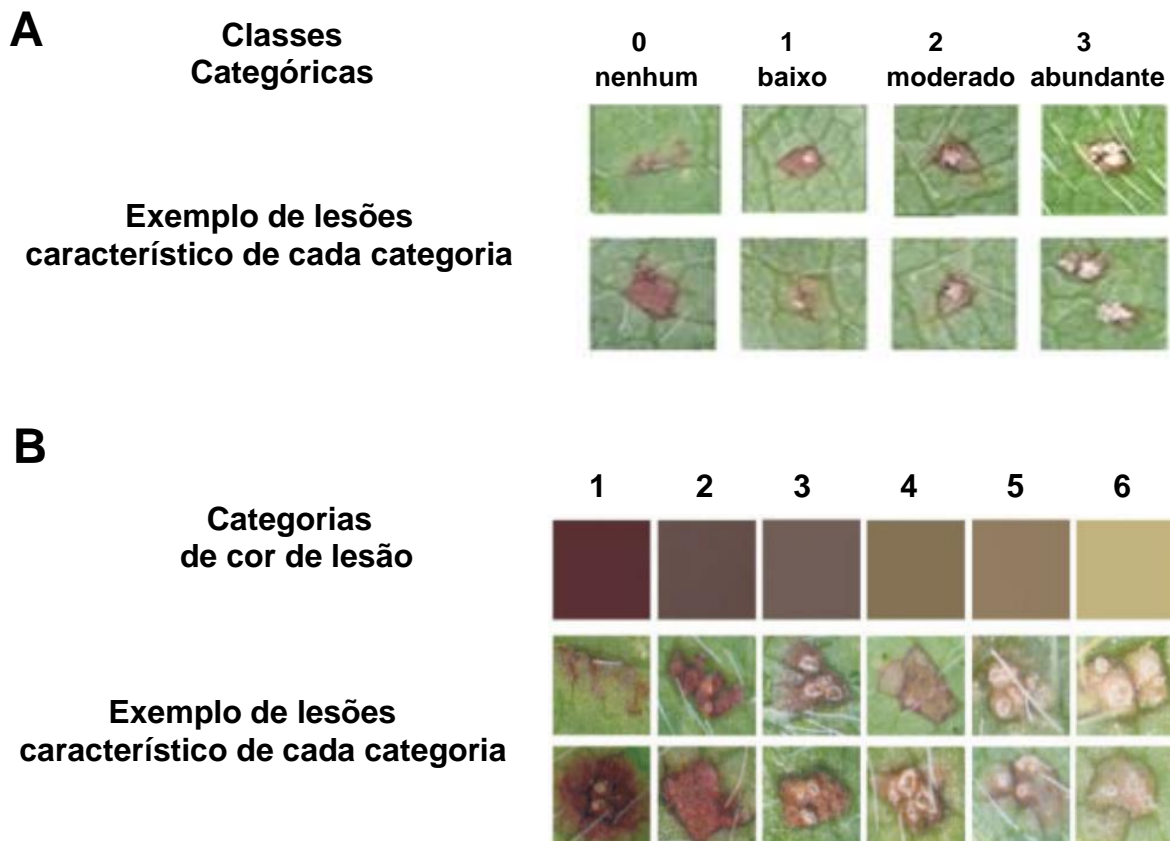
Nessa classificação, genótipos que apresentaram lesões de coloração castanho-claro; médio ou abundante nível de esporulação variando de 0-2 mm e apresentando bordas com formatos indefinidos, foram nomeados de lesões TAN (suscetíveis). Em contrapartida, genótipos com lesões castanho-avermelhadas; apresentando formato angular de 2-5 mm, com bordas bem definidas de pouca ou nenhuma esporulação, foram nomeados de lesões RB (resistentes) (BROMFIELD; HARTWING, 1980; BROMFIELD, 1984; CHILDS, 2017). Realizada a classificação TAN/RB, por fim foi possível distinguir através do teste das progênies F_{2:3} a segregação entre famílias resistentes homocigota (AA), resistentes heterocigota (Aa) e suscetível (aa).

2.5 FENOTIPAGEM QUANTITATIVA DA F₂

Para essa avaliação, após a fenotipagem visual (qualitativa) dos trifólios, estes foram coletados e armazenados a -80,°C até o momento da avaliação. Em seguida, os trifólios foram descongelados aos poucos sobre a bancada, e avaliados em relação aos quatro caracteres individuais: Nível de esporulação (SL – sporulation level); Número de urédias por lesão (NoU); Número de urédias abertas por lesão (Open NoU), seguindo os critérios de classificação propostos por Yamanaka et al. (2010) e cor da lesão (LC – lesion color), conforme descrito por Kato e Yorinori (2008).

Assim, para o caráter nível de esporulação (SL) aplicou-se uma gradação de 0 a 3, onde: 0- representa ausência de esporulação; 1- pouca esporulação; 2- moderado nível de esporulação e 3 - abundante nível de esporulação (Figura 1A). Após essa avaliação, foi realizada a análise do número de urédias abertas por lesão (Open NoU) e número de urédias por lesão (NoU), o que consistiu na contagem sequencial do número de urédias abertas por lesão e total de urédias por lesão, respectivamente. Em seguida, o próximo caractere avaliado foi a cor da lesão (LC). Para essa avaliação, notas foram estabelecidas de 1 a 6, sendo o valor 1 para colorações muito escuras e 6 para as mais claras (Figura 1B). Por conseguinte, para os quatro caracteres avaliados uma média de 30 lesões por genótipo foi estabelecida, objetivando uma fenotipagem mais sucinta de plantas resistentes e suscetíveis, para mapeamento da população F₂.

Figura 1– A) Representa a classificação do nível de esporulação de cada lesão, variando de nenhum (0) a abundante nível de esporulação (3). B) Representa a categoria de coloração de cada lesão, variando entre uma coloração mais escura (1) a uma coloração de lesão mais clara (6).



Fonte: A) Modificado de Yamanaka et al. (2010). B) Adaptado de Kato e Yorinori (2008).

À medida que foram seguidas tais classificações e estabelecidas médias para as 30 lesões individuais, seguiu-se com a avaliação para obtenção de frequência de lesões com urédias (%LU). Para esse caractere, uma escala de 0 a 100% foi determinada, a fim de agregar maior confiabilidade na classificação dos fenótipos. Por conseguinte, valores fenotípicos para os três caracteres (%LU, NoU e SL) foram estabelecidos, na tentativa de classificar os genótipos da população F₂ como resistente ou suscetíveis, conforme proposto por Yamanaka et al. (2011). Entretanto, quando aplicado para essa análise, tal classificação não foi capaz de promover a distribuição dos dados fenotípicos da população F₂. Então, objetivando uma boa classificação de indivíduos para a formação de bulks segregantes e para o mapeamento de genes mais assertivo na população F₂, uma nova classificação de resistência (modificada do método de Yamanaka et al. (2011)) proporcionou maior confiabilidade na classificação de plantas.

Nesse sentido, na re-classificação dos quatro caracteres, foi possível distinguir genótipos “altamente resistentes e moderadamente resistentes” para uso na genotipagem em larga escala, via Agriplex e para a análise de bulks segregantes (BSA). Para essa classificação, foram tomados valores de corte, a partir dos valores de média, mediana, moda e desvio padrão que levaram a criação de novas classes fenotípicas entre plantas resistentes e suscetíveis, a partir da análise individual de cada parâmetro avaliado quantitativamente (SL; NoU; Open NoU e LC), no qual gerou uma concordância com a fenotipagem visual (Tabela 1).

Logo, para essa determinação, foi estabelecido que esses valores de corte estivessem entre os valores médios de cada parâmetro em relação aos indivíduos R e S, e que não fossem tomados valores igual ou muito próximo à relação (média \pm desvio padrão) para resistência e suscetibilidade, respectivamente. Assim, para a obtenção da primeira nota de corte: 1,40 de SL, a seguinte relação “média + desvio padrão” foi determinada para plantas resistentes ($0,38 + 0,36 = 0,74$). Já para as suscetíveis ($2,12 - 0,64 = 1,60$) foi aplicado. Esse critério foi implantado para todos os demais parâmetros (SL, NoU, Open NoU, LC), com exceção do %LU que não foi capaz de separar os indivíduos R e S na população de mapeamento deste trabalho. Para este parâmetro quando o valor de corte de 70% proposto Yamanaka et al. (2011) foi aplicado, metade dos indivíduos resistentes foram excluídos da avaliação, visto que a mediana da distribuição coincidiu com o próprio valor de corte (70%).

Tabela 1 – Valores de média, moda, mediana e desvio padrão para determinação de corte das novas classes fenotípicas.

Plantas		SL	NoU	Open NoU	LC	%LU
Resistentes	Média	0,38	1,98	1,25	2,00	0,53
	Moda	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00
	Mediana	0,37	2,07	1,02	1,83	0,70
	Desvio Padrão	0,36	1,86	1,41	0,94	0,41
	Corte	1,40	5,50	4,00	4,00	-
Suscetíveis	Média	2,12	8,65	7,69	5,03	0,99
	Moda	2,23	9,57	8,37	6,00	1,00
	Mediana	2,23	8,97	8,13	5,17	1,00
	Desvio Padrão	0,64	1,98	2,22	0,93	0,03

SL: nível de esporulação; NoU: número de urédias por lesão; Open NoU: número de urédias abertas por lesão; LC: cor de lesão; %LU: frequência de urédias por lesão; Moda: valores que mais se repetem; mediana: meio da distribuição; Desvio padrão: dispersão em torno da média. Para %LU novos valores de corte não foram estabelecidos, pois de acordo com o critério proposto por Yamanaka et al. (2011) um corte de 70% seria excludente para os dados dessa população.

Fonte: o próprio autor.

Em vista dessa caracterização mais detalhada, fórmulas foram estabelecidas, sendo automaticamente classificadas como: “plantas altamente resistentes”, aquelas que apresentaram todas as quatro características como resistentes, e ainda as 30 lesões NoU igual a zero; “plantas resistentes” quando todas as quatro características foram de resistência e as 30 lesões (NoU) com valores de resistência <5,5. Na classificação “moderadamente resistentes”, quando plantas apresentaram ao menos duas ou três dessas características (resistentes) e valores de (NoU) maior ou menor que 5,5. Por conseguinte, plantas foram classificadas “suscetíveis” quando ao menos três das quatro características fossem suscetíveis, apresentando valores acima de 5,5 para NoU. Diante disso, tais modificações ao método descrito por Yamanaka foram adotadas para melhor adequação dos critérios aos dados obtidos e para possibilitar a identificação de indivíduos com mais alto nível de resistência, objetivando maior confiabilidade na classificação de plantas para serem usados nos bulks segregantes.

Posteriormente os novos valores de corte foram plotados de forma gráfica em relação a cada parâmetro estabelecido. Assim, de posse dessa

distribuição houve uma concordância entre a fenotipagem visual e a nova classificação quantitativa no momento em que plantas suscetíveis atingiram o ponto zero na curva da distribuição bimodal.

2.6 COLETA DE AMOSTRAS E EXTRAÇÃO DE DNA DA POPULAÇÃO F₂

Para a extração de DNA, discos foliares de 226 plantas F₂ jovens da soja, em estágio V₄ e V₅ de desenvolvimento, foram coletados de acordo com a técnica de genotipagem a ser utilizada. Nesse caso, o DNA foi extraído por meio de diferentes metodologias: SAM-R, CTAB e Dneasy. O DNA extraído pelo método SAM-R foi realizado conforme o protocolo disponibilizado pelo laboratório de SAM da Embrapa-Soja (Londrina-Paraná) e utilizados para a detecção via ensaios Taqman. Nesse método de extração, dois discos foliares por amostra foram utilizados e misturados com tampão SAMR-A e SAMR-B. Subsequentemente as amostras foram conduzidas ao termociclador.

O DNA extraído por CTAB em placa foi baseado no protocolo CTAB modificado, sendo utilizados para a genotipagem por sequenciamento de amplicon (KEIM; OLSON; SHOEMAKER, 1988). Nesse caso, aproximadamente 0,1 g de tecido foliar foram macerados em nitrogênio líquido e posteriormente misturados com tampão de extração CTAB (CTAB 1%, NaCl 1,4M, Tris-HCl pH 8,0 0,1M, EDTA 0,5M, Mercaptoetanol 0,1%). Em seguida, essa mistura foi aquecida, centrifugada e o sobrenadante extraído duas vezes com clorofórmio álcool isoamílico (24:1v/v). As amostras de DNA foram então precipitadas com isopropanol e tratadas com RNase A (1u/ug).

A qualidade do DNA foi avaliada por meio da eletroforese em gel de agarose (1%), utilizando o marcador High Mass, como parâmetro de qualidade de DNA expresso em bp. Outra medida da qualidade do DNA foi através da espectrofotometria no Nanodrop. Nesse caso, o DNA foi classificado “puro” ou apresentou-se livre de proteínas quando indicou valores entre 1,7 até 2,0 na razão de absorbância a 260 e 280 nanômetros (nm), medidos por espectrofotometria (DEMEKE; JENKINS, 2012). Dessa forma, se a razão 260nm/280nm for baixa, pode ser o indicativo de grande concentração de proteína que absorvem a 280 nanômetros. Por outro lado, o DNA foi classificado “puro” ou livre de polissacarídeos quando apresentou valores entre 1,8 até 2,2 na razão de absorbância a 260 e 230

nm. Se a razão 260nm/230nm apresenta-se inferior a 1,8 é um indício da presença de polissacarídeos (Thermo Scientific).

Em última análise, foi realizado a extração do DNA pelo kit Dneasy, utilizando o protocolo de acordo com as recomendações do fabricante. Desse modo, as amostras que se apresentaram íntegras em gel, com quantidade mínima de DNA e com relações dentro dos padrões esperados, foram posteriormente estimadas e analisadas em Nanodrop. Subsequentemente, as amostras que foram destinadas à formação dos bulks para a análise BSA, foram estimadas e quantificadas em fluorômetro Qubit.

2.7 MAPEAMENTO GENÉTICO

2.7.1 Testes de Marcas Co-segregantes para Genes *Rpp* já Mapeados

Marcadores do tipo SNP (26 SNPs), já descritos na literatura como ligados aos genes *Rpp1/Rpp1b*, *Rpp2*, *Rpp3* e *Rpp4* em trabalhos prévios de mapeamento e validados pelo LGMSA (AOYAGI et al., 2018; HYTEN et al., 2007; CHAKRABORTY et al., 2009.; DA SILVA et al., 2008.; HYTEN et al., 2009.; DA SILVA, 2008), foram utilizados na genotipagem do DNA oriundo da população F₂ a fim de identificar uma possível segregação genotípica dos marcadores para um caráter monogênico. A genotipagem foi conduzida por meio de sequenciamento pela plataforma Next-Gen PlexSeq™, Laboratório AgriPlex, Cleveland, US.

