

ALAN ALVES PEREIRA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO LOCO *Red* ASSOCIADO A  
RESISTÊNCIA AO OÍDIO DA SOJA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

P436c  
2015  
Pereira, Alan Alves, 1981-  
Caracterização molecular do loco *Red* associado a  
resistência ao oídio da soja / Alan Alves Pereira. – Viçosa, MG,  
2015.

xi, 58f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Aluizio Borém de Oliveira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.50-58.

1. Soja. 2. Resistência a doenças e pragas. 3. Oídio.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitotecnia.  
Programa de Pós-graduação em Fitotecnia. II. Título.

CDD 22. ed. 633.34


ALAN ALVES PEREIRA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO LOCO *Red* ASSOCIADO A  
RESISTÊNCIA AO OÍDIO DA SOJA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.


APROVADA: 10 de julho de 2015.

  
\_\_\_\_\_  
Eveline Teixeira Caixeta

  
\_\_\_\_\_  
Francismar Correa Marcelino-  
Guimarães

  
\_\_\_\_\_  
Thais Roseli Corrêa

  
\_\_\_\_\_  
Tuneso Sedyama

  
\_\_\_\_\_  
Alúzio Borém de Oliveira  
(Orientador)

*“With every mistake we must surely be learning”*

George Harrison

## **Dedico**

*À Aguida, que sempre me deu força,  
incentivo, amor e principalmente  
pelo maior presente que eu poderia  
ter recebido, nossa filha Lisa.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, presente em todos os momentos de minha vida.

À minha esposa, Aguida, faltam palavras pra expressar o quão importante é ter você em minha vida. Muito obrigado por todo o apoio, jamais teria conseguido sem você.

À minha família: meu pai José Luiz e Ester; meus irmãos Alexandre, Ainho, John e Samara; e minha avó Elza. Amo todos vocês.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Programa de Pós-graduação em Fitotecnia pela oportunidade oferecida para a realização deste curso.

Ao CNPq e CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À Embrapa Soja pela disponibilização da fantástica estrutura física para a realização deste estudo.

Ao Dr. Aluizio Borém. Muito obrigado pela amizade, confiança e por toda ajuda ao longo do doutorado. Seu incentivo foi fundamental para a realização deste estudo.

Ao Dr. Ricardo Vilela Abdelnoor por toda ajuda e por ter dado a oportunidade da realização deste estudo em seu laboratório.

À Dra. Francismar Corrêa Marcelino-Guimarães pela imensa contribuição para a realização deste estudo.

À Dra. Michelle Graham. Obrigado por toda ajuda, profissional e pessoal, durante meu período nos EUA.

À Dra. Mariangela Hungria. Serei eternamente grato por tudo que você fez por mim durante toda minha vida acadêmica. Você é um exemplo a ser seguido.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Aluizio Borém, Dra. Eveline T. Caixeta, Dra. Francismar C. M. Guimarães, Dra. Thaís R. Corrêa e Prof. Tuneo Sedyama. Muito obrigado pelas sugestões e auxílio na correção da tese.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal: Alessandra, Alisson, André, Bianca, Bruna, Carla, Carol, Carvalho, César, Cynara, Dani, Elton, Juliana, Juliane, Jean, João, Kenia, Luana, Márcia, Michelle, Patrícia, Talitta, Rafaela, Suellen, Takao, Thiago, Valéria e Verinha pela ajuda, conselhos, dedicação e companheirismo. Foi muito bom trabalhar com vocês.

À Silvana Rockenbach Marin pela ajuda, paciência e convívio. Não consigo

imaginar o que seria do laboratório sem você!

Ao Dr. Steven Whitham, Lori Lincoln e Jody Hayes, por toda ajuda nos experimentos realizados em Ames.

Ao João Vitor, Carvalho, Talitta e Márcia pela ajuda nos experimentos e análises.

Ao Paulo e Théa. Muito obrigado por toda ajuda que me deram durante o período em Viçosa.

Aos amigos Shampoo e Michelle, André e Thayse, Thiago e Adriana, Neto e Amanda por todos os momentos de descontração em Londrina. Vocês são muito especiais!

Aos amigos de Viçosa, Amilton, Haroldo e Rafaeli. Obrigado pela amizade, ajuda nas disciplinas e pelos grupos de estudo.

Aos amigos Paulo e Bailey (e Paisley), Matt e Mariana (e Sophie) e Martjin. Muito obrigado pela amizade e pela força que vocês me deram durante o período que passei em Ames.

As secretárias do programa de Pós-graduação em Fitotecnia, Tatiani e Lídia por toda ajuda e paciência.

Enfim, a todos os meus amigos e familiares que mesmo à distância, de alguma forma contribuíram para a realização desse estudo, meus mais sinceros agradecimentos.

## BIOGRAFIA

ALAN ALVES PEREIRA, filho de José Luiz Alves Pereira e Elsie Alves Pereira (*in memoriam*), nasceu na cidade de Londrina, estado do Paraná, no dia 13 de julho de 1981. Em janeiro de 2001, iniciou o curso de Graduação em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário Filadélfia, UniFil, em Londrina-PR, graduando-se em dezembro de 2004. Durante a graduação foi bolsista de iniciação científica da Embrapa Soja, em Londrina-PR, atuando no Laboratório de Biotecnologia do Solo. No ano de 2005, realizou o curso de Pós-Graduação, *Latu Sensu*, em Biologia Aplicada à Saúde pela Universidade Estadual de Londrina, UEL, em Londrina-PR. No período de março de 2006 a julho de 2007 foi bolsista de Desenvolvimento Tecnológico e Industrial (DTI) do CNPq, atuando no Laboratório de Biotecnologia do Solo da Embrapa Soja. Em agosto de 2008, iniciou o curso de Pós-Graduação, *Stricto Sensu*, em Fitotecnia pela Universidade Federal de Viçosa, UFV, em Viçosa-MG, defendendo o título de *Magister Scientiae* no dia 05 de julho de 2010. Em agosto de 2011, ingressou no curso de Doutorado em Fitotecnia pela Universidade Federal de Viçosa, UFV. Teve a oportunidade de desenvolver parte do seu projeto de tese em parceria com a Embrapa Soja no Laboratório de Biotecnologia Vegetal e na Iowa State University, ISU / Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, USDA, em Ames, Iowa, EUA. Defendeu o título de *Doctor Scientiae* no dia 10 de Julho de 2015.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	viii
LISTA DE TABELAS .....	ix
RESUMO .....	x
ABSTRACT .....	xi
1. Introdução .....	1
2. Revisão de Literatura .....	2
2.1. A Soja .....	2
2.2. Oídio da Soja .....	4
2.3. Resistência Genética .....	6
2.4. Polimorfismos de nucleotídeo único .....	10
2.5. Silenciamento gênico induzido por vírus .....	11
3. Objetivos .....	12
4. Material e Métodos .....	13
4.1. Resistência ao oídio em linhagens endogâmicas de soja .....	13
4.2. Sequenciamento e análises de bioinformática .....	15
4.3. Análise de expressão gênica .....	19
4.4. Silenciamento gênico induzido por vírus .....	22
4.4.1. Obtenção das construções .....	22
4.4.2. Obtenção do inóculo viral .....	26
4.4.3. Fenotipagem .....	29
5. Resultados e Discussão .....	31
5.1. Resistência ao oídio em linhagens endogâmicas de soja .....	31
5.2. Análise Genômica da PI229358 .....	35
5.3. Análise de expressão gênica .....	39
5.4. Silenciamento gênico induzido por vírus .....	44
6. Conclusões .....	48
7. Referências .....	50

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de ligação da região genômica do gene <i>Red</i> .....	7
Figura 2. Distribuição dos vasos inoculados com oídio (fonte de inóculo) na casa de vegetação.....	14
Figura 3. Escala diagramática para avaliação da severidade do oídio da soja.	15
Figura 4. <i>Gene gun</i> utilizado no bombardeamento.....	28
Figura 5. SNPs exclusivos da PI229358 e acessos moderadamente resistentes ao oídio localizados na região dos <i>Glymas</i> de resistência a doenças em soja na região do gene <i>Red</i> .....	38
Figura 6. Grupos obtidos a partir do alinhamento dos oito genes de resistência. ....	40
Figura 7. Eficiência dos <i>primers</i> utilizados nas reações de RT-qPCR. ....	41
Figura 8. Nível de expressão das quatro construções avaliadas.....	47

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parentais do acesso BR01-22106. ....	8
Tabela 2. Informações dos <i>primers</i> utilizados para análise de expressão gênica. .....	21
Tabela 3. Sequência dos <i>primers</i> utilizados como controle endógeno. ....	22
Tabela 4. Informações dos <i>primers</i> utilizados para a construção de VIGS.....	24
Tabela 5. Médias e grupos de reação das famílias avaliadas quanto ao nível de infecção de oídio.....	33
Tabela 6. Informações dos <i>Glymas</i> relacionados a resistência encontrados na região do gene <i>Red</i> . ....	36
Tabela 7. Avaliação dos acessos em resposta ao oídio da soja.....	37
Tabela 8. Nível de expressão dos acessos sob diferentes tempos de infecção ao oídio.....	43
Tabela 9. <i>Bulks</i> desenvolvidos a partir das folhas coletadas e avaliação fenotípica do experimento.....	45

## RESUMO

PEREIRA, Alan Alves, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2015. **Caracterização molecular do loco *Red* associado a resistência ao oídio da soja.** Orientador: Alúzio Borém de Oliveira. Coorientadores: Ricardo Vilela Abdelnoor e Ney Sussumu Sakiyama.

