



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ADRIANO CONSONI CAMOLESE

**PODRIDÃO RADICULAR DE FITÓFTORA EM SOJA:  
IDENTIFICAÇÃO DE UM GENE RECESSIVO DE  
RESISTÊNCIA E VALIDAÇÃO DE *SNPs* PARA EMPREGO EM  
SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES MOLECULARES**



**Universidade Estadual de Londrina**

**Instituto Agrônomo do Paraná**

**Empresa Brasileira de Pesquisa**

**Agropecuária**

---

ADRIANO CONSONI CAMOLESE

**PODRIDÃO RADICULAR DE FITÓFTORA EM SOJA:  
IDENTIFICAÇÃO DE UM GENE RECESSIVO DE  
RESISTÊNCIA E VALIDAÇÃO DE *SNPs* PARA EMPREGO EM  
SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES MOLECULARES**

ADRIANO CONSONI CAMOLESE

**PODRIDÃO RADICULAR DE FITÓFTORA EM SOJA:  
IDENTIFICAÇÃO DE UM GENE RECESSIVO DE  
RESISTÊNCIA E VALIDAÇÃO DE *SNPs* PARA EMPREGO EM  
SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES MOLECULARES**

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Arrabal  
Arias

Co-orientadora: Profa. Dra. Francismar  
Corrêa Marcelino-  
Guimaraes

Londrina  
2015

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

Camolese, Adriano Consoni.

Podridão radicular de fitófтора em soja : identificação de um gene recessivo de resistência e validação de SNPs para emprego em seleção assistida por marcadores moleculares / Adriano Consoni Camolese. - Londrina, 2015.

80 f. : il.

Orientador: Carlos Alberto Arrabal Arias.

Coorientador: Francismar Corrêa Marcelino-Guimarães.  
(dissertação) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Resistência a doenças e pragas - Teses. 2. Marcadores biológicos - Teses. 3. Plantas - Teses. 4. Melhoramento genético - Teses. I. Arias, Carlos Alberto Arrabal. II. Marcelino-Guimarães, Francismar Corrêa. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. IV. Título.

ADRIANO CONSONI CAMOLESE

**PODRIDÃO RADICULAR DE FITÓFTORA EM SOJA: IDENTIFICAÇÃO  
DE UM GENE RECESSIVO DE RESISTÊNCIA E VALIDAÇÃO DE  
SNPs PARA EMPREGO EM SELEÇÃO ASSISTIDA POR  
MARCADORES MOLECULARES**

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Arrabal  
Arias  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -  
EMBRAPA

---

Prof. Dr. Douglas Silva Domingues  
Instituto Agrônômico do Paraná - IAPAR

---

Dr. Salvador Lima Brito Júnior  
Genética do Brasil - GDM

Londrina, 06 de Março de 2015

CAMOLESE, Adriano Consoni. **Podridão radicular de fitóftora em soja: identificação de um gene recessivo de resistência e validação de *snps* para emprego em seleção assistida por marcadores moleculares.** 2015. 80f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular), Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

## RESUMO

*Phytophthora sojae* é causador da doença conhecida como Podridão Radicular de Fitóftora (PRF). A cultivar BRSMG 752S é resistente à doença e estudos preliminares apontam a existência de um gene em seu genoma. O gene de resistência a *P. sojae* *Rps1k* tem sido um dos mais efetivos e empregado no controle da doença. A herança da resistência da cultivar BRSMG 752S foi avaliada a partir de seu cruzamento com nove genótipos portadores de diferentes genes de resistência já descritos, sendo possível concluir que o *locus rps* da BRSMG 752S não está em nenhum dos *locus* testados e que se trata de um gene/alelo recessivo. Adicionalmente, estudos foram conduzidos visando à descoberta, validação e otimização de marcadores *SNPs* ligados ao gene *Rps1k* para emprego em seleção assistida em larga escala. Os *SNPs* 4740659 e 4740671 obtidos a partir de dados de re-sequenciamento, foram selecionados para validação utilizando 108 genótipos de soja, previamente fenotipados com diferentes raças de *P. sojae* permitindo a determinação da presença ou ausência do gene *Rps1k*. Outras 17 linhagens elites do Programa de Melhoramento Genético (PMG) também foram genotipadas. A partir da combinação dos dados de fenotipagem e genotipagem foi possível selecionar o ensaio 7221 garantindo uma acuracidade de seleção para o gene *Rps1k* acima de 88%. Trinta e um genótipos foram caracterizados como portadores do gene *Rps1k*. Os ensaios de genotipagem 7221 e 8094 foram otimizados para utilização em genotipagem de larga escala via *qPCR*.

**Palavras-chave:** Soja. *SNPs*. *Phytophthora sojae*. Genes recessivos. Genotipagens.

CAMOLESE, Adriano Consoni. **Phytophthora root rot in soybean**: identification of a recessive resistance gene and *Snps* validation for use in assisted selection by molecular markers. 2015. 80p. Dissertation (Master's Degree in Genetics and Molecular Biology - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015).

## ABSTRACT

Phytophthora root rot (PRR) of soybean is caused by *Phytophthora sojae*. The cultivar BRSMG 752S is resistant to disease and preliminary studies indicate the existence of a single gene in their genome. The resistance gene Rps1k to *P. sojae* has been one of the most effective against the disease. Genetic studies were performed involving crosses between the resistant cultivar BRSMG 752S with nine genotypes containing different resistance Rps genes previously described. Based on the crosses it was possible to conclude that the resistance locus present at cultivar BRSMG 752S is none of the tested loci and is a single recessive gene. Moreover, studies were performed to discover and validate SNP markers linked to Rps1k to be used in high throughput molecular markers assisted selection. The SNPs 4740659 and 4740671 based on resequencing, were selected for validation with 108 soybean genotypes, previously phenotyped with different races of *P. sojae* allowing determining the presence or absence of the gene Rps1k. Other 17 elite lines derived from the genetic breeding program also were genotyped. By combining phenotyping and genotyping data, it was possible to select the 7221 ensuring more than 88% of selection accuracy for Rps1K. Thirty one genotypes were characterized as having the Rps1k gene. The genotyping assays based on SNPs, 7221 and 8094, were optimized for use in high throughput genotyping by qPCR.

**Keywords:** SNPs. Soybean. *Phytophthora sojae*. Recessive genes. Genotyping.

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS</b> .....	9
<b>1</b> <b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2</b> <b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	10
2.1            Cultura da Soja .....	10
2.2            Podridão Radicular de Fitóftora .....	11
2.2.1          Etiologia e Características Morfológicas .....	12
2.2.2          Epidemiologia e Sintomas.....	14
2.3            Resistência do Hospedeiro e Manejo Planta-Patógeno .....	16
2.3.1          Tipos de Resistência.....	16
2.3.2          QTLs e Genes de Resistência a Fitóftora .....	17
2.4            Marcadores Moleculares.....	19
2.5            Técnicas Utilizadas para Descoberta de <i>SNPs</i> .....	22
<b>3</b> <b>OBJETIVOS</b> .....	25
3.1            OBJETIVO GERAL .....	25
3.2            OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
<b>4</b> <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	26
<b>CAPÍTULO 2 – UM GENE RECESSIVO DETERMINANDO A RESISTÊNCIA À FITÓFTORA NA CULTIVAR BRSMG 752S.</b> .....	34
RESUMO.....	34
INTRODUÇÃO .....	35
MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
Material Vegetal .....	35
Ensaio de Teste de Segregação .....	37
Inóculo de <i>P. sojae</i> .....	37
Inoculação com <i>P. sojae</i> .....	38
Fenotipagem .....	39

Teste de Segregação .....	40
RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	41
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>48</b>
<b>CAPÍTULO 3 – IDENTIFICAÇÃO, VALIDAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE SNPs EM SOJA VISANDO A SELEÇÃO DE PLANTAS PORTADORAS DO GENE <i>Rps1k</i> .....</b>	<b>50</b>
RESUMO.....	50
INTRODUÇÃO .....	50
MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
Material Vegetal .....	51
Fenotipagem .....	52
Identificação e seleção de SNPs ligados ao <i>locus Rps1k</i> .....	53
Otimizações dos Ensaios de Detecção de SNPs.....	57
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
Identificação e seleção de SNPs ligados ao <i>locus Rps1k</i> .....	58
Localização do <i>locus Rps1k</i> .....	59
Otimização dos ensaios de genotipagens para aplicações em larga escala.....	64
Validação dos SNPs ligados ao <i>Rps1k</i> .....	65
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>71</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>72</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>74</b>
ANEXO A - Conjunto de <i>primers</i> utilizado para amplificação da região contendo os SNPs. ....	74
ANEXO B - Imagens dos géis mostrando as bandas obtidas após a amplificação das regiões dos SNPs.....	75
ANEXO C - Imagem do alinhamento das sequências obtidas após o sequenciamento da região amplificada pelo conjunto de primers 4740688. ....	76

ANEXO D -	Imagem do alinhamento das sequências obtidas após o sequenciamento da região amplificada pelo conjunto de primers 4700063. ....	77
ANEXO E -	Imagem do alinhamento das sequências obtidas após o sequenciamento da região amplificada pelo conjunto de primers 4608515. ....	78
ANEXO F -	Imagens das otimizações dos ensaios TaqMan®. ....	79
ANEXO G -	Imagens das tentativas de otimizações feitas para estabelecer o volume mínimo de reação a ser utilizado. ....	80

## CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

### 1. INTRODUÇÃO

A soja é a fonte de proteína mais comercializada no mundo servindo de base para muitos processos, dentre eles destacam-se a alimentação humana e animal. Além disso, contribui significativamente com o Produto Interno Bruto (PIB) agrícola, e conseqüentemente para o agronegócio brasileiro.

Dentre os possíveis fatores que podem afetar a produção de soja no Brasil, um dos maiores são as doenças causadas por diversos tipos de patógenos. Devido ao clima quente e ausência de inverno rigoroso, uma ampla gama de vetores e patógenos, tais como vírus, bactérias, fungos, podem encontrar condições favoráveis para infectar e causar doenças.

A podridão radicular de fitóftora (PRF), causada pelo patógeno *Phitophythora sojae*, pode gerar perdas de até 100% nas lavouras comerciais (SCHMITTHENNER, 1999), sendo a segunda doença que causa mais danos em soja nos Estados Unidos.

No Brasil, a doença já foi reportada em vários estados importantes para a sojicultura, tais como Rio Grande do Sul, Paraná, Goiás e Mato Grosso do Sul. Embora danos econômicos só tenham ocorrido em poucas lavouras da região sul, é importante conhecer todos os fatores inerentes ao patógeno e antecipar assim medidas de controle visando minimizar as perdas.

Várias estratégias podem ser adotadas para restringir os danos causados e a disseminação de doenças. Para PRF, uma das ações a serem tomadas é o desenvolvimento de cultivares resistentes a uma ou mais raças de fitóftora. Deste modo, é fundamental a caracterização de fontes de resistência bem como identificar os genes já incorporados nas cultivares comerciais, tendo em vista que muitos genótipos brasileiros descendem de genótipos americanos portadores de genes de resistência, em especial o *locus Rps1k*. Em busca de materiais resistentes, cada vez mais utiliza-se ferramentas moleculares visando identificar genes e inseri-los em materiais adaptados. No melhoramento genético da soja, estratégias de seleção em larga escala e o uso de marcadores moleculares ligados aos genes de resistência tem sido prática rotineira em empresas desenvolvedoras de materiais genéticos.

Desse modo, a identificação e validação de marcadores *SNPs* fortemente ligados ou no interior do *locus Rps1k*, que permitam a seleção de genótipos resistentes em PMGs com elevada eficiência se mostra como uma importante estratégia para o desenvolvimento de linhagens resistentes ao patógeno.

Assim, o objetivo deste trabalho foi esclarecer a herança da resistência da cultivar BRSMG 752S e também promover a descoberta, validação e otimização de marcadores *SNPs* ligados ou inseridos no gene de resistência *Rps1k*.

## **2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **2.1 Cultura da Soja**

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) movimentava bilhões de dólares em comércio no chamado complexo soja, que envolve o grão *in natura*, o farelo e o óleo bruto, sendo que em 2014 esta se tornou a maior commodity exportada pelo Brasil, com ganho de mais de 31 bilhões de dólares, ultrapassando o minério de ferro (ZAFALON, 2015).

Atualmente a área plantada com soja no Brasil representa mais de 31 milhões de hectares (ha). A produção total é estimada em mais de 91 milhões de toneladas para a safra 2014/2015 e a média de produtividade é mais de 3000 kg/ha, (CONAB, 2015).

Vários fatores levaram o Brasil a ser o segundo maior produtor mundial de soja, com perspectivas de ascender à liderança global, no curto prazo. Dentre esses fatores se destacam: plantio direto que reduziu a erosão a menos de 96% quando comparado com o plantio convencional; cultivares adaptadas às condições brasileiras de cultivo, especialmente às condições de comprimento de dia e resistência ou tolerância às principais enfermidades; zoneamento de risco agroclimático, que permitiu identificar as regiões mais aptas ao cultivo da soja; correção e adubação do solo, que otimizou o uso de corretivos (calcário por exemplo) e fertilizantes, evitando desperdícios e contaminações; fixação biológica de nitrogênio, que reduziu o uso de fertilizantes químicos; manejo de pragas que possui capacidade para reduzir em até 70% o uso de agrotóxicos; manejo de plantas daninhas, que entre outros aspectos, viabilizou a expansão do plantio direto; mecanização agrícola, através da modernização da frota, a expansão da cultura

para novas áreas; integração entre lavoura, pecuária e florestas que representa o grau máximo na escala de sustentabilidade de exploração agropecuária (GAZZONI, 2013).

Mas a produção de soja vive cercada por incertezas, especialmente no Brasil, que é caracterizado pela sua agricultura tropical, com ausência de inverno rigoroso que serve como controle natural de pragas e ervas daninhas. Isso contribui para que o Brasil seja o maior consumidor mundial em agroquímicos, desde 2008 (LONDRES, 2011). No entanto o uso intensivo de agrotóxicos, não afeta somente o ambiente, mas geram problemas à saúde humana e animal além da elevação dos custos de produção que dependendo da cultivar utilizada, transgênica ou convencional, os custos podem passar de R\$ 2.000 por ha, de acordo com a região produtora (RICHETTI, 2013).

## 2.2 Podridão Radicular de Fitóftora

A PRF em soja é uma doença causada pelo patógeno *Phytophthora sojae* Kaufm. & Gerd. e tem como sinónimas, *P. megasperma* var. *sojae* A. A. Hildebr., *P. megasperma* f. sp. *glycines* T. L. Kuan & Erwin e *P. sojae* f. sp. *glycines* Faris et al. (COSTAMILAN; SOARES; BERTAGNOLLI, 2010).

A doença já foi descrita afetando plantações em vários países tais como Brasil, França, Rússia, Argentina, Austrália, EUA e outros mais (COSTAMILAN; SOARES; BERTAGNOLLI, 2010). Duas hipóteses foram propostas para explicar a origem evolucionária da doença. A mais conservadora afirma que o patógeno e a soja co-evoluíram no leste da Ásia (DORRANCE; SCHMITTHENNER, 2000). A outra hipótese é que o patógeno evoluiu junto de espécies de tremçoço da família das leguminosas na América do Norte, antes de possuir a habilidade de infectar a cultura da soja (GIJZEN; QUTOB, 2009).

Foi citada primariamente como uma nova doença de causa desconhecida nos estados norte americanos de Indiana em 1948 e, em 1951, em Ohio, sendo rapidamente identificada em outros estados do meio oeste. Em 1954 ela foi efetivamente associada com soja nos estados norte americanos de Ohio e Carolina do Norte (SCHMITTHENNER, 1985). Na América do Sul foi detectada primeiro na Argentina em 1970 por E. E. Hartwig (BARRETO; STEGMAN DE GURFINKEL; FORTUGNO, 1995). No Brasil, a doença foi identificada na safra de 1994/95, mas

perdas significativas ocorreram apenas na safra 2005/06, em lavouras do Rio Grande do Sul e Paraná, que apresentam tombamento de plantas em pós-emergência (COSTAMILAN; SOARES; BERTAGNOLLI, 2010). Além destes estados, Santa Catarina, Mato Grosso de Sul, Minas Gerais e Goiás também já foram feitos relatos da doença (COSTAMILAN et al., 2012). Ao todo são descritas no mundo mais de 55 raças do patógeno (RINCÃO, 2013). No Brasil, de acordo com o levantamento de Costamilan et al., (2012) existem ao menos 37 raças do patógeno.

### 2.2.1 Etiologia e Características Morfológicas

*Phytophthora sojae* é uma dentre as mais de oitenta espécies do gênero *Phytophthora* que causam doenças em um importante grupo de plantas cultivadas e ornamentais (TYLER, 2007).

Os integrantes do gênero *Phytophthora* não são considerados fungos e de fato, evolutivamente, estão muito distantes dos fungos “verdadeiros” (TYLER, 2007) e a real condição taxonômica permanece controversa (COSTAMILAN; SOARES; BERTAGNOLLI, 2010). Segundo Tyler (2007), o patógeno pode ser classificado como pertencente ao super-reino *Eucarioto*, reino *Stramenopila*, filo *Oomycota*, classe *Peronosporomycetidae*, ordem *Pythiales*, família *Pythiaceae*, gênero *Phytophthora*. O fato dos oomicetos não serem fungos verdadeiros, não impede que essas duas classes de organismos apresentem estruturas altamente similares. Embora alguns fungos sejam unicelulares (leveduras), a maioria é filamentosa, e formam estruturas tais como os cogumelos comuns de jardim, que consistem em muitos filamentos densamente unidos. Tais filamentos são conhecidos como hifas, e ao conjunto de hifas que forma o organismo denomina-se micélio. O crescimento principal das hifas ocorre na região apical, embora a produção de proteínas ocorra em todo o micélio. As hifas podem ser septadas (divididas por paredes transversais, chamadas septos). Hifas que não contém septos são chamadas asseptadas ou cenocíticas (que significa ter citoplasma em comum) (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2010).

*Phytophthora sojae* é heterotrófico e saprofítico. Além disso, é homotático (gametângios masculinos e femininos no mesmo indivíduo) e o micélio é cenocítico em colônias novas. O oósporo (esporo sexual) varia entre 19,2 µm e 38,8 µm, sendo

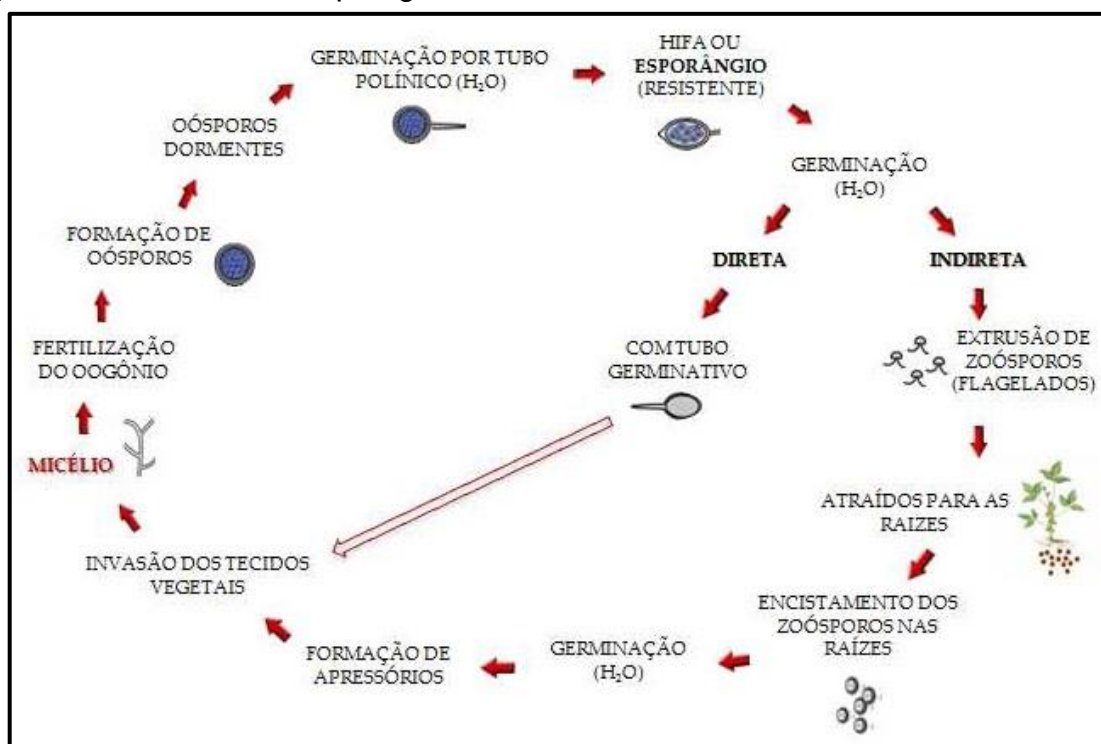
rapidamente formados após a fertilização do oogônio em meio de cultura ou em tecido infectado.