Para genotipagem através dessa plataforma, sequências de 100 pb flanqueando 26 SNPs ligados e/ou previamente identificados em trabalhos prévios de mapeamento para os locus de resistência *Rpp1/Rpp1b*, *Rpp2*, *Rpp3* e *Rpp4*, foram utilizados para desenho de primers direcionados a região de interesse e posterior sequenciamento de nova geração. As posições físicas e tipo de polimorfismos podem ser observados na Tabela 2. Por conseguinte, tendo resultado um conjunto de SNPs dessa genotipagem, avaliou-se a segregação das marcas pelo teste do qui-quadrado (X^2). Marcas monomórficas foram descartadas da avaliação, sendo calculadas apenas aquelas que se apresentaram polimórficas entre os parentais.

Realizada a análise de segregação genotípica das marcas (*Rpp1-Rpp4*) pelo teste do X^2 , apenas aquelas que apresentaram segregação esperada 1:2:1 foram aplicadas ao mapeamento na população F_2 . O mapeamento foi conduzido utilizando o Software JoinMap 4.1 (VAN OOIJEN 2006). Para determinar a ligação entre locos e os marcadores, a função de regressão, com LOD score de 3 foram determinadas, de modo que as distâncias de recombinação foram calculadas usando a função de mapeamento Kosambi. Por conseguinte, o programa MapChart foi utilizado para a criação de um mapa físico, aos marcadores genéticos aplicados para esse estudo, com base no Glyma. Wm82.a2 do genoma de referência (Soybase.org).

Tabela 2 – Identificação, posições físicas, tipo de polimorfismo e *Rpp* das 26 marcas previamente mapeadas (*Rpp1/Rpp1b*, *Rpp2*, *Rpp3* e *Rpp4*) com base no genoma referência da soja versão Wm82.a2 (Gmax2.0).

SNPs	Posições no Cromossomo	Polimorfismos	<i>Rpp</i>
ss715632294	56.123.455	T/C	<i>Rpp1</i>
ss715632296	56.143.019	C/A	<i>Rpp1</i>
ss715632307	56.236.027	C/A	<i>Rpp1</i>
ss715632317	56.326.327	A/C	<i>Rpp1</i>
ss715632488	57.620.444	A/G	<i>Rpp1</i>
ss715632303	56.195.857	G/A	<i>Rpp1</i>
ss715632304	56.207.694	T/C	<i>Rpp1</i>
ss715632219	55.571.075	A/G	<i>Rpp1</i>
Chr18:56544134	56.544.134	C/T	<i>Rpp1</i>
Chr18:56207185	56.207.185	T/A	<i>Rpp1</i>
Chr18:56378428	56.378.428	C/T	<i>Rpp1</i>
Chr18:56544813	56.544.813	T/C	<i>Rpp1</i>
Chr18:56378436	56.378.436	G/T	<i>Rpp1</i>
Chr18:56976566	56.976.566	G/T	<i>Rpp1</i>
Chr18:56412205	56.412.205	G/A	<i>Rpp1</i>
ss715624074	29.28.5678	C/A	<i>Rpp2</i>
ss715624075	29.287.747	C/T	<i>Rpp2</i>
ss715624089	29.344.427	A/G	<i>Rpp2</i>
ss715594488	44.735.622	G/T	<i>Rpp3</i>
ss715594493	44.867.901	A/G	<i>Rpp3</i>
ss715631617	50.704.250	T/C	<i>Rpp4</i>
ss715631707	51.584.557	T/C	<i>Rpp4</i>
ss715631715	51.640.411	C/A	<i>Rpp4</i>
ss715632051	54.453.474	T/C	-
ss715632117	55.024.472	T/G	-
ss715632209	55.501.162	A/G	-

Chr18: Cromossomo. “-” Indicam marcas obtidas no soy50K sem *Rpp* identificado.

As posições referentes as 26 marcas previamente mapeadas (*Rpp1-Rpp4*) foram obtidas no Soybase

Fonte: (<http://soybase.org/gb2/gbrowse/gmax2.0/>).

2.7.2 Análise de BSA

Baseado na fenotipagem da análise de agrupamentos segregantes, com algumas modificações (Bulked Segregant Analysis – BSA; MICHELMORE et al., 1991), bulks de DNA de plantas resistentes e suscetíveis foram formados, buscando-se encontrar polimorfismos que estejam associados à característica de interesse para sua discriminação.

Para a análise de BSA, três bulks de DNA resistentes foram criados, contendo dois bulks com 14 plantas e um bulk com 16 plantas fenotipadas como altamente resistentes; além de 2 bulks de DNA de plantas fenotipadas como suscetíveis, contendo 15 e 16 plantas. Em sequência, os DNAs dos bulks e dos parentais foram encaminhados para uma análise de genotipagem via sondas de hidrólise e encaminhados para o BeadChip® soySNP6K (SONG et., 2013), Laboratório Labex, USDA, US.

Os dados de hibridização foram avaliados pelo Software Genomestudio (Illumina), sendo descartados os SNPs não polimórficos e selecionados aqueles que co-segregaram com o fenótipo baseado na análise comparativa entre os bulks resistentes e suscetíveis e parentais. Os 6 SNPs homocigotos identificados na análise de BSA, assim como outros 11 SNPs adicionais (Tabela 3) fisicamente posicionados na região identificada foram selecionados do genoma referência da soja, utilizando o banco de dados disponíveis no Soybase (<http://soybase.org/gb2/gbrowse/gmax2.0/>) para saturação da região alvo. Estes marcadores foram então utilizados para genotipagem de 161 indivíduos da população F₂ via metodologia Taqman e sequenciamento de amplicons e aqueles que apresentaram-se polimórficos entre os parentais e a população, foram utilizados para condução do mapeamento genético.

Tabela 3 – Identificação das respectivas marcas, posições físicas e tipo de polimorfismos identificado via análise de BSA e genoma referência da soja versão Wm82.a2 (Gmax2.0).

6 SNPS (BSA)	Posições	Polimorfismos
ss715632208	55.493.680	C/T
ss715632251	55.863.741	G/A
ss715632260	55.909.139	C/T
ss715632295	56.127.446	G/T
ss715632339	56.443.425	G/A
ss715632359	56.570.437	C/T
11 SNPs (Adicionais)	Posições	Polimorfismos
Chr18:54391672	54.391.672	T/G
Chr18:54737619	54.737.619	G/A
Chr18:54811534	54.811.534	T/C
Chr18:54912585	54.912.585	T/C
ss715632117	55.024.472	T/G
Chr18:55205764	55.205.764	G/A
Chr18:55367486	55.367.486	C/T
Chr18:55733993	55.733.993	C/T
Chr18:56350292	56.350.292	G/A
Chr18:56299103	56.299.103	T/C
Chr18:56515646	56.515.646	T/G

Chr18: Cromossomo. As posições referentes as 11 marcas adicionais foram obtidas no Soybase

Fonte: (<http://soybase.org/gb2/gbrowse/gmax2.0/>).

A partir das análises de SNPs selecionados, cerca de 100 pb da região flanqueando os SNPs foram utilizados para desenhos de primers e sondas marcados com fluoróforos VIC® e FAM™ pela Custom Taqman Assays (Thermo Fischer). A otimização dos ensaios visou determinar as concentrações ideais do ensaio de detecção, contendo os primers e sondas para o SNP alvo, em placas de 384 wells, ajustando para volumes final de 2,75 µL, bem como as condições ideais de termociclagem que permitiram diferenciar os possíveis genótipos com grande precisão. As reações foram conduzidas em Termociclador Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR, em um volume final de mix de 2,75 µL contendo 2,25 µL de DNA de cada amostra F₂ e 0,25 µL de genotyping assay.

Similarmente, para o sequenciamento de amplicons, os fragmentos de 100 pb contendo a região do SNP foram utilizados para o desenho de primers e o sequenciamento de amplicons foi conduzido pela metodologia Agriplex da Next-Gen PlexSeq™. Adicionalmente, marcadores SSR localizados na região de interesse foram selecionados para complementar a genotipagem de 161 indivíduos da F₂. Para essa análise, inicialmente buscou-se primers que fossem polimórficos entre os pais (PI 594756 X PI 594891). Desse modo, 10 marcadores microssatélites

disponíveis no Soybase foram testados, além de mais 27 identificados do grupo de ligação G da soja, desenvolvidos por Camargo (2010) (Anexo A).

Os 10 primeiros marcadores SSR foram submetidos à análise de PCR convencional em termociclador Applied Biosystems, seguindo as condições específicas de temperaturas de anelamento para cada marcador, disponíveis na plataforma (<https://www.thermofisher.com>). Para os demais 27 SSR, as seguintes condições de termociclagem foram estabelecidas: 1 ciclo de desnaturação 95° C por 5 s.; 35 ciclos de 94° C por 30 s, 50° C por 45 s e 72° C por 30 s, além de uma etapa final de 72° C por 7 minutos. Para cada reação, um volume total de 15 µl contendo (10 ug/ul de BSA, 50 mM de MgCl₂, 2,5 mM de dNTPs, 2 µM de cada iniciador, 5 u/µl de Taq Polimerase e 2 ng/ul de DNA de cada amostra F₂) foi estabelecida. Dentre todos 37 SSR analisados, 4 foram polimórficos e subsequentemente testados para genotipagem de toda população F₂. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese de agarose (synergel), contendo brometo de etídio e tampão TAE 1X (Tampão Tris-Acetate-Tris 40Mm, Ac. Acético 20 Mm EDTA 1Mm) diluído a solução estoque 50x em água Milli-Q) e seu tamanho padronizado conforme o marcador molecular 1 Kb plus e fotografados no fotodocumentador de luz ultravioleta.

2.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Análises fenotípicas qualitativas foram conduzidas nas populações: F₂ (226 indivíduos) e F_{2:3} (161 famílias) de reações ao isolado LPF2B07 e à uma população de inóculo obtida dos campos experimentais da Embrapa-Soja de *P. pachyrhizi*, respectivamente. Em sequência, os resultados foram submetidos ao teste de qui-quadrado ($X^2 = \sum[(FO-FE)^2/FE]$). Onde, FO: representa a frequência observada e FE: frequência esperada de uma determinada hipótese ocorrer. Diante disso, o teste (X^2) foi conduzido estabelecendo a hipótese de que a herança de resistência seja controlada por 1 gene com 2 alelos, e que eles estejam segregando na proporção 3 R (resistência) : 1 rr (suscetível), conforme o padrão de segregação mendeliana, esperado para características monogênica de resistência à população F₂. Assim, para interpretação dos resultados, duas hipóteses foram estabelecidas, H₀: no qual aceita-se a hipótese monogênica, onde a herança é controlada por 1 único gene com 2 alelos e os alelos estão segregando na proporção 3:1 conforme a

1º lei de Mendel, e H1: Rejeita-se a hipótese, e nesse caso a herança não é controlado por 1 único gene.

Para análises estatísticas aplicadas à reação ao inóculo de *P. pachyrhizi* aos indivíduos da família F_{2:3}, foi estabelecida a hipótese de que a herança de resistência seja controlada por 1 gene com 2 alelos, e que eles estejam segregando na proporção 1R (homozigoto resistente) : 2 Rr (heterozigoto) : 1rr (homozigoto suscetível), conforme o padrão de segregação mendeliana esperado para características de resistência monogênica codominante às famílias F_{2:3}.

Por fim, análises estatísticas também foram aplicadas aos resultados de sequenciamento via plataforma Next-Gen PlexSeq™ (AgriPlex) e aos resultados de genotipagem de marcadores SSR. Para ambas as análises, um teste de segregação de marcas (X^2) foi realizado, testando duas hipóteses: H0: na qual aceita-se a hipótese de que as marcas estejam segregando na proporção genotípica 1:2:1, conforme esperado para uma característica de resistência (monogênica), controlada por um único gene dominante; e a hipótese H1: na qual rejeita-se essa possibilidade, e nesse caso as marcas não segregam na proporção 1:2:1.

2.9 CARACTERIZAÇÃO PATOGÊNICA DE PI'S COM DIFERENTES ISOLADOS *P. PACHYRHIZI*

A fim de determinar a amplitude de resistência presente na PI 594756 e comparar seu perfil patogênico com as demais fontes de gene *Rpp* previamente mapeados, em especial a PI 200492 (*Rpp1*) e outros acessos descritos como contendo alelos de *Rpp1*, um painel composto por 11 isolados monospóricos (*P. pachyrhizi*) (Tabela 4), foi avaliado quali e quantitativamente frente inoculação com 14 acessos de soja, apresentando todas as outras fontes: *Rpp1/Rpp1-b*, *Rpp2*, *Rpp3*, *Rpp4*, *Rpp5*, *Rpp6* e *Rpp7*.

Para cada acesso, seis sementes foram plantadas por vaso e desenvolvidas em casa de vegetação de fluxo negativo da Embrapa-Soja, Londrina, sob controle de temperatura e umidade. Alcançado o estágio V₃ de desenvolvimento, as folhas foram coletadas, inoculadas com atomizador manual e mantidas em placa de petri, sob câmara de crescimento no laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa. Passados 15 dias da inoculação, a avaliação final de reação aos isolados, foi realizada conforme descrita no item 5, sendo analisadas pelo menos 30 lesões por folha, em um total de 9 folhas por genótipo.

Tabela 4 – Descrição, Origem, e Ano de coleta dos 11 isolados monospóricos de *P. pachyrhizi* testados.