Diante da importância da cultura da soja e da severidade do oídio em causar danos, este estudo teve como principais objetivos avaliar linhagens endogâmicas recombinantes de soja para resistência a este patógeno e caracterizar molecularmente os genes de resistência localizados na região de mapeamento do loco *Red*, que confere resistência ao oídio em soja. Avaliações fenotípicas realizadas em 109 famílias derivadas do cruzamento entre o acesso BRI01-22106 (Resistente) e o acesso PI200487 (Suscetível) resultaram em uma discriminação distinta entre a resistência e suscetibilidade ao oídio da soja, dentre essas, 29 famílias apresentaram característica de imunidade e foram consideradas promissoras para o desenvolvimento de cultivares resistentes ao oídio. Por meio do sequenciamento do genoma da PI229358, acesso resistente ao oídio e que deu origem ao parental resistente da população em estudo, foi possível identificar 19 potenciais SNPs, exclusivos de plantas resistentes ao oídio, localizados em uma região de 2 Mb, compreendendo o loco *Red*, contendo oito genes com similaridades a genes de resistência, tais como a presença dos domínio TIR-NBS-LRR. O perfil de expressão diferencial dos genes candidatos à resistência ao oídio frente à infecção com o patógeno ao longo do ciclo infeccioso permitiu constatar a expressão diferencial dos genes candidatos, nos acessos resistentes e suscetível, presentes no loco *Red* que estão envolvidos no mecanismo de resistência da soja ao oídio. Por meio da técnica de VIGS foi possível obter o silenciamento gênico dos quatro grupos de genes candidatos nos dois acessos resistentes avaliados, evidenciando o envolvimento desses nos mecanismos de resistência da soja ao oídio.

## ABSTRACT

PEREIRA, Alan Alves, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2015. **Molecular characterization of the *Red* locus associated with resistance to soybean powdery mildew.** Adviser: Aluizio Borém de Oliveira. Co-advisers: Ricardo Vilela Abdelnoor and Ney Sussumu Sakiyama.

Given the importance of soybean and severity of powdery mildew, the main objectives of this study are to evaluate recombinant inbred lines of soybean for resistance to this pathogen and to characterize resistance genes located on the mapping region *Red*, which confers resistance to soybean powdery mildew. Phenotypic assessments conducted in 109 families derived from the cross between BRI01-22106 (resistant) and PI200487 (susceptible) resulted in a distinct discrimination between resistance and susceptibility to soybean powdery mildew. Among these, 29 families had an immunity feature and they were considered promising for the development of cultivars resistant to powdery mildew. Through genome sequencing of PI229358, resistant to powdery mildew and parental of the study population, it was possible to identify 19 potential single nucleotide polymorphisms (SNPs). The SNPs are located in a 2 Mb region, comprising the region *Red* and containing eight genes with similarity to resistance genes, such as the presence of the TIR-NBS-LRR domain. The profile of candidate genes expression for resistance to powdery mildew revealed the differential expression of candidate genes in the resistant and susceptible accesses present in *Red* locus involved in the mechanism of resistance of soybean powdery mildew. Using virus induced gene silencing (VIGS) it was possible to obtain the gene silencing of the four groups of candidate genes in both resistant accessions, indicating their involvement in mechanisms of resistance to soybean powdery mildew.

## 1. Introdução

A soja é uma cultura de grande importância para o Brasil. A produção brasileira coloca o país numa posição destacada como o segundo maior produtor mundial deste grão. Estes resultados se devem principalmente ao melhoramento genético que ocupa papel de destaque no aumento da produtividade brasileira de soja (Igarashi et al., 2010; Silva Neto, 2011).

No entanto, diversos fatores limitam a obtenção de altos rendimentos em soja. Aproximadamente 40 doenças causadas por fungos, bactérias, nematoides e vírus já foram identificadas no Brasil. Todavia, em função da expansão das áreas de soja no país esse número continua aumentando. A importância econômica de cada doença varia conforme o ano e a região, dependendo das condições climáticas de cada safra. As perdas anuais de produção causadas por doenças são estimadas em cerca de 15 a 20%, entretanto, algumas doenças podem ocasionar perdas de quase 100% (Embrapa, 2013; Grigolli, 2014).

Dentre as diversas doenças associadas à cultura da soja, o oídio, causado pelo fungo *Erysiphe diffusa* (Cooke e Peck) U. Braun e S. Takamatsu, ocasiona perdas no rendimento que variam de 10 a 40% (Embrapa, 2013; Hartman et al., 1999).

O oídio era considerado uma doença esporádica e de pouca importância na cultura da soja, porém, na safra de 1996/97 atingiu proporções epidêmicas na maioria das regiões produtoras do país. A severidade da doença nessa safra resultou em uma pequena disponibilidade de sementes de cultivares resistentes e como medida emergencial, foi recomendado o tratamento químico da parte aérea, com o uso de diversos fungicidas (Yorinori, 1997).

Uma forma de evitar perdas ocasionadas por esse patógeno é não semear cultivares suscetíveis nas épocas mais favoráveis à ocorrência da doença, tais como semeaduras tardias ou safrinha e cultivo no inverno. No entanto, o método mais eficiente de controle do oídio, a longo prazo, é o do uso de cultivares resistentes (Embrapa, 2013; Grigolli, 2014; Pereira et al., 2012).

O controle genético das características de interesse em soja envolve geralmente vários genes e apresenta interação significativa com o ambiente. O uso de marcadores moleculares tem levado a identificação de inúmeros locos para tais características. Deste modo, os marcadores moleculares apresentam-se como uma ferramenta de apoio ao melhoramento genético, aumentando potencialmente sua eficiência por meio de estratégias de seleção assistida, sem a necessidade da caracterização fenotípica e, conseqüentemente, excluindo-se a influência do ambiente (Borém e Caixeta, 2009; Toppa e Jadoski, 2013).

Além das poderosas ferramentas biotecnológicas que estão disponíveis atualmente, para o desenvolvimento de cultivares resistentes ao oídio, é necessário o conhecimento dos mecanismos de resistência atuantes na herança do caráter, o qual pode ser realizado por meio do estudo de populações segregantes provenientes de parentais contrastantes para a reação de resistência à doença.

## **2. Revisão de Literatura**

### **2.1. A Soja**

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é a principal cultura de grãos produzida no Brasil com aumentos de produção e comercialização a cada ano. A produtividade nacional atingiu a média de 2.976 kg/ha, representando um crescimento de 4,3% em relação à obtida em 2013/2014. Também ocorreu um aumento de 3,9% na área plantada em comparação com a safra anterior. Os efeitos dessas ocorrências na safra brasileira deste ano apontaram para uma produção recorde de 93.259,9 mil toneladas, comparada com 86.120,8 mil toneladas em 2013/14, representando um aumento de 8,3% (Conab, 2015).

Dentre as culturas agrícolas que mais cresceram no Brasil nas últimas três décadas, a soja corresponde a 49% da área plantada em grãos do país. O aumento da produtividade está associado aos avanços tecnológicos, ao manejo e eficiência dos produtores (Mapa, 2015).

Esta cultura apresenta maior adaptabilidade em temperaturas entre 20°C e 30°C, onde a temperatura ideal para seu crescimento e desenvolvimento é em torno de 30°C. Em temperaturas menores ou iguais a 10°C seu crescimento vegetativo é pequeno ou nulo. Já temperaturas acima dos 40°C podem causar efeitos prejudiciais a planta (Embrapa, 2013).

Além da temperatura, a disponibilidade de água é fator importante para o desenvolvimento da soja, principalmente nos períodos de germinação-emergência e floração-enchimento de grãos. Para que se possa obter um máximo rendimento, a necessidade total de água na cultura da soja deve variar entre 450 a 800 mm/ciclo, dependendo das condições climáticas, manejo da cultura e duração do ciclo (Embrapa, 2013).