A temperatura ideal para sua formação e sua germinação é de 24°C (COSTAMILAN; SOARES; BERTAGNOLLI, 2010). É capaz de autofertilização e a meiose ocorre através da transferência do núcleo do anterídio para a oogônia haplóide (SCHMITTHENNER, 1985). O resultado dessa união são os oósporos diploides. Em ambiente favorável eles germinam e formam hifas. Em ambientes desfavoráveis podem tornar-se estruturas de sobrevivência, permanecendo no solo por anos (TYLER, 2007). As infecções podem ocorrer em diferentes épocas, gerando assim múltiplas e sucessivas epidemias (GUNADI, 2012).

Os esporângios convertem-se em indefinidos números de esporos assexuais endógenos, os zoósporos, que são, tipicamente, obpiriformes (forma de pera invertida), não papilados (a papila é uma protuberância refringente semelhante a um mamilo na extremidade superior do esporângio, através da qual os zoósporos são liberados), prolíferos (esporângios que dão origem a vários outros que se formam sucessivamente no interior do esporângio que já liberou seus zoósporos), de dimensões variáveis (42-65 µm x 32-53 µm). Podem germinar diretamente, atuando como esporos, ou indiretamente, pela extrusão de zoósporos flagelados, assexuados e desprovido de parede celular. A temperatura ideal para germinação direta é de 25°C e 14°C para germinação indireta (COSTAMILAN; SOARES; BERTAGNOLLI, 2010).

Os zoósporos possuem vida curta de poucas horas, e quando encontram as raízes das plantas eles encistam, germinam e a infecção ocorre por meio da penetração da hifa na epiderme da raiz (ENKERLI; MIMS; HAHN, 1997). A germinação dos cistos está fortemente relacionada às condições do ambiente, e a adesão é essencial para formação do apressório, estrutura dilatada ou ramificada se diferencia na extremidade de uma hifa e adere firmemente à parede celular do hospedeiro, da qual origina a hifa de penetração, dilatando-se no interior da célula invadida formando o haustório saprofítico (MORRIS; BONE; TYLER, 1998). A Figura 1 ilustra o ciclo de vida do patógeno.

**Figura 1.** Ciclo de vida do patógeno.



Fonte: Adaptado de Rincão (2013).

### 2.2.2 Epidemiologia e Sintomas

As condições climáticas que favorecem a ocorrência da doença são temperatura igual ou superior a 25°C, solo com alta umidade ou encharcado, além de solo muito compactado (COSTAMILAN; SOARES; BERTAGNOLLI, 2010). Práticas culturais como plantio direto na palha, monocultura da soja, plantios sucessivos, aplicação de altas doses de fertilizantes orgânicos ou com potássio, tornam a doença mais severa (SCHMITTHENNER, 1999).

De modo geral, em condições favoráveis, o micélio, esporângios e oósporos podem germinar diretamente e infectar os hospedeiros, enquanto que em condições desfavoráveis, os oósporos (esporos de resistência) servem de inóculo primário e, em temperaturas próximas a 25°C, germinam, produzindo esporângios que se acumulam até que o solo fique encharcado, ocorrendo assim à liberação dos zoósporos. Estes são atraídos pelas raízes através de quimiotactismo positivo, sendo capazes de perceber no ambiente, isoflavonóides (genisteína e daidzeína) produzidos e liberados no solo pelas raízes e sementes (COSTAMILAN; SOARES; BERTAGNOLLI, 2010).

Os sintomas causados pela infecção são dependentes do nível de resistência do hospedeiro. Podem ser observados desde a semente, incluindo todo o processo de pré e pós-emergência da plântula, afetando também plantas já adultas (mas de modo geral, quanto mais jovem a planta mais suscetível). Os sintomas incluem apodrecimento da semente, germinação lenta, flacidez de raiz e cotilédone, sendo que os tecidos afetados adquirem coloração marrom.

As plântulas infectadas geralmente morrem durante a emergência (também chamado de *damping off*). Na raiz, os sintomas incluem flacidez dos tecidos e mudança de coloração pendendo para o marrom. A evolução para o hipocótilo estende-se até o nó cotiledonar ocorrendo o colapso do tecido. Na sequência as folhas ficam amareladas e murchas e a planta seca e morre (COSTAMILAN; SOARES; BERTAGNOLLI, 2010).

Plantas mais desenvolvidas tem morte mais lenta, onde as folhas amarelam, os tecidos secam em torno das nervuras, seguindo pela murcha completa da planta, permanecendo as folhas murchas, presas as plantas e voltadas para baixo. A raiz principal apodrece e as secundárias são quase totalmente destruídas, adquirindo assim coloração marrom-escura. Nessa fase, ocorre no exterior da haste, a mudança da cor verde para a marrom-escura, se estendendo desde o solo até o ápice da planta.

Em plantas adultas, os sintomas principais são o apodrecimento da raiz principal, com ocorrência ocasional de lesões longas, lineares, levemente aprofundadas e de cor marrom em apenas um dos lados da haste, sintoma que pode ser confundido com lesões de cancro da haste causado por *Diaporthe phaseolorum var. meridionalis*. Os tecidos de raiz e da haste atacados permanecem firmes. O tecido escurecido na haste geralmente é coberto de micélio de fungos saprófitos, principalmente de *Fusarium* spp. podendo dificultar a identificação do agente causal (COSTAMILAN; SOARES; BERTAGNOLLI, 2010).

Em lavouras atacadas, podem aparecer plantas isoladas infectadas, cercadas por plantas saudáveis, ou em pontos isolados, geralmente onde há acúmulo de umidade no solo, com grupos de plantas infectadas, sendo comum também plantas em diferentes estádios da doença. Cultivares que apresentam menor suscetibilidade ou resistência parcial podem ter os danos restritos à raiz apresentando plântulas com clorose e menor desenvolvimento, sintoma muitas vezes similares à falta de

nitrogênio ou encharcamento do solo. Danos econômicos estão relacionados com o replantio e também devido diminuição da população de plantas (COSTAMILAN et al., 2012). Nos EUA, só no ano de 2010 a perda estimada foi mais de um milhão de toneladas de soja (WRATHER; KOENNING, 2010).

## **2.3 Resistência do Hospedeiro e Manejo Planta-Patógeno**

### **2.3.1 Tipos de Resistência**

De acordo com Costamilan, Soares e Bertagnolli (2010) a resistência genética é o principal método de controle da doença.

A resistência do tipo completa, também chamada de resistência gene-a-gene, raça específica, resistência monogênica ou resistência vertical, é aquela caracterizada por um único gene de resistência no hospedeiro chamados de genes *Rps* (DORRANCE; MCCLURE; ST. MARTIN, 2003). Podem conferir imunidade ou elevada resistência através da resposta de hipersensibilidade (RH) (SUN et al., 2011). . A RH é uma reação rápida da planta, caracterizada pela necrose que ocorre no local de entrada de um patógeno. A planta reage imediatamente promovendo a morte do tecido invadido, bloqueando o avanço da colonização. Podem ocorrer mudanças morfológicas e histológicas, assim como a inativação do agente infeccioso (GASPAROTTO et al., 2010).

O outro tipo também empregado em materiais resistentes é a resistência do tipo parcial, também chamada de resistência horizontal, resistência incompleta, resistência poligênica, resistência quantitativa ou resistência de campo, age de forma a limitar o desenvolvimento das lesões nos tecidos infectados. Por se tratar de uma herança quantitativa, controlada por muitos genes que contribuem de maneiras e intensidades diferentes, sendo que sua utilização dependeria de testes e cruzamentos mais complexos que os utilizados para estudar heranças qualitativas, embora seja um tipo de resistência mais estável que a qualitativa, faz com que os melhoristas não a utilizem em cruzamentos para fim de obtenção de materiais resistentes (SUN et al., 2011).

### 2.3.2 QTLs e Genes de Resistência a Fitóftora

Até o momento, cerca de vinte loci de resistência monogênica (genes *Rps*) à podridão radicular de fitóftora foram identificados em quatro cromossomos do genoma da soja. No cromossomo 3, grupo de ligação (GL N), já foram identificados sete *loci*: o *Rps1* consiste de um série alélica composta de cinco alelos (*Rps1a*, *Rps1b*, *Rps1c*, *Rps1d* e *Rps1k*), *Rps7*, *Rps9*, *RpsYu25*, *RpsYD29*, *RpsUN1* e um *locus Rps* ainda não totalmente elucidado presente no genótipo “Waseshiroge” (DEMIRBAS et al., 2001; GAO et al., 2005; WENG et al., 2001; WU et al., 2010; SUN et al., 2011; ZHANG et al., 2013; LIN et al., 2013; SUGIMOTO et al., 2011). Os *loci Rps2* e *RpsUN2* foram mapeados no cromossomo 16 (GL J) (DEMIRBAS et al., 2001; LIN et al., 2013). O *locus Rps3* possui três alelos (*Rps3a*, *Rps3b* e *Rps3c*), foi mapeado no cromossomo 13 (GL F) e está ligado com o *locus Rps8* (GORDON et al., 2006; DEMIRBAS et al., 2001; SANDHU et al., 2005). Os loci *Rps4*, *Rps5* e *Rps6* estão ligados e foram mapeados no cromossomo 18 (GL G) (DEMIRBAS et al., 2001; SANDHU et al., 2004).

Marcadores moleculares ligados a genes *Rps* e *loci* que controlam caracteres quantitativos (do inglês *QTLs – Quantitative Trait Loci*) de resistência parcial ao patógeno, já foram determinados em diferentes populações. 45 *QTLs* de resistência parcial distribuídos em 15 cromossomos no genoma da soja foram identificados e podem ser acessados através do portal *SoyBase* (<http://soybase.org/>) (SUN et al., 2014).

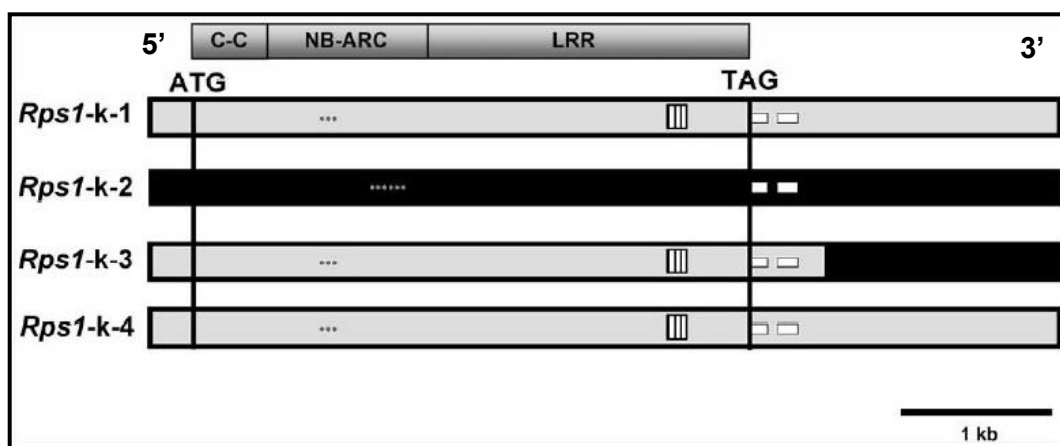
O gene de resistência *Rps1k* foi um dos primeiros a ser amplamente utilizado em materiais resistentes nos EUA durante mais de 40 anos, pois é estável e confere resistência a diversas raças do patógeno (SONG et al., 2013). No Brasil, até o momento, somente uma raça é capaz de infectar e causar doença em genótipos portadores do *locus Rps1k* estando presente apenas no estado do Rio Grande do Sul (COSTAMILAN et al., 2012).

Existem diferentes classes de genes de resistência, a maior é a classe de genes contendo os domínios *Nucleotide Binding Site – Leucine Rich Repeat (NBS-LRR)*. As proteínas resultantes destes genes possuem um sítio de ligação de nucleotídeo e uma repetição rica em leucinas. Essa e outras classes de proteínas estão envolvidas diretamente na detecção de diversos patógenos, incluindo vírus,

bactérias, oomicetos, nematóides, insetos, além de outros (McHALE et al., 2006). Os genes *CC-NBS-LRR* são consideravelmente variáveis em números e arranjos dentre os diferentes alelos do gene *Rps1*. No entanto, para o alelo *Rps1k* eles são altamente similares e fazem parte do mesmo *locus*, característica nunca antes observada.

Até o momento, o *locus Rps1k* é o único a ter sido completamente clonado a partir de uma biblioteca gerada por cromossomos artificiais de bactérias (BAC) utilizando o genótipo Williams 82 (GAO et al., 2005; BHATTACHARYYA, 2007, 2010; GAO; BHATTACHARYYA, 2008). Por meio destes estudos, descobriu-se inicialmente quatro regiões no genoma que codificam proteínas com estruturas de “bobinas-enroladas” (*CC: coiled-coil*) do tipo *NBS-LRR*. Esses possíveis genes foram subclonados a partir da biblioteca BAC e nomeados como *Rps1k-1*, *Rps1k-2*, *Rps1k-3* e *Rps1k-4*. Os genes *Rps1k-1*, *Rps1k-3* e *Rps1k-4* foram agrupados como Classe I. Os genes *Rps1k-1* e *Rps1k-4* são 100% idênticos, no entanto independentes, e foram gerados por duas regiões distintas da biblioteca. O *Rps1k-3* é altamente similar ao *Rps1k-1* e *Rps1k-4*, porém a extremidade 3’ do *Rps1k-3* é similar à extremidade 3’ do *Rps1k-2* (Figura 2), demonstrando ter ocorrido recombinação. A classe II é composta pelo gene *Rps1k-2* que difere dos demais devido a sua região da extremidade terminal C conter 27 LRRs imperfeitas, o que é ausente na Classe I (GAO et al., 2005).

**Figura 2.** Esquema representando a família gênica do *Rps1k*.



Legenda: C-C: domínio *coiled-coil*; NB-ARC: *nucleotide-binding adaptor* conservado em *Apaf-1* (protease ativadora de apoptose). LRR: *Leucine-Rich-Repeat*. Adaptado de Gao et al., (2005).

Os genes *Rps1k-1*, *Rps1k-2* e *Rps1k-3* foram isolados e inseridos separadamente em genótipos de Williams sem genes de resistência (genes *rps* com reação de suscetibilidade) por meio de técnicas de transgenia. As plantas transformadas foram regeneradas e testadas quanto à resistência para o *Rps1k*. Os genes *Rps1k-1* e *Rps1k-2* demonstraram conferir resistência às raças 1, 2, 18 e ao isolado 997A-2-3 específicos do patógeno (GAO et al., 2005). Enquanto que para os demais genes o autor não relata os motivos de não os ter testados quanto a resistência aos isolados.

Contudo, em publicações posteriores, Bhattacharyya (2007, 2010) cita que a família gênica do *Rps1k* é composta além dos quatro genes já citados, por mais um, denominado *Rps1k-5*, sendo que este gene é idêntico ao *Rps1k-1*, segrega independentemente dos outros e também conferiu resistência ao patógeno.

## 2.4 Marcadores Moleculares

O uso de marcadores moleculares, isto é, de polimorfismos baseados no DNA, tem sido a tecnologia básica para a construção de mapas genéticos de várias espécies. Vários tipos de marcadores moleculares de DNA estão hoje disponíveis, diferenciando entre si quanto à sua habilidade em detectar polimorfismo, custo de aplicação, facilidade de uso e consistência de resultados.

Existem vários tipos de marcadores, mas os mais utilizados atualmente são os *RFLP* (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), *AFLP* (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), *RAPD* (*Random Amplification of Polymorphic DNA*), microssatélites ou *SSR* (*Single Sequence Repeats*) e os *SNPs* (*Single Nucleotide Polymorphism*).

Os marcadores moleculares podem atuar no pré-melhoramento de plantas, visando conhecer o material genético antes de introduzi-lo no programa de melhoramento. O uso dos marcadores no melhoramento faz referência à seleção assistida por marcadores moleculares (SAM), com o objetivo de auxiliar o melhorista na escolha dos melhores genótipos obtidos a partir da etapa de avanço de gerações ou cruzamento, facilitando a seleção de plantas de interesse e agilizando o processo de desenvolvimento de novas cultivares. Os marcadores também podem ser empregados no pós-melhoramento em atividades de caracterização de cultivares

para uma característica alvo que antes era desconhecida ou não visada (ex.: resistência a doenças) (BORÉM; CAIXETA, 2006).

Os marcadores moleculares podem ser empregados para outros fins, tais como filogenia de um grupo de organismos, estudos de *pedigree*, uso de marcadores para quantificação de genes ou regiões alvos. Outra aplicação dos marcadores moleculares está na detecção de genes de outros organismos no genoma de interesse, ou seja, detecção de transgenes, evitando assim que seja feita uma fenotipagem, poupando tempo e dinheiro (BORÉM; CAIXETA, 2006).

A SAM é uma metodologia que se desenvolveu simultaneamente ao desenvolvimento da Genética Molecular que somado aos procedimentos existentes visa facilitar o processo de melhoramento genético. O uso rotineiro desta tecnologia depende do conhecimento dos seus princípios básicos, do estabelecimento de infraestrutura laboratorial mínima que permita a rápida extração de *DNA* e detecção dos marcadores (ALZATE-MARIN et al., 2005).

Dentre suas finalidades a que mais se destaca no melhoramento vegetal é auxiliar o melhorista na seleção de genótipos desejáveis, com máxima eficiência, rapidez e com baixo custo. Uma das aplicações mais concreta da SAM é durante o processo de piramidação de genes/alelos de resistência principalmente a doenças. Essa técnica consiste de criar e/ou selecionar genótipos com dois ou mais genes de resistência de interesse. Ainda, a piramidação vem sendo considerada como uma forma de desenvolver cultivares com genes de resistência que sejam efetivos por mais tempo, raça específica ou não e de amplo espectro (ALZATE-MARIN et al., 2005).

A SAM pode ser realizada com vários tipos de marcadores moleculares. No entanto, os mais aplicáveis são os *SSR* e os *SNPs*, sendo estes os mais utilizados tendo em vista sua capacidade de automação dos processos de descoberta, mapeamento e genotipagem. Os passos para a realização da SAM envolvem a obtenção de marcadores moleculares, a associação dos marcadores com características fenotípicas e a aplicação dessas informações na seleção. Uma estratégia que pode ser usada em conjunto com a SAM são os marcadores fenotípicos, tal abordagem pode ser fundamental para a compreensão e estudos principalmente para características complexas tais como *QTLs* e heranças quantitativas. Uma vez que se detenha o conhecimento genético da resistência

determinada por um gene ou *QTL*, bem como de marcadores ligados a estes genes, é possível se aplicar estratégias de genotipagem para a seleção de linhas contendo genes de resistência. Uma vez determinada que uma reação a um estímulo biótico ou abiótico está relacionada com uma marca genética - um *SNP* por exemplo; a seleção de plantas de interesse torna-se mais fácil e segura.