Isolados Brasileiros			
Código do Isolado	Local de Origem/UF	UF	Ano de coleta
Band 15.1M	Bandeirantes	PR	2015
RV14.1M	Rio Verde	GO	2014
AS13.4M	Agua Santa	RS	2013
GN13.4M	Goiânia	GO	2013
LPF2B.1M	Passo Fundo	RS	2007
2003.1M	Londrina	PR	2003
Isolados Internacionais			
Código do Isolado	Local de Origem	País	Ano de coleta
MBA16.1M	M. Baracayu	Paraguai	2016
ARG 14.1M	_____	Argentina	2014
FL07.2M	_____	USA	2007
TIJP07.1M	_____	Japão	2007
EIJP 07.1M	_____	Japão	2007

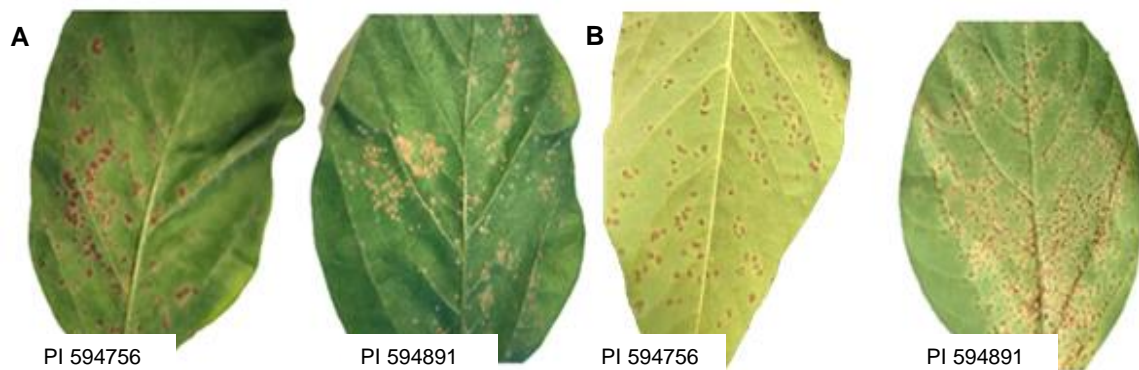
Fonte: Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Soja, Londrina.

3 RESULTADOS

3.1 AVALIAÇÃO FENOTÍPICA QUALITATIVA DA F₂ E F_{2:3}

Diferenças significativas foram observadas entre os parentais PI 594756 (resistente) x PI 594891 (suscetível) quando inoculadas com ambos isolados, o isolado monospórico LPF2B07 e a amostra populacional do fungo oriunda da safra 2016/2017. Em ambas as fenotipagens, o parental resistente indicou lesões fortemente RB, apresentando zero SL, NoU e OPEN NoU (Figura 2).

Figura 2 – Reação dos parentais PI 594756 (resistente) x PI 594891 (suscetível) ao isolado do fungo *P. pachyrhizi* (A) LPF2B07 e (B) à amostra populacional do fungo oriundo da safra 2016/2017 provenientes da coleção de microrganismos da Embrapa Soja.



Fonte: o próprio autor.

A fenotipagem qualitativa da população F₂, utilizando o isolado LPF2B07, revelou 171 indivíduos com reação de resistência e 46 de suscetibilidade, de um total de 226 plantas avaliadas. Dessa forma, a análise da distribuição fenotípica revelou um valor de (χ^2) de 1,66^{ns} em relação ao valor crítico de (χ^2) de 3,841, com 1GL. Assim, através desses dados foi estabelecido e confirmado que a herança da resistência na PI 594756 é monogênica, havendo dominância completa do alelo que condiciona resistência sobre o alelo que condiciona suscetibilidade, numa proporção de 3:1 conforme estabelecido pela primeira lei de Mendel (Tabela 5).

Adicionalmente, a fenotipagem das progênies F_{2:3}, utilizando a amostra populacional do fungo, oriundo dos campos da Embrapa-Soja safra 2016/2017, permitiu a identificação do fenótipo das plantas F₂ em resistentes

homozigota, resistentes heterozigota e suscetível. O teste qui-quadrado (χ^2) revelou uma segregação observada para as três classes (1:2:1), seguindo a proporção esperada para um gene de resistência: 47 plantas resistentes homozigota, 80 foram resistentes heterozigota e 34 foram suscetíveis (Tabela 5).

Tabela 5 – Teste Qui-quadrado (χ^2) para análise qualitativa da população F_2 e $F_{2:3}$ segregantes, seguindo a hipótese 3 :1 e 1: 2: 1 respectivamente.

Avaliação Fenotípica(F_2)	Frequência Observada*	Frequência Esperada	(χ^2)
Resistente	171	162,75	0,41 ^{ns}
Suscetível	46	54,25	1,25 ^{ns}
Total	217	217	1,66^{ns}
Avaliação Fenotípica($F_{2:3}$)	Frequência Observada**	Frequência Esperada	(χ^2)
Resistentes homozigota	47	40,25	1,131988 ^{ns}
Resistentes heterozigota	80	80,5	0,003106 ^{ns}
Suscetível	34	40,25	0,970497 ^{ns}
Total	161	161	2,10559^{ns}

(χ^2) Valor crítico (1GL) = **3,841**; ns: não significativo; GL: grau de liberdade, *número de plantas F_2 avaliadas, ** número de famílias $F_{2:3}$ testadas. **Fonte:** o próprio autor.

3.2 FENOTIPAGEM QUANTITATIVA DA F_2

Adicionalmente, visando maior confiabilidade na determinação do fenótipo das plantas F_2 , uma avaliação quantitativa foi empregada, o que permitiu a seleção de indivíduos altamente resistentes para a formação dos bulks para a análise BSA e ao mapeamento mais assertivo utilizando diretamente a população F_2 com os novos cortes estabelecidos para cada parâmetro foram SL: 1,4; NoU: 5,5; Open NoU: 4,0; e LC: 4,0. A visualização dos cortes aplicados assim como a distribuição dos indivíduos F_2 nas diferentes faixas de valores de cada parâmetro pôde ser observado na Figura 3.

Com base nesta avaliação os indivíduos na F₂ foram distribuídos em 45 altamente resistentes, 117 resistentes e 9 moderadamente -relacionado aos 171 genótipos classificados como resistentes na fenotipagem qualitativa- e em 46 genótipos suscetíveis, com base nos parâmetros SL, NoU, Open NoU e LC.

A correlação de Pearson revelou que todos os parâmetros avaliados apresentaram elevado nível de correlação, sendo o maior índice de correlação (0,97640) observado entre os caracteres Open NoU (NUAP) e NoU (NUP) (Quadro 1).

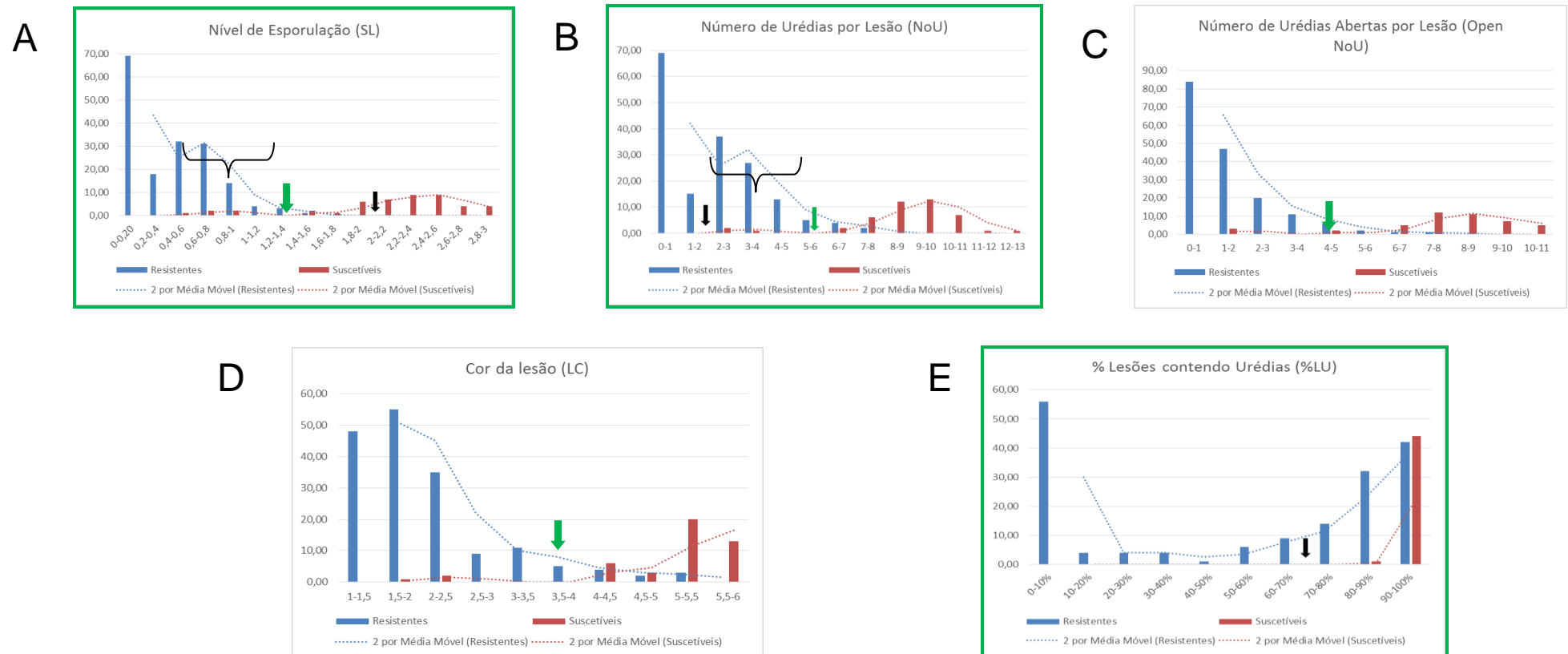
Quadro 1 – Coeficiente de correlação de Pearson entre os caracteres quantitativos estudados.

Coeficiente de Correlação de Pearson, N = 226 Prob > r under H0: Rho=0				
	SLP	NUP	NUAP	LCP
SLP Nível de esporulação ponderado	1.00000	0.94457 <.0001	0.96527 <.0001	0.88068 <.0001
NUP Número de uredia por lesão ponderado	0.94457 <.0001	1.00000	0.97640 <.0001	0.91532 <.0001
NUAP Número de urédias abertas por lesão ponderado	0.96527 <.0001	0.97640 <.0001	1.00000	0.89915 <.0001
LCP Cor lesão ponderado	0.88068 <.0001	0.91532 <.0001	0.89915 <.0001	1.00000

“SLP, NUP, NUAP, LCP” significam ponderações pelo número de lesões analisadas, sendo representadas pela multiplicação do valor observado em cada lesão, pela razão: N° de lesões avaliadas/ 30. “<.0001” representa a significância ao nível de P <0,001 pelo teste t.

Fonte: o próprio autor.

Figura 3 – Distribuição dos indivíduos F₂ do cruzamento PI 594756 x PI 594891 nas diferentes faixas de cada parâmetro fenotípico SL, NoU, Open NoU e LC em resposta ao isolado LPF2B07. As cores (azul e vermelho) indicadas em cada gráfico representam genótipos resistentes e suscetíveis (respectivamente), dos quais foram avaliados qualitativamente. As setas de cor verde estão indicando novos valores de cortes, obtidos para os caracteres: SL: 1,4; NoU: 5,5; Open NoU: 4,0; e LC: 4,0, enquanto as setas pretas indicam os valores utilizados por Yamanaka et al. (2011) (caracteres SL: 2; NoU: 2; e %LU: 70%). Por fim, os “colchetes” apresentados nos gráficos A e B estão indicando as discrepâncias entre a “classificação de Yamanaka e a fenotipagem qualitativa visual”.



Fonte: o próprio autor.

3.3 MAPEAMENTO GENÉTICO

Inicialmente, 26 marcadores SNPs previamente descritos como ligados aos genes *Rpp1*, *Rpp2*, *Rpp3* e *Rpp4* foram avaliados na população F₂. A partir dos resultados de genotipagem via AgriPlex desses 26, 14 foram monomórficos na população, ou apresentaram segregação dominante ou falharam na genotipagem, de modo que não foram utilizados no mapeamento. Logo, um total de 12 marcas foram aplicadas ao teste X² para verificação da hipótese de segregação com o gene. Por conseguinte, foi possível verificar que apenas as 10 marcas presentes na região do cromossomo 18, foram selecionadas para o mapeamento, por terem apresentado segregação esperada, na proporção 1 (AA) : 2 (Aa) : 1 (aa), conforme esperado para uma característica monogênica em dominância completa (Tabela 6). Dessas 10 marcas apresentando LOD score 3 (9 *Rpp1* e 1 *Rpp4*), apenas as marcas presentes no cromossomo 18, na região de *Rpp1*, indicaram possível presença do gene no locus *Rpp1* à uma distância de 7,3 cM dos marcadores Chr18:56544134 e Chr18:56544813 (Apêndice A). Contudo, por ainda representar uma longa distância, seguiu-se para a análise de BSA.

Tabela 6 – Teste de qui-quadrado (X²) para análise de segregação dos marcadores ligados aos genes *Rpp* previamente mapeados, para uso no mapeamento da população F₂ (217 indivíduos), obtidos do cruzamento entre PI 594756 (resistente) x PI 594891 (suscetível).

Marcadores	Frequência Observada			Frequência Esperada			Proporção	X ²
	A	H	B	A	H	B		
<i>Rpp1</i>								
ss715632294	61	108	48	54,25	108,5	54,25	1:2:1	1,55 ns
ss715632317	60	108	49	54,25	108,5	54,25	1:2:1	1,10 ns
ss715632303	61	107	49	54,25	108,5	54,25	1:2:1	1,35 ns
ss715632304	61	107	49	54,25	108,5	54,25	1:2:1	1,35 ns
ss715632219	62	109	46	54,25	108,5	54,25	1:2:1	2,35 ns
Chr18:56544134	61	107	49	54,25	108,5	54,25	1:2:1	1,35 ns
Chr18:56207185	61	107	49	54,25	108,5	54,25	1:2:1	1,35 ns
Chr18:56544813	61	107	49	54,25	108,5	54,25	1:2:1	1,35 ns
Chr18:56412205	60	108	49	54,25	108,5	54,25	1:2:1	1,10 ns
<i>Rpp3</i>								
ss715594488	28	112	77	54,25	108,5	54,25	1:2:1	22,35 s
ss715594493	29	111	77	54,25	108,5	54,25	1:2:1	21,34 s
<i>Rpp4</i>								
ss715631715	59	108	50	54,25	108,5	54,25	1:2:1	0,79 ns

A= plantas altamente resistentes; H= plantas resistentes e moderadamente resistentes; B= plantas suscetíveis, obtidas através da fenotipagem quantitativa da F₂, inoculadas com o isolado LPF2B07. s = significativo ao nível de 5% de probabilidade; ns= não significativo ao nível de 5% de probabilidade. **Fonte:** o próprio autor.