A adaptação de diferentes cultivares a determinadas regiões depende, além das exigências hídricas e térmicas, de sua exigência fotoperiódica. A soja é considerada uma planta de dia curto, porém sua resposta ao fotoperíodo

difere de acordo com a cultivar e a temperatura, ou seja, cada cultivar possui seu fotoperíodo crítico, acima do qual o florescimento é atrasado (Embrapa, 2013; Farias, et al., 2007).

## **2.2. Oídio da Soja**

Vários fatores bióticos e abióticos são responsáveis por limitarem o potencial produtivo da cultura da soja, entre eles, as doenças foliares são consideradas um dos principais, pois afetam a qualidade de grãos e causam perdas consideráveis no rendimento final. Mesmo com todas as medidas preventivas, ainda assim é difícil o controle de algumas doenças, tais como a ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi* H. Sydow e Sydow) e o oídio (*Erysiphe diffusa* (Cooke e Peck) U. Braun e S. Takamatsu).

O oídio da soja, embora considerado de pouco interesse há alguns anos, ultimamente vem aumentando sua importância. O oídio da soja foi primeiramente observado na Alemanha no ano de 1921 (Wahl, 1921) e atualmente é observado em quase todas as regiões produtoras do mundo (Grau, 1984). A partir de 1996/1997, desde a região Sul até as regiões Sudeste e Centro Oeste do Brasil, foram relatados diversos surtos epidêmicos desta doença, onde as lavouras mais afetadas apresentaram perdas de rendimento de aproximadamente 25%, alcançando perdas de até 40%, tornando-se uma das mais importantes doenças da soja na época (Almeida et al., 2008; Embrapa, 2013; Silva e Seganfredo, 1999; Yorinori, 1997).

O fungo se desenvolve em toda parte aérea da planta e a infecção pode ocorrer em qualquer estágio de desenvolvimento, sendo mais visível no início da floração (Igarashi et al., 2010). A planta de soja apresenta nas partes

atacadas uma fina camada de micélio e esporos pulverulentos que, de pequenos pontos brancos podem evoluir e cobrir totalmente as partes infectadas. Assim, nos casos de elevada colonização dos fungos nos tecidos superficiais da planta, é possível ocorrer uma redução significativa no rendimento da soja devido à redução da área fotossinteticamente ativa em até 50% e, em casos severos, o conseqüente secamento e queda prematura das folhas (Grau 2006; Mignucci e Boyer, 1979; Mulrooney, 2009; Pérez-Vega, 2013; Sartorato e Yorinori, 2001; Unêda-Trevisoli et al., 2002).

Em relação às alterações fisiológicas no hospedeiro, Mignucci e Boyer (1979) constataram menor fotossíntese e transpiração com o aumento da infecção. Com 82% da área foliar infectada, mais da metade da atividade fotossintética da folha havia sido perdida e a transpiração baixou para 36% em relação à testemunha, como resultado da alteração direta na atividade metabólica induzida pelo patógeno.

Para seu desenvolvimento, o fungo necessita de temperaturas em torno de 18-24°C e baixa umidade relativa do ar (Phillips, 1984; Grau, 2006), não se desenvolvendo em temperaturas maiores que 30°C (Mignucci et al., 1977). De acordo com Bedendo (2011), o conídio do fungo não germina quando um filme de água está presente na superfície da folha, entretanto, uma umidade relativa em torno de 95% é necessária para que a germinação ocorra.

Outros fatores, como época de semeadura e fase de desenvolvimento da planta, influenciam significativamente na severidade da doença, assim, algumas cultivares consideradas resistentes se tornam suscetíveis quando plantadas nas épocas mais favoráveis à ocorrência da doença (Grigolli, 2014).

O oídio é dificilmente controlado por técnicas convencionais visto que o fungo produz esporos que são facilmente dispersos pelo vento. Além do mais,

o fungo pode ser transmitido por sementes infectadas, resíduos vegetais e algumas ervas daninhas (Pérez-Vega, 2013). O controle convencional é realizado por meio de aplicações preventivas com fungicidas, porém, a aplicação indiscriminada de produtos químicos, pode causar danos ao meio ambiente (Ghini e Kimati, 2000).

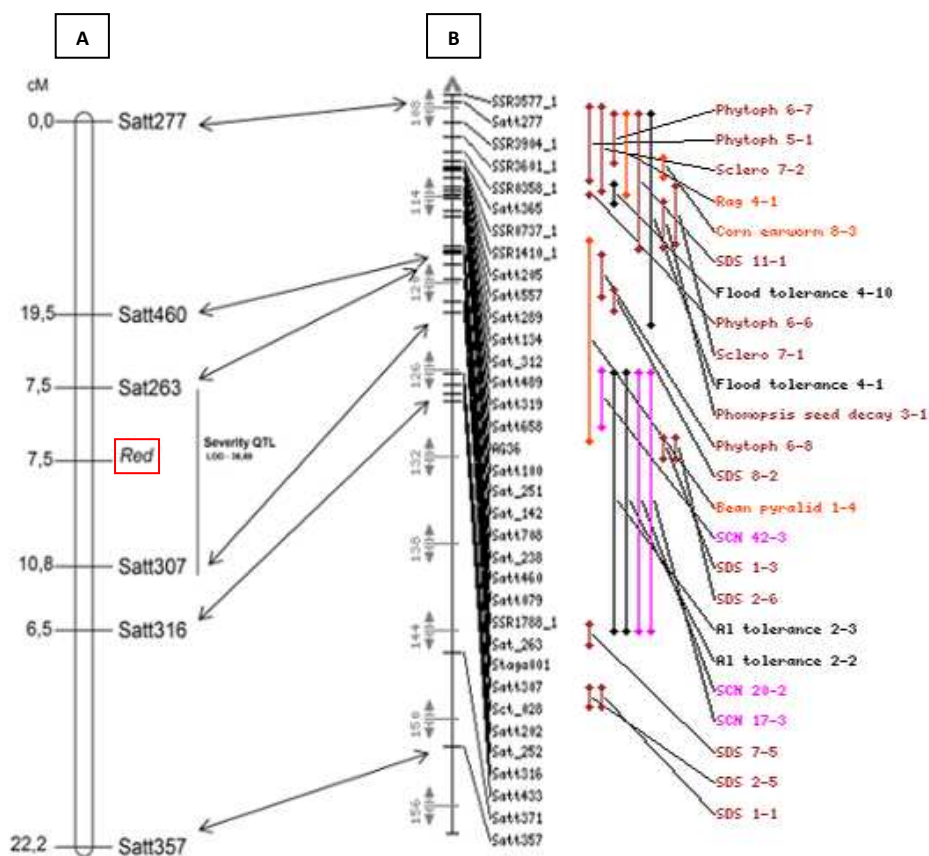
### **2.3. Resistência Genética**

Em condições de campo, três tipos de reações podem ser observadas: suscetibilidade, resistência de planta adulta, e resistência total. A resistência ao oídio da soja apresenta herança mendeliana, ou seja, é controlado por genes maiores, embora com uma influência variável na intensidade e na severidade da doença (Grau e Laurence, 1975; Mignucci e Lim, 1980).

O uso de cultivares resistentes é o método mais eficiente de controle desta doença. Em estudos anteriores mostrou-se que a resistência ao oídio da soja é controlada por um único loco de resistência (Grau e Laurence, 1975; Lohnes e Bernard 1992). O loco de resistência *Rmd*, composto por três alelos (*Rmd*, *Rmd-c*, *rmd*), foi mapeado no cromossomo 16, grupo de ligação J, com auxílio de marcadores moleculares RFLP (Polzin et al., 1994).

O alelo *Rmd* confere resistência em plantas adultas (Mignucci e Lim, 1980). O alelo *Rmd-c* que teve origem da cultivar CNS, é associado ao gene *Rps2* que confere resistência a podridão radicular de fitóftora e ao gene que restringe a nodulação (*Rj2*). Este alelo, *Rmd-c*, confere resistência ao oídio em todos os estádios de desenvolvimento da soja (Lohnes e Bernard, 1992; Graham et al., 2002), enquanto que o alelo *rmd* confere suscetibilidade ao oídio (Buzzell e Hass, 1978).

Recentemente, um novo gene de resistência ao oídio da soja, chamado de *Red* (**R**esistente a *Erysiphe diffusa*) foi mapeado no cromossomo 6, grupo de ligação C2, flanqueado pelos marcadores microssatélites Sat\_263 e Satt307 (Figura 1; Catelli, 2009). Para isso, foi utilizado uma população contendo 109 indivíduos F<sub>2:3</sub>, derivada do cruzamento entre o acesso BR01-22106 (Resistente) e PI200487 (Suscetível). O caráter de resistência ao oídio nesta população foi determinado por um único gene dominante. De acordo com o banco de dados do Soybase (<http://soybase.org>), essa região tem sido associada com resistência a diversas doenças e pragas, além de tolerância a estresses abióticos.