Com o advento das novas técnicas e plataformas de sequenciamento, foi possível aumentar significativamente o volume de dados gerados, a medida em que genomas e o re-sequenciamento de genótipos de uma mesma espécie foram sendo obtidos. Essas tecnologias aumentaram significativamente a velocidade de descoberta de polimorfismos de uma base (*SNPs*), estimulando pesquisas em melhoramento genético em culturas que antes não eram estudadas devido à relativa falta de dados acerca de seus genomas (Ex.: cevada, eucalipto e pinus) (SILVA, 2012).

Os marcadores do tipo *SNP* são definidos como uma posição no *DNA* onde diferentes sequências alternativas (alelos) co-existem em indivíduos de uma população, em uma frequência maior que 1% (BROOKES, 1999), caracterizados como única base em posição específica do genoma. Podem ser classificados de acordo com o tipo de variação do nucleotídeo. Existem as transições que são trocas de purina por outra purina (A/G) ou pirimidina por outra pirimidina (C/T). Transversões que são trocas de purinas por pirimidinas e vice-versa (A/C, G/T, G/A e C/T), sendo que as transições são as mais frequentes (BORÉM; FRITSCHENETO, 2013).

As variações podem ocorrer em regiões codificadoras ou com função regulatória, no entanto a maioria ocorre em regiões não codificantes. As variações em regiões codificadoras são classificadas em sinônimas ou não-sinônimas. Mutações sinônimas são aquelas em que ocorre a alteração do códon mas o aminoácido gerado continua sendo o mesmo, não trazendo assim diferenças estruturais ou químicas para a proteína em questão. Mutações não-sinônimas resultam na alteração do *frame* de leitura na tradução, alterando assim o aminoácido gerado (BORÉM; FRITSCHENETO, 2013). As mutações não-sinônimas podem ainda ser conservativas, quando o novo aminoácido gerado possui estrutura química similar ao aminoácido antigo, não gerando grandes consequências a proteína; e podem ser também do tipo não-conservativa onde o aminoácido gerado pela

mutação é muito diferente do anterior podendo gerar alterações conformacionais a proteína e aos processos da qual ela participa.

Podem existir mutações do tipo *indels* caracterizadas pela inserção ou deleção de uma ou mais bases. Essa característica também pode alterar o *frame* de leitura, alterando o aminoácido gerado. Segundo Ramalho et al., (2012) qualquer tipo de mutação acima descrita acontece em uma frequência muito baixa, cerca de  $10^{-7}$  por local por geração e a maioria do polimorfismo ocorre em regiões não-codificantes, pois somente de 1% a 5% do genoma codifica alguma proteína.

Os marcadores *SNPs* geralmente são bialélicos, ou seja, apresentam dois alelos por loco (BORÉM; FRITSCHÉ-NETO, 2013), portanto a tecnologia desenvolvida até agora para detectar este tipo de polimorfismo é também baseada no bialelismo. Além disso, têm comportamento codominante, isto é, no genótipo heterozigoto os dois alelos são identificados. De fato a natureza bialélica os torna menos informativos quando comparados a marcadores microssatélites (SILVA, 2012). No entanto, isto pode ser compensado pela abundância em que os *SNPs* são encontrados no genoma e também pela grande capacidade de automação de processos de descoberta destes marcadores e também quando são utilizados para genotipar o organismo ou população estudada.

A correlação entre um marcador genético e um loco de interesse propicia a seleção para genes/alelos específicos ou seleção pela combinação de múltiplos genes/alelos para a resistência a doenças sendo a ligação entre eles crucial para que a seleção assistida seja concretizada (FOOLAD; SHARMA, 2005).

## 2.5 Técnicas Utilizadas para Descoberta de *SNPs*

O sequenciamento de nova geração (*NGS*) vem propiciando rápido avanço no sequenciamento e re-sequenciamento de genomas. Técnicas como *Genotyping by Sequencing (GBS)* e *GoldenGate* são excelentes para descoberta e validação dos *SNPs* em larga escala.

O método consiste na diminuição da complexidade do genoma alvo através da clivagem da região a partir de um sítio reconhecido por uma ou mais enzimas de restrição. Os ensaios baseados em *GBS* fazem usos de adaptadores comuns e com “*barcode*” que são ligados às extremidades de corte dos fragmentos. O “*barcode*” é

uma sequência de *DNA* específica inserida no adaptador para identificar cada genótipo em ensaios multiplex. Assim, pode-se fazer uso de ensaios multiplex (ensaios onde mais de um alvo é analisado simultaneamente) contendo até 384 indivíduos diferentes em cada reação de sequenciamento. Mas existem limitações, pois quanto maior o número de genótipos, menor será a quantidade de sequências obtidas de cada genótipo, o que pode dificultar a análise posteriormente (SILVA, 2012).

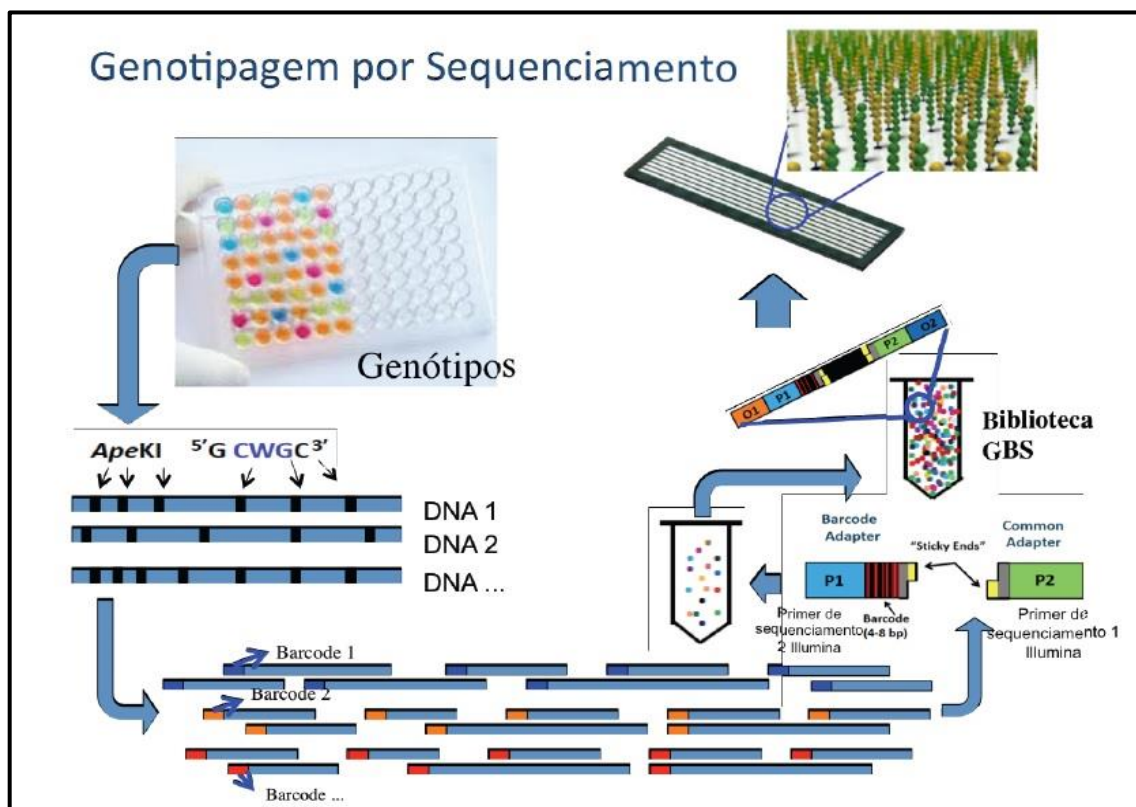
Por este método é possível sequenciar regiões distribuídas por todo o genoma utilizando a enzima de restrição *ApeK1*, que realiza a digestão do *DNA* toda vez que o sítio de ligação é reconhecido ao longo do genoma. Desta forma, a complexidade do genoma é reduzida, favorecendo a identificação de *SNPs* em regiões ricas em genes e a ampla cobertura do genoma com milhares de *SNPs*, possibilitando a utilização de estudos de associação genômica ampla (GWAS – Genomic Wide Association Studies).

A metodologia *GBS* permite a detecção de centenas e até milhares de *SNPs* no conjunto de genótipos analisados. Após o sequenciamento, diversos filtros são aplicados de acordo com a qualidade e quantidade de dados almejados, o que naturalmente decresce o número de *SNPs*, mas mesmo assim ao final do procedimento obtém-se uma quantidade significativa de marcadores *SNP* (milhares), com grau de polimorfismo elevado (SILVA, 2012).

A tecnologia já é utilizada para detectar marcadores do tipo *SNPs* em várias culturas. Sonah et al., (2013) conseguiu mapear milhares de *SNPs* em oito genótipos diferentes de soja, e tentou aperfeiçoar o *pipeline* de trabalho visando a redução da complexidade dos processos. Elshire et al., (2011) utilizaram esta metodologia também visando a melhoria e otimização dos processos envolvidos nas genotipagens aliados a grande capacidade de descoberta de novos *SNPs*, sendo que neste trabalho, milho e aveia foram genotipados.

A Figura 3 ilustra simplificada a metodologia *GBS*.

Figura 3. Metodologia GBS simplificada.



Fonte: Adaptado de Passianotto (2014).

Neste contexto, espera-se que cada vez mais a geração de dados de sequenciamento e estudos de associação genômica permitam a identificação de novos marcadores ligados a caracteres de interesse promovendo o desenvolvimento de cultivares melhoradas, decréscimo de tempo e custos demandados para o desenvolvimento de novas cultivares.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar geneticamente fontes de resistência à fitóftora e identificar e validar marcadores *SNPs* para genotipagem em larga escala de materiais contendo o *locus Rps1k*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o(s) gene(s) de resistência presente(s) na cultivar resistente BRSMG 752S em cruzamentos com fontes portadoras de genes de resistência a *Phytophthora sojae* já descritos;
- Identificar genótipos portadores do *locus Rps1k* através da reação às diferentes raças do patógeno;
- Realizar análise *in silico* para a seleção de marcadores *SNPs* ligados ao *locus Rps1k* com base em publicações, bancos de dados de patentes, bancos de dados genômicos e dados de re-sequenciamento (*GBS*);
- Validar os marcadores *SNPs* associados à resistência a *P. sojae* caracterizando a resistência raça específica;
- Otimizar ensaios baseados na Metodologia *TaqMan*® para fins de seleção do *locus Rps1k* em análises de rotina de laboratório;
- Genotipar linhagens recombinantes, genótipos diversos, cultivares comerciais e plantas introduzidas (PIs) utilizadas no programa de melhoramento genético da Embrapa através dos marcadores *SNPs* validados, de modo a auxiliar na implementação dos marcadores *SNPs* ligados ao *locus Rps1k* ao processo de seleção assistida no Programa de Melhoramento da Embrapa.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALZATE-MARIN, Ana Lilia et al. Seleção Assistida por Marcadores Moleculares Visando ao Desenvolvimento de Plantas Resistentes a Doenças, com Ênfase em Feijoeiro e Soja. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 4, p.333-342, jun. 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/fb/v30n4/a01v30n4.pdf>>. Acesso em: 16 set. 2014.

BARRETO, Dora; STEGMAN DE GURFINKEL, Beatriz; FORTUGNO, C. Races of *Phytophthora sojae* in Argentina and reaction of soybean cultivars. **Plant Disease**, [s.l.], v. 79, n. 6, p.599-600, jun. 1995.

BHATTACHARYYA, Madan K. **RPSk-1 gene family, nucleotide sequences and uses thereof**. U.S. Patent n. 7,256,323, 14 ago. 2007.

BHATTACHARYYA, Madan K. **RPS-1-k Nucleotide Sequence and Proteins**. U.S. Patent n. 7,696, 410 B1, 13 abr. 2010.

BORÉM, Aluizio; CAIXETA, Eveline Teixeira (Ed.). **Marcadores Moleculares**. 1 ed. Viçosa, MG: Produção Independente, 2006. 374 p.

BORÉM, Aluizio; FRITSCHÉ-NETO, Roberto (Ed.). **Biotecnologia Aplicada ao Melhoramento de Plantas**. Viçosa, MG: Produção Independente, 2013. 335 p.

BROOKES, Anthony J. The essence of *SNPs*. **Gene**, v. 234, n. 2, p. 177-186, 1999.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Séries Históricas - Soja**. Brasília: Conab, 2015. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&ordem=produto&Pagina\\_objcmsconteudos=3#A\\_objcmsconteudos](http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&ordem=produto&Pagina_objcmsconteudos=3#A_objcmsconteudos)>. Acesso em: 31 jan. 2015.

COSTAMILAN, Leila Maria et al. Pathogenic diversity of *Phytophthora sojae* pathotypes from Brazil. **European Journal Of Plant Pathology**, [s.l.], v. 135, n. 4,

p.845-853, nov. 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s10658-012-0128-9>>. Acesso em: 28 maio 2014.

COSTAMILAN, Leila Maria; SOARES, Rafael Moreira; BERTAGNOLLI, Paulo Fernando. Podridão Radicular de Fitóftora: (*Phytophthora sojae*). In: ALMEIDA, Álvaro Manuel Rodrigues; SEIXAS, Claudine Dinali Santos (Ed.). **SOJA: Doenças Radiculares e de Hastes e Inter-relações com o Manejo do Solo e da Cultura**. Londrina: Embrapa Soja, 2010. p. 105-126.

DEMIRBAS, Ayhan. et al. Simple Sequence Repeat Markers Linked to the Soybean *Rps* Genes for *Phytophthora* Resistance. **Crop Science**, St. Paul, v. 41, n. 4, p.1220-1227, jul. 2001. Disponível em: <https://www.crops.org/publications/cs/abstracts/41/4/1220>>. Acesso em: 04 set. 2014.

DORRANCE, Anne Elizabeth; MCCLURE, S. A.; ST. MARTIN, S. K. Effect of Partial Resistance on *Phytophthora* Stem Rot Incidence and Yield of Soybean in Ohio. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 87, n. 3, p.308-312, mar. 2003.

DORRANCE, Anne Elizabeth; SCHMITTHENNER, August Frederick. New Sources of Resistance to *Phytophthora sojae* in the Soybean Plant Introductions. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, n. 12, p.1303-1308, dez. 2000.

ELSHIRE, Robert J. et al. A Robust, Simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) Approach for High Diversity Species. **Plos One**, [s.i.], v. 6, n. 5, p. e19379, maio 2011.

ENKERLI, K.; MIMS, Charles W.; HAHN, Michael G. Ultrastructure of compatible and incompatible interactions of soybean roots infected with the plant pathogenic oomycete *Phytophthora sojae*. **Canadian Journal of Botany**, v. 75, n. 9, p. 1493-1508, 1997.

FOOLAD, Majid R.; SHARMA, Arun. Molecular markers as selection tools in tomato breeding. In: **International Symposium on Tomato Diseases**, 1. 695. p. 225-240. 2004. HAAS, Jerry H;

GAO, Hongyu; BHATTACHARYYA, Madan K. The soybean-*Phytophthora* resistance locus *Rps1-k* encompasses coiled coil-nucleotide binding-leucine rich repeat-like genes and repetitive sequences. **BMC Plant Biology**, London, v. 8, n. 3, p.1-14, mar. 2008. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/8/29>>. Acesso em: 04 set. 2014.

GAO, Hongyu et al. Two Classes of Highly Similar Coiled Coil-Nucleotide Binding-Leucine Rich Repeat Genes Isolated from the *Rps1-k* Locus Encode *Phytophthora* Resistance in Soybean. **Molecular Plant-microbe Interactions**, St. Paul, v. 18, n. 10, p.1035-1045, out. 2005. Disponível em: <[http://www.public.iastate.edu/~mbhattac/bhattacharyya/Publications/Publications/Gaoetal.2005\\_MPMI-18-1035.pdf](http://www.public.iastate.edu/~mbhattac/bhattacharyya/Publications/Publications/Gaoetal.2005_MPMI-18-1035.pdf)>. Acesso em: 03 set. 2014.

GASPAROTTO, Luadir et al. **Glossário de Fitopatologia**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. 431 p.

GAZZONI, Décio Luiz. **A sustentabilidade da soja no contexto do agronegócio brasileiro e mundial**. Londrina: Embrapa Soja, 2013. 50 p. Disponível em: <[http://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/busca?b=ad&id=973921&biblioteca=vazio&busca=asustentabilidadedasoja&qFacets;=\(asustentabilidadedasoja\)AND\(\(ano-publicacao:"2014"ORano-publicacao"2013"\)\)&sort;=&paginacao=t&paginaAtual=1](http://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/busca?b=ad&id=973921&biblioteca=vazio&busca=asustentabilidadedasoja&qFacets;=(asustentabilidadedasoja)AND((ano-publicacao:)>. Acesso em: 27 maio 2014.

GIJZEN, Mark; QUTOB, Dinah. *Phytophthora sojae* and soybean. In: LAMOUR, Kurt; KAMOUN, Sophien (Ed.). **Oomycete genetics and genomics: Diversity, interactions, and research tools**. New Jersey: J. Wiley & Sons, 2009. p. 303-330.

GORDON, Stuart G. et al. *Rps8* Maps to a Resistance Gene Rich Region on Soybean Molecular Linkage Group F. **Crop Science**, St. Paul, v. 46, n. 1, p.168-173, dez. 2006.

GUNADI, Andika. **Characterization of *Rps8* and *Rps3* Resistance Genes to *Phytophthora sojae* through Genetic Fine Mapping and Physical Mapping of Soybean Chromosome 13**. 2012. 160 f. Tese (Doutorado) - Curso de Graduate Program In Plant Pathology, The Ohio State University, Columbus, 2012. Disponível em: <[https://etd.ohiolink.edu/ap/10?0::NO:10:P10\\_ACCESSION\\_NUM:osu1354640151](https://etd.ohiolink.edu/ap/10?0::NO:10:P10_ACCESSION_NUM:osu1354640151)>. Acesso em: 29 maio 2014.

KILEN, T. C.; HARTWIG, E. E.; KEELING, B. L. Inheritance of a Second Major Gene for Resistance to *Phytophthora* Rot in Soybeans. **Crop Science**, Madison, v. 14, n. 2, p.260-262, mar. 1974.

LIN, Feng et al. Molecular mapping of two genes conferring resistance to *Phytophthora sojae* in a soybean landrace PI 567139B. **Theoretical And Applied Genetics**, Berlin, v. 126, n. 5, p.2177-2185, maio 2013.

LONDRES, Flavia. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida**. Rio de Janeiro: Articulação Nacional de Agroecologia, 2011. 188 p.

McHALE, Leah et al. Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. **Genome Biology**, Londres, v. 7, n. 4, p.212-223, abr. 2006. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/gb-2006-7-4-212.pdf>>. Acesso em: 03 set. 2014.

MORRIS, Paul F; BONE, Elizabeth; TYLER, Brett M. Chemotropic and Contact Responses of *Phytophthora sojae* Hyphae to Soybean Isoflavonoids and Artificial Substrates. **Plant Physiology**, Rockville, v. 117, n. 4, p.1171-1178, ago. 1998. Disponível em: <<http://www.plantphysiol.org/content/117/4/1171.full.pdf+html>>. Acesso em: 29 maio 2014.

RAMALHO, Magno Antonio Patto et al. **Genética na Agropecuária**. 5. ed. Lavras: UFLA, 2012. 566 p.

RAVEN, Peter H.; EVERT, Ray F.; EICHHORN, Susan E. **Biologia Vegetal**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

RICHETTI, Alceu. **Viabilidade econômica da cultura da soja na safra 2013/2014, em Mato Grosso do Sul**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2013. 10 p. Disponível em: <[http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/85622/1/COT\\_2013187.pdf](http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/85622/1/COT_2013187.pdf)>. Acesso em: 22 maio 2014.