Através da análise de BSA, utilizando a plataforma soySNP6K seis SNPs polimórficos, ss715632208, ss715632251, ss715632260, ss715632295, ss715632339, ss715632359 foram revelados em associação com o bulk e pai resistente PI 594756, indicando a posição do gene no cromossomo 18 da soja, próximo a região de *Rpp1*. Adicionalmente, a genotipagem de 3 destes 6 SNPs, além de 12 SNPs (7 SNPs adicionais e 4 SNPs ligados a *Rpp1*, e 1 SNP ligado a *Rpp4*), e outros 4 SSR (SSR1859, Stta520, Sat_79806, Sat_064) cobrindo a região com resultados válidos foi utilizada para mapeamento na população F₂ (161 indivíduos). Neste caso, os resultados da fenotipagem das famílias F_{2:3} foram utilizados para confirmar o fenótipo das plantas F₂, garantindo um mapeamento mais preciso. A análise de segregação destas marcas podem ser visualizadas na Tabela 7. Um perfil geral dos resultados de genotipagem com os SNPs avaliados pela Metodologia Taqman e de um gel de amplificação de marcas SSR na população pode ser visualizado no Apêndice B e C.

O gene *Rpp* (PI 594756) foi mapeado à 2,3 cM do Sat_064 e 1,6 cM do Stta520 posicionadas no cromossomo 18 da soja (Figura 4). Dentre as 19 marcas apresentando LOD score 3 (Tabela 7), apenas 18 marcas presente na região de *Rpp1* confirmaram o mapeamento do gene no locus *Rpp1*, sendo a marca próxima ao *Rpp4* descartada, por estar localizada numa região muito distante. Seguindo o posicionamento dessas marcas, também foi possível determinar a posição física do gene dentro de uma região putativa de 90,9 Kb (Stta520 – Sat_064). Tal região coincide com a mesma região de 93,6 Kb estabelecido por Kim et al. (2012) associada potencialmente ao loco *Rpp1* e seu alelo *Rpp1-b* presentes nas PI 200492 e PI 561356, respectivamente. Tal região também está contida naquelas previamente mapeadas ao loco *Rpp1-b* (PI 594538A) e *Rpp-?* nas PI 587880A e PI 587886 (Figura 5).

Tabela 7 – Análise de segregação dos marcadores a partir dos resultados de BSA, utilizados para mapeamento da população F₂ (161 indivíduos) obtidos do cruzamento entre PI 594756 (resistente) x PI 594891 (suscetível).

Marcadores	Frequência Observada			Frequência Esperada			Proporção	X ²
	A	H	B	A	H	B		
(SSR)								
Stta520	45	82	34	40,25	80,5	40,25	1:2:1	1,56 ^{ns}
Sat_79806	46	82	33	40,25	80,5	40,25	1:2:1	2,15 ^{ns}
SSR1859	38	89	34	40,25	80,5	40,25	1:2:1	1,99 ^{ns}
Sat_064	46	81	34	40,25	80,5	40,25	1:2:1	1,79 ^{ns}
(12 SNPs)								
Chr18:54391672	43	86	30	39,75	79,5	39,75	1:2:1	3,18 ^{ns}
Chr18:54912585	43	86	30	39,75	79,5	39,75	1:2:1	3,18 ^{ns}
ss715632117	44	86	30	39,75	79,5	39,75	1:2:1	3,37 ^{ns}
Chr18:55205764	44	84	31	39,75	79,5	39,75	1:2:1	2,62 ^{ns}
Chr18:56299103	46	80	33	39,75	79,5	39,75	1:2:1	2,12 ^{ns}
Chr18:55733993	46	80	33	39,75	79,5	39,75	1:2:1	2,12 ^{ns}
Chr18:56350292	44	82	33	39,75	79,5	39,75	1:2:1	1,66 ^{ns}
ss715632294	45	81	33	39,75	79,5	39,75	1:2:1	1,85 ^{ns}
ss715632317	44	82	33	39,75	79,5	39,75	1:2:1	1,66 ^{ns}
ss715632303	45	81	33	39,75	79,5	39,75	1:2:1	1,85 ^{ns}
ss715632304	45	81	33	39,75	79,5	39,75	1:2:1	1,85 ^{ns}
ss715631715 (<i>Rpp4</i>)	47	80	34	40,25	80,5	40,25	1:2:1	2,1 ^{ns}
(BSA)								
ss715632251	46	79	34	39,75	79,5	39,75	1:2:1	1,81 ^{ns}
ss715632295	45	81	33	39,75	79,5	39,75	1:2:1	1,85 ^{ns}
ss715632359	43	83	33	39,75	79,5	39,75	1:2:1	1,55

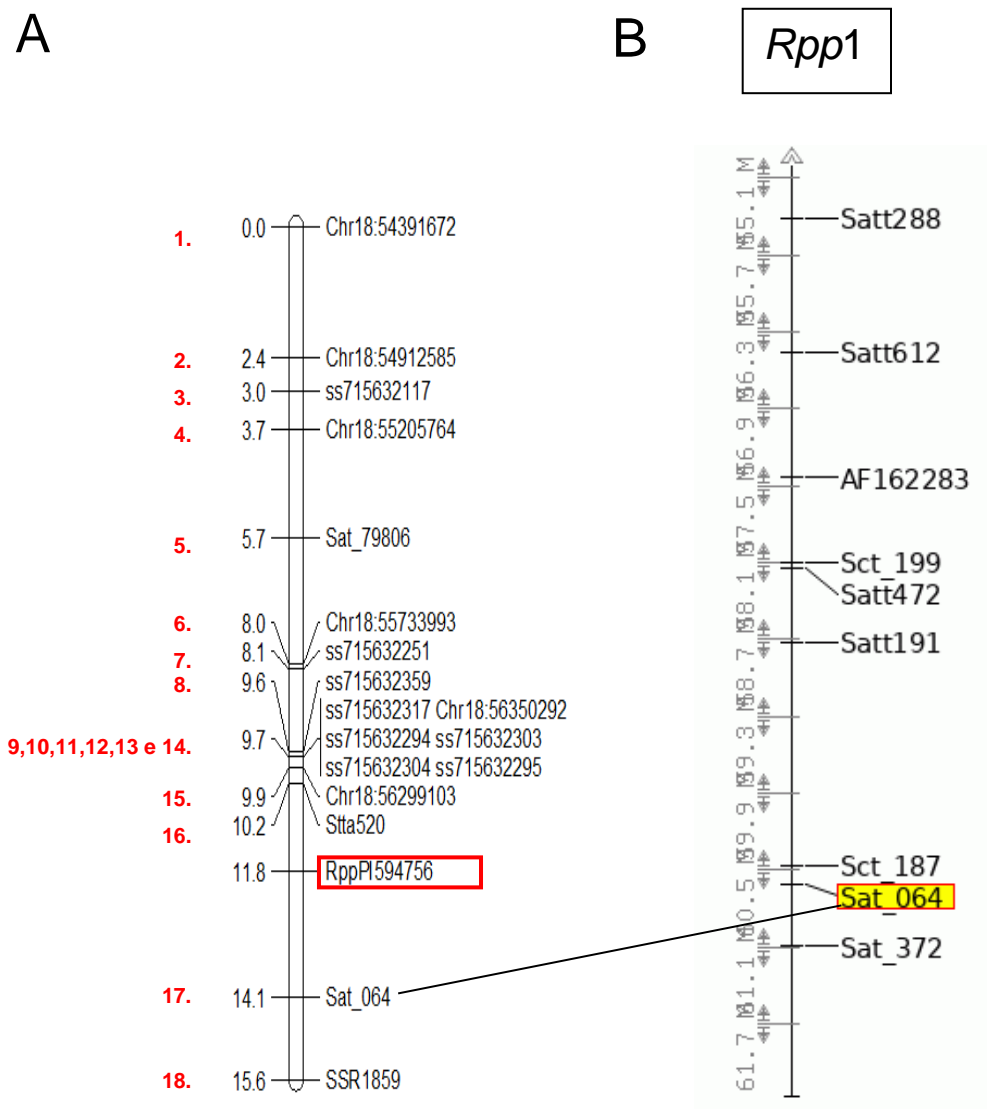
A= plantas resistentes homozigota; H= resistentes heterozigota e B= suscetível, obtidas através da fenotipagem qualitativa da F_{2:3}, inoculadas com uma população de fungos obtidos da Embrapa-Soja, safra 2016/2017.

s = significativo ao nível de 5% de probabilidade; ns= não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Obs.: A análise de segregação de 14 SNPs apresentou frequência esperada A=39,75; H= 79,5 e B=39,75, resultante de 159 indivíduos.

Fonte: o próprio autor.

Figura 4 – As imagens representam os mapas genéticos e consenso da soja, localizado em uma porção do cromossomo 18. A) Representa o mapa genético da população F₂ (161 indivíduos) integrado ao loco *Rpp1* gerados com as informações da cultivar Williams82.a2 (Gmax2.0). Os números ao lado esquerdo (cor preta) do cromossomo referem-se as distância em (cM), já os números indicados em cor vermelho representam as 18 marcas polimórficas (à direita), posicionadas na região (*Rpp1*) mapeada. À uma distância de 2,3 cM e 1,6 cM encontra-se o loco *Rpp* (PI 594756) de resistência à FAS, flanqueado pelas marcas Sat_064 e Stta520, respectivamente. B) Esta porção do mapa de ligação consenso foi gerado na página da web do Soybase, mapa físico da cultivar Williams82.a2, Soybase, (2008).



Fonte: o próprio autor.

O intervalo (2.178 Mpb) mapeado abrangendo as 18 marcas polimórficas, englobam 94 modelos gênicos (Glymas). Desses 94 modelos gênicos identificados, 24 possuem funções associadas a defesa (Tabela 8), ao passo que os demais apresentam diversas outras funções associadas ao crescimento e desenvolvimento; à processos metabólicos; ao ciclo celular; aos processos enzimáticos e catalíticos; processo de transcrição e transporte na célula e componentes estrutural (Anexo B). Dentre os 24 modelos gênicos ligados a função de defesa, apenas cinco encontram-se na região putativa (90,9 Kb) entre as marcas *Stta520* e *Sat_064* flanqueando o locus *Rpp* (PI 594756) mapeado: Glyma.18G281600 e Glyma.18G281700 (NB-ARC domain, LRR), Glyma.18G282100 (Protein Tyrosine Kinase) e Glyma.18G282200 (Protein Serine Carboxypeptidase e o Glyma.18G282000 (PH domain) (Figura 5).

Interessantemente ao se comparar o mapa físico com o mapa genético, é possível identificar uma inversão de posição entre alguns marcadores gerados pelo programa Mapchart. Tais inversões ocorrem apenas no mapeamento genético. Uma vez que o mapa de ligação consenso de soja (SONG et al., 2004) não apresenta os novos microssatélites. Assim sendo, as diferenças na posição entre os mapas ocorrem, pois, os mapas genéticos foram obtidos pela frequência de recombinação já o mapa físico é gerado através do sequenciamento do genoma da Williams82 (SCHMUTZ et al., 2010).

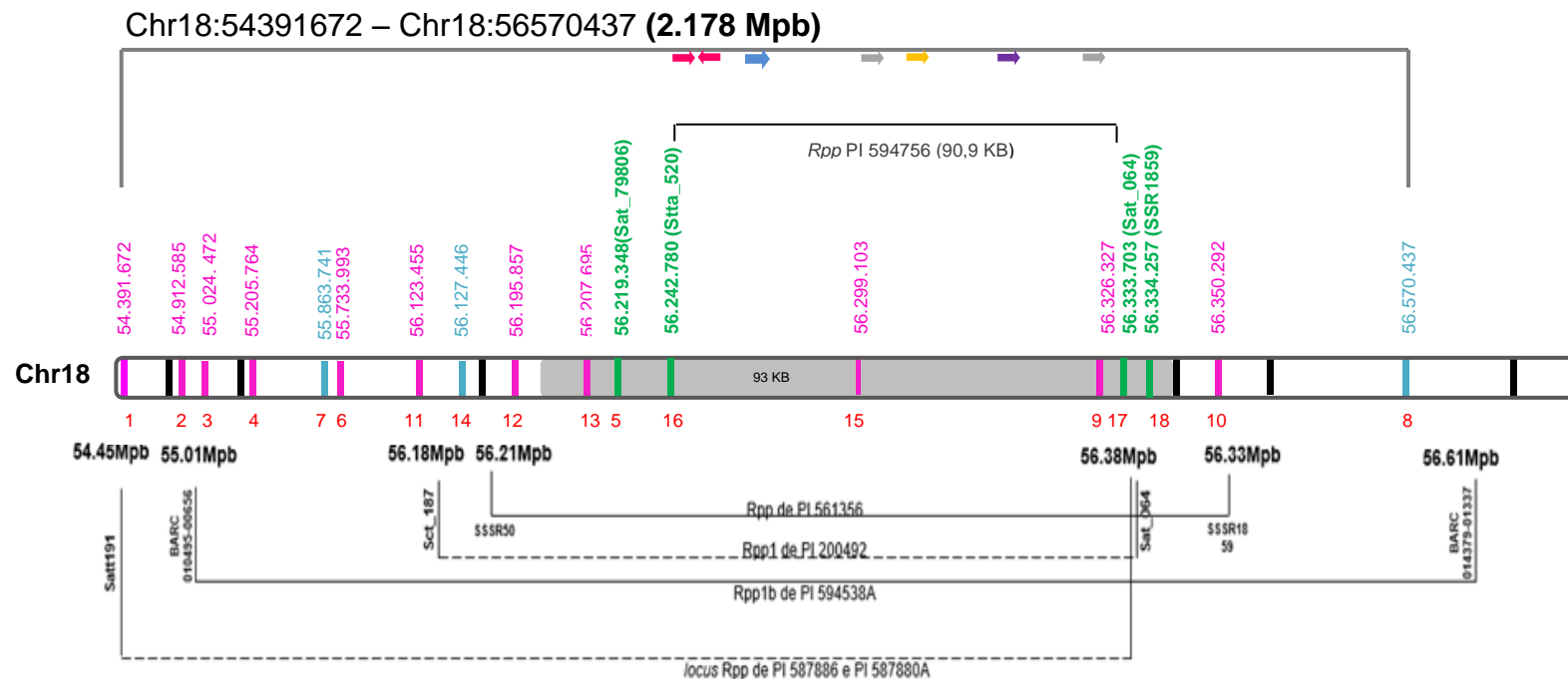
Tabela 8 – Identificação, posição no genoma e anotação funcional dos 24 Glymas com funções de defesa que englobam as 18 marcas polimórficas à FAS na região (2.178 Mpb).