**Figura 1.** Mapa de ligação da região genômica do gene *Red*. **A)** mapa genético gerado por Catelli (2009); **B)** parte do grupo de ligação consenso C2, gerada pelo Soybase.

O acesso BRI01-22106 (também conhecido como RI-75) foi desenvolvida a partir do cruzamento da cultivar Williams com a PI229358, no programa de melhoramento de resistência a insetos e pragas da Embrapa Soja, por possuir características agronômicas desejáveis de resistência à doenças e pragas. Arias et al. (2004), por meio de estudos de herança constataram no acesso BR01-22106 apenas um gene dominante de resistência ao oídio da soja. Catelli (2009) observou que populações derivadas deste acesso apresentaram-se altamente resistentes ao oídio em soja. Este acesso tem como parentais diversos acessos com características agronômicas desejáveis, como produtividade e resistência a insetos e doenças (Tabela 1).

**Tabela 1.** Parentais do acesso BR01-22106.

<b>Acessos</b>	<b>Nomes alternativos</b>	<b>País</b>	<b>Características</b>	<b>Referência</b>
BR82-12547	*	Brasil	Resistência insetos	Lima e Lara, 2004
BRI01-22106	RI-75	Brasil	Resistência doenças	Catelli, 2009
BRT91-11843	*	Brasil	*	*
BRT91-15740	*	Brasil	Produtividade	Gazzoni, 1994
E74-111	*	-	*	*
M67	*	EUA	*	*
PI200487	Kinoshita	Japão	Resistência doenças	Garcia et al., 2008
PI229358	Soden-daizu	Japão	Resistência insetos/doenças	GRIN, 2015
PI548631	Williams	EUA	Produtividade	GRIN, 2015
PI628871	OCEPAR-8	Brasil	*	*
UFV-1	*	Brasil	*	*

\* Não foram encontradas informações na literatura

O acesso PI229358 (*Soden-daizu*) é uma PI (*Plant introduction*) originária do Japão. Estudos apontam que esta PI tem demonstrado resistência múltipla a insetos, e se tornou um modelo de pesquisa sobre a herança de

resistência. Frequentemente, esta PI vem sendo utilizada como parental doador em programas de melhoramento nos EUA e em outros países, incluindo o Brasil, a fim de desenvolver cultivares resistentes a insetos e doenças (Arias et al., 2004; Boethel, 1999).

Diversos estudos demonstraram que a PI229358 está associada à resistência múltipla a insetos. Dentre eles, resistência à lagarta falsa-medideira (*Pseudoplusia includens* (Walker)), *Epilachna varivestis* (Mulsant) (Coleoptera, Coccinellidae), lagarta-da-maçã (*Heliothis virescens* (Fabricius)) e cigarrinha (Cicadellidae) (GRIN, 2015; Hatchett et al., 1979).

Rogers e Sullivan (1987) estudaram o desempenho de ninfas de *Geocoris punctipes* (Say) quando parasitavam a PI229358. Os autores relataram que houve um aumento na mortalidade de ninfas de quando as mesmas foram alimentadas com a PI229358. Sharma (2009) mostrou que a PI229358 apresentou resistência contra a lagarta-da-espiga do milho (*Helicoverpa zea* (Boddie)). Além disso, Fugi et al. (2005) demonstrou que esta PI também apresenta resistência contra a lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis* (Hübner)). Estudos comprovam que a PI229358 apresenta tanto antixenose (não-preferência de colonização/alimentação de insetos) como antibiose (efeitos adversos no ciclo de vida do inseto, como mortalidade, redução de peso e tamanho de indivíduos) para diversos tipos de lepidópteros e coleópteros (Lambert e Kilen, 1984; Van Duyn et al 1971). Rector et al. (1998, 2000) encontrou, no grupo de ligação M desta PI, um QTL que confere condições tanto de antixenose como de antibiose à lagarta-da-espiga do milho em soja.

De acordo com o banco de dados do GRIN (*Germplasm Resources Information Network*), a PI229358 apresenta resistência a doenças como o

crestamento bacteriano (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*) e ao cancro da haste (*Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*) (GRIN, 2015).

O acesso PI200487 (*Kinoshita*) é uma PI (*Plant introduction*) originária do Japão. Garcia et al. (2008) demonstraram que esta PI apresenta o gene de resistência *Rpp5*, localizado no grupo de ligação N, que confere resistência a ferrugem asiática da soja. De acordo com o banco de dados do GRIN (*Germplasm Resources Information Network*), essa PI apresenta resistência a doenças como o cancro da haste e resistência moderada ao crestamento bacteriano. Também apresenta resistência moderada contra insetos como a cigarrinha e *Epilachna varivestis* (Mulsant) (Coleoptera, Coccinellidae) (GRIN, 2015). No entanto, a PI200487 é suscetível à podridão radicular de fitóftora (*Phytophthora sojae*) (GRIN, 2015) e ao oídio (Catelli, 2009).

#### **2.4. Polimorfismos de nucleotídeo único**

Os polimorfismos de nucleotídeo único (*Single Nucleotide Polymorphisms* - SNPs) são a forma mais frequente de variação na sequência de DNA encontrada no genoma. São variações de nucleotídeos definidos como regiões pontuais do DNA encontradas tanto nas regiões codificantes e não codificantes do genoma (Brookes, 1999; Collins, et al., 1998).

Os SNPs ocorrem com grande frequência no genoma. Gupta et al. (2001) relataram que a frequência de SNPs em genomas vegetais é cerca de 1 SNP a cada 100-300 pb, e provavelmente são responsáveis pela maioria das contribuições em variações alélicas do genótipo, resultando na variação fenotípica. Para que uma variação seja considerada SNP, essa deve ocorrer em pelo menos 1% da população (Caixeta et al., 2009; Botstein e Risch, 2003).

Devido à alta frequência de ocorrência nos genomas, os SNPs são considerados uma importante fonte de variabilidade genética, além de serem potencialmente úteis para o mapeamento por associação de características de interesse. De acordo com Wray (2007), acredita-se que os SNPs tenham um papel importante na evolução das espécies por levarem a uma modulação leve de determinados traços fenotípicos.

A identificação de SNPs tem uma grande aplicação no melhoramento de plantas. No genoma de soja, a frequência de ocorrência de SNPs tem sido o objetivo de estudo de diversos grupos de pesquisa, para o desenvolvimento de marcadores moleculares para uso no mapeamento genético de alta resolução, assim como para estudos de associação baseados em genes candidatos (Rafalski, 2002).

Milhares de SNPs podem ser usados para cobrir o genoma de um organismo com marcadores que não estão a mais de 1 cM um do outro no genoma inteiro (Resende et al., 2008). Segundo Song et al. (2013), um total de 146.161 SNPs estão dispostos no genoma da soja. Por terem uma baixa taxa de mutação e serem muito frequentes no genoma e facilmente automatizados, os SNPs são considerados importantes marcadores genotípicos (Caixeta et al., 2009).

## **2.5. Silenciamento gênico induzido por vírus**

O silenciamento gênico induzido por vírus (*Virus Induced Gene Silencing* - VIGS) tem se destacado como uma importante ferramenta da genética reversa. O VIGS tem como alvo sequências específicas de ácidos nucleicos,

resultando na regulação negativa da expressão gênica. (Grønlund et al., 2008; Unver e Budak, 2009).

A técnica de VIGS é comumente utilizada para silenciar genes em diversos tecidos vegetais, incluindo folhas (Liu et al, 2002), raízes (Ryu et al., 2004), flores (Chen et al., 2004; Liu et al, 2004) e tubérculos (Faivre-Rampant et al., 2004).

Para a obtenção de VIGS, um fragmento do gene de interesse é inserido em um vetor viral, substituindo genes dispensáveis para a infecção sistêmica. Assim, este vetor viral modificado, ao ser introduzido na planta, fará com que o fragmento de interesse seja replicado e disseminado pela planta. Iniciado o processo, o mRNA endógeno, correspondente ao fragmento transportado pelo vetor viral, é degradado via silenciamento de RNA (Baulcombe, 2004; Lu et al., 2003).

Por se tratar de um procedimento relativamente rápido, as construções podem ser montadas com certa facilidade e o fenótipo de silenciamento pode ser observado entre duas a quatro semanas após a inoculação (Lu et al., 2003; Senthil-Kumar et al., 2008; Godge et al., 2008). Além disso, esta técnica permite analisar genes que possuem um fenótipo letal, uma vez que o VIGS é aplicado em plantas adultas, não havendo morte do embrião como geralmente ocorre em sistemas de mutagênese insercional (Baulcombe, 1999).

### **3. Objetivos**

Analisar a eficiência do loco *Red* para resistência ao oídio e identificar potenciais genes candidatos envolvidos nos mecanismos de resistência a essa doença.