RINCÃO, Michelle Pires. **Validação de Marcadores Moleculares em Soja ligados a Genes de Resistência à Podridão Radicular de Fitóftora**. 2013. 94 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Genética e Biologia Molecular, Departamento de Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

SANDHU, Devinder et al. Deletion of a Disease Resistance Nucleotide-Binding-Site Leucine-Rich-Repeat-like Sequence Is Associated With the Loss of the *Phytophthora* Resistance Gene *Rps4* in Soybean. **Genetics**, Bethesda, v. 168, n. 4, p.2157-2167, dez. 2004. Disponível em: <<http://www.genetics.org/content/168/4/2157.full.pdf+html>> . Acesso em: 04 set. 2014.

SANDHU, Devinder et al. Soybean *Phytophthora* Resistance Gene *Rps8* Maps Closely to the *Rps3* Region. **Journal Of Heredity**, Oxford, v. 96, n. 5, p.536-541, jun. 2005.

SCHMITTHENNER, August Frederick. *Phytophthora rot*. In: HARTMAN, G. L.; SINCLAIR, J. B.; RUPE, J. C. (Ed.). **Compendium of soybean diseases**. 4. ed. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1999. p. 39-42.

SCHMITTHENNER, August Frederick. Problems and progress in control of *phytophthora* root rot of soybean. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 69, n. 4, p.362-368, abr. 1985.

SILVA, Pedro Italo Tanno. **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. *japonica*)**. 2012. 153 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, 2012. Disponível em: <<http://repositorio.unb.br/handle/10482/14647>>. Acesso em: 26 ago. 2014.

SONAH, Humira et al. An Improved Genotyping by Sequencing (GBS) Approach Offering Increased Versatility and Efficiency of SNP Discovery and Genotyping. **Plos One**, [s.i.], v. 8, n. 1, p. e54603, jan. 2013. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0054603>>. Acesso em: 15 out. 2014.

SONG, Q. J. et al. A new integrated genetic linkage map of the soybean. **Theoretical And Applied Genetics**, [s.l.], v. 109, n. 1, p.122-128, fev. 2004. Disponível em: <[http://digitalcommons.unl.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1021&context=agronomyfacpub&sei-redir=1&referer=https://scholar.google.com.br/scholar?q=A+new+integrated+genetic+linkage+map+of+the+soybean&btnG=&hl=pt-BR&as\\_sdt=0%2C5#search=new+integrated+genetic+linkage+map+soybean](http://digitalcommons.unl.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1021&context=agronomyfacpub&sei-redir=1&referer=https://scholar.google.com.br/scholar?q=A+new+integrated+genetic+linkage+map+of+the+soybean&btnG=&hl=pt-BR&as_sdt=0%2C5#search=new+integrated+genetic+linkage+map+soybean)>. Acesso em: 15 fev. 2015.

SONG, Tianqiao et al. Two RxLR Avirulence Genes in *Phytophthora sojae* Determine Soybean *Rps1k*-Mediated Disease Resistance. **Molecular Plant-microbe Interactions**, St. Paul, v. 26, n. 7, p.711-720, jul. 2013.

SUGIMOTO, T. et al. Genetic analysis and identification of DNA markers linked to a novel *Phytophthora sojae* resistance gene in the Japanese soybean cultivar Waseshiroge. **Euphytica**, Wageningen, v. 182, n. 1, p.133-145, set. 2011.

SUN, Jutao et al. Genetic analysis and fine mapping of *RpsJS*, a novel resistance gene to *Phytophthora sojae* in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. **Theoretical And Applied Genetics**, Berlin, v. 127, n. 4, p.913-919, abr. 2014.

SUN, S. et al. Characterization and mapping of *RpsYu25*, a novel resistance gene to *Phytophthora sojae*. **Plant Breeding**, [s.l.], v. 130, n. 2, p.139-143, abr. 2011. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/pbr.2011.130.issue-2/issuetoc>>. Acesso em: 03 jun. 2014.

TYLER, Brett M. *Phytophthora sojae*: root rot pathogen of soybean and model oomycete. **Molecular Plant Pathology**, Londres, v. 8, n. 1, p.1-8, jan. 2007. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1364-3703.2006.00373.x/pdf>>. Acesso em: 28 maio 2014.

WENG, C. et al. Mapping Genes Conferring Resistance to *Phytophthora* Root Rot of Soybean, *Rps1a* and *Rps7*. **The Journal Of Heredity**, Oxford, v. 92, n. 5, p.442-446, 2001. Disponível em: <<http://jhered.oxfordjournals.org/content/92/5/442.full>>. Acesso em: 04 set. 2014.

WRATHER, James Allen; KOENNING, Steve. **Soybean Disease Loss Estimates for the United States, 1996-2010**. 2010. Disponível em: <<http://aes.missouri.edu/delta/research/soyloss.stm>>. Acesso em: 28 maio 2014.

WU, Xiao-Ling et al. A survey of soybean germplasm for resistance to *Phytophthora sojae*. **Euphytica**, Wageningen, v. 176, n. 2, p. 261-268, nov. 2010.

ZAFALON, Mauro. **Soja supera minério de ferro e lidera exportações do país em 2014**. 2015. Disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/colunas/vaivem/2015/01/1570914-soja-supera-minerio-de-ferro-e-lidera-exportacoes-do-pais-em2014.html>>. Acesso em: 06 jan. 2015.

ZHANG, Jiqing et al. Genetic characterization and fine mapping of the novel *Phytophthora* resistance gene in a Chinese soybean cultivar. **Theoretical And Applied Genetics**, Berlin, v. 126, n. 3, p.1555-1561, mar. 2013.

## CAPÍTULO 2 – UM GENE RECESSIVO DETERMINANDO A RESISTÊNCIA À FITÓFTORA NA CULTIVAR BRSMG 752S.

### RESUMO

O desenvolvimento de cultivares de soja por meio de cruzamentos entre genótipos de interesse é utilizado há muitos anos pelos melhoristas. Tais cruzamentos podem ser feitos visando à resistência a doenças, dentre elas a fitóftora, causada pelo oomiceto *Phytophthora sojae*. A resistência mais comum empregada no manejo de fitóftora é aquela conferida por um único *locus Rps*, em função da facilidade de uso em programas de melhoramento de soja. No entanto, o número de *loci Rps* efetivamente utilizados nos programas é relativamente restrito, existindo forte demanda pela ampliação dessa base genética nas cultivares comerciais. Estudos preliminares conduzidos por outros autores demonstraram que a resistência da cultivar BRSMG 752S é determinada por um único gene, mas o tipo de interação alélica (se de dominância ou recessividade) e o *locus rps* envolvido, permanecem desconhecidos. O objetivo deste trabalho foi inferir, por meio de cruzamentos entre a BRSMG 752S e várias fontes portadoras de diferentes genes de resistência à fitóftora já descritos na literatura, qual o tipo de interação alélica assim como o *locus* envolvido na resistência dessa cultivar. Foi possível concluir que o *locus* presente na cultivar BRSMG 752S é recessivo e que não mapeia nos mesmos *loci* descritos nas fontes testadas neste trabalho (*Rps1b*, *Rps1c*, *Rps1k*, *Rps3*, *Rps3c*, *Rps4*, *Rps5*, *Rps6* e *Rps8*). Assim, esta cultivar representa importante fonte de resistência, distinta de outras fontes já caracterizadas, a ser utilizada em programas de melhoramento genético.

## INTRODUÇÃO

A cultivar de soja BRSMG 752S foi desenvolvida pela Embrapa para a região central do Brasil e apresenta precocidade adequada para viabilizar a safrinha com outras culturas. Segundo Bergamo, Arias e Soares (2011) esta cultivar foi caracterizada como resistente à fitóftora e a resistência é controlada por um gene simples, podendo ser uma ótima fonte para uso no melhoramento. Entretanto, não se conhece qual o gene *Rps* envolvido nessa resistência e o tipo de interação alélica também não foi esclarecido, o que possibilitaria o uso desse gene isolado ou em combinações com outros genes.

O objetivo deste trabalho foi estudar o gene de resistência à fitóftora presente na cultivar BRSMG 752S em cruzamentos com fontes de resistência portadoras de diferentes genes de resistência já descritos na literatura.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Material Vegetal

A fim de identificar o gene de resistência presente na cultivar BRSMG 752S, foram avaliados uma série de cruzamentos entre esta cultivar e nove genótipos portadores de diferentes genes de resistência a *P. sojae* em seu background genético (Tabela 1). As BRS's 260, 262 e 268 não entraram como fontes nos cruzamentos, no entanto as duas primeiras foram utilizadas como padrão de resistência e a última como padrão de suscetibilidade ao patógeno testado. Todos os genótipos envolvidos nos cruzamentos foram obtidos do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Soja, visando à mitigação de possíveis misturas.

Os cruzamentos foram realizados pela equipe de melhoramento da Embrapa Soja e também por Bergamo (2012). Para a obtenção das sementes provenientes da geração  $F_1$  desses cruzamentos, tais plantas foram trilhadas, etiquetadas e armazenadas manualmente, a fim de se evitar misturas. A geração  $F_1$  foi posteriormente plantada e autofecundada durante o inverno, em casa-de-vegetação obtendo-se assim a geração  $F_2$ . Deste modo as plantas avaliadas no presente trabalho foram sementes provenientes de população  $F_2$ .

**Tabela 1.** Genótipos parentais utilizados nos cruzamentos e algumas cultivares utilizadas como padrão de resistência ou suscetibilidade.

Genótipo	Genealogia	TC	CF	CP	CH	Gene <i>Rps</i> / Característica
<b>BRSMG 752S</b>	<b>Don Mario 43 x Suprema</b>	<b>I</b>	<b>R</b>	<b>M</b>	<b>MC</b>	<b>R</b>
<b>PI 518671 (Williams 82)</b>	<b>Williams (7) x Kingwa (PI 548359)</b>	<b>I</b>	<b>B</b>	<b>M</b>	<b>MC</b>	<b>1k</b>
<b>PI 518670 (Williams 79)</b>	<b>Williams (6) x Lee 68</b>	<b>I</b>	<b>B</b>	<b>M</b>	<b>P</b>	<b>1c</b>
<b>PI 547842 (L77-1863)</b>	<b>Williams (7) x Harrel (PI 548458)</b>	<b>I</b>	<b>B</b>	<b>MC</b>	<b>P</b>	<b>1b</b>
<b>PI 547862 (L83-570)</b>	<b>Williams (6) x PI 86972-1</b>	<b>I</b>	<b>B</b>	<b>MC</b>	<b>P</b>	<b>3</b>
<b>PI 340046</b>	-	<b>SD</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>MC</b>	<b>3c</b>
<b>PI 399073</b>	-	<b>D</b>	<b>R</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>8</b>
<b>PI 86050</b>	-	<b>D</b>	<b>R</b>	<b>MC</b>	<b>M</b>	<b>1c, 4</b>
<b>PI 547876 (L85-3059)</b>	<b>Williams (6) x PI 91160</b>	<b>I</b>	<b>B</b>	<b>MC</b>	<b>P</b>	<b>5</b>
<b>PI 591511 (L89-1581)</b>	<b>Wm6 x Altona (PI 548504)</b>	<b>I</b>	<b>B</b>	<b>MC</b>	<b>P</b>	<b>6</b>
BRS 260	BRS 133 x CD 201	D	B	C	MC	R
BRS 262	Sharkey x [Hartwig x (Sel. em Savana*2 x BR85-206)]	D	B	M	P	R
BRS 268	FT86-309 x FT86-195	D	B	C	MC	S

Genótipos utilizados nos cruzamentos estão destacados. Legenda: Tipo de Crescimento (TC) – Semi-determinado (SD); Determinando (D) e Indeterminado (I); Cor da flor (CF) – Branca (B) e Roxa (R); Cor da Pubescência (CP) – Castanho (C), Marrom (M) e Marrom-claro (MC); Cor do hilo (CH) – Marrom-claro (MC), Preto (P), Amarelo (A) e Marrom (M). R: resistente – S: suscetível. Quando duas ou mais fontes literárias diferiam quanto aos dados, prevalecia a mais recente.

## Ensaio de Teste de Segregação

Aproximadamente 200 sementes da geração F<sub>2</sub> provenientes de cada cruzamento e genótipos usados como padrões foram semeadas em vasos, sendo que cada vaso recebia em média 10 sementes. Eles eram preenchidos com aproximadamente 4 kg de substrato estéril, composto por uma mistura de terra, areia e matéria orgânica na proporção 3:1:1 sob delineamento inteiramente casualizado. O experimento foi realizado durante os meses de fevereiro e março de 2013 em casas-de-vegetação da Embrapa Soja com temperatura e umidade controlados. Os demais tratamentos culturais, tais como adubação e controle de insetos foram realizados de acordo com a demanda.

### Inóculo de *P. sojae*

O inóculo utilizado nas fenotipagens é compatível com os genes *Rps1d*, *Rps2* e *Rps7* e é mantido pela equipe do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Soja, sendo que as inoculações e avaliações das plantas foram realizadas em parte e supervisionadas pela equipe do laboratório.

Todas as plantas do experimento foram inoculadas pelo método do palito de madeira (“palito de dente”) contendo o micélio (colonizado) (Figura 1) do patógeno.

O patógeno foi incubado durante 15 dias sob temperatura controlada a 25°C, em placas de petri contendo meio de cultura V8 que por sua vez é composto de 250 g de extrato de tomate sem sal, 0.6 g de CaCO<sub>3</sub>, 1 g de sacarose, 0.2 g de extrato de levedura, 20 g de agar e 1000 mL de água destilada. O meio contendo o patógeno era vertido na placa contendo no fundo papel filtro com as pontas dos palitos voltadas para cima (vertical) (Figura 1) (ALFENAS; FERREIRA, 2007).

**Figura 1.** Placa de vidro contendo meio colonizado pelo patógeno.



Palitos de madeira com as pontas voltadas para cima. **Fonte:** Adriano C. Camolese.

### **Inoculação com *P. sojae***

Sete dias após a emergência, as plantas foram inoculadas introduzindo a ponta do palito colonizado com micélio no hipocótilo da planta, um centímetro abaixo dos cotilédones em um ângulo com aproximadamente 45° de inclinação. A inclinação é necessária, pois quando a planta fosse irrigada, a água escorresse mantendo úmido o local da inserção, impedindo o ressecamento, prevenindo assim que ocorresse falha na inoculação (Figura 2).

A cada 45 minutos durante a inoculação, era borrifada água sobre as plantas para impedir o ressecamento do inóculo. Finalizada a inoculação e para prevenir ainda mais o ressecamento, as plantas eram amarradas com barbante de algodão, deixando-as inclinadas de forma a expor os pontos de inserção dos palitos aos aspersores e favorecer o molhamento do local da inserção do palito (Figura 2).

Após a inoculação, o sistema de aspersão de água era ligado durante 30 segundos a cada intervalo de 30 minutos por doze horas (08:00 – 20:00). Esse procedimento foi realizado durante quatro dias após a inoculação, evitando eventuais falhas na inoculação.

**Figura 2.** Exemplo de planta recém-inoculada.



**Fonte:** Adriano C. Camolese.

## Fenotipagem

A fenotipagem pelo “método do palito” foi conduzida conforme descrito por Dorrance e Schmitthenner (2000).

Sete dias após a inoculação foi realizada avaliação visual das plantas. Dez dias após a inoculação, as plantas foram reavaliadas para determinar com maior acurácia a verdadeira característica da planta e extinguir possíveis dúvidas. A intensidade da infecção causada pelo patógeno foi detectada mediante avaliação visual da extensão da lesão na haste da planta, descoloração vascular e sintomas de murcha ou morte da planta (RINCÃO, 2013).

A determinação da reação das plantas, se resistentes ou suscetíveis, foi baseada no seguinte critério: (1) resistente (R) quando exibiam calo de resistência, característica marcante de planta resistente, que é causada pela necrose dos tecidos ao redor da lesão, visando impedir que o patógeno se desenvolva no interior da haste, no local de inserção do palito; (2) infectada (I), com plantas que, após sete dias, ainda não haviam morrido e exibiam lesão de cor marrom (necrose) ao longo e no interior da haste e caracterizada também

pela baixa resistência da haste, que levava a planta ao tombamento; e (3) suscetíveis (S), exibindo plantas mortas ou morrendo (esse fenótipo é caracterizado pela planta totalmente murcha e/ou já em estágios iniciais de decomposição). A classificação das plantas infectadas como resistentes ou suscetíveis, pode variar de acordo com o objetivo. Neste trabalho, como o objetivo principal é saber se existem efetivamente plantas suscetíveis dentro da população segregante derivada de cruzamentos entre dois parentais resistentes, aplicou-se um critério mais severo sobre as plantas intermediárias, as quais foram consideradas resistentes, uma vez que não morreram mesmo neste ambiente altamente favorável para a ocorrência da doença em comparação ao ambiente característico de um campo comercial. Assim, por esse critério, as plantas só foram caracterizadas como suscetíveis quando apresentavam a reação típica de suscetibilidade.

### Teste de Segregação

Após a avaliação, as plantas foram agrupadas nas categorias e testes de aderência aos modelos de segregação contendo um ou mais locos de resistência foram aplicados, utilizando o teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) (RINCÃO, 2013). O  $\chi^2$  foi calculado através da equação proposta por Karl Pearson, segundo Ferreira (2005):

$$\chi^2 = \frac{\sum (\text{Observado} - \text{Esperado})^2}{\text{Esperado}}$$

O teste foi aplicado para aceitar ou rejeitar os padrões de segregação de plantas resistentes e suscetíveis esperadas para a geração F<sub>2</sub> segundo a hipótese baseada nas Leis de Segregação Mendelianas. Os dados foram agrupados em grupos independentes e assim estabeleceu-se o valor de cada grupo de indivíduos.

A equação/teste acima mede a probabilidade das diferenças encontradas nas classes serem ao acaso. A partir disso, duas hipóteses são propostas:

**H<sub>0</sub>**: as frequências de segregação observadas e esperadas não diferem entre si e;

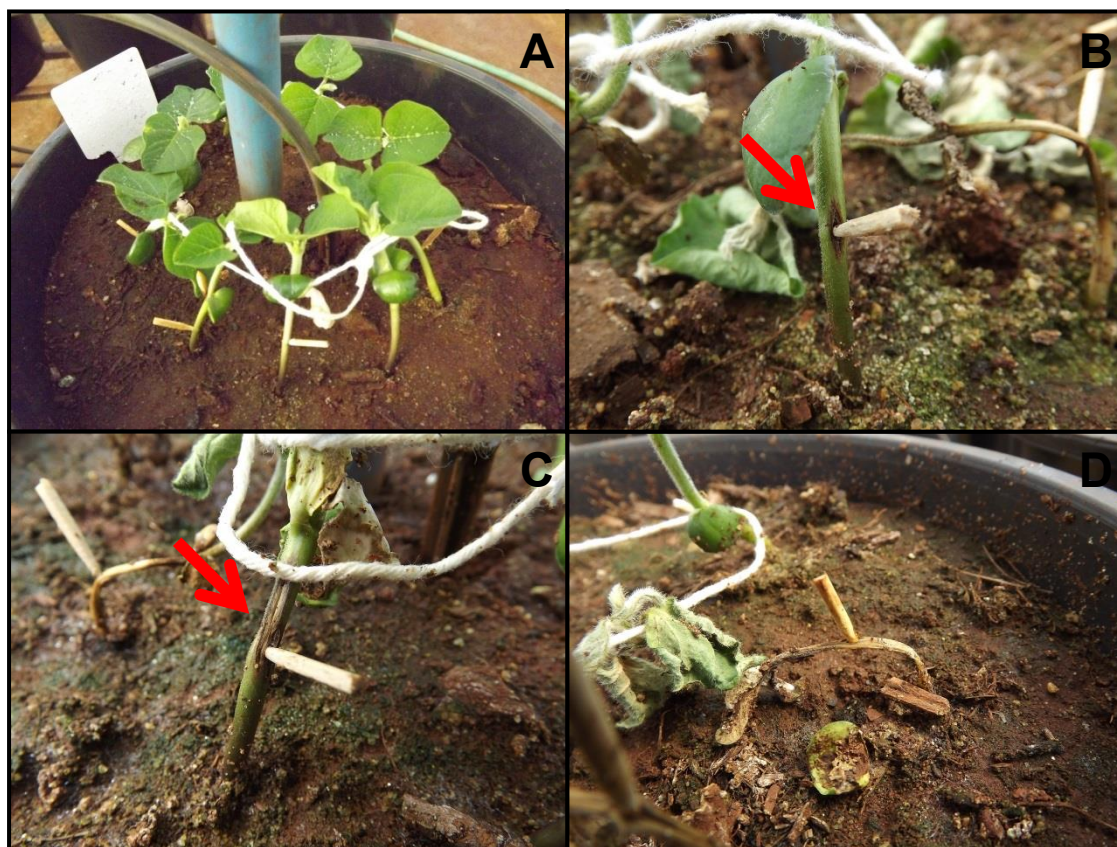
$H_1$ : as frequências de segregação observadas diferirem estatisticamente das frequências esperadas.