Nome do locus ^a	Posição genômica ^a	Anotação Funcional	ID*
Glyma.18G268000	Chr18:55205656 – 55213313	PF13855 – Protein kinase domain, LRR	
Glyma.18G270100	Chr18:55367099 – 55370356	PF11721 – Protein tyrosine kinase	
Glyma.18G278100	Chr18:55964515 – 55967181	PTHR31319:SF10 – ZINC FINGER PROTEIN CONSTAN	
Glyma.18G278200	Chr18:55980551 – 55984677	PF08263 – Leucine rich repeat N-terminal domain; LRR	
Glyma.18G278800	Chr18:56010994 – 56013915	PF01536 – Adenosylmethionine decarboxylase	
Glyma.18G278900	Chr18:56019403 – 56022725	PF01619 – Proline dehydrogenase	
Glyma.18G280300	Chr18:56110927 – 56121368	PF00931 – NB-ARC domain; PF13855 – Leucine rich repeat, LRR	
Glyma.18G280400	Chr18:56122911 – 56126419	PF00931 – NB-ARC domain, LRR	
Glyma.18G280700	Chr18:56158545 – 56161978	PF03634 – TCP family transcription factor	
Glyma.18G280900	Chr18:56187448 – 56189322	PF06351 – Allene oxide cyclase	
Glyma.18G281400	Chr18:56218084 – 56222243	PF00847 – AP2 domain	
Glyma.18G281500	Chr18:56234929 – 56241066	PF00931 – NB-ARC domain; PF13855 – LRR	
Glyma.18G281600	Chr18:56245668 – 56252626	PF00931 – NB-ARC domain, LRR	1
Glyma.18G281700	Chr18:56264735 – 56272703	PF00931 – NB-ARC domain, LRR	2
Glyma.18G282000	Chr18:56285699 – 56294543	PH domain	3
Glyma.18G282100	Chr18:56297226 – 56300254	PF07714 – Protein tyrosine kinase	4
Glyma.18G282200	Chr18:56302289 – 56306074	PF00450 – Serine carboxypeptidase	5
Glyma.18G282500	Chr18:56330046 – 56339511	PTHR10825–SF23 - RING FINGER PROTEIN	
Glyma.18G282600	Chr18:56353572 – 56355551	PF03018 – Dirigent-like protein	
Glyma.18G283100	Chr18:56397323 – 56405619	PF00026 – Eukaryotic aspartyl protease	
Glyma.18G283200	Chr18:56406350 – 56408927	PF00931 – NB-ARC domain; LRR	
Glyma.18G283300	Chr18:56411520 – 56416642	PF00481 – Protein phosphatase 2C	
Glyma.18G283400	Chr18:56423007 – 56426460	PF00182 – Chitinase class I	
Glyma.18G284100	Chr18:56477698 – 56481600	PF08263 – Leucine rich repeat; PF00069 – Protein kinase domain; LRR	

^a: Informações obtidas no Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov>) e Soybase (<https://www.soybase.org/>). *Chr: Cromossomo . ID*: Identificação dos cinco Glymas que estão na região putativa de 90,9 Kb (setas no topo da figura 5).

Fonte: Adaptado de Aoyagi et al. (2018).

Figura 5 – Posição física de marcadores SSR, SNPs e genes candidatos mapeados na região do loco *Rpp1* no cromossomo 18 da soja. O intervalo de 2.178 Mpb representa a distância física entre as 18 marcas polimórficas indicadas no mapeamento genético. As posições verticais das marcas (cor rosa), numeradas de 1, 2, 3, 4, 6, 11, 12, 13, 15, 9 e 10 foram identificadas através do genoma referência da soja, utilizando o Soybase (<http://soybase.org/gb2/gbrowse/gmax2.0/>). As posições das marcas numeradas de 7, 14, e 8 (cor azul clara) foram identificadas via análise de BSA (estando todas associadas a resistência a FAS). Por outro lado, marcas verticais representadas em verde, estão indicando as respectivas posições dos microsstatélites, obtidas através do Phytozome v.2. Já as setas coloridas acima (vermelho- genes NB-ARC domínio, LRR; azul escuro – gene PH domain; amarelo- proteína Serine Carboxypeptidase e roxo- proteína Tyrosine Kinase) representam os cinco dos 24 Glymas, com funções associadas a defesa, localizadas no intervalo 90,9 kb (*Sat_064* e *Stta520*) do genoma da cultivar Williams82 (Phytozome v.2) e as setas em cinza indicam genes sem função ligadas a defesa dentro da mesma região (90,9kb).



Fonte: Adaptado de Kim et al. (2012).

3.4 REAÇÃO DOS ACESSOS DE SOJA AOS DIFERENTES ISOLADOS *P. PACHYRHIZI*

A análise das reações da PI 594756 comparada com as diferentes PIs previamente descritas como contendo genes *Rpp* frente a inoculação com 11 diferentes isolados *P. pachyrhizi* revelou um perfil único de reação da PI 594756, apresentando reações de resistência a todos os isolados testados. O perfil de virulência foi diferente da fonte PI 200492, primeira fonte contendo o gene *Rpp1* (HYTEN et al., 2007) e na PI 594766 (GILLI et al., 2013), assim como de seu alelo *Rpp1-b* descritos nas PI 587880A (RAY et al., 2009), PI 594760B (GARCIA et al., 2011) e 561356 (KIM et al., 2012) (Quadro 2).

Quadro 2 – Reações fenotípicas de diferentes fontes de resistência (PI) à ferrugem asiática da soja frente a diferentes isolados. Os tipos de reações são classificados em: S- reações suscetíveis (TAN) com grande quantidade de esporulação.; R- reação de resistência (RB) com baixo ou nenhum nível de esporulação.; I- resposta imune, sem sinal visível de infecção.; IM- intermediário. Diferentes respostas de reação ao fungo *P. pachyrhizi* podem ser observadas entre a fonte *Rpp* (PI 594756) e as PIs que contém os genes *Rpp1*, *Rpp1-b* indicadas em (*). (--) Indicam que os acessos não foram testados com os respectivos isolados.

Resposta de reação ao isolado <i>P. pachyrhizi</i>												
Acesso	<i>Rpp</i>	LPF2B07	Mbaracayu (Mba)	FL07.1M	ARG14.1M	AS13.4M	2003.1M	EJJP07.1M	GN13.4M	BAND15.1M	TJJP07.1M	RV14.1M
*PI 200492	<i>Rpp1</i>	S	R	R	R	R	R	R	IM	IM	S	S
*PI 594760B	<i>Rpp1</i>	--	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
*PI 594766	<i>Rpp1</i>	--	R	R	I	I	R	R	R	IM	R	IM
*PI 587880A	<i>Rpp1-b</i>	R	R	R	I	R	I	I	I	R	R	R
PI 230970	<i>Rpp2</i>	R	IM	R	R	IM	IM	R	IM	S	IM	S
PI 462312	<i>Rpp3</i>	--	S	S	S	S	S	S	S	S	IM	S
PI 459025B	<i>Rpp4</i>	IM	IM	R	R	R	R	R	IM	IM	IM	IM
PI 200487	<i>Rpp5</i>	R	R	R	R	R	R	I	IM	IM	R	IM
PI 200526	<i>Rpp5</i>	--	S	IM	S	IM	S	R	S	S	S	S
PI 567129	<i>Rpp6</i>	--	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
PI 567102B	<i>Rpp6</i>	IM	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
PI 605823	<i>Rpp7</i>	--	S	IM ou RB	S	IM	R	S	S	S	IM	S
BRS 184	--	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
PI 594756	<i>Rpp</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

Fonte: Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Soja, Londrina.

4 DISCUSSÕES

Neste trabalho, a PI 594756 apresentou reação de resistência frente ao isolado LPF2B07 e à uma população coletada nos campos experimentais da Embrapa-Soja, Londrina-PR, na safra 2016/2017, exibindo lesões fortemente RB com zero SL, NoU e OPEN NoU. De modo similar, a resistência presente nesta PI foi previamente reportada por Miles et al. (2006). Os autores avaliaram um subconjunto de 530 acessos de soja, provenientes de uma parcela de 805 acessos pertencentes ao banco de germoplasma do USDA, dos quais foram testados com quatro diferentes isolados de ferrugem. Em sequência, quando a PI 594756 foi avaliada em ensaios a campo, com fungo do Paraguai, esta apresentou lesões do tipo RB (MILES et al., 2008). No Brasil, essa PI tem revelado grande amplitude de resistência quando testada com amostras de campo e isolados monospóricos do patógeno (comunicação pessoal Marcelino-Guimarães), apresentando reações do tipo imune e de resistência a todos os isolados testados. Desse modo, tal acesso constitui importante fonte de resistência ao fungo *P. pachyrhizi*, por isso foi o foco de mapeamento neste trabalho.

As análises de segregação fenotípica do caráter nas plantas F₂ e famílias F_{2:3} revelou que o locus de resistência presente na PI 594756 se enquadrou nos padrões como um caráter dominante. Logo, o mapeamento conduzido utilizando apenas marcas ligadas aos genes *Rpp* já mapeados foi capaz de mapear assertivamente o gene no cromossomo 18, na região previamente mapeando o gene *Rpp1* (HYTEN et al., 2007). Nesse aspecto, o uso de marcadores previamente conhecidos como ligados a locos de resistência previamente mapeados teve sucesso.

A partir do mapeamento utilizando o método BSA e confirmando-se o fenótipo da F₂ a partir da análise das famílias F_{2:3}, foi possível mapear precisamente o locus presente na PI 594756 no cromossomo 18, entre as marcas: Sat_064 e Stta520. Localizado dentro de um intervalo de 90,9 Kb (56.333.703-56.242.780), as posições genéticas de ambas as marcas (Sat_064 e Stta520) mapeadas nesse estudo foram consistentes com a localização genética e física do mapa consenso G. max 4.0 e genoma G. max (versão 2.0) (<http://soybase.org>).

Diferentes trabalhos de mapeamento prévios com acessos de soja para a resistência a *P. pachyrhizi* mapeiam na mesma região no cromossomo 18 da

soja. (HYTEN et al., 2007.; CHAKRABORTY et al., 2009.; HARRIS et al. 2015.; RAY et al., 2009; ROCHA et al. 2015.; YAMANAKA et al. 2016). Embora o presente estudo não apresente os mesmos isolados e marcadores de outros estudos, todos os alelos já mapeados na região de *Rpp1* utilizando diferentes acessos sobrepõem-se à uma mesma região (93 Kb) no cromossomo 18 da soja (<http://soybase.org>) (Figura 5).

Usando SNPs, BARC-010495-00656 e BARC-014379-01337, Chakraborty et al. (2009) mapearam o mesmo locus na PI 594538A, descrevendo-o como um segundo alelo de resistência no loco *Rpp1*, denominado (*Rpp1-b*), com base na resposta diferencial destes acessos aos isolados *P. pachyrhizi* à populações de ferrugem nos EUA, em comparação com a (PI 200492). O mesmo alelo foi posteriormente descrito por Kim et al. 2012, que mapeou o loco de resistência à FAS na PI 561356 dentro de um intervalo que abrange 94,4 kb, entre os microssatélites SSR50 e SSR1859. Em subsequente analogia a essa região, Yamanaka et al. (2016), identificaram na PI 587855 o mesmo alelo (*Rpp1-b*) descrito na PI 594538A, na PI 594767A e na cultivar chinesa 'Xiao Jing Huang', distanciados a 2,1 cM do Sat_372 e à 7,4 cM do Sat_117.

Adicionalmente, Ray et al. (2009) analisando as PI 587886 e PI 587880A, mapearam novos alelos na mesma região do cromossomo 18 da soja (*Rpp1?*), num intervalo de 1,889.7 kb entre as marcas Satt191 e Sat_064. A análise da reação diferencial das PIs em comparação com a PI 200492 e a PI 594538A, frente aos isolados, TW72-1, ZM01-1 e AU79-1 permitiram concluir se tratar de um novo alelo ou gene fortemente ligado, sendo então denominada no trabalho como *Rpp1?*.

Em análises posteriores, outros acessos apresentando resistência à FAS, mapearam para a mesma região do locus *Rpp1*. Harris et al. (2015), realizando a análise de BSA mapearam para as PI 417120, PI 518295, PI 423958 a mesma reação de imunidade da PI 200492, à uma distância de 5 cM do *Rpp1* quando desafiado com diferentes tipos de isolados *P. pachyrhizi*. Por outro lado, Hossain et al. (2014) estabeleceram em seus estudos forte associação entre o alelo de resistência da PI 594767A, com o alelo *Rpp1-b* distanciados à 11,4 cM do microssatélite Sat_117 e 0,0 cM do Sat_064, quando desafiado com uma população "POP-1" de isolados. Já quando desafiado com a população de isolado "POP-2", os mesmos autores analisando a PI 587905, identificaram ambas as marcas Sat_064 e

SSR66 flanqueando o loco *Rpp1*, á uma distância de 0,2 cM. Interessantemente analisando a mesma PI 594767A, Rocha et al. (2015) identificaram nas proximidades do loco *Rpp1* um novo alelo de resistência, quando desafiado com o isolado PPUFV02 na mesma posição do Sct_187 e Sat_064 à 1,3 cM do Sat_372.

Com base nas posições físicas e genéticas obtidas no mapeamento conduzido neste trabalho não é possível afirmar que o alelo presente se trata do *Rpp1*, *Rpp1-b* ou *Rpp1?* ou ainda um gene adicional fortemente ligado. No entanto, com base na análise da resposta de virulência frente ao painel de 11 isolados diferentes, é possível afirmar que a PI 594756 apresenta um alelo diferente de *Rpp1* e *Rpp1?*, descritos nas PI 200492 e PI 587880A, respectivamente. Este alelo foi aqui denominado de *Rpp* (PI 594756). Análises das reações de virulência em comparação com a PI 594538A ou PI 561356 serão importantes para comparar o perfil com o alelo *Rpp1-b* descrito nestas PIs (CHAKRABOTY et al., 2009; KIM et al., 2012).