### **Objetivos Específicos:**

- Identificar linhagens endogâmicas recombinantes de soja com efetiva resistência para o oídio;
- Caracterizar fisicamente a região contendo o loco *Red*, pelo resequenciamento da PI229358, para a identificação de SNPs;
- Identificar potenciais genes de resistência responsáveis pela resistência ao oídio derivada do loco *Red*.

## **4. Material e Métodos**

### **4.1. Resistência ao oídio em linhagens endogâmicas de soja**

Com a finalidade de avaliar a resistência ao oídio em famílias segregantes de soja, foi realizado um experimento utilizando a estrutura (Casa de vegetação e Laboratório de Biotecnologia Vegetal) da Embrapa Soja. A princípio utilizou-se a população F<sub>3</sub>, avançando geração até F<sub>6</sub>, juntamente com os genótipos parentais. Nas gerações F<sub>4</sub> e F<sub>6</sub> foram realizadas avaliações qualitativas quanto à infecção de oídio. A população F<sub>6</sub> foi constituída de 109 indivíduos, originadas do cruzamento do acesso BRI01-22106 (RI-75; Resistente) e o acesso PI200487 (Kinoshita; Suscetível). As sementes dos parentais foram obtidas da coleção do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Soja.

Em condições de casa de vegetação, principalmente no inverno, é comum o aparecimento da doença sem necessidade de inoculação. Porém,

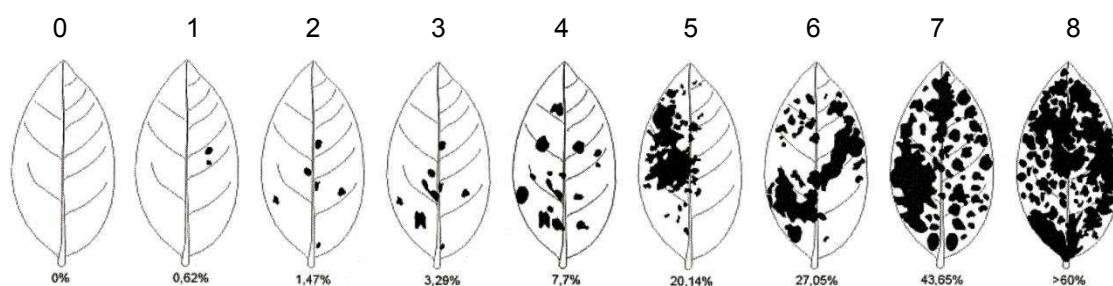
para garantir a presença de oídio, foram mantidas plantas altamente suscetíveis (Embrapa 48) em fase anterior à instalação do experimento, considerando-se que o oídio se trata de um parasita biotrófico obrigatório. Foram instalados dois vasos contendo plantas infectadas para cada bancada. Estes vasos foram colocados em uma altura superior aos restantes de modo a facilitar a infecção (Figura 2).

O experimento foi instalado em casa de vegetação, com temperatura controlada, variando de 18 a 25°C. A semeadura foi realizada em vasos de 4,5 kg, contendo uma mistura de solo, areia e esterco, previamente esterilizados. Foram semeadas quatro sementes por vaso das 109 famílias, seus parentais resistente (RI-75) e suscetível (Kinoshita), e o acesso PI229358. A população F<sub>6</sub> foi avaliada qualitativamente sob um delineamento em blocos casualizados, contendo 3 repetições.



**Figura 2.** Distribuição dos vasos inoculados com oídio (fonte de inóculo) na casa de vegetação.

Cada família F<sub>6</sub>, constituída de 12 plantas, foi independentemente avaliada durante três semanas consecutivas. A avaliação qualitativa foi feita baseada em uma escala diagramática proposta por Mattiazzi (2003) (Figura 3). Foram aplicadas notas de 0 a 8 conforme a severidade da doença. Foram realizadas 3 avaliações, a primeira feita 15 dias após a inoculação (dai), seguida de outras duas aos 22 e 29 dai.



**Figura 3.** Escala diagramática para avaliação da severidade do oídio da soja. Adaptado de Mattiazzi (2003).

As análises estatísticas foram realizadas através do programa SAS – *Statistical Analysis System* (SAS, 2011). Foram realizadas análises de variância, teste de Scott-Knott (Scott-Knott, 1974) para análise de agrupamento baseado na média e teste de Tukey (Tukey, 1949) para comparação de médias.

#### **4.2. Sequenciamento e análises de bioinformática**

Sementes provenientes do acesso PI229358 foram semeadas em vaso de 5kg contendo uma mistura de solo, areia e esterco, previamente esterilizados, em casa de vegetação. Aproximadamente quatro semanas após a semeadura foram coletados os trifólios, armazenados em nitrogênio líquido até a extração de DNA. A extração do DNA foi realizada utilizando o kit DNeasy

Plant Mini Kit (*Qiagen*), segundo protocolo do fabricante. A amostra foi quantificada utilizando o fluorômetro Qubit® (*Life Technologies*) e enviada para a empresa Fasteris SA (Genebra, Suíça) para sequenciamento.

O sequenciamento foi realizado utilizando a plataforma illumina HiSeq 2000. A estratégia empregada foi a de sequenciamento a partir de ambas as extremidades (*paired-end*) gerando fragmentos de 2x100pb e profundidade genômica de 15x.

As análises de bioinformática foram conduzidas no Laboratório do USDA (*Corn Insects and Crop Genetics Research*) em Ames, IA, EUA, em ambiente UNIX utilizando diversos scripts e linhas de comandos.

O formato do arquivo resultante do sequenciamento é o FASTQ (.fastq). Este formato foi criado de modo a reduzir o volume de dados do arquivo FASTA/QUAL, utilizado nos sequenciadores de Sanger. Além disso, o formato FASTQ é a representação das bases e suas qualidades (FASTA/QUAL) em um único arquivo.

Primeiramente foi utilizado o *software* FastQC (*Babraham Bioinformatics*) a fim de avaliar a qualidade do sequenciamento. O FastQC é um programa baseado em Java que permite fornecer, por meio de gráficos e tabelas, informações do sequenciamento, verificações de controle de qualidade e constatar quaisquer problemas ocorridos durante o sequenciamento.

Baseado no relatório gerado pelo FastQC, as 12 bases iniciais correspondentes aos adaptadores utilizados no sequenciamento foram removidas utilizando o comando *fastx\_trimmer* (FASTX-Toolkit). Em seguida foi utilizado o comando *fastq\_quality\_filter* (FASTX-Toolkit) para filtrar o sequenciamento baseado na qualidade. Por se tratar de um sequenciamento

*paired-end*, todos os comandos foram realizados igualmente para as duas extremidades.

Através do banco de dados do Phytozome (<http://phytozome.jgi.doe.gov>) foi feito o *download* do arquivo referente às informações do genoma referência da soja (versão 2.0), em seguida, o arquivo de sequenciamento foi alinhado com o genoma referência da soja utilizando o comando *bowtie2* (*Johns Hopkins University*), gerando um arquivo SAM (*Sequence Alignment/Mapping*) (.sam) que é um arquivo de texto delimitado criado para representar o resultado do alinhamento dos fragmentos (*reads*) contra um genoma de referência.

Por meio da ferramenta SAMtools foi possível converter o arquivo texto delimitado (SAM) para um arquivo BAM (*Binary SAM*) (.bam), que é a versão binária de um arquivo SAM. Além de o formato binário ser mais eficiente, o arquivo BAM também é compactado em blocos, permitindo a economia de espaço em disco e na memória do computador, o que é muito importante para programas de visualização.

Com a utilização da ferramenta SAMtools, foi possível filtrar somente os fragmentos (*reads*) únicos gerados no arquivo BAM. Em seguida, o arquivo foi ordenado e indexado de acordo com a posição genômica, de modo a facilitar a visualização e realização de diversas análises.

O SAMtools além de ser uma ferramenta geral para a manipulação de arquivos BAM, também permite fazer análises de variações através do comando *mpileup*, assim como a detecção de SNPs e INDELS através do comando *bcftools*. Deste modo, o arquivo BAM, previamente ordenado e indexado, foi utilizado para detectar os SNPs através dos comandos *samtools*, *mpileup* e *bcftools*, gerando um arquivo BCF (.bcf).

Em seguida, o arquivo BCF foi convertido para um arquivo VCF (.vcf). O formato VCF (*Variant Call Format*) é um arquivo de texto em colunas separadas por tabulação, desenvolvido para representar as variações detectadas no genoma. Este formato permite uma fácil manipulação e pode ser aberto em uma planilha eletrônica ou por meio de scripts e utilitários do UNIX.