Se o valor calculado para o teste de Qui-Quadrado for maior que o valor tabelado ao nível de 5% de probabilidade ( $P < 0,05$ ), rejeita-se  $H_0$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

A análise da presença de genes de resistência à fitófтора em nove cruzamentos entre a BRSMG 752S e PI's portadoras de genes de resistência inoculadas (Figura 3 - Imagem A) em conjunto com os parentais e padrões de suscetibilidades, permitiu no momento da avaliação, detectar três diferentes fenótipos, o fenótipo de resistência (Figura 3 - Imagem B), intermediário (Figura 3 - Imagem C) e fenótipo de suscetibilidade (Figura 3 - Imagem D).

**Figura 3.** Plantas recém-inoculadas e fenótipos observados.



Legenda: **A:** Plantas recém-inoculadas e amarradas com barbante de algodão de maneira facilitar que o local de inoculação se mantenha úmido. **B:** Planta exibindo reação de hipersensibilidade – “calo” de resistência, típico de plantas resistentes. **C:** Planta com reação intermediária (lesões aprofundadas ao longo da haste). **D:** Planta suscetível característica.  
Fonte: Adriano C. Camolese.

A BRSMG 752S teve comprovada sua reação de resistência sendo que todas as plantas foram agrupadas como resistentes (Tabela 2). A presença de plantas infectadas dentro do parental resistente ressalta a importância de se considerar as plantas com reação intermediária como resistentes dentro dos objetivos deste trabalho, sendo mais rigoroso contra a ocorrência do “falso suscetível”.

A partir dos cruzamentos dessa cultivar com as diversas fontes portadoras de *loci Rps* conhecidos, observou-se padrões de segregação de dois ou até mais genes de resistência. Bergamo, Arias e Soares (2011) citam que ao cruzar plantas da BRSMG 752S com as cultivares resistentes BRS 246RR e BRS 260, foram observadas, na geração F<sub>2</sub>, padrões de segregação compatíveis com a presença de dois diferentes genes de resistência e quando cruzada com a BRS 262 a segregação indica a presença de três genes de resistência. Um dos ancestrais da BRS 262 é a “Sharkey”, que de acordo com os autores possui os *loci Rps1c* e *Rps3*. Costamilan, Soares e Bertagnolli (2010) citam que as BRS 260 e BRS 262 são resistentes e a BRS 246RR é intermediária quanto ao isolado compatível com os *loci Rps1* e *Rps7*.

Exatamente 80% das plantas derivadas da cultivar suscetível BRS 268 foram classificadas como suscetíveis ou mortas e 20% como infectadas ou intermediárias (Tabela 2). Este resultado é muito importante, pois revela que todo o preparo do inóculo, inoculação, condições ambientais e avaliações foram bem conduzidos e garantiram a ausência de escapes ou de plantas saudáveis dentro do parental suscetível. Apesar disso, a presença de 20% de plantas com reação intermediária dentro do parental suscetível, indica que um material sabidamente suscetível poderá ser classificado como intermediário dentro do padrão de qualidade deste experimento.

Em geral, o número de plantas avaliadas por cruzamento nas populações segregantes foi suficiente para assegurar a ocorrência de todos os genótipos e fenótipos esperados (Tabela 3).

No decorrer das análises das segregações, foi possível constatar que para vários cruzamentos outras proporções também não foram rejeitadas. Como exemplo, para o cruzamento entre a Williams 79 e a BRSMG 752S, a proporção definida pela segregação de um só gene de resistência (3R:1S) não

é rejeitada. Porém, mesmo em casos onde o número de plantas avaliadas no cruzamento tenha sido relativamente baixo para definir os padrões de segregação com absoluta certeza, a simples ocorrência de segregação na geração  $F_2$  com a presença de plantas resistentes e suscetíveis, já é suficiente para comprovar que os genes de resistência nos dois parentais envolvidos não são alélicos, trazendo informação importante para os objetivos deste trabalho.

Portanto, durante as análises além de se utilizar os padrões de segregação que não foram rejeitados, também foi levado em consideração o padrão de todos os cruzamentos, permitindo assim um melhor entendimento do controle genético envolvido. Além disso, para o cruzamento citado, essa proporção não se aplica, pois já é conhecido que a BRSMG 752S é portadora de gene de resistência, como já foi relatado por Bergamo, Arias e Soares (2011).

Em trabalho posterior, Bergamo (2012) também relata dificuldades em definir qual o gene de resistência a BRSMG 752S porta em seu genoma e qual o tipo de interação, chegando a citar que o gene poderia ser recessivo em função de padrões de segregação de 1R:3S obtidos na  $F_2$  derivada de cruzamentos com a cultivar suscetível BRS 268 (informação pessoal), mas que em função da baixa qualidade do experimento (presença de escapes no padrão suscetível BRS 268), esses resultados eram inconclusivos e exigiam estudos complementares.

Quando comparados com o trabalho de Bergamo (2012) é possível notar que os dados aqui mostrados são comparativamente mais robustos, pois não foram observadas plantas sadias no padrão suscetível BRS 268. O motivo provável de tal variação pode ser atribuída a fatores ambientais afetando negativamente o inóculo e a evolução da doença, gerando falhas na inoculação. Assim, os dados revelam que a pressão de inóculo sobre as plantas analisadas foi maior do que no trabalho acima citado, pois nos padrões suscetíveis as plantas ou morreram ou se mostraram infectadas. Com essa maior pressão de inóculo fica mais seguro afirmar que determinado genótipo é resistente ou suscetível.

**Tabela 2.** Resultados das avaliações quanto à característica de cada genótipo utilizado nos cruzamentos separadamente.

Genótipo	Gene/ Característica	Sadias	Intermediárias	Suscetíveis	Total de Plantas
BRS 268	S	0	13	52	65
BRSMG 752S	R	13	8	0	21
BRS 260	R	26	0	0	26
BRS 246 RR	R	15	0	0	15
Williams 79	1c	22	0	0	22
Williams 82	1k	24	0	0	24
PI 340046	3c	-	-	-	-
PI 547842	1b	23	0	0	23
PI 547862	3a	20	0	0	20
PI 547876	5	24	0	0	24
PI 86050	4	9	0	0	9
PI 591511	6	22	0	0	22
PI 399073	8	18	0	0	18

A segunda coluna correlaciona o gene *Rps* que cada diferenciadora porta em seu genoma ou a característica do genótipo em questão. R: resistente; S: suscetível e os genes/alelos *Rps* relacionados a cada genótipo (*Rps1c*, *Rps1k*, etc.).

**Tabela 3.** Resultados sumarizados das avaliações dos cruzamentos entre as fontes listadas com a cultivar BRSMG 752S.

Fontes	Frequências Observadas		Frequências Esperadas		Total de Plantas	Segregação não rejeitada	$\chi^2$	Probabilidade
	Plantas Sadias	Plantas Suscetíveis	Plantas Sadias	Plantas Suscetíveis				
Williams 79	83	28	90,19	20,81	111	13:3	3,05	8%
Williams 82	95	18	91,81	21,19	113	13:3	0,59	44%
PI 547842	112	27	112,94	26,06	139	13:3	0,04	84%
PI 547862	104	29	108,06	24,94	133	13:3	0,81	37%
PI 86050	63	53	65,25	50,75	116	9:7	0,18	67%
PI 547876	62	49	62,44	48,56	111	9:7	0,01	93%
PI 591511	43	36	44,44	34,56	79	9:7	0,11	74%
PI 340046	94	2	91,5	4,5	96	61:3	1,46	23%
PI 399073	37	9	37,38	8,63	46	13:3	0,02	89%

Segregações expressas em resistentes : suscetíveis. Probabilidade expressa em porcentagem equivale ao valor de *P*.

Tendo por base os resultados obtidos no trabalho de Bergamo (2012) e os dados obtidos neste trabalho (Tabela 3) pode-se concluir que a BRSMG 752S não possui nenhum alelo de resistência nos *loci Rps1* e *Rps3*, pois para estes dois loci foram testados vários alelos, sempre demonstrando segregação entre os genes derivados dos dois parentais resistentes. Para os cruzamentos entre a BRSMG 752S com os doadores portadores dos *loci Rps4*, *Rps5*, *Rps6* e *Rps8* também houve segregação de plantas resistentes e suscetíveis na geração F<sub>2</sub>, indicando que o gene da BRSMG 752S esteja em *locus* independente em relação a todos esses loci.

O padrão de segregação (Tabela 3) predominante nas gerações F<sub>2</sub> derivadas dos cruzamentos envolvendo a BRSMG 752S com as diversas fontes foi de 13R:3S, compatível com a segregação de dois genes, um com dominância completa e outro recessivo. Assim, para os genes derivados dessas fontes, tanto o genótipo homozigoto como o heterozigoto produzem reação de resistência independente da presença dos genes da BRSMG 752S, funcionando como genes dominantes. Já o gene de resistência derivado da BRSMG 752S só confere reação de resistência quando em homozigose, comportando-se, portanto como um gene recessivo. Tal fato aponta para uma constatação inesperada, mas que possui amplo suporte nos dados aqui mostrados, de que o gene de resistência derivado da cultivar BRSMG 752S seja recessivo.

Para os cruzamentos que apresentaram a segregação de 9R:7S (Tabela 3), a diferença em relação aos casos anteriores é que o duplo heterozigoto estaria produzindo reação de suscetibilidade e não de resistência como no padrão 13R:3S anteriormente discutido. Este tipo de segregação é descrita na literatura como epistasia entre genes complementares, onde a resistência só seria expressa na presença de pelo menos um alelo de resistência em cada um dos dois locos, mas esta teoria não se aplica para esse caso já que os parentais são resistentes *per se*. Algum tipo de epistasia estaria ocorrendo entre os genes dominantes das fontes de resistência e o gene recessivo da BRSMG 752S de forma a expressar reação de suscetibilidade do duplo heterozigoto, quando seria esperada uma reação de resistência. Tal hipótese é plausível, pois Demirbas et al. (2001) em seu trabalho cita que os loci *Rps4*, *Rps5* e *Rps6* estão no cromossomo 18 e estão ligados.

Apesar desse padrão de herança ser mais complexo, a segregação com a ocorrência de plantas resistentes e suscetíveis já é suficiente para admitir a presença de genes com segregação independente e o esclarecimento do tipo de epistasia existente entre esses genes de resistência está fora do escopo deste trabalho, exigindo estudos complementares. Ainda que as fontes tenham sido caracterizadas como resistentes, elas não foram fenotipadas com a mesma raça utilizada neste experimento. Assim, a PI pode ser resistente à raça “n” mas quando testada com a raça utilizada neste trabalho, seus genes não mais demonstram a reação de resistência e quando cruzadas com a BRSMG 752S essa “diminuição” no nível de resistência se torna evidente.

Houve um único cruzamento que gerou segregação indicando a presença de três genes de resistência (Tabela 3), sendo dois dominantes derivados da PI 340046 e um recessivo derivado da BRSMG 752S. Nesse caso, a segregação de 61R:3S também é condizente com a presença de um gene recessivo presente na cultivar BRSMG 752S. Além da segregação observada no cruzamento, de acordo com o site ARS-GRIN (<http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/acc/obs.pl?1253416>), este genótipo é resistente a 13 raças do patógeno. Embora ela só tenha sido associada ao gene *Rps3c* é muito provável que existam mais genes de resistência em seu genoma que ainda não foram descobertos ou totalmente elucidados.

## CONCLUSÕES

A resistência à fitóftora derivada da cultivar BRSMG 752S é controlada por um gene recessivo localizado em loco distinto em relação aos loci *Rps1*, *Rps3*, *Rps4*, *Rps5*, *Rps6* e *Rps8*. Trata-se do primeiro gene de resistência recessivo descrito para essa doença e que já está disponível em material adaptado para uso nos programas de desenvolvimento de cultivares de soja.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C.; FERREIRA, F. A. **Inoculação de fungos fitopatogênicos**. In: ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. Métodos em fitopatologia. Viçosa: UFV, p. 117-137, 2007.

BERGAMO, Maurilio Cristiano Batista; ARIAS, Carlos Alberto Arrabal; SOARES, Rafael Moreira. Herança da resistência de variedades comerciais brasileiras de soja à podridão radicular de fitóftora. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS**, 6. 2011, Búzios. Panorama atual e perspectivas do melhoramento de plantas no Brasil. [Búzios]: SBMP, 2011. 4 p. 1 CD-ROM.

BERGAMO, Maurilio Cristiano Batista. **Herança da resistência da soja à podridão radicular de fitóftora, em variedades comerciais brasileiras**. 2012. 53 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Genética e Biologia Molecular, Departamento de Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

COSTAMILAN, Leila Maria; SOARES, Rafael Moreira; BERTAGNOLLI, Paulo Fernando. Podridão Radicular de Fitóftora: (*Phytophthora sojae*). In: ALMEIDA, Álvaro Manuel Rodrigues; SEIXAS, Claudine Dinali Santos (Ed.). **SOJA: Doenças Radiculares e de Hastes e Inter-relações com o Manejo do Solo e da Cultura**. Londrina: Embrapa Soja, 2010. p. 105-126.

DORRANCE, Anne Elizabeth; SCHMITTHENNER, August Frederick. New Sources of Resistance to *Phytophthora sojae* in the Soybean Plant Introductions. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, n. 12, p.1303-1308, dez. 2000.

FERREIRA, Daniel Furtado. **Estatística Básica**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2005. 664 p.

RINCÃO, Michelle Pires. **Validação de Marcadores Moleculares em Soja ligados a Genes de Resistência à Podridão Radicular de Fitóftora**. 2013. 94 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Genética e Biologia Molecular, Departamento de Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

## **CAPÍTULO 3 – IDENTIFICAÇÃO, VALIDAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE SNPs EM SOJA VISANDO A SELEÇÃO DE PLANTAS PORTADORAS DO GENE *Rps1k***

### **RESUMO**

Dentre as principais doenças que pode comprometer a produção de soja, a Podridão Radicular de Fitóftora, causada pelo patógeno *Phytophthora sojae*, pode gerar grandes decréscimos de produção. A resistência genética dos cultivares conferida pelos genes *Rps* é a principal ferramenta no manejo da doença. O gene *Rps1k* é amplamente empregado em cultivares resistentes, pois se trata de um gene estável e que confere resistência a várias raças do patógeno. Visando a seleção de plantas portadoras do *locus Rps1k* que posteriormente seriam utilizadas para validação de marcadores moleculares, foram fenotipados 108 genótipos. Além destes genótipos, outras 17 linhagens elite provenientes do Programa de Melhoramento Genético da Embrapa Soja (PMG) já fenotipados, foram genotipados por meio de ensaios baseados em marcadores moleculares do tipo *SNP*. O objetivo deste trabalho foi descobrir, validar e otimizar marcadores moleculares do tipo *SNPs* para uso em larga escala na seleção de genótipos portadores do gene *Rps1k*. Foram genotipados 68 materiais com quatro ensaios de genotipagem. Dentre eles, os ensaios 7221 e 8094, já testados e validados em populações biparentais segregantes, foram construídos com base em sequências disponíveis em bancos de dados e os ensaios 4740659 e 4740671 foram construídos com base em dados obtidos via *GBS*. O ensaio 7221 obteve a maior acuracidade dentre os marcadores, sendo que 31 genótipos foram caracterizados como portadores do *locus Rps1k*. Também foi possível otimizar reações de genotipagem, reduzindo custos e aumentando o número de amostras analisadas simultaneamente.

### **INTRODUÇÃO**

*Phytophthora sojae* é um oomiceto capaz de infectar plantas de soja em qualquer estágio de desenvolvimento. Sua ocorrência é favorecida por solos

compactados, encharcados e temperaturas médias próximas a 24°C e quando não encontra as condições nem hospedeiros propícios à infecção, seus oósporos podem permanecer no solo por anos até que o ambiente e/ou hospedeiro seja(m) propício(s) ao seu desenvolvimento.

Dentre as técnicas de manejo recomendadas para controle e diminuição dos danos, o emprego de cultivares que possuam resistência genética ao patógeno têm sido altamente eficaz durante várias décadas. Pelo menos vinte *loci Rps* que conferem resistência específica ao patógeno já foram descritos. No Brasil só uma raça, detectada no Rio Grande do Sul, capaz de infectar plantas portadoras do *locus Rps1k* e causar a doença (COSTAMILAN et al., 2012).

Vários marcadores *SSR* e *SNPs* já foram descritos como ligados, no entanto, apenas recentemente Rincão (2013), validou três marcadores *SNPs* com elevada acurácia na seleção em populações biparentais. Empresas de melhoramento do mundo todo tem realizado esforços para descobrir, otimizar e aplicar os marcadores na SAM, exemplo disso são as patentes “*Methods and compositions for selecting soybean plants resistant to phytophthora root rot*” (US 8859845 B2) e “*Soybean markers linked to phytophthora resistance*” (US 20140283197 A1).

Técnicas atuais de obtenção e mapeamento de *SNPs* baseiam-se principalmente no sequenciamento de nova geração. A tecnologia *GBS* desenvolvida há poucos anos, combina o sequenciamento de alto desempenho com a descoberta e genotipagem simultânea de alelos de *SNPs*.

Neste trabalho, reportamos a validação de quatro marcadores *SNPs*, dois inéditos, identificados pela técnica de *GBS*, bem como sua acurácia de seleção do *locus Rps1k* em diferentes backgrounds genéticos. Paralelamente os sistemas de detecção via *qPCR* foram otimizados para emprego em larga escala, utilizando baixo volumes de reação e *DNA* oriundo de métodos de extração *in house*.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Material Vegetal**

Para validação dos marcadores *SNPs* ligados ao *locus Rps1k* foram selecionados 108 genótipos de soja potencialmente portadores ou não portadoras deste *locus*, entre plantas introduzidas (PI), cultivares brasileiras e americanas. A seleção de tais genótipos baseou-se na busca da genealogia de cada material em sites de bancos de dados tais como *VIPS* (<http://www.vipsoybeans.org/v4/vpCompare/cvCS1.cfm?b=y>) e *ARS – GRIN* (<http://www.ars-grin.gov/>) e fontes literárias como livros e artigos que citavam se o genótipo/variedade era resistente/portador do gene alvo. Além dos genótipos acima, foram selecionados 17 linhagens elite do PMG que foram selecionados para resistência a fitóftora durante três anos.

## Fenotipagem

As fenotipagens dos materiais utilizados para a validação de marcadores *SNPs* ligados ao *locus Rps1k* foram conduzidas na Embrapa Trigo em Passo Fundo/RS, com uma série de isolados capaz de diferenciar genótipos portadores ou não do *locus Rps1k*. Os genótipos foram infectados com uma série de quatro raças (patótipos) de *P. sojae*, cada um com diferentes fórmulas de virulência a genes *Rps*, conforme Tabela 1. Tais fenotipagens foram realizadas no período de maio a setembro de 2014.