Ressalta-se que a região mapeada é conhecida por apresentar grande quantidade de genes ou famílias de genes de resistência. Além do locus *Rpp1* de resistência ao fungo *P. pachyrhizi*, vários outros genes/ QTLs que conferem resistência a outras doenças na cultura da soja foram identificados e mapeados para essa mesma região: *Soybean Cist Nematode* (SCN) (CAMARGO, 2010); *Sclerotinia sclerotiorum* (SDS) (ARAHANA et al., 2001); *Phytophthora* (*Rps*); e oídio (*Rmd*) (POLZIN et al., 1994; DEMIRBAS et al., 2001; NITJI et al., 2001).

Dentre os Glymas identificados na região putativa (90,9 Kb), 5 foram identificados como apresentando função de defesa, sendo que os Glyma.18G281600 e Glyma.18G281700 foram semelhantemente anotados como contendo os domínios de proteínas: LRR (*Leucine rich repeat*), domínio comumente descrito nos genes que conferem resistência em plantas, além do domínio NB-ARC. Tal domínio (NB-ARC) é constituído em suas sequências proteicas por um domínio NB (*nucleotide binding*), uma porção N-terminal efetora e um domínio de proteína LRR, participante da interação “proteína-proteína”. Por possuírem função ATPase, além da capacidade de associar-se a nucleotídeos NB, tais domínios podem estar funcionalmente atuando na sinalização e ativação das respostas de hipersensibilidade (HR) (VAN DER BIEZEN; JONES, 1998).

Considerando a elevada variabilidade do fungo e seu alto potencial evolutivo, a descoberta de novos genes ou alelos de resistência se faz fundamental

para o melhoramento genético da soja, visando o desenvolvimento de cultivares resistente à FAS.

REFERÊNCIAS

AOYAGI, L. N. **Variabilidade alélica do loci de *Rpp1* em diversos germoplasmas de soja caracterizada por GBS e resequenciamento**. 2018, 88p. Tese (Doutorado), Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Maringá, 2018.

ARAHANA, V. S.; GRAEF, G. L.; SPECHT, J. E.; STEADMAN, J. R.; ESKRIDGE, K. M. Identification of QTLs for resistance to Sclerotinia Sclerotiorum in soybean. **Crop Science**, v. 41, p. 180-188, 2001.

BROMFIELD, K. R. **Soybean rust**. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1984. 65 p.

BROMFIELD, K. R.; HARTWIG, E. E. Resistance to soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) and mode of inheritance. **Crop Science**, v. 20, n. 2, p. 254-255, 1980.

CAMARGO, P. O. **Estudo da herança de caracteres quali-quantitativos e mapeamento genético de alelos resistentes à ferrugem asiática da soja presentes nas PI561356 e PI594754**. 2010. 80p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

CASTANHO, F. M. **Caracterização estrutural e polimorfismo de genes candidatos à efetores de *Phakopsora pachyrhizi***. 2017. 68p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual do Norte do Paraná, Campus Luiz Meneghel, Bandeirantes-PR, 2017.

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 *Rpp1* from soybean PI 594538A conferring RB lesion-type resistance to soybean rust. **Crop Science**, v. 49, p. 783-790, 2009.

CHILDS, S. P.; BUCK, J. W.; LI, Z. Breeding soybeans with resistance to soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*). **Plant Breeding**, v. 137, n. 3, p. 250–41, 2018.

CHILDS, S. P.; KING, Z. R.; WALKER, D. R.; HARRIS, D. K.; PEDLEY, K. F.; BUCK, J. W.; BOERMA, H. R.; LI, Z. Discovery of a seventh Rpp soybean rust resistance locus in soybean accession PI 605823. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 131, p. 27–41, 2017.

CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM. **Parceria público pivada no combate à ferrugem asiática da soja.** 2017. Disponível em: <<http://www.consorcioantiferrugem.net/portal/>>. Acesso em: 30 jul. 2018.

DARBEN, L. M. **Obtenção e caracterização molecular e fenotípica de isolados monouredinais de *Phakopsora pachyrhizi* coletados em diferentes regiões do Brasil.** 2013. 87p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Maringá, 2013.

DA SILVA, D. C. G. **Mapeamento de genes de resistência da soja à ferrugem asiática e análise transcricional na interação patógeno-hospedeiro.** 2008. 167p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Campus de Jaboticabal, 2008.

DA SILVA, D. C. G.; YAMANAKA, N.; BROGIN, R. L.; ARIAS, C. A. A.; NEPOMUCENO, A. L.; DI MAURO, A. O.; PEREIRA, S. S.; NOGUEIRA, L. M.; PASSIANOTTO, A. L. L.; ABDELNOOR, R. V. Molecular mapping of two loci that confer resistance to Asian rust in soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, V. 11, p. 57-63, 2008.

DEMEKE, T.; JENKINS, R. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and qualification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, n. 2, p.291-311, 2012.

DEMIRBAS, A.; RECTOR, B. G.; LOHNES, D. G.; FIORITTO, R. J.; GRAEF, G. L.; CREGAN, P. B.; SHOEMAKER, R. C.; SPECHT, J. E. Simple sequence repeat markers linked to the soybean rps genes for phytophthora resistance. **Crop Science**, v. 41, n. 4, p. 1220-1227, 2001.

DUHATSCHEK, E.; SANTOS, L. A.; FARIA, C. M. D. R. Sensibilidade de isolados de *Phakopsora pachyrhizi* provenientes da região do centro oeste do Paraná a fungicidas. **Summa Phytopathologica**, v. 44, n. 2, p. 193-194, 2018.

GARCIA, A.; CALVO, É. S.; DE SOUZA KIIHL, R. A.; 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**, v. 117, n. 4, p. 545–553, 2008.

GARCIA, A.; CALVO, É. S.; KIIHL, R. A. D. S.; SOUTO, E. R. D. Evidence of a susceptible allele inverting the dominance of rust resistance in soybean. **Crop Science**, v. 51, p. 32-40, 2011.

GILLI, J.; LUCÍA, A. DE.; GHIONE, C.; HEINZ, R.; BERNARDI, C.; VELLICCE, G. **Mapeo molecular de la resistencia a la roya asiática de la soja en el genotipo PI 594766**. 2013.

GODOY, C. V.; SEIXAS, C. D. S.; SOARES, R. M.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.; MEYER, M. C.; COSTAMILAN, L. M. Asian soybean rust in Brazil: Past, present, and future. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 51, n. 5, p. 407–421, 2016.

HARRIS, D. K.; KENDRICK, M. D.; KING, Z. R.; PEDLEY, K. F.; WALKER, D. R.; CREGAN, P. B.; BUCK, J. W.; PHILLIPS, D. V.; LI, Z.; BOERMA, H. R. Identification of unique genetic sources of soybean rust resistance from the USDA soybean germplasm collection. **Crop Science**, v. 55, n. 5, p. 2161-2176, 2015.

HARTWIG, E. E. Identification of a fourth major genes conferring resistance to soybean rust. **Crop Science**, v. 26, p. 1135-36, 1986.

HARTWIG, E. E.; BROMFIELD, K. R. Relationships among three genes conferring specific resistance to rust in soybeans. **Crop Science**, v. 23, n. 2, p. 237-239, 1983.

HOSSAIN, M. M.; AKAMATSU, H.; MORISHITA, M.; MORI, T.; YAMAOKA, Y.; SUENAGA, K.; YAMANAKA, N. Molecular mapping of Asian soybean rust resistance in soybean landraces PI 594767A, PI 587905 e PI 416764. **Plant Pathology**, v. 64, p. 147-156, 2014.

HYTEN, D. L.; HARTMAN, G. L.; NELSON, R. L.; FREDERICK, R. D.; CONCIBIDO, V. C.; NARVEL, J. M.; CREGAN, P. B. Map location of the Rpp1 locus that confers resistance to soybean rust in soybean. **Crop Science**, v. 47, n. 2, p. 837-838, 2007.

KATO, M; YORINORI, J. T (2008). **A study on a race composition of Phakopsora pachyrhizi in Brazil: a difficulty of race identification**. JIRCAS Working Rep 58.

KEIM, P.; OLSON, T. C.; SHOEMAKER, R. C. A rapid protocol for isolating DNA. **Soybean Genetics Newsletter**, v. 15, p. 150-152, 1988.

KIM, K. S.; UNFRIED, J. R.; HYTEN, D. L.; FREDERICK, R. D.; HARTMAN, G. L.; NELSON, R. L.; DIERS, B. W. Molecular mapping of soybean rust resistance in soybean accession PI 561356 e SNP haplotype analysis of the Rpp1 region in diverse germplasm. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 125, p.1339-1352, 2012.

LEMOS, N. G.; DE E BRACCINI, A. L.; ABDELNOOR, R. V.; DE OLIVEIRA, M. C. N.; SUENAGA, K.; YAMANAKA, N. Characterization of genes *Rpp2*, *Rpp4*, and *Rpp5* for resistance to soybean rust. **Euphytica**, v. 182, n. 1, p. 53–64, 2011.

LEVY, C. Epidemiology and Chemical Control of Soybean Rust in Southern Africa. **Plant Disease**, v. 89, n. 6, p. 669–674, 2005.

LI, S.; SMITH, J. R.; RAY, J. D.; FREDERICK, R. D. Identification of a new soybean rust resistance gene in PI567102B. **Theoretical Applied Genetics**, v.125, p.133-142, 2012.

MCLEAN, R. J.; BYTH, D. E. Inheritance of Resistance To Rust (*Phakopsora-Pachyrhizi*) in Soybeans. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 31, n. 5, p. 951–956, 1980.

MICHELMORE, R.; PARAN, I.; KESSELI, R. 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 segregating populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.88, n. 21, p. 9828-9832, Nov. 1991.

MILES, M. R.; FREDERICK, R. D.; HARTMAN, G. L. Evaluation of soybean germplasm for resistance to *Phakopsora pachyrhizi*. **Plant Health Progress**, v. 10, p. 34-46, 2006.

MILES, M. R.; MOREL, W.; RAY, J. D.; SMITH, J. R.; FREDERICK, R. D.; HARTMAN, G. L. Adult plant evaluation of soybean accessions for resistance to *Phakopsora pachyrhizi* in the field and greenhouse in Paraguay. **Plant Disease**, v. 92, p. 96-105, 2008.

NJITI, V. N.; MEKSEM, K.; IQBAL, M. J.; JOHNSON, J. E.; KASSEM, M. A.; ZOBRIK, K. F.; KILO, V. Y.; LIGHTFOOT, D. A. Common loci underlie field resistance to soybean sudden death syndrome in Forrest, Pyramid, Essex, and Douglas. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.104, n.2, p.294-300, February 2001.

POLZIN, K. M.; LOHNES, D. G.; NICKELL, C. D.; SHOEMAKER, R. C. Integration of *Rps2 Rmd* and *Rj2* into linkage group-J of the soybean molecular map. **Journal of Heredity**, Cary, v. 85, n. 4, p. 300-303, July 1994.

RAY, J. D.; MOREL, W.; SMITH, J. R.; FREDERICK, R. D.; MILES, M. R. Genetics and mapping of adult plant rust resistance in soybean PI 587886 e PI 587880A. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 119, n. 2, p. 271-280, 2009.

ROCHA, C. M. L. .; VELLICCE, G. R. .; GARCÍA, M. G. .; PARDO, E. M. .; RACEDO, J. .; PERERA, M. F. .; DE LUCÍA, A. .; GILLI, J. .; BOGADO, N. .; BONNECARRÈRE, V. .; GERMAN, S. .; MARCELINO, F. .; LEDESMA, F. .; REZNIKOV, S. .; PLOPER, L. D. .; WELIN, B. .; CASTAGNARO, A. P. Use of AFLP markers to estimate molecular diversity of *Phakopsora pachyrhizi*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 6, p. 439–444, 2015.

SCHMUTZ, J.; CANNON, S. B.; SCHLUETER, J.; MA, J.; MITROS, T.; NELSON, W.; HYTEN, D. L.; SONG, Q.; THELEN, J. J.; CHENG, J.; XU, D.; HELLSTEN, U.; MAY, G. D.; YU, Y.; SAKURAI, T.; UMEZAWA, T.; BHATTACHARYYA, M. K.; SANDHU, D.; VALLIYODAN, B.; LINDQUIST, E.; PETO, M.; GRANT, D.; SHU, S.; GOODSTEIN, D.; BARRY, K.; FUTRELL-GRIGGS, M.; ABERNATHY, B.; DU, J.; TIAN, Z.; ZHU, L.; GILL, N.; JOSHI, T.; LIBAULT, M.; SETHURAMAN, A.; ZHANG, X. C.; SHINOZAKI, K.; NGUYEN, H. T.; WING, R. A.; CREGAN, P.; SPECHT, J.; GRIMWOOD, J.; ROKHSAR, D.; STACEY, G.; SHOEMAKER, R. C.; JACKSON, S. A. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. **Nature**, v. 463, n. 7278, p. 178–183, 2010.

SONG, Q.; HYTEN, D. L.; JIA, G.; QUIGLEY, C.V.; FICKUS, E. W.; NELSON, R. L.; CREGAN, P. B. Development and avaluation of SoySNP50K, ahigh-density genotyping array for soybean. **Plos one**. v. 8, n. 1, p.1-12, 2013.
SONG, Q.; JIA, G.; HYTEN, D. L.; JENKINS, J.; HWANG, E. Y.; SCHROEDER, S. G.; OSORNO, J. M.; SCHMUTZ, J.; JACKSON, S. A.; McCLEAN, P. E.; CREGAN, P. B. SNP Assay development for linkage map construction, anchoring whole-genome sequence, and other genetic and genomic applications in common bean. **Genes, Genomes, Genetics**, v. 5, n.11, p. 2285-2290, 2015.

USDA. **World agricultural production**. 2018. Disponível em <<http://www.ipad.fas.usda.gov/cropexplorer/>>. Acesso em: 07Jul. 2018.

VAN DER BIEZEN, E. A.; JONES, J. D. The NB-ARC domain a novel signaling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals. **Current biology**: CB, v. 8, p. 226-227, 1998.

VAN OOIJEN, J. W. **JoinMap® 4, software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations**. Kyazma BV, Wagenibgen, 2006.

YAMANAKA, N.; LEMOS, N. G.; AKAMATSU, H.; YAMAOKA, Y.; SILVA, D. C. G.; PASSIANOTTO, A. L. L.; ABDELNOOR, R. V.; SOARES, R. M.; SUENAGA, K.

Soybean breeding materials useful for resistance to soybean rust in Brazil. **Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ**, v. 45, n. 4, p. 385-395, 2011.