A manipulação dos SNPs foi realizada por meio de planilhas eletrônicas e com a ajuda do programa IGV (*Integrative Genomics Viewer*) (Robinson et al., 2011). Para isso foi utilizado os formatos VCF, BAM juntamente com o arquivo referente ao genoma da soja, obtido do banco de dados do Phytozome.

Com o intuito de comparar os SNPs encontrados na PI229358 com acessos resistentes e suscetíveis ao oídio da soja, foi realizado um experimento em casa de vegetação com 26 acessos nacionais que foram recentemente sequenciados utilizando a mesma estratégia (*paired-ends*), pela mesma plataforma que a PI229358 e com similar cobertura de genoma (Santos, 2015).

Os 26 acessos utilizados foram: Anta 82, BR 16, BRS 232, BRS 284, BRS 360RR, BRS Sambaíba, BRS Valiosa, BRS/GO 8360, BRS/GO 8660, BRS/GO Chapadões, BRS/MG 850GRR, BRS/MT Pintado, BRS/MT Uirapuru, BRS 361, CD 201, MG/BR46 Conquista, EMGOPA 301, FT Abyara, FT Cristalina, IAC 8, IAS 5, NA 5909RG, P98Y11, Paraná, Santa Rosa e V MAX RR, além da Williams 82.

A semeadura foi realizada em vasos de 5kg contendo uma mistura de solo, areia e esterco, previamente esterilizados. Foram semeadas quatro sementes provenientes de cada acesso por vaso. As plantas foram mantidas a uma temperatura controlada entre 18 a 25°C, após 15 dias foi realizada a inoculação das plantas com oídio.

Foram realizadas três avaliações em um intervalo de 14 dias entre cada uma. As avaliações foram realizadas qualitativamente com base na escala diagramática de oídio proposta por Mattiazi (2003) (Figura 3). Foram atribuídas notas variando de 0 a 8 sendo que notas de 0 a 2 foram consideradas resistentes (R), 3 a 5 moderadamente resistentes (MR) e 6 a 8 suscetíveis (S).

### **4.3. Análise de expressão gênica**

Três acessos foram selecionados para a condução do experimento de expressão gênica, PI229358 (Resistente), BRI01-22106 (Resistente) e PI200487 (Suscetível). O experimento foi conduzido em câmara climatizada (Fitotron), com temperatura e umidade controlada de 20°C e 50%, respectivamente. A semeadura foi realizada em vasos de 1 kg, contendo uma mistura de solo, areia e esterco, previamente esterilizados. Foram semeadas quatro sementes por vaso, desbastadas para duas, sob um delineamento inteiramente ao acaso, contendo cinco repetições.

Foram utilizados cinco tempos de coleta: 0h, 12h, 24h, 48h e 96h. Um trifólio de cada planta foi coletado e juntado aleatoriamente com o trifólio de outra planta do mesmo acesso (mesmo tempo de coleta, porém repetições diferentes). Os trifólios foram imediatamente imersos em nitrogênio líquido e armazenados em ultrafreezer a -80°C para posterior extração do RNA total e síntese do cDNA.

Para a extração de RNA total, foi utilizada a metodologia descrita por Chomczynski e Sacchi (1987) com algumas modificações, utilizado o reagente TRIzol Reagent (*Life Technologies*). Para análise da integridade do RNA total, utilizou-se eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e

a quantificação foi realizada utilizando o espectrofotômetro NanoDrop ND-1000.

Extraído o RNA, procedeu-se ao tratamento do mesmo utilizando o reagente DNase I RNase free (*Life Technologies*), seguindo as recomendações do fabricante, a fim de evitar contaminação com DNA genômico (gDNA). O tratamento foi feito a partir de 1µg de RNA total de cada tecido extraído. Após o tratamento foi realizado um PCR seguido de eletroforese para a confirmação da ausência de gDNA utilizando o *primer* β-actina-intron (β-actina-intron *Forward* - 5'CCCCTCAACCCAAAGGTCAACAG3', β-actina-intron *Reverse* - 5'GGAATCTCTCTGCCCAATTGTG3'). As amostras tratadas foram quantificadas no NanoDrop.

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 580µg do RNA tratado de cada tecido extraído. A síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit SuperScript® III First-Strand Synthesis System (*Life Technologies*). Após a síntese de cDNA foi realizado um PCR seguido de eletroforese, utilizando o *primer* β-actina-intron a fim de confirmar a síntese. O cDNA foi quantificado com o auxílio do NanoDrop, em seguida foi armazenado a -20°C até o momento de uso.

Para análise de PCR em tempo real foram sintetizados quatro pares de *primers*, *Primer A*, *Primer B*, *Primer C* e *Primer D* (Tabela 2), correspondendo a quatro grupos de genes identificados. Os *primers* foram desenhados com auxílio do programa Primer3Plus (Untergasser et al., 2007), com base na sequência de genes localizados na região em que o loco *Red*, de resistência ao oídio, foi mapeado, entre os marcadores Sat\_263 e Satt307, no cromossomo 6 do genoma da soja. Para isso, utilizou-se o banco de dados do Soybase

(<http://soybase.org>) a fim de obter as informações necessárias sobre a anotação genômica da região do loco *Red*.

**Tabela 2.** Informações dos *primers* utilizados para análise de expressão gênica.

Nome		Sequência	Glymas v2.0
<i>Primer A</i>	F	5'TCCCGAATATGGCCTACAAG3'	Glyma.06g261400, Glyma.06g261500
	R	5'CCCAAATCGCACAACTC3'	
<i>Primer B</i>	F	5'GGGACTAGGCTACGCAATAAAC3'	Glyma.06g263900, Glyma.06g265000, Glyma.06g265400
	R	5'CCACCTAGGCACTCACGTAATAG3'	
<i>Primer C</i>	F	5'GAACTTGCAACCATCCTTGG3'	Glyma.06g267300, Glyma.06g268600
	R	5'TTCCTCAAGCCTAGCCAATC3'	
<i>Primer D</i>	F	5'TGGTGCATGAAAGAGCTGAC3'	Glyma.06g275000
	R	5'AAAGCCTCTCCAACTGTCC3'	

As análises de RT-qPCR foram realizadas no aparelho StepOnePlus™ (*Applied Biosystems*) no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Soja, e as análises de expressão gênica foram realizadas com a utilização do programa StepOne™ Software v.2.1 (*Applied Biosystems*). Todas as reações foram submetidas às mesmas condições de análise e normalizadas pelo sinal do corante de referência passiva ROX Reference Dye (*Life Technologies*) para correção de flutuações na leitura decorrentes a variações de volume e evaporação ao longo da reação. Em todas as reações foi utilizado o fluoróforo SYBR® Green (*Life Technologies*).

As condições da ciclagem da reação de quantificação foram 95°C durante 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. As condições da ciclagem da curva de dissociação foram 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto seguido de 95°C por 15 segundos.

Com o intuito de avaliar a eficiência da reação de amplificação de cada *primer*, foram realizadas diluições seriadas de cDNA (concentrado, 5x diluído, 25x diluído, 125x diluído e 625x diluído) para todos os pares de *primers* e

controles endógenos. Esse é o procedimento padrão que garante que não ocorram diferenças na eficiência dos alvos e o normalizador. Foram utilizados como controles endógenos o  $\beta$ -actina e  $\beta$ -tubulina (Tabela 3).

**Tabela 3.** Sequência dos *primers* utilizados como controle endógeno.

Nome		Sequência
$\beta$ -actina	F	5'GAGCTATGAATTGCCTGATGG3'
	R	5'CGTTTCATGAATTCCAGTAGC3'
$\beta$ -tubulina	F	5'CGCACCCCTTAAGCTCACCACC3'
	R	5'TTTCCACGGACATCGCAGAAGC3'

As reações de RTq-PCR foram preparadas em triplicatas. O *mix* e as condições da ciclagem da quantificação relativa foram as mesmas utilizadas nas análises de eficiência. Após esta etapa foi realizada uma curva de dissociação com o intuito de verificar a formação de dímeros de *primers*, ampliações inespecíficas, possíveis erros e contaminações.

Para as análises de expressão gênica e estatística foi utilizado o método  $C_T$  comparativo ( $\Delta\Delta C_T$ ) seguido do teste t a 5% (Student, 1908).

#### 4.4. Silenciamento gênico induzido por vírus

##### 4.4.1. Obtenção das construções

Para o experimento de VIGS, foram utilizadas dois acessos de soja resistentes ao oídio, PI229358 e BRI01-22106 (RI-75). Foi utilizado como vetor viral o BPMV IA-1033, desenvolvido e cedido pela equipe do Dr. Steven Whitham (Departamento de Patologia de Plantas e Microbiologia da *Iowa State University*, Ames, IA, EUA). O desenvolvimento do BPMV (*Bean pod mottle virus*) foi descrito por Zhang et al. (2010).