**Tabela 1.** Denominações dos isolados, fórmula de virulência e local de coleta.

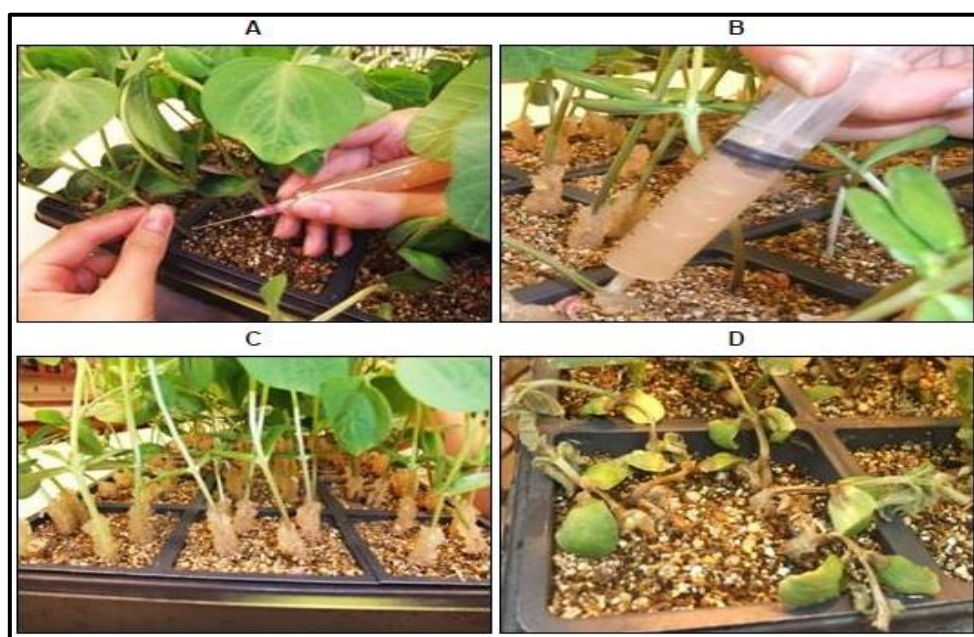
Isolados	Fórmula de Virulência	Origem
Ps2.4	1d, 2, 3b, 3c, 4, 5, 6, 7	Passo Fundo – RS
Ps14.4	3a, 3b, 8	Cachoeirinha – RS
R4	1a, 1c	EUA
Ps36.1	1b, 3a, 8	Cachoeira do Sul – RS

O isolado R4 foi cedido a Leila M. Costamilan por Anne E. Dorrance, *Ohio State University*. Fonte: Leila M. Costamilan (comunicação pessoal). A fórmula de virulência demonstra que se o genótipo tiver somente aqueles genes, ele demonstrará o fenótipo de suscetibilidade.

A inoculação foi feita utilizando o método de injeção de macerado de micélio com quinze dias de crescimento e de meio de cultura na haste baseado no método desenvolvido por Schmitthenner e Bhat (1994) (Figura 1). O macerado é obtido passando-o duas vezes através de uma seringa de 20 mL.

É feita uma incisão com uma agulha de injeção de tamanho 18 (COSTAMILAN et al., 2012). A incisão tem aproximadamente 2 cm de comprimento ao longo da haste da plântula imediatamente acima da linha do solo. É injetado por volta de 0.8 a 1 mL do macerado na incisão com ajuda da seringa. Após a inoculação, as plântulas foram incubadas em câmara húmida por 48 horas com temperatura controlada entre 18 a 20°C no escuro. Depois disso, as plântulas foram colocadas em casa-de-vegetação com temperaturas entre 18 a 28°C sob luz natural. Foram inoculadas no mínimo cinco plantas por genótipo (Leila M. Costamilan, comunicação pessoal; VARIETAL INFORMATION PROGRAM FOR SOYBEANS, 2011; COSTAMILAN et al., 2012). A leitura da reação foi realizada sete dias após a inoculação. Considerou-se efetiva a reação até 30% de plantas mortas e inefetiva a reação com mortalidade acima de 70%.

**Figura 1.** Método de inoculação por seringa.



Legenda: **A:** Incisão sendo feita no hipocótilo da plântula com ajuda de uma agulha. **B:** Plântula sendo inoculada com o patógeno. **C:** Plântulas inoculadas. **D:** Plântulas suscetíveis mortas.  
Fonte: VARIETAL INFORMATION PROGRAM FOR SOYBEANS, 2011.

### **Identificação e seleção de SNPs ligados ao *locus Rps1k***

Os novos marcadores SNPs foram selecionados próximos ou se possível, dentro da região contendo o *locus Rps1k*. Dados de GBS (PASSIANOTTO, 2014), obtidos a partir do sequenciamento de 418 genótipos

de soja, foram utilizados para a seleção dos marcadores. Dentre os parâmetros utilizados para seleção, os principais foram: frequência alélica, homozigosidade e distância do locus *Rps1k*. A Tabela 2 mostra uma parte dos haplótipos gerados para seleção dos *SNPs*.

**Tabela 2.** SNPs identificados na região de interesse com suas respectivas posições no genoma e a reação a isolados de *P. sojae* capazes de identificar a presença de *Rps1k* via fenotipagem.

SNP/Posição	4608515	4608556	4700063	4700065	4740659	4740671	4740688
Alelo	A/G	T/A	C/T	G/A	T/C	C/T	C/T
BRS 268	A	T	C	G	T	C	C
BRS Candieiro	A	T	C	G	T	C	C
BRS Corisco	A	T	C	G	T	C	C
BRS Macota	A	T	C	G	T	C	C
BRS Milena	A	T	C	G	T	C	C
BRS Raimunda	A	T	C	G	T	C	C
BRS Tianá	A	T	C	G	T	C	C
BRS 216	A	A	C	G	C	C	C
BRS 263	A	T	C	G	T	C	C
BRSGO 7960	A	T	C	G	T	C	C
BRSGO 8360	A	A	C	G	C	C	C
BRSGO Chapadões	A	T	C	G	T	C	C
BRSGO Raissa	A	T	C	G	T	C	C
BRSMT Pintado	A	T	C	G	T	C	C
CD 215	A	T	C	G	T	C	C
Embrapa 60	A	A	C	G	C	C	T
IAC 11	G	A	C	A	C	T	C
MT/BR49 (Pioneira)	A	T	C	G	T	C	C
MT/BR53 (Tucano)	A	T	C	G	T	C	C
PI 458294	A	T	T	G	N	N	N

O primeiro alelo corresponde ao alelo encontrado no genoma referência (Williams 82). Legenda: A – Adenina; G – Guanina; T – Timina; C – Citosina; N – Qualquer uma das quatro bases. A primeira letra de cada haplótipo representa a base encontrada no genoma referência (Williams 82). S: Suscetível ao isolado compatível com os genes *Rps1d* e *Rps7*; R: Resistente ao isolado compatível com os genes *Rps1d* e *Rps7*; "-": Genótipo não testado. Fonte: Sistemas de Produção 16 – Tecnologias de Produção de Soja – Região Central do Brasil 2014.

Os *SNPs* identificados a partir da análise via *GBS* foram selecionados e suas regiões flangeadoras foram obtidas a partir do alinhamento de suas sequências contra o genoma referência (sites *SoyBase* e *Phytozome*) e as sequências disponíveis nas patentes (BHATTACHARYYA, 2007; 2010).

Tais sequências foram utilizadas para o desenho de primers para confirmação do polimorfismo via sequenciamento dos produtos de *PCR* entre genótipos resistentes e suscetíveis a fitóftora. Cerca de 500 pb de cada lado da região contendo *SNPs* foi utilizada para o desenho dos primers utilizando o software online Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). Os conjuntos de primers utilizados para sequenciamento estão disponíveis no Anexo A.

Os conjuntos de primers foram utilizados para amplificação do *DNA* dos genótipos resistentes portadoras do *locus Rps1k* (Williams 82, BMX Alvo RR, Resnik e Kingwa) e dois potencialmente portadores (G - 46 e G - 45), e seis plantas que não portavam o *locus Rps1k* (suscetíveis) em seu genoma: BRSMG 752S, BRS 268, BRS 133, BRS 284, BRS 232 e BRS Invernada, visando confirmar a presença do polimorfismo, gerando bandas altamente específicas (Anexo B).

A amplificação dos fragmentos contendo os *SNPs* foi realizada via *PCR* convencional em um volume final de 50  $\mu$ L, contendo: 2  $\mu$ L a 20  $\mu$ M de cada *primer*, 1,5  $\mu$ L de  $MgSO_4$  a 2 mM, 3  $\mu$ L de dNTPs a 0,2 mM cada e 0,2  $\mu$ L (equivalente a uma unidade) da enzima *Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity*, 4  $\mu$ L de *DNA* a 10 ng/ $\mu$ L e quantidade de água suficiente para 50  $\mu$ L. Os produtos de *PCR* foram separados em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta.

Para cada genótipo foram feitas duas reações de amplificação utilizando o mesmo *DNA* template gerando um volume final aproximado de 100  $\mu$ L. Os produtos de *PCR* foram purificados utilizando o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean Up System* (Promega) conforme recomendações do fabricante. As amostras foram armazenadas em freezer  $-20^{\circ}C$  até serem enviadas para sequenciamento.

A partir do resultado de sequenciamento, as sequências dos diferentes genótipos foram alinhadas e a detecção do polimorfismo foi conduzida com auxílio do software *DNABaser*. A seleção dos *SNPs* para validação baseou-se

no polimorfismo entre os genótipos resistentes e suscetíveis e a frequência alélica baseado nos dados de *GBS* dos genótipos analisados, bem como inserção dos *SNPs* em regiões não repetitivas, como regiões ricas em retrotransposons. Tais regiões foram identificadas com o auxílio do software *Repeat Masker Web Server* (<http://www.repeatmasker.org/cgi-bin/WEBRepeatMasker>). A partir das análises das sequências contendo os *SNPs* selecionados, foram desenhados os primers e sondas do tipo *MGB Probes* marcadas com os fluoróforos VIC® e FAM™ para ensaios em multiplex via *qPCR*.

### Otimizações dos Ensaios de Detecção de *SNPs*

Os ensaios construídos com base nos *SNPs* BARC-041781-08094 (BARC 8094) e BARC-31833-07221 (BARC 7221) utilizados por Rincão (2013) foram selecionados para validação e otimização via *qPCR* para uso em larga escala. Em seu trabalho, ambos os *SNPs* foram avaliados em 87 famílias biparentais segregantes para o locus *Rps1k* na geração F<sub>2:3</sub>, tendo como fonte a parental Williams 82. As distâncias destes marcadores em relação ao gene alvo foram 8,5 cM e 6,2 cM respectivamente, enquanto suas taxas de concordância entre fenótipo e genótipo foram de 91,5% e 93,8%, respectivamente.

A otimização dos ensaios visou determinar as concentrações ideais do Ensaio de detecção, contendo os primers e sondas para o *SNP* alvo, tanto em placas de 96 como 384 *wells*, ajustando para volumes final de 5,5 µL, bem como as condições ideais de termociclagem que permitiram diferenciar os possíveis genótipos com elevada acurácia. As reações foram conduzidas em termociclador ABI 7900 em um volume final de 5,5 µL contendo 20 ng de *DNA*, 1x tampão *TaqMan*® e diferentes concentrações finais do ensaio, variando entre 50 e 250 nM. Adicionalmente, testes foram conduzidos a fim de determinar se os métodos SAMQ e SAMR de extração de *DNA* desenvolvidos e validados “*in house*” de baixo custo e aplicáveis para extração larga escala (), a partir de *DNA* de folha, poderiam se empregadas, além do método CTAB (KEIM et al., 1988). O *DNA* extraído pelos protocolos CTAB e SAMQ foram diluídos para concentração de 10 ng/µL, enquanto pelo método de extração SAMR na proporção de 1:25.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Identificação e seleção de *SNPs* ligados ao locus *Rps1k*

Foram selecionados seis *SNPs* para validação e potencial uso em SAM. Suas posições físicas no cromossomo 3 da soja são 4.608.515, 4.608.556, 4.700.063, 4.700.065, 4.740.659 e 4.740.688, de acordo com a segunda versão do genoma.

Com base no sequenciamento, foi possível confirmar a presença do alelo C para Williams 82 e demais plantas resistentes e o alelo T para as plantas suscetíveis, resultado que condiz com o predito pelas análises de *GBS* para o *SNP* alvo 4740659. O *SNP* alvo 4740688 não foi confirmado, sendo que somente o alelo C foi identificado para todos os genótipos (Anexo C). Além destes, foi possível identificar um novo *SNP* não alvo na posição 4.740.571.

O *SNP* alvo 4700063 foi confirmado como tendo um alelo T para a Williams 82 e as demais plantas resistentes e o alelo C para as plantas suscetíveis, contrariando assim as informações geradas via *GBS*. O *SNP* alvo 4700065 não foi confirmado, sendo que foi detectado somente o alelo G para todas as plantas (Anexo D).

O *SNP* alvo 4608515 foi confirmado o alelo T para a Williams 82 e demais resistentes e para as suscetíveis o alelo confirmado foi o A, contrariando os resultados de *GBS*, que previa um alelo G para as plantas resistentes. O *SNP* alvo 4608556 foi confirmado tendo um alelo C para a Williams 82 e demais plantas resistentes e o alelo T foi confirmado para as plantas suscetíveis, também diferindo dos alelos previstos pelo *GBS* (Anexo E).

Assim, dos seis novos *SNPs* identificados via *GBS*, em quatro foi possível confirmar a existência do polimorfismo via sequenciamento, porém, apenas o 4740659 teve o haplótipo similar ao previsto via *GBS*.

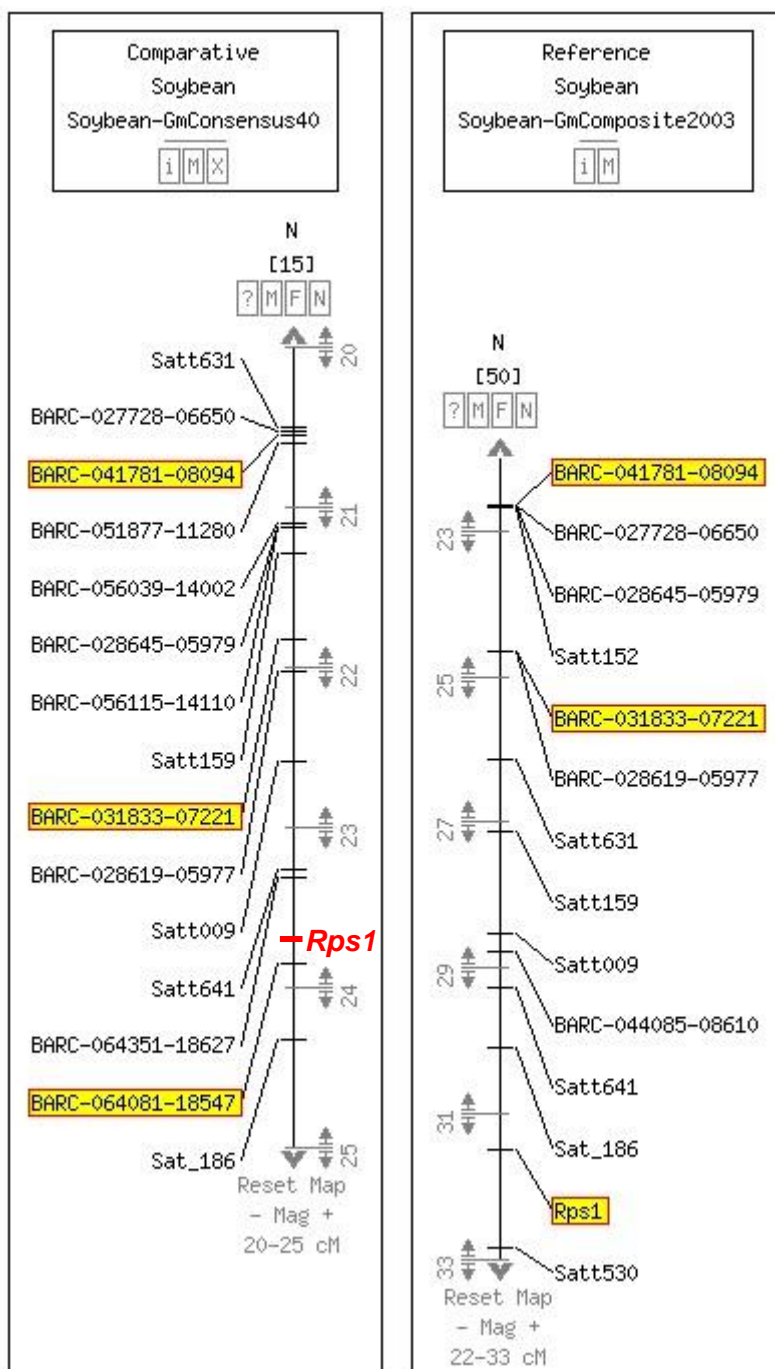
Por estarem apenas a 12 bases de distância, os *SNPs* 4740659, frequência alélica superior a 5%, e o *SNP* 4740671, frequência alélica em torno de 0,01%, foram construídos em um único Ensaio *TaqMan*® chamado de ADR659671. Foram feitos de modo a empregar o mesmo par de *primers* para amplificação da região contendo ambos os *SNPs*, mas sondas específicas apenas para a detecção de cada alelo positivo para a presença do *Rps1k*,

permitindo que os dois *SNPs* possam ser detectados em um único ensaio multiplex. Nesse caso, genótipos heterozigotos para cada *SNP* não são capazes de serem identificados. Essa estratégia poderia reduzir pela metade o custo de construção dos ensaios, pois seria utilizado apenas um fluoróforo por *SNP*, e não mais dois, padrão utilizado atualmente.

### **Localização do *locus Rps1k***

De acordo com o mapa de ligação do banco de dados do site *SoyBase*, o *Rps1* é flanqueado pelos marcadores microssatélites *Satt\_641* e *Sat\_186*, sendo que os dois estão a aproximadamente 0,5 cM de distância (Figura 2). Rincão (2013) mostra a localização do *locus Rps1k* e cita que os marcadores *Satt\_641* e *Satt\_009* estão a 3,3 e 4,3 cM de distância, respectivamente. Adicionalmente, seu trabalho também gerou um mapa de ligação, onde os marcadores BARC-031833-07221 e o BARC-041781-08094 utilizados em seu trabalho para genotipagem de plantas quanto à ausência ou presença do *locus Rps1k*, estão posicionados aproximadamente a 6,2 cM e 8,5 cM do gene alvo, respectivamente. Sun et al., (2011), com base nos dados de Song et al., (2004) citam que o *locus Rps1* está intimamente flanqueado pelos *Satt\_159* e *Satt\_009*, numa distância de aproximadamente 1,4 cM entre os dois marcadores. Sugimoto et al., (2011) utilizando população gerada a partir dos genótipos Tanbakuro and Waseshiroge, citam que o *Rps1* é flanqueado pelos *Satt\_009* e *Satt\_530* e distam do gene 0,9 e 12,1 cM respectivamente.