YAMANAKA, N.; YAMAOKA, Y.; KATO, M.; LEMOS, N. G.; PASSIANOTTO, A. L. de L.; DOS 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**, v. 35, n. 3, p. 153-162, 2010.

YAMANAKA, N.; MORISHITA, M.; MORI, T.; MURAKI, Y.; HASEGAWA, M.; HOSSAIN, M. M.; KATO, M. The locus for resistance to Asian soybean rust in PI 587855. **Plant Breeding**, v. 135, n. 5, p. 621-626, 2016.

YORINORI, J. T.; PAIVA, W. M.; FREDERICK, R. D.; COSTAMILAN, L. M.; BERTAGNOLLI, P. F.; HARTMAN, G. L.; GODOY, C. V.; NUNES, J. Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. **Plant Disease**, v. 89, n. 6, p. 675-677, 2005.

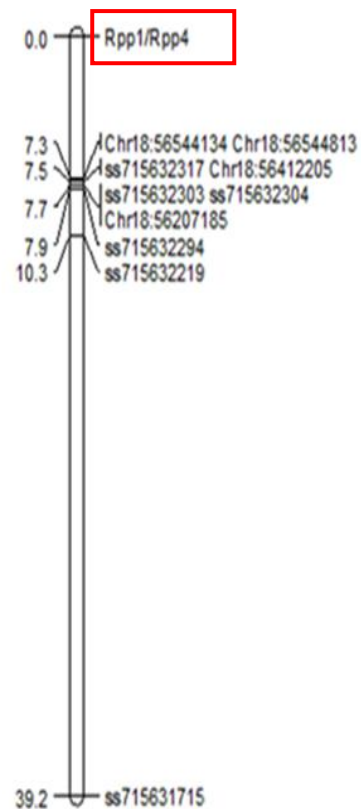
CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, a análise de mapeamento genético, utilizando as metodologias Next-Gen PlexSeq e soySNP6K mapearam o gene aqui referido *Rpp* (PI 594756) dentro de uma região putativa (90,9 kb) à 2,3 cM do Sat_064 e 1,6 cM do Stta520 no cromossomo 18 da soja, na mesma região contendo o locus *Rpp1*, com LOD score igual 3. No entanto, baseado nas posições físicas e genéticas obtidas no presente mapeamento não foi possível afirmar que o alelo presente, seja o mesmo do *Rpp1*, *Rpp1-b*, *Rpp1?* ou ainda um gene adicional fortemente ligado a eles. Entretanto, a partir da análise da resposta de virulência a 11 isolados diferentes, foi possível afirmar que a PI 594756 apresenta um alelo diferente de *Rpp1* e *Rpp1?*. Deste modo, análises das reações de virulência em comparação com a PI 594538A ou PI 561356 serão importantes para fins de comparação com o alelo *Rpp1-b* descrito nestas PIs.

Em última análise, objetivando a realização de trabalhos posteriores, faz-se necessário a identificação de indivíduos recombinantes informativos na população F_{2:3} segregante (161 indivíduos). A partir dos dados obtidos nessa população, será montada uma tabela com as categorias de recombinantes encontrados. Deste modo, essa tabela indicará o fenótipo e o genótipo dos SNPs pertencentes a cada categoria. Os SNPs devem estar ordenados de acordo com sua posição física e com isso, a partir da análise de haplótipos, será possível identificar entre os marcadores SNPs, onde encontra-se o loco de resistência à ferrugem asiática da soja e dessa forma, desenvolver técnicas que minimizem os riscos e perdas causados por esses patógenos, nas quais tem afetado diretamente a qualidade, e produção da cultura da Soja.

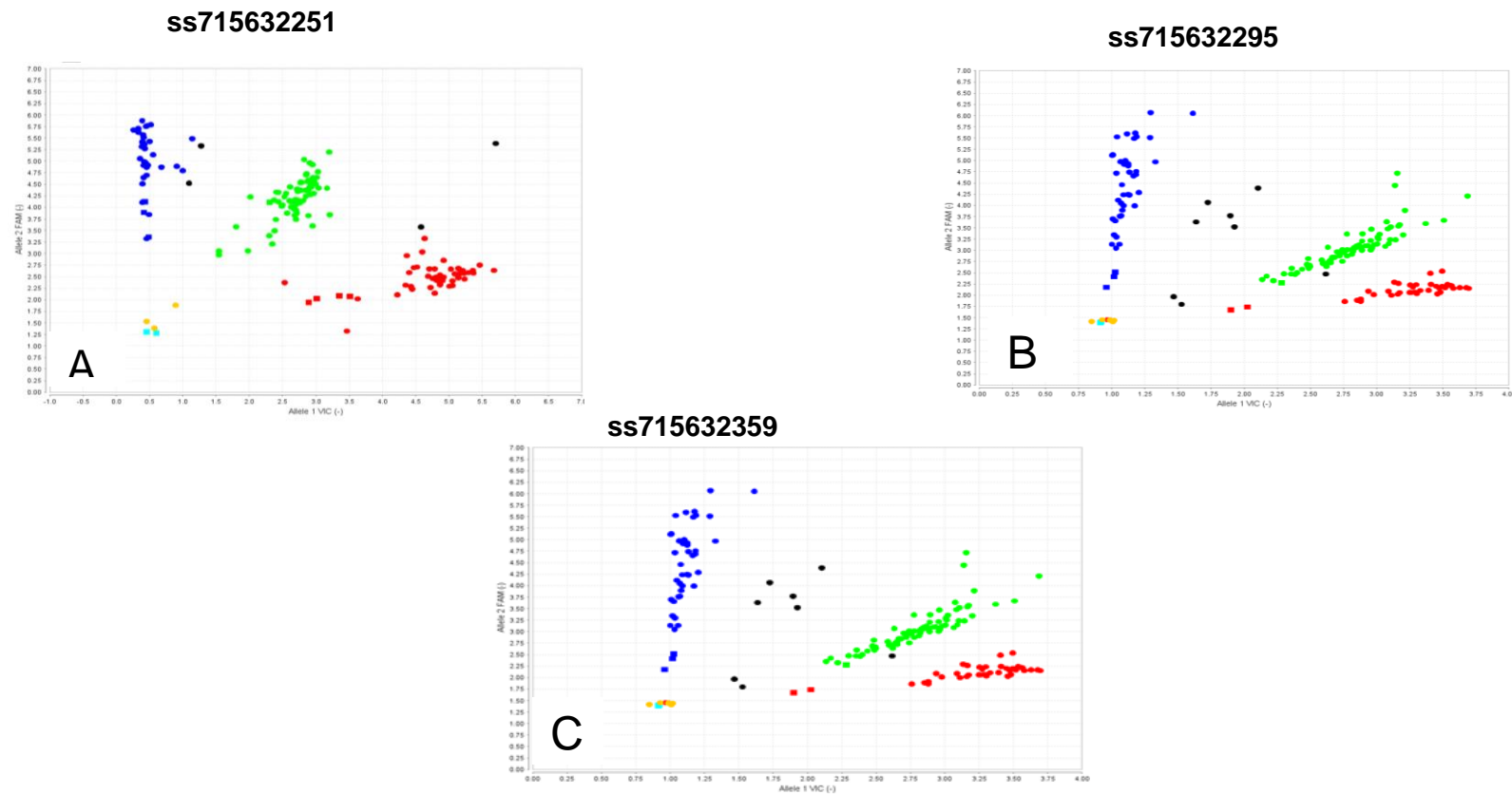
APÊNDICES

APÊNDICE A – A figura está representando o mapeamento genético da população F₂ (217 indivíduos) ao longo do cromossomo 18 da soja, utilizando marcadores ligados aos genes *Rpp* previamente mapeados. No mapa, os marcadores Chr18:56544134 e Chr18:56544813 mapearam à uma distância de 7,3 cM o gene denominado (*Rpp1/Rpp4*), presente na PI 594756 de resistência à FAS. Ao lado esquerdo da figura estão indicadas as distâncias em cM. Enquanto ao lado direito, estão representadas as marcas que foram polimórficas e aplicadas ao mapeamento.



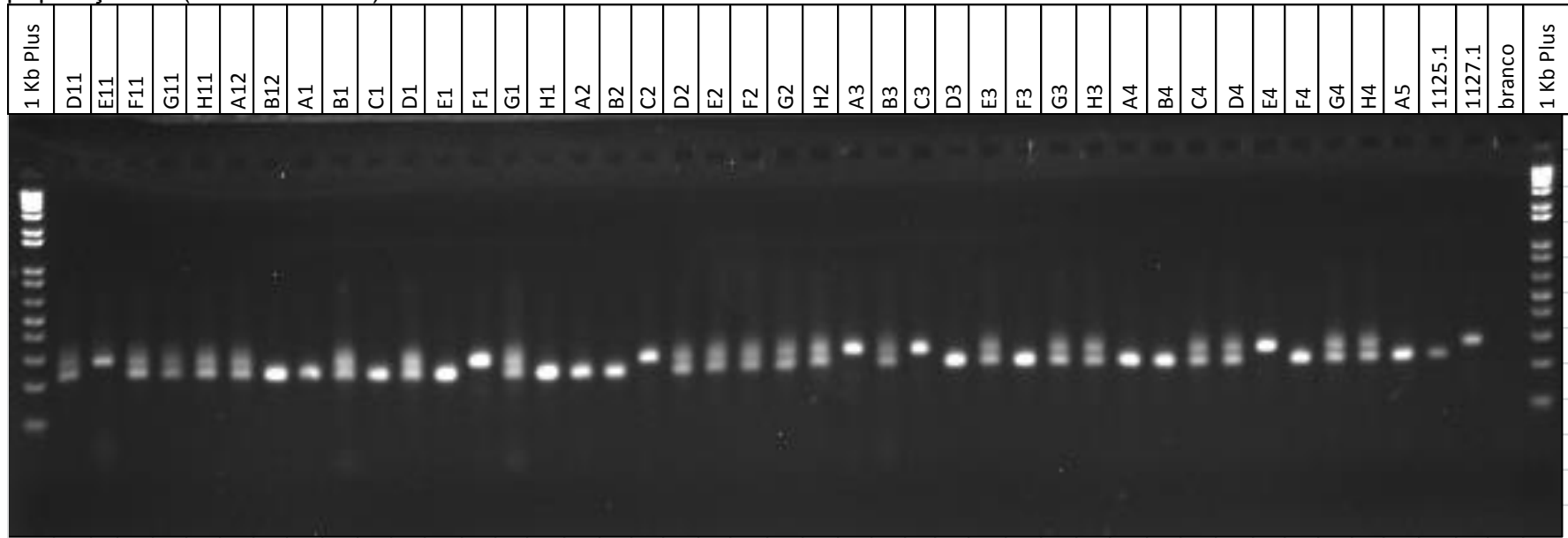
Fonte: o próprio autor.

APÊNDICE B – As imagens representam as ampliações e genotipagens realizadas pela metodologia Taqman de 161 amostras distribuídas no eixo “x” e “y (pontos coloridos). A figura A representa o ensaio com o marcador ss715632251, a figura B com o ss715632295 e a figura C com o ss715632359. Para os ensaios A e B, as pontuações em azul escuro representam as amostras amplificadas pelos oligonucleotídeos marcados por sonda FAM/FAM (resistente), os pontos em verdes por sonda VIC/FAM (heterozigoto) e os vermelhos por sonda VIC/VIC (suscetíveis). Para o ensaio C, as pontuações em azul escuro representam amostras amplificadas pelos oligonucleotídeos marcados por sonda VIC/VIC (resistentes), pontos em verde marcados por sondas VIC/FAM (heterozigoto) e os pontos em vermelho marcados com sonda FAM/FAM (suscetível).



Fonte: o próprio autor.

APÊNDICE C – Eletroforese em gel de agarose (synergel) ilustrando a amplificação do microssatélite Stta520 em parte da população F₂ (161 indivíduos) avaliada.



* 1kb Plus: peso molecular do respectivo marcador.

Fonte: o próprio autor.

ANEXOS

ANEXO A – Marcadores microssatélites (SSR) selecionados para análise de genotipagem à população F₂ (161 indivíduos).

Marcador	Tipo	Sequência do primer Reverse	Sequência do primer Forward	GL	Início	Fim	Genótipo Utilizado
*Sat_064	SSR	gtatgcaagggattaattaag	tagctttataatgagtgtagat	G	56333703	56333845	Williams
*Sat_117	SSR	gctggatcgcagta	ttggcagttctttag	G	58879539	58879586	Williams
*Sat_372	SSR	gcgagtttgtaacatcgagtattgat	gcgtctcgaggaattatctattatctttt	G	56797468	56968533	Williams
*Satt191	SSR	gggagttggtgtttcttctg	cgcgatcatgtctctg	G	54450956	54451181	Williams
*Satt472	SSR	gcgttctataaattcattcatagtttcaat	gcgaatacataaaactcaaattcaaatacata	G	53866536	53866808	Williams
*Satt612	SSR	gcgcttttagtctctgaaagtattt	gtcactgggtgttctattatgac	G	52181721	52181952	Williams
*Sct_199	SSR	gcgatttctatttctcacagtg	gcgacaatggctattagtaacaatca	G	53823764	53823972	Williams
*Satt 199	SSR	gcgtttcatcaggtgtttgcctat	gcggtaaatggtgaaaatcattatggtt	G	48185138	48185329	Williams
*Sat_288	SSR	gcgggaaggtaggtaaagaaaattcaaataga	gcgacagactgcaagaattgatgtaaatct	G	19169342	19169569	Williams
*SSR1859	SSR	gcctccaactcatgtttcaa	ctcaatcgcacaccttgata	G	56334257	56334276	Williams
**Sttta2915	SSR	gaggcctttattgttagga	ctttataccgggcaccctta	G	2915	2929	Williams
**Staaa18593	SSR	cagaaacctccactttctgtg	agtttgcgtttgatggacaa	G	18593	18607	Williams
**Saaat47951	SSR	ctagttgatgcaaagctgacg	ttggtttggaaggggaaat	G	47951	47966	Williams

Negrito (vermelho): Representam SSR polimórficos. **Fonte:** *Marcadores SSR obtidos no Soybase: (<http://soybase.org/gb2/gbrowse/gmax2.0/>).;