O vetor viral BPMV IA-1033 foi digerido com as enzimas de restrição RE XhoI (*Promega*) e RE BamHI (*Promega*), seguido de eletroforese em gel de agarose 1%. O padrão de bandas foi visualizado sob luz ultravioleta e fotodocumentado. A digestão foi realizada em duplicata e cada uma foi aplicada em três poços no gel de agarose.

Os fragmentos obtidos foram cortados do gel com auxílio de uma lâmina, sob luz ultravioleta, e purificados com o kit Qiagen QIAquick Gel Extraction Kit (*Qiagen*), de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras foram quantificadas com o espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 de modo a determinar a concentração do vetor digerido.

Para dar início a construção de VIGS, foram desenhados quatro pares de *primers*: *Primer AV*, *Primer BV*, *Primer CV* e *Primer DV*, com o auxílio do programa Oligo 7, na região onde está localizado o gene *Red*. Na extremidade 5' de cada *primer forward* foi adicionado as bases CTCGAG referentes ao sítio da enzima de restrição XhoI e na extremidade 5' de cada *primer reverse* foi adicionado as bases GGATCC referentes ao sítio da enzima de restrição BamHI. De modo a obter uma digestão mais específica foram adicionadas três bases (ATT) no início de cada *primer* (Tabela 4). A adição de combinações de bases A e T ao invés de C e G é preferível a fim de manter a temperatura mais baixa.

O procedimento de construção do VIGS foi baseado no artigo de Zhang et al. (2013) com algumas adaptações. Inicialmente foi realizado um PCR com os quatro *primers* de interesse, seguido de eletroforese em gel de agarose 1% e fotodocumentação. O DNA extraído da cultivar Williams 82 foi utilizado para realizar as análises.

**Tabela 4.** Informações dos *primers* utilizados para a construção de VIGS. As bases sublinhadas indicam os sítios para as enzimas de restrição.

Nome		Sequência	Enzima de restrição	Glymas v2.0
<i>Primer AV</i>	F	5'AAT <u>CTCGAG</u> ACTAGAAAAGCTCAGAGAA3'	XhoI	Glyma.06g261400, Glyma.06g261500
	R	5'AAT <u>GGATCC</u> AGTTGACGCATACATGGAA3'	BamHI	
<i>Primer BV</i>	F	5'ATT <u>CTCGAG</u> TTGTGCGAGTTACCACATTTT3'	XhoI	Glyma.06g263900, Glyma.06g265000, Glyma.06g265400
	R	5'ATT <u>GGATCC</u> TAGCGTACACATCCATAGAG3'	BamHI	
<i>Primer CV</i>	F	5'ATT <u>CTCGAG</u> TTGATTTCCCATATCTGAC3'	XhoI	Glyma.06g267300, Glyma.06g268600
	R	5'ATT <u>GGATCC</u> TCGCGTATGGCAAGATTTCGT3'	BamHI	
<i>Primer DV</i>	F	5'ATT <u>CTCGAG</u> GCTTTGGTGACAGTTGGATT3'	XhoI	Glyma.06g275000
	R	5'ATT <u>GGATCC</u> ATTTGAATCGTTGAAGATGG3'	BamHI	

Após a confirmação por eletroforese, foi realizada a purificação da reação de PCR utilizando o kit Qiagen QIAquick PCR Purification Kit (*Quiagen*), segundo as recomendações do fabricante. Em seguida foi realizado a digestão da reação com as enzimas de restrição RE XhoI (*Promega*) e RE BamHI (*Promega*), seguido por uma nova purificação com o kit Qiagen QIAquick PCR Purification Kit (*Quiagen*). As amostras foram quantificadas com o espectrofotômetro NanoDrop ND-1000.

A reação de ligação do inserto no vetor foi realizada para um volume final de 10µL, utilizando uma razão molar de 8 (inserto) : 1 (vetor). Foi utilizado aproximadamente 30ng do DNA clivado, 100ng do vetor clivado, tampão de reação e 1U de T4 DNA Ligase (*Promega*). A reação foi incubada a 4°C por aproximadamente 16 horas.

Em seguida, foi realizado um PCR para confirmar o resultado da ligação. Os *primers* utilizados foram os quatro previamente utilizados (*Primer AV* (Ligação 1), *Primer BV* (Ligação 2), *Primer CV* (Ligação 3) e *Primer DV* (Ligação 4)), além do *Primer MCS*, desenhado no sítio de clonagem múltipla do vetor BPMV IA-1033 (*MCS Forward* - 5'CTACAGTTTTTGGACATTCTCC3', *MCS Reverse* - 5'ATAGACAGAGCATACTCAACG3'). Foi realizada a eletroforese em

gel de agarose 1% e o padrão de bandas foi visualizado sob luz ultravioleta e fotodocumentado.

Após a confirmação da ligação, foi realizada a transformação de *Escherichia coli* por choque térmico com as células One Shot® TOP10 Electrocomp™ *E. coli* (Life Technologies), de acordo com as recomendações do fabricante. O aparelho MicroPulser™ Electroporator (BioRad) foi utilizado para fazer a transformação.

A cultura já transformada foi transferida para um tubo Falcon de 15mL e incubada a 37°C por 1 hora a 200rpm. As células foram plaqueadas em meio LB sólido contendo ampicilina (50µg/mL). Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C por aproximadamente 16 horas.

Para a análise dos transformantes, foram selecionadas 10 colônias brancas de cada ligação e para a confirmação da transformação foi feito um PCR, seguindo as mesmas condições anteriormente citadas. As colônias que apresentaram amplificação do produto esperado foram inoculadas em 10mL de meio LB líquido contendo ampicilina (50µg/mL) e incubadas a 37°C por aproximadamente 18 horas sob agitação de 250rpm. Após o crescimento, foram removidos 500µL do meio de cultura e aliqüotados juntamente com 450µL de glicerol 50%. Os tubos foram armazenados em ultrafreezer a -80°C.

Foram selecionadas duas colônias por ligação. A seleção das colônias foi feita baseado no peso molecular (aproximadamente 500pb) das bandas representadas no gel de agarose. Confirmadas as colônias positivas, o DNA plasmidial foi isolado pelo método de purificação em colunas, utilizando o kit QIAprep® Miniprep (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante. As amostras foram quantificadas com o espectrofotômetro NanoDrop ND-1000.

O sequenciamento dos clones recombinantes foi realizado em sequenciador ABI 3730xl DNA Analyzer (*Applied Biosystems*), usando o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (*Life Technologies*), conforme recomendações do fabricante, e as reações foram ressuspendidas em Hi-Di™ Formamide (*Life Technologies*).

Após o sequenciamento, as sequências obtidas foram transferidas para o computador e analisadas com o auxílio do programa Sequencher® v.5.3 (*Genes Codes Corporation*) e a busca por similaridades com as sequências depositadas no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) foi realizada usando o algoritmo BLAST (Altschul et al., 1997).

#### **4.4.2. Obtenção do inóculo viral**

Foram colocadas para germinar, em papel de germinação, sementes da cultivar Williams 82. Após 3 dias, as plântulas foram transferidas para pequenos vasos contendo uma mistura de solo e areia previamente autoclavados. A inoculação do vetor viral foi realizada pelo método de biobalística, utilizando o bombardeador de micropartículas (*Gene gun*) do Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Soja (Equipamento desenvolvido pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia).

O vetor viral BPMV IA-1033 necessita dos dois componentes (RNA1 e RNA2) e do SMV (*Soybean Mosaic Virus*) para funcionar corretamente. Tanto o RNA1 (7D10A) como o SMV (SMV101A) foi cedido pela equipe do Dr. Steven Whitham (*Iowa State University*).