**Figura 2.** Mapas de ligação ilustrando as posições de marcadores e genes.



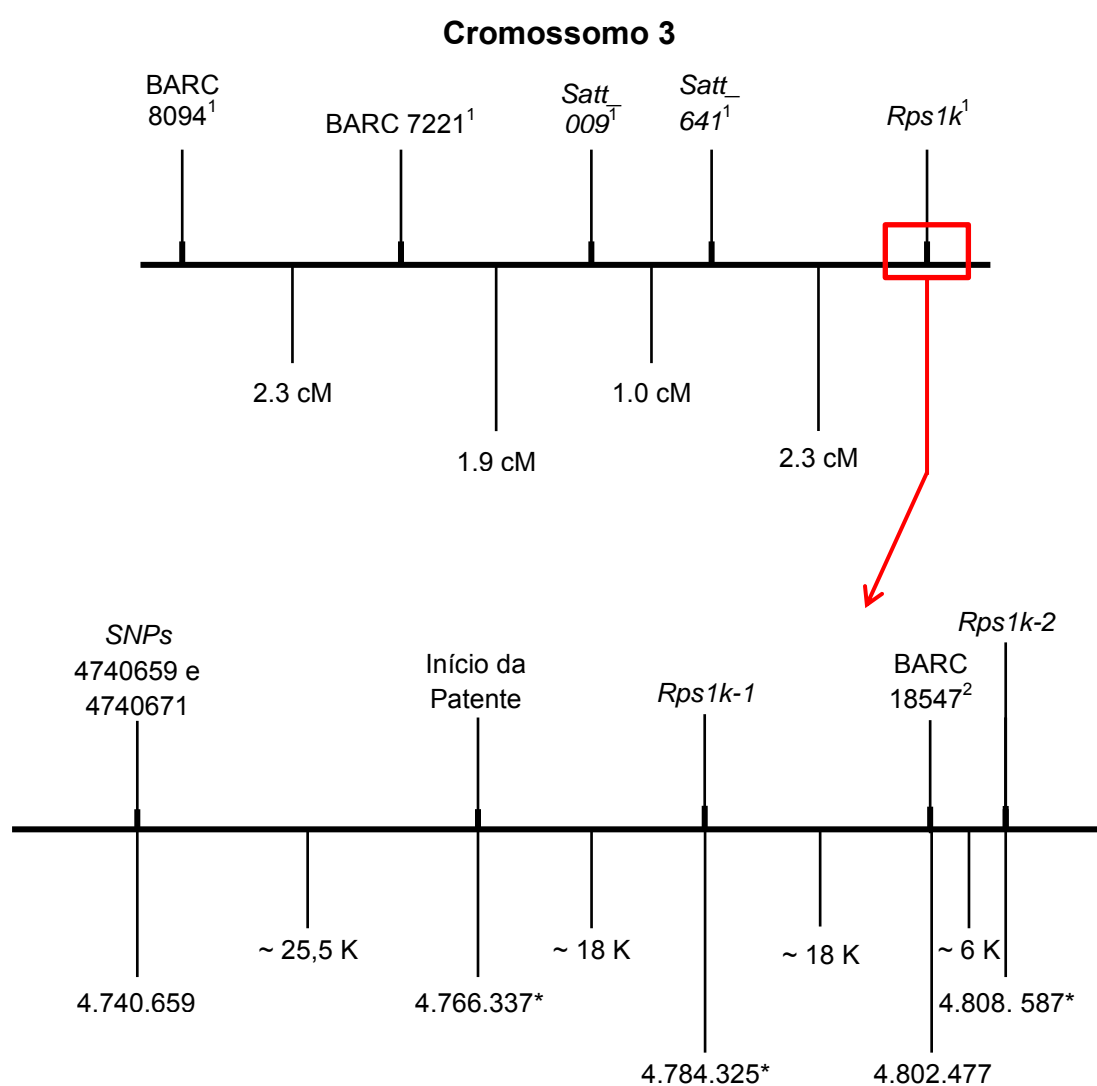
Legenda: **Esquerda:** Mapa ligação mostrando os marcadores BARCs, SSRs e o locus *Rps1* (posição aproximada). Mapa *Comparative Soybean Soybean-GmConsensus40*. **Direita:** Mapa de ligação Reference Soybean Soybean-GmComposite2003 que ilustra a posição do *Rps1*. Adaptado do site SoyBase.

Por meio do alinhamento das sequências dos *SNPs* publicados por Rincão (2013) com as sequências encontradas nas patentes de Bhattacharyya (2007; 2010) e o genoma de referência da soja encontrado nos sites SoyBase

(<http://soybase.org/>) e *Phytozome* (<http://www.phytozome.net/search.php>), o locus *Rps1k* inicia-se aproximadamente no nucleotídeo de posição 4.784.325 no cromossomo 3 do genoma da soja.

O BARC-064081-18547, também utilizado por Rincão (2013), está entre os genes *Rps1k-1* e *Rps1k-2*, sendo que o BARC está a aproximadamente 18 mil e 6 mil bases de distância do início do *Rps1k-1* e *Rps1k-2*, respectivamente.

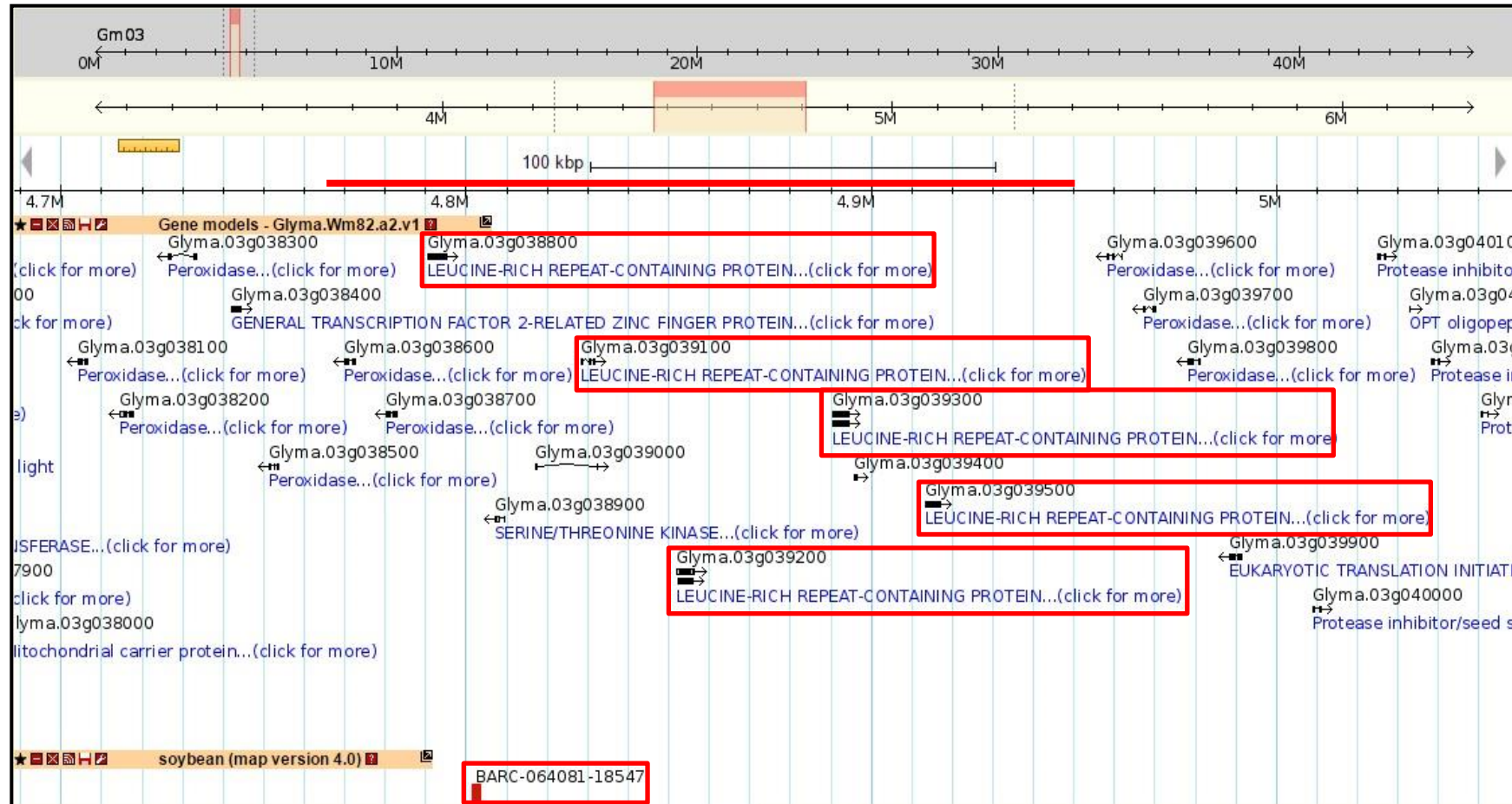
**Figura 3.** Esquema do cromossomo 3 do genoma da soja.



Integração de bancos de dados e de mapas genéticos e físicos da região do genoma. Legenda: <sup>1</sup>: dados retirados de Rincão (2012); <sup>2</sup>: dados retirados do site SoyBase. \*: distâncias aproximadas.

Por meio do *blast* da sequência do *Rps1k-1* nos sites *SoyBase* e *Phytozome* foi possível obter os mapas físicos (Figura 4) da região onde está inserido o gene, sendo possível identificar cinco *loci* (Glyma.03g038800, Glyma.03g039100, Glyma.03g039200, Glyma.03g039300 e o Glyma.03g039500) potencialmente codificadores de proteínas do tipo *LRR*, característico de genes de resistência a doenças. Tal organização vem corroborar os dados publicados por Bhattacharyya (2007, 2010), onde ele cita que existem cinco genes independentes que compõem a família gênica do *Rps1k*, todos eles produzindo proteínas do tipo *LRR*.

Figura 4: Mapa físico destacando a região do *locus Rps1k* no cromossomo 3 do genoma da soja.



Legenda: *Glymas* e BARC (retângulos) e a região que a patente abrange (traço).

## Otimização dos ensaios de genotipagens para aplicações em larga escala

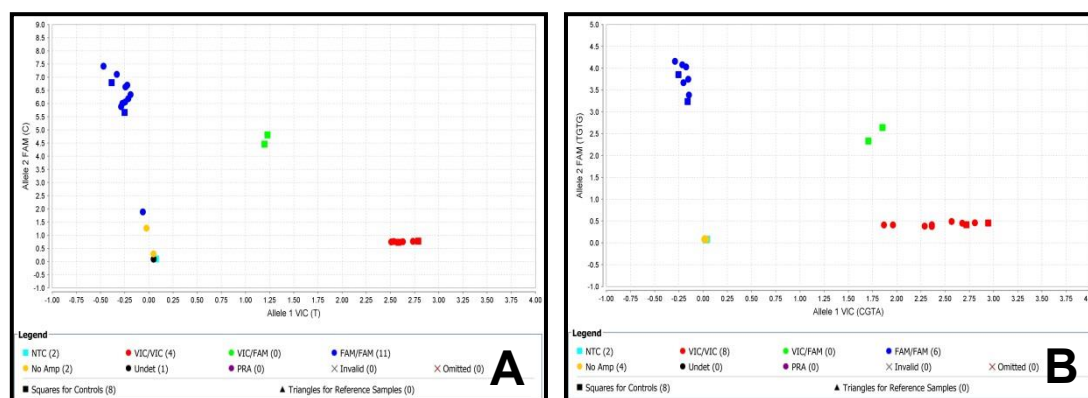
Com base nos valores de intensidade de fluorescência emitida ( $\Delta R_n$ ) por cada sonda e perfil de amplificação, foi possível estabelecer que a melhor ciclagem foi 50°C por dois minutos, 95°C por dez minutos, 90°C por quinze segundos, 60°C por noventa segundos e um total de 55 ciclos, conduzidos em equipamento ABI7900, como satisfatório. Ao analisar a ciclagem com 50 ciclos ainda era possível aumentar significativamente o valor de  $\Delta R_n$ , mas analisando a ciclagem com 60 ciclos, a fase de platô se mostrava extensa, indicando assim depleção dos reagentes.

Os resultados obtidos com a ciclagem a 55 ciclos apresentaram o valor de  $\Delta R_n$  para os alvos FAM e VIC para o ensaio 7221 ficaram em torno de 7 e 2.8, respectivamente; enquanto que para ensaio 8094 os valores de FAM e VIC ficaram em torno de aproximadamente 5 e 2.8, respectivamente. Estes resultados são satisfatórios e esperados, indicando bom sinal de amplificação e a detecção do fluoróforo FAM superior ao VIC, como esperado (Anexo F).

Adicionalmente, foi conduzida a otimização para estabelecer o volume mínimo do ensaio a ser utilizado em análise em placa de 96 wells, sem prejuízo do sinal detectado, visando otimizar o emprego dos ensaios de detecção para larga escala e baixo custo. Foi possível constatar que com a redução do volume final utilizado para 5.5  $\mu$ L, contendo 0.25X do ensaio (amostra contendo primers e sondas para o *SNPs* alvo) não houve queda na qualidade da reação. Também não houve redução significativa no valor de  $\Delta R_n$ , sendo possível uma genotipagem correta e com elevada confiança, conforme pode ser observado no perfil de disposição dos genótipos homozigotos Alelo1, heterozigoto, e homozigoto alelo 2, visualizados pelo Software *TaqMan® Genotyper* e SDS 2.4 na (Anexo G).

A comparação da genotipagem dos *SNPs* com *DNA* de amostras provenientes de três tipos de extração demonstraram que a metodologia SAMR que tem por princípios a rápida execução, baixa toxicidade, baixo custo e que pode ser feita no próprio laboratório, é perfeitamente hábil a ser utilizada na rotina com os ensaios testados (Figura 4).

**Figura 4:** Plot de amplificação e genotipagem com amostras extraídas pelo método SAMR.



Legenda: **Imagem A:** ensaio 7221; **Imagem B:** ensaio 8094. A figura ilustra a distribuição das amostras (pontos coloridos) nos eixos x e y. Os pontos azuis escuros, verdes, vermelhos e azuis claros representam as amostras cujas as sequências foram amplificadas pelos oligonucleotídeos marcados com as sondas FAM, VIC/FAM (heterozigoto), VIC e controle negativo, respectivamente.

### Validação dos SNPs ligados ao *Rps1k*

Dos 108 materiais fenotipados, 51 foram genotipados (Tabela 3). Foi dada preferência para os materiais fenotipados como portadores do *locus Rps1k* (resistentes) já visando à seleção destes para uso no Programa de Melhoramento, totalizando 31 materiais fenotipados e genotipados como resistentes/portadores do *locus Rps1k*. Também foram genotipados 17 linhagens elite do PMG da Embrapa Soja (Tabela 4).

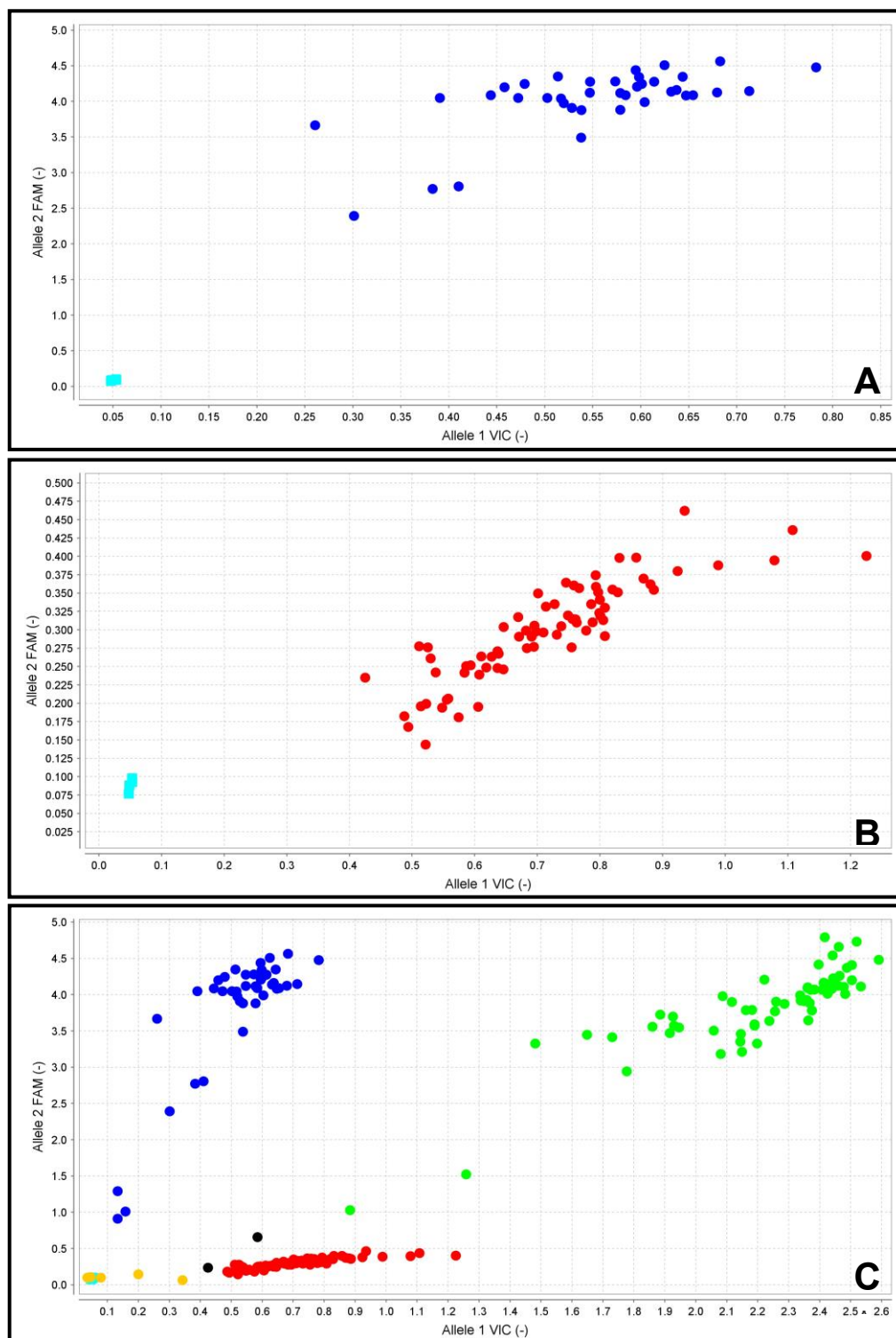
O ensaio 7221 apresentou a mais alta acurácia, com 88,2% quando analisado somente os materiais que foram especificamente fenotipados para o *Rps1k*. Quando analisado em conjunto com os dados das linhagens elites do PMG, sua eficácia diminuiu para 83,8%, ainda sim mantendo um nível relativamente elevado de acurácia. Este marcador foi o que apresentou também o menor erro Tipo I ( $\alpha$ ), ou seja, menor taxa de falso positivos (16,2%), que consiste em manter um genótipo considerado suscetível pela fenotipagem, mas considerado como resistente pela genotipagem.

O ensaio 8094 foi o segundo melhor observado; quando avaliado somente os materiais fenotipados para o *Rps1k*, ele apresentou acurácia de 68,6%, e quando analisado em conjunto, houve decréscimo na acurácia, sendo que esta ficou em 52,9% (Tabela 5).

O ensaio ADR659671 foi avaliado de três maneiras diferentes. A primeira considerando como portadoras do *locus Rps1k* aquelas plantas em que foram marcadas somente com FAM indicando que possuíam somente o *SNP* 4740659. A segunda abordagem foi considerando aquelas plantas marcadas como heterozigoto (VIC/FAM) e a terceira abordagem, consistiu em considerar portadoras do gene aquelas marcadas somente com VIC, indicando a presença somente do *SNP* 4740671.

De acordo com as análises, foi considerado que o uso associado entre os dois marcadores foi a melhor metodologia, com acurácia de 66% quando avaliado somente os materiais fenotipados para o *Rps1k*, quando todos os genótipos foram analisados a acurácia caiu para 49,3% (Tabela 5). Os perfis de genotipagem gerado pelos três ensaios pode ser observado na Figura 5.

**Figura 5.** *Plot* de amplificação e genotipagem das três diferentes maneiras de avaliar o Ensaio ADR659671.



Legenda: **Imagem A:** Análise levando em consideração o SNP 4740659 mostrando somente as amostras marcadas com FAM (azul escuro). **Imagem B:** Análise levando em consideração o SNP 4740671 mostrando somente as amostras marcadas com VIC (vermelho). **Imagem C:** Análise somente levando em consideração os dois SNPs, 4740659 e 4740671, com amostras homocigotas para o 4740659 em azul escuro, amostras homocigotas para o 4740671 em vermelho e as heterocigotas (VIC/FAM) em verde.