**Marcadores SSR desenvolvidos por Camargo (2010), identificados no grupo de ligação G da soja.

ANEXO A – continuação

Marcador	Tipo	Sequência do primer Reverse	Sequência do primer Forward	GL	Início	Fim	Genótipo Utilizado
**Sгааag63014	SSR	ggttgttttcccttgttgac	ttaatcttgaaaccgcact	G	63014	63028	Williams
**Stttta105090	SSR	tccatgagtacgggtgaat	tgtgaccaccaacgtttctt	G	105090	105108	Williams
**Sat_32791	SSR	tgtgtgcgtaaggagatca	tgctgcaagttcactgatt	G	32791	32825	Williams
**Sc_66262	SSR	aacaagaacggatccacctg	tctctcacatgtaccatccttg	G	66262	66280	Williams
**Sat_79806	SSR	gccacctctacaccaacaca	atgaccaacaatggctttca	G	70806	79842	Williams
**Sat_109421	SSR	cacaactctcccgtgtgttt	ccgttagcgtgacatgaaaa	G	109421	109440	Williams
**Stta520	SSR	caccaatattttatttcctttgttga	tgcaaggaagtctgccaat	G	520	544	Williams
**Sgt_1150	SSR	gggaaaagagaggcatttca	caatttagtgcgacattttattga	G	1150	1164	Williams
**Sat_6421	SSR	ttttcaatgaaggtggaatct	ccgttagcgtgacatgaaaa	G	6421	6440	Williams
**Sga_10904	SSR	ctgttgcccgcactataaca	cccaagttgaggaagtgagg	G	10904	10920	Williams
**Stat13537	SSR	aggatgagagtaaggtgtgg	caaacaattattctgtctccaaa	G	13537	13563	Williams
**St_25273	SSR	cccttgatagcctttt	ttcaagattcttaggtgcagtg	G	25273	25287	Williams
**Stta31540	SSR	aggatgccagtaaggtgtgg	aacaaccgcataaatgctc	G	31540	31555	Williams

Negrito (vermelho): Representam SSR polimórficos. **Fonte:** *Marcadores SSR obtidos no Soybase: (<http://soybase.org/gb2/gbrowse/gmax2.0/>).;

**Marcadores SSR desenvolvidos por Camargo (2010), identificados no grupo de ligação G da soja.

ANEXO A – continuação

Marcador	Tipo	Sequência do primer Reverse	Sequência do primer Forward	GL	Início	Fim	Genótipo Utilizado
**Sc_41970	SSR	gaggcatcaactgtcaagca	accagagcaatgcaaacaca	G	41970	41994	Williams
**Stac53280	SSR	accagttttgtcgcagaag	cggtgactaacaacccaac	G	53280	53294	Williams
**Stat61788	SSR	agccaaagaacaaggggtt	tgagaatgggggaaaaagt	G	61788	61803	Williams
**Sgaa64750	SSR	caaggatccgtttccat	gaggggtcgactatccatca	G	64750	64764	Williams
**Scca86517	SSR	ccctcgactccaaatgta	gatggaaaagacgcatactg	G	86517	86532	Williams
**Sta_89568	SSR	ccatccaaccttctgaat	atccactctggctgctgatt	G	89568	89631	Williams
**Stttta2090	SSR	tccatgagtacgggttgaat	acatttcttaacacataaaaacatca	G	2090	2108	Williams
**Saagt61874	SSR	gccaagctgaaggagtagga	tgagaatgggggaaaaagt	G	61874	61888	Williams
**Statt64311	SSR	ttgggaaatgtgaaggaagg	ggataggcgagattcgtgag	G	64311	64328	Williams
**Sagttt70211	SSR	gaagagcctctggacaatgg	ttgtagtcattggcgtcttgc	G	70211	70225	Williams
**Scgaaca79479	SSR	cgaagaggaaaagcaaacg	aagcaactcgtcatcgacct	G	79479	79496	Williams

Fonte: *Marcadores SSR obtidos no Soybase: (<http://soybase.org/gb2/gbrowse/gmax2.0/>).; **Marcadores SSR desenvolvidos por Camargo (2010), identificados no grupo de ligação G da soja.

ANEXO B – Identificação, posição no genoma e anotação funcional dos 94 Glymas com diferentes tipos de funções, que englobam a região de (2.178Mpb) entre as 18 marcas polimórficas à FAS.

Nome do locus ^a	Posição genômica ^a	Anotação Funcional
Glyma.18G263900	Chr18:54907058 – 54912936	PTHR10217–SF501 - CYCLIC NUCLEOTIDE-GATED ION CHANNEL 2
Glyma.18G265600	Chr18:55024122 – 55024816	PTHR24286–SF66 - CYTOCHROME
Glyma.18G268000	Chr18:55205656 – 55213313	PF13855 – Protein kinase domain, LRR
Glyma.18G270100	Chr18:55367099 – 55370356	PF11721 – Protein tyrosine kinase
Glyma.18G275200	Chr18:55733594 – 55753376	E3 ubiquitin-protein ligase UBR4
Glyma.18G271900	Chr18:55493601 – 55497764	SF3 – COBRA-LIKE EXTRACELLULAR GLYCOSYL-PHOSPHATIDYL
Glyma.18G272800	Chr18:55569073 – 55572249	K04730 – interleukin-1 receptor-associated kinase 1
Glyma.18G276100	Chr18:55828898 – 55829787	PTHR33184-SF11 –BETA-1,3-N- ACETYLGLUCOSAMINYLTRANSFERASE FAMILY
Glyma.18G276200	Chr18:55832841 – 55845279	PROTEIN K10908 – DNA-directed RNA polymerase,mitochondrial
Glyma.18G276300	Chr18:55846093 – 55853463	PTHR23308:SF2 – KANADAPTIN
Glyma.18G276400	Chr18:55856703 – 55857803	–
Glyma.18G276500	Chr18:55861770 – 55865686	PF01535//PF13041 – PPR repeat (PPR)
Glyma.18G276600	Chr18:55866582 – 55869929	K17710 – pentatricopeptide repeat domain
Glyma.18G276700	Chr18:55870778 – 55872454	–
Glyma.18G276800	Chr18:55873039 – 55876738	K14207 – solute carrier family 38
Glyma.18G276900	Chr18:55885009 – 55890555	PTHR35705–SF1 – WPP DOMAIN
Glyma.18G277000	Chr18:55891640 – 55895016	PF01535//PF13041//PF14432 - PPR repeat (PPR)
Glyma.18G277100	Chr18:55913585 – 55914521	PTHR22952:SF201 - BASIC LEUCINE-ZIPPER
Glyma.18G277200	Chr18:55915691 – 55916809	–
Glyma.18G277300	Chr18:55917312 – 55920484	K00033 - 6-phosphogluconate dehydrogenase
Glyma.18G277400	Chr18:55922710 – 55923495	–
Glyma.18G277500	Chr18:55923773 – 55924841	–
Glyma.18G277600	Chr18:55931856 – 55932610	–
Glyma.18G277700	Chr18:55943605 – 55944250	–
Glyma.18G277800	Chr18:55950684 – 55951016	–
Glyma.18G278000	Chr18:55956758 – 55960739	K14820 – ribosome biogenesis protein BRX
Glyma.18G278100	Chr18:55964515 – 55967181	PTHR31319:SF10 – ZINC FINGER PROTEIN CONSTAN
Glyma.18G278200	Chr18:55980551 – 55984677	PF08263 – Leucine rich repeat N-terminal domain; LRR
Glyma.18G278300	Chr18:55991048 – 55996455	–
Glyma.18G278400	Chr18:55998387– 56002158	PF01535 – PPR repeat; PF13041 - PPR repeat family

Chr: Cromossomo.; Mpb: Mega pares de base.

Fonte: ^a: Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov>) e Soybase (<https://www.soybase.org/>).

ANEXO B – continuação

Nome do locus ^a	Posição genômica ^a	Descrição Funcional
Glyma.18G278500	Chr18:56003106 – 56004162	PF08659 – KR domain
Glyma.18G278600	Chr18:56005545 – 56006375	–
Glyma.18G278700	Chr18:56009037 – 56009870	–
Glyma.18G278800	Chr18:56010994 – 56013915	PF01536 – Adenosylmethionine decarboxylase
Glyma.18G278900	Chr18:56019403 – 56022725	PF01619 – Proline dehydrogenase
Glyma.18G279000	Chr18:56023788 – 56029617	PF03878 – YIF1
Glyma.18G279100	Chr18:56025028 – 56025339	–
Glyma.18G279200	Chr18:56030433 – 56033542	PF05158 – RNA polymerase Rpc34 subunit
Glyma.18G279300	Chr18:56034493 – 56035229	–
Glyma.18G279400	Chr18:56037157 – 56041783	PF10143 – 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase
Glyma.18G279500	Chr18:56042606 – 56052443	PF12895 – Anaphase-promoting complex, cyclosome, subunit 3
Glyma.18G279600	Chr18:56054299 – 56061027	–
Glyma.18G279700	Chr18:56065123 – 56066082	–
Glyma.18G279800	Chr18:56074203 – 56079350	PF14416 – PMR5 N terminal Domain
Glyma.18G279900	Chr18:56084932 – 56088020	PF14416 – PMR5 N terminal Domain
Glyma.18G280000	Chr18:56093039 – 56095398	–
Glyma.18G280100	Chr18:56094747 – 56095007	PF01277 – Oleosin
Glyma.18G280200	Chr18:56100685 – 56107771	PF00069 – Protein kinase domain; PF07714 – Protein tyrosine kinase
Glyma.18G280300	Chr18:56110927 – 56121368	PF00931 – NB-ARC domain; PF13855 – Leucine rich repeat, LRR
Glyma.18G280400	Chr18:56122911 – 56126419	PF00931 – NB-ARC domain, LRR
Glyma.18G280500	Chr18:56128100 – 56135781	–
Glyma.18G280600	Chr18:56141403 – 56147728	PF01008 – Initiation factor 2 subunit family
Glyma.18G280700	Chr18:56158545 – 56161978	PF03634 – TCP family transcription factor
Glyma.18G280800	Chr18:56181686 – 56182443	PF08137 – DVL family
Glyma.18G280900	Chr18:56187448 – 56189322	PF06351 – Allene oxide cyclase
Glyma.18G281000	Chr18:56200332 – 56205303	–
Glyma.18G281100	Chr18:56206467 – 56208314	PF13656 – RNA polymerase Rpb3/Rpb11 dimerisation domain
Glyma.18G281200	Chr18:56210047 – 56212089	PF01248 – Ribosomal protein L7Ae/L30e/S12e/Gadd45 family
Glyma.18G281300	Chr18:56213291 – 56216398	PF00583 – Acetyltransferase (GNAT) family
Glyma.18G281400	Chr18:56218084 – 56222243	PF00847 – AP2 domain
Glyma.18G281500	Chr18:56234929 – 56241066	PF00931 – NB-ARC domain; PF13855 – LRR

Chr: Cromossomo.; Mpb: Mega pares de base.

Fonte: ^a: Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov>) e Soybase (<https://www.soybase.org/>).

ANEXO B – continuação

Nome do locus ^a	Posição genômica ^a	Descrição Funcional
Glyma.18G281600	Chr18:56245668 – 56252626	PF00931 – NB-ARC domain, LRR
Glyma.18G281700	Chr18:56264735 – 56272703	PF00931 – NB-ARC domain, LRR
Glyma.18G281800	Chr18:56277508 – 56281660	PF13837 – SANT-like DNA-binding domain
Glyma.18G281900	Chr18:56285101 – 56285349	–
Glyma.18G282000	Chr18:56285699 – 56294543	<i>PH domain</i>
Glyma.18G282100	Chr18:56297226 – 56300254	PF07714 – Protein tyrosine kinase
Glyma.18G282200	Chr18:56302289 – 56306074	PF00450 – Serine carboxypeptidase
Glyma.18G282300	Chr18:56314635 – 56321590	PF00533 – BRCA1 C Terminus (BRCT) domain;
Glyma.18G282400	Chr18:56323046 – 56324310	PF07647 – SAM domain (<i>Sterile alpha motif</i>)
Glyma.18G282500	Chr18:56330046 – 56339511	PTHR10825–SF23 - RING FINGER PROTEIN
Glyma.18G282600	Chr18:56353572 – 56355551	PF03018 – Dirigent-like protein
Glyma.18G282800	Chr18:56377928 – 56395985	PF08506 – Cse1; PF03810 - Importin-beta N-terminal domain
Glyma.18G282900	Chr18:56387634 – 56388991	–
Glyma.18G283000	Chr18:56389043 – 56391457	–
Glyma.18G283100	Chr18:56397323 – 56405619	PF00026 – Eukaryotic aspartyl protease
Glyma.18G283200	Chr18:56406350 – 56408927	PF00931 – NB-ARC domain; LRR
Glyma.18G283300	Chr18:56411520 – 56416642	PF00481 – Protein phosphatase 2C
Glyma.18G283400	Chr18:56423007 – 56426460	PF00182 – Chitinase class I
Glyma.18G283500	Chr18:56428413 – 56430831	PF00786 – P21-Rho-binding domain
Glyma.18G283600	Chr18:56435985 – 56437478	PF03016 – Exostosin family
Glyma.18G283700	Chr18:56440957 – 56442558	PF03016 – Exostosin family
Glyma.18G283800	Chr18:56445016 – 56451963	PF07889 – Protein of unknown function (DUF1664)
Glyma.18G283900	Chr18:56453767 – 56460708	PF08774 – VRR-NUC domain
Glyma.18G284000	Chr18:56462668 – 56468361	–
Glyma.18G284100	Chr18:56477698 – 56481600	PF08263 – Leucine rich repeat; PF00069 – Protein kinase domain; LRR
Glyma.18G284300	Chr18:56489793 – 56496952	PF00282 – Pyridoxal-dependent decarboxylase conserved domain
Glyma.18G284400	Chr18:55861770 – 55865686	PF01535//PF13041 - PPR repeat , PPR
Glyma.18G284500	Chr18:56514365 – 56517519	–
Glyma.18G284600	Chr18:56525770 – 56534088	PF02781 – Glucose-6-phosphate dehydrogenase, C-terminal domain; PF00479
Glyma.18G284700	Chr18:56542358 – 56545578	PF01842 – ACT domain
Glyma.18G284800	Chr18:56547660 – 56552282	PF04909 – Amidohydrolase
Glyma.18G284900	Chr18:56556144 – 56557078	PF00612//PF02179 - IQ calmodulin-binding motif (IQ)

Chr: Cromossomo.; Mpb: Mega pares de base.

Fonte: ^a: *Phytozome* (<https://phytozome.jgi.doe.gov>) e *Soybase* (<https://www.soybase.org/>).