**Tabela 3.** Resultados das genotipagens das plantas fenotipadas para o *Rps1k*.

Genótipos	Fenotipagem	Genotipagem			
		7221	8094	4740659	4740671
<b>Williams 82</b>	+	+	+	+	+
<b>BRS 133</b>	-	-	-	-	+
BRS 214	-	-	-	+	+
BRS 244 RR	-	-	-	IND	IND
BRS 262	-	-	-	-	+
BRS 268	-	-	-	-	+
BRS 284	-	+	-	-	+
BRS 313	-	+	-	-	+
BRS 359 RR	-	-	-	-	+
BRS 360 RR	-	+	-	+	-
BRS INVERNADA	-	-	-	-	+
BRS-MG 800 A	-	-	-	+	+
BRSMG 752S	-	+	-	-	+
BRSMG Confiança	-	-	-	+	+
BRSMS Piracanjuba	-	-	-	+	+
Emgopa 316 RR	-	-	-	+	+
Kingwa	+	+	-	+	+
Paraná	-	-	-	+	+
Resnik	+	+	-	+	+
G - 07	-	-	-	+	+
G - 15	-	+	-	-	+
G - 26	+	+	-	+	+
G - 32	-	-	-	+	+
G - 40	+	+	+	+	+
G - 42	+	+	+	+	+
G - 43	+	+	+	+	+
G - 45	+	+	-	-	+
G - 46	-	+	-	-	+
G - 50	+	+	+	+	+
G - 51	+	+	+	+	+
G - 53	+	+	+	+	+
G - 54	+	+	+	+	+
G - 57	+	+	+	-	+
G - 61	+	+	+	+	+
G - 64	+	+	+	-	+
G - 65	+	+	+	+	+
G - 68	+	+	+	+	+
G - 69	+	+	+	+	+
G - 71	+	+	-	-	+

Genótipos	Fenotipagem	Genotipagem			
		7221	8094	4740659	4740671
G - 73	+	+	-	+	+
G - 76	+	+	-	+	+
G - 78	+	+	-	+	+
G - 81	+	+	-	+	+
G - 88	+	+	-	-	+
G - 90	+	+	-	-	+
G - 92	+	+	-	-	+
G - 94	+	+	-	+	+
G - 95	+	+	-	+	-
G - 96	+	+	-	-	+
G - 101	+	+	-	-	+
G - 102	+	+	+	+	+

Legenda: “+” significa que a planta foi fenotipada como resistente e/ou genotipada como positiva para o alelo *Rps1k*. “-” significa que a planta foi fenotipada como suscetível e/ou genotipada como negativa para o alelo *Rps1k*. IND: planta indeterminada.

**Tabela 4.** Resultados das genotipagens das linhagens elites do PMG.

Genótipos	Fenotipagem	Genotipagem			
		7221	8094	4740659	4740671
BR10 1109 RF	+	+	-	-	+
BR10 50152	+	-	-	+	-
BR10 52227	+	+	-	-	+
BR10 54841	+	+	-	-	+
BR10 54846	+	+	-	-	+
BR10 54849	+	+	-	-	+
BRB11 01640	+	+	-	-	+
BRB11 01644	+	+	-	+	-
BRMS08 11913	+	-	-	+	-
BRR12 13002	+	-	-	-	+
BRR12 13006	+	-	-	-	+
BRR12 2497	+	+	-	-	+
BRR12 2508	+	+	-	-	+
BRR12 2511	+	-	-	-	+
BRR12 2599	+	+	-	-	+
BR08 52756	+	+	+	+	-
BRZ11 30191	+	+	-	-	-

“+” significa que a planta foi fenotipada como resistente e/ou genotipada como positiva para o alelo *Rps1k*. “-” significa que a planta foi fenotipada como suscetível e/ou genotipada como negativa para o alelo *Rps1k*.

**Tabela 5.** Correlação entre os marcadores, acurácia e erros.

Marcador	Acurácia - %			Erro Tipo I - %		
	LE	PF	PF + LE	LE	PF	PF + LE
BARC 7221	70,6	88,2	83,8	0	16,2	12,2
BARC 8094	5,9	68,6	52,9	0	0	0
ADR651679	0	66	49,3	0	26,7	26,7

Legenda: LE: Linhagens elite do PMG; PF: plantas fenotipadas especificamente para o *locus Rps1k*; PF + LE: Dados gerados a partir da análise conjunta da estatística das linhagens elite e das plantas que foram fenotipadas especificamente para o alelo *Rps1k*.

Neste trabalho tentou-se utilizar dados de *GBS* que foram gerados para outros fins de seleção de plantas, para a seleção de haplótipos ligados a resistência a fitófтора. Uma vez que a região contendo o *locus Rps1k* foi conhecida, foi explorada a localização desses polimorfismos na região, no entanto, devido o baixo número de acessos contendo o *locus Rps1k* dentre os materiais utilizados na análise de *GBS*, aliado aos poucos dados de fenotipagens de plantas para fitófтора, a eficiência do ensaio construído com base no *GBS* foi insatisfatória. Isso pode ser atribuído em parte à baixa frequência alélica dos *SNPs* na população, que foi de 0,01% para um dos marcadores selecionados (*SNP* 4740671). Outro fator que contribuiu para diminuição da eficiência foi à tentativa de genotipar simultaneamente, em um único ensaio, ambos os *SNPs*. A falta de marcação dos genótipos suscetíveis no momento da análise da genotipagem torna a análise mais difícil e também a padronização e ajustes finos dos marcadores quanto aos parâmetros de ciclagem. Pois por mais idênticas que sejam as especificações de ciclagem de cada sonda, elas podem necessitar de ajustes que só podem ser feitos de maneira separada, limitando assim a sua eficiência.

Uma vez que o *SNP* 4740659 apresentou frequência alélica na população superior a 5% e constitui o marcador testado neste trabalho mais próximo ao *locus Rsp1k*, pretende-se ainda realizar nova síntese deste ensaio, permitindo a marcação de genótipos suscetíveis.

O emprego de genótipos selecionados por meio de fenotipagens inespecíficas para o *locus Rps1k*, embora esteja selecionando plantas resistentes ao patógeno, não é indicado para a validação de marcadores, pois pode gerar grandes discrepâncias entre os resultados, uma vez que não há informação de qual raça do patógeno predomina nas regiões avaliadas, bem

como não há nenhuma informação de qual o gene ou alelo possa estar conferindo a resistência presente nos materiais. A análise das linhagens elite visou apenas determinar quais materiais nas fases avançadas do PGM apresentam o *locus Rps1k*.

Ressalta-se ainda que com base nos resultados de fenotipagem e de genotipagem com marcador 7221, pelo menos 31 novas fontes de resistência para o *locus Rps1k* foram identificadas dentre os materiais analisados, dentre estes os genótipos Kingwa e Resnik. Tal informação é importante para Programas de Melhoramento que desejem incorporar o *locus Rps1k* além de ampliarem a base genética dos materiais.

## CONCLUSÕES

O ensaio BARC 7221 obteve mais de 88% acurácia, sendo o melhor marcador para seleção de materiais portadores do *locus Rps1k* utilizado neste trabalho. Ele se caracteriza como uma ferramenta para *screening* de germoplasma, bem como para incrementar a eficiência e precisão de seleção para resistência para este patógeno em programas de melhoramento.

Além de Williams 82, o marcador permitiu a detecção do alelo em trinta e uma fontes de resistência, entre estas Resnik e Kingwa, tradicionais genótipos utilizados como fontes de resistência.

É possível sintetizar ensaios *TaqMan*® com base em dados gerados por *GBS*, no entanto é necessário garantir a frequência alélica no *SNP* na população ou um número mínimo de acessos sabidamente portadores do gene/alelo de interesse.

É possível utilizar um método *in house* de extração de *DNA*, rápido, simples, seguro e com baixo custo, para genotipagem de *SNPs* via *qPCR*. A otimização das condições de termociclagem permitiu o emprego do volume mínimo de 5,5  $\mu$ L para as reações de amplificação, tanto em placas de 96 como 384 *wells*, gerando redução de custos próximo a 50%.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BHATTACHARYYA, Madan K. **RPSk-1 gene family, nucleotide sequences and uses thereof**. U.S. Patent n. 7,256,323, 14 ago. 2007.

BHATTACHARYYA, Madan K. **RPS-1-k Nucleotide Sequence and Proteins**. U.S. Patent n. 7,696, 410 B1, 13 abr. 2010.

COSTAMILAN, Leila Maria et al. Pathogenic diversity of *Phytophthora sojae* pathotypes from Brazil. **European Journal Of Plant Pathology**, [s.l.], v. 135, n. 4, p.845-853, nov. 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s10658-012-0128-9>>. Acesso em: 28 maio 2014.

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

PASSIANOTTO, André Luiz de Lima. **IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO NO GENOMA DA SOJA E SEU USO NO MAPEAMENTO ASSOCIATIVO DE CARACTERÍSTICAS SIMPLES E COMPLEXAS**. 2014. 71 f. Tese (Doutorado) - Curso de Doutorado em Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

RINCÃO, Michelle Pires. **Validação de Marcadores Moleculares em Soja ligados a Genes de Resistência à Podridão Radicular de Fitóftora**. 2013. 94 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Genética e Biologia Molecular, Departamento de Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

SCHMITTHENNER, August Frederick.; BHAT, R. G. **Useful methods for studying Phytophthora in the laboratory**. 143. ed. Wooster: Ohio Agricultural Research And Development Center, 1994. 10 p.

VARIETAL INFORMATION PROGRAM FOR SOYBEANS (Urbana) (Org.). **VIPS Disease Evaluation Information**. 2011. Disponível em: <<http://>

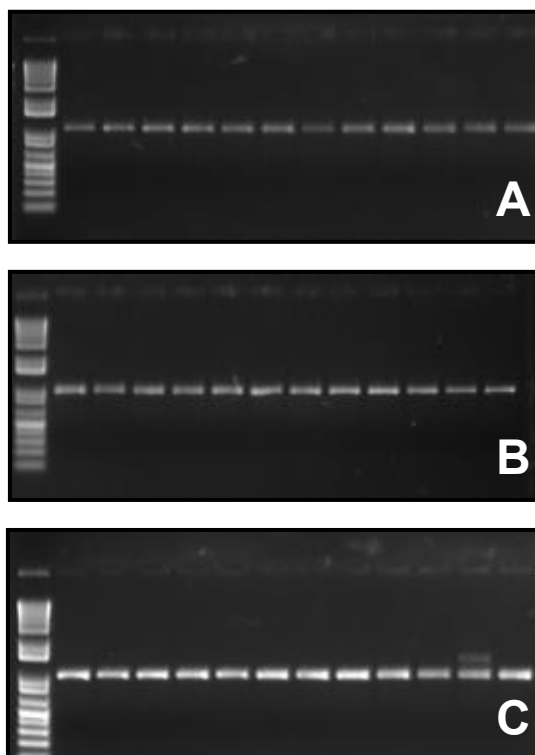
[www.vipsoybeans.org/v4/vpinfo/diseaseINFOpg.cfm?b=y#PhytophthoraRootRot](http://www.vipsoybeans.org/v4/vpinfo/diseaseINFOpg.cfm?b=y#PhytophthoraRootRot) (Company Data)>. Acesso em: 10 set. 2014.

**ANEXOS**

**Anexo A.** Conjunto de *primers* utilizado para amplificação da região contendo os *SNPs*.

Conjunto	<i>Primer Forward</i>	<i>Primer Reverse</i>
4700063	AGTGGACAAACCCACAGAGG	TCGCAGAAGTCGTCGTTTC
4608515	TCGTCTGTTAAGGAGGATGA GAG	CGATGGTGAGAAGGGTAAGC
4740688	TAGCATTTCGTGGTGTCTTGG	AATAGGCCCCAGGTAATGTTGC

**Anexo B.** Imagens dos géis mostrando as bandas obtidas após a amplificação das regiões dos *SNPs*.



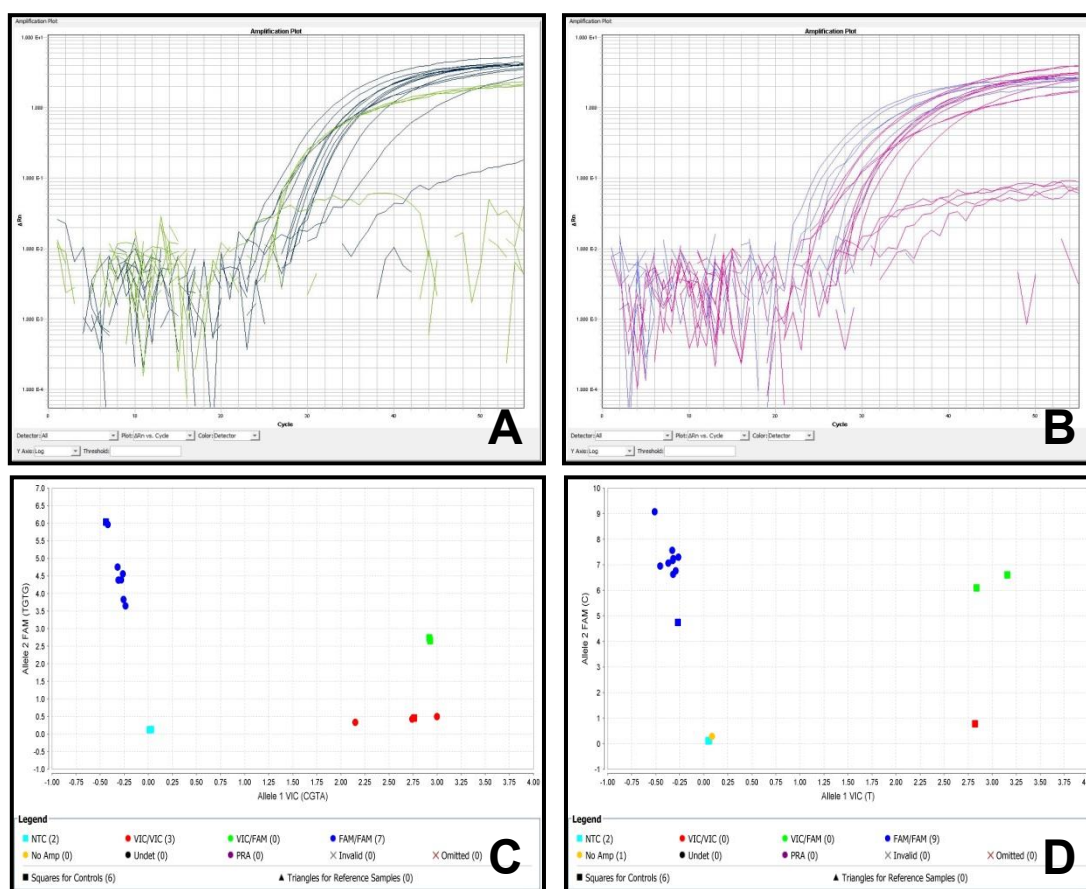
As imagens acima ilustram o gel de agarose a 1% corrido em meio SB 1x, a fim de aferir a qualidade das reações de amplificação. As imagens A, B e C equivalem aos *primers forward* e *reverse* 4740688, 4700063 e 4608515, respectivamente. A sequência das diferenciadoras portadoras do *Rps1k* da esquerda para direita é: Williams82, Kingwa, G - 46, G - 45, BMX Alvo RR e Resnik. A sequência das diferenciadoras suscetíveis da direita para esquerda é: BRS's: MG 752S, 268, 133, 284, 232 e Invernada.





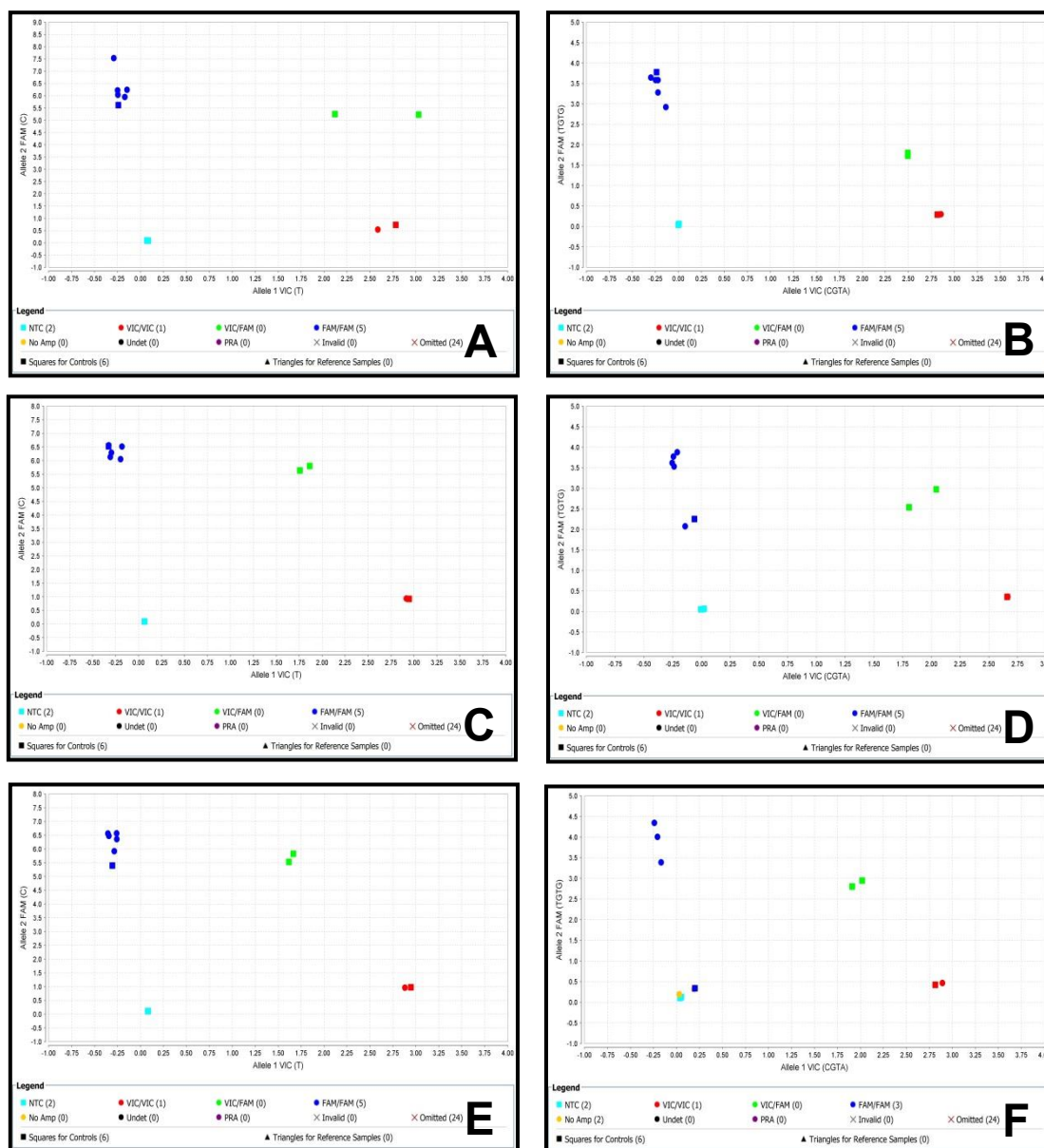


## Anexo F. Imagens das otimizações dos ensaios TaqMan®.



As imagens A e C mostram os resultados de quantificação absoluta e discriminação alélica, respectivamente, para o ensaio 7221, as imagens B e D mostram as mesmas características para o ensaio 8094. Os pontos azuis escuros, verdes, vermelhos e azuis claros representam as amostras cujas as seqüências foram amplificadas pelos oligonucleotídeos marcados com as sondas FAM, VIC/FAM (heterozigoto), VIC e controle negativo, respectivamente.

**Anexo G.** Imagens das tentativas de otimizações feitas para estabelecer o volume mínimo de reação a ser utilizado.



As imagens acima mostram que não houve mudança no padrão de plotagem das amostras e somente redução do valor da fluorescência. As imagens A, C e E mostram os valores de  $\Delta Rn$  do ensaio 7221 com volumes de 25  $\mu\text{L}$ , 12.5  $\mu\text{L}$  e 6  $\mu\text{L}$  respectivamente. As imagens B, D e F mostram os valores para os mesmos volumes para o ensaio 8094. Os pontos azuis escuros, verdes, vermelhos e azuis claros representam as amostras cujas as sequências foram amplificadas pelos oligonucleotídeos marcados com as sondas FAM, VIC/FAM (heterozigoto), VIC e controle negativo, respectivamente.