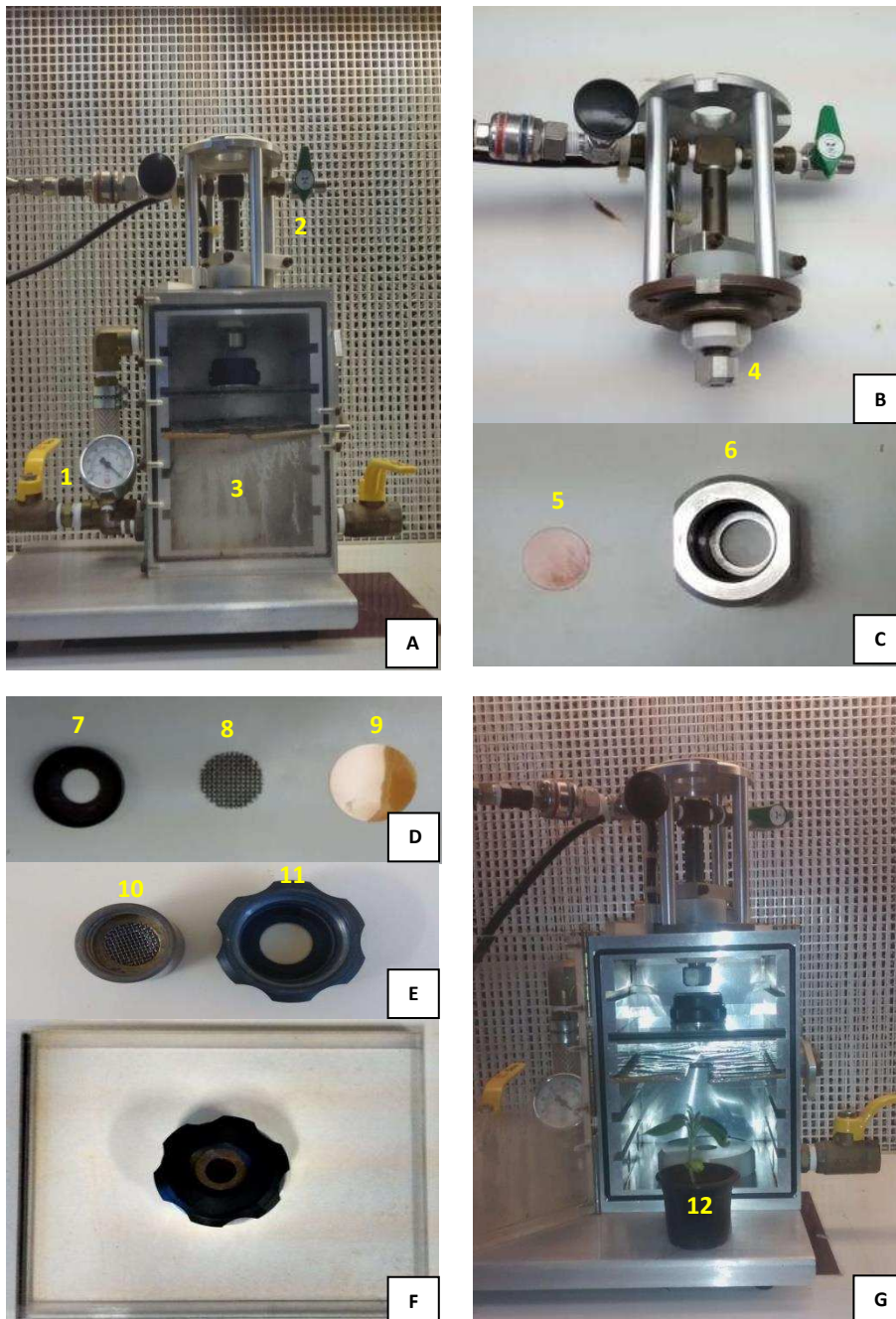
Foram utilizadas as quatro construções mencionadas anteriormente (construção 1, 2, 3 e 4). Primeiramente, as partículas de ouro foram limpas com

Etanol 100%, em seguida, resuspendidas em água e armazenadas a -20°C até o momento do uso.

O volume correspondente a cada construção foi pipetado juntamente com o RNA1, SMV e as micropartículas de ouro e distribuídos em quatro microtubos. Em seguida, os microtubos foram colocados no sonificador e foi adicionado em cada tubo uma mistura de Glicerol 50%, CaCl<sub>2</sub> 2,5M e espermidina 0,1M. As suspensões contendo as micropartículas de ouro foram lavadas com isopropanol e aplicadas no centro da membrana macrocarreadora.

Os vasos contendo a cultivar Williams 82, com aproximadamente 10 dias após a germinação, foram colocados dentro do *Gene gun*, já preparado com as construções, mantendo uma distância de aproximadamente 2,5cm entre a folha e a membrana. Foi utilizada uma pressão de 1100psi para o bombardeamento das amostras. Em seguida, as plantas foram borrifadas com água destilada e mantidas por 2 dias em câmara de crescimento a 22°C, devidamente cobertas com saco plástico a fim de manter a umidade. O processo de preparo do *Gene gun* está ilustrado na Figura 4.

Após dois dias mantidas em câmara de crescimento, as plantas transformadas foram transferidas para vasos de 5Kg contendo uma mistura de solo, areia e esterco, e armazenadas em casa de vegetação com temperatura controlada a 25°C. Aproximadamente três semanas após o bombardeamento iniciam-se os sintomas. No caso do SMV, os sintomas característicos são o enrugamento das folhas.



**Figura 4.** *Gene gun* utilizado no bombardeamento. **A)** vista geral do aparelho de bombardeamento de micropartículas - 1) controles do vácuo, 2) câmara para contenção de gás hélio e controles para sua liberação, 3) câmara de vácuo; **B)** câmara de contenção do gás hélio - 4) encaixe do suporte da membrana de ruptura (microcarreador); **C)** detalhe do encaixe do microcarreador - 5) membrana de ruptura, 6) suporte da membrana de ruptura; **D)** detalhe do suporte das micropartículas (macrocarreador) - 7) suporte para a membrana macrocarreadora, 8) tela de retenção da membrana macrocarreadora, 9) membrana macrocarreadora; **E)** 10) suporte da tela de retenção da membrana, 11) encaixe do suporte da tela de retenção e macrocarreador; **F)** dispositivo que mantém todo o conjunto (figuras D e E) unido dentro da câmara de vácuo; **G)** *Gene gun* com todas as peças encaixadas, pronto para o bombardeamento - 12) Planta de soja em estágio V1 (folhas unifoliadas completamente desenvolvidas e emergência do primeiro trifólio).

As folhas que apresentaram sintomas foram coletadas, identificadas e liofilizadas no Liotop L101 por cerca de 10 horas, em seguida, foram transferidas para tubos *Falcon* de 50mL, contendo sílica gel, e armazenadas em freezer a -20°C até o momento da inoculação (*Rub-inoculation*).

#### **4.4.3. Fenotipagem**

Foi realizado um experimento de acordo com Pandey et al. (2011) adaptado. Um delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições foi empregado, sendo testados os genes potencialmente envolvidos na resistência conferida pelo gene *Red* (construção 1, 2, 3 e 4). Dois acessos resistentes ao oídio foram utilizados (PI229358 e RI-75). O efeito do silenciamento foi comparado entre as plantas inoculadas com a construção do gene alvo e o vetor vazio.

O experimento foi conduzido em câmara climatizada (Fitotron) com temperatura controlada (22°C durante o dia e 20°C durante a noite), fotoperíodo de 16h de luz e aproximadamente 50% de umidade relativa do ar. A semeadura foi realizada em vasos de 1kg contendo uma mistura de solo, areia e esterco, previamente esterilizados. Foram semeadas quatro sementes por vaso. Após a germinação, foram desbastadas três plantas, restando uma planta por vaso.

Duas semanas após a semeadura, quando as plantas estavam no estágio de desenvolvimento V1, foi realizada a inoculação mecânica (*Rub-inoculation*) dos vetores virais para indução do silenciamento. Foram preparadas as soluções partindo de 50mg de folhas liofilizadas para 1mL de

tampão fosfato  $KPO_4$  50mM, pH7,0. As folhas liofilizadas referente as quatro construções foram maceradas com o auxílio de um cadinho e pistilo (previamente gelados) juntamente com o tampão fosfato. Todas as plantas foram previamente pulverizadas com Carborundum (carbureto de silício), em seguida foi aplicada a solução (construção/vetor vazio e tampão fosfato) nas duas folhas unifoliadas friccionando levemente com os dedos para ajudar a penetração da construção nas células. Por fim, as plantas foram borrifadas com água destilada.

Aproximadamente três semanas após o *Rub* os sintomas da infecção viral começaram a aparecer. Neste mesmo período foi realizada a coleta das folhas para confirmação do silenciamento gênico via RT-qPCR. Uma única folha proveniente do terceiro trifólio de cada planta foi coletada, embaladas em papel alumínio, devidamente identificadas, imediatamente submersas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer a  $-80^{\circ}C$  para posterior extração de RNA.

Após a confirmação do silenciamento, os vasos contendo a cultivar Embrapa 48, previamente inoculadas com oídio, foram transferidos para o Fitotron a fim de realizar a inoculação das plantas para posterior caracterização fenotípica e genotípica do silenciamento. A avaliação fenotípica foi realizada qualitativamente com base na escala diagramática para severidade do oídio (Figura 3).

Para confirmar o silenciamento, foi utilizada a técnica de PCR em tempo real (RT-qPCR) utilizando o aparelho StepOnePlus™ (*Applied Biosystems*). Um *bulk* contendo as cinco folhas coletadas, uma de cada repetição, foi feito para cada construção. A extração do RNA total, tratamento com DNase, síntese de

cDNA e as análises de RT-qPCR foram realizadas da mesma maneira descrita no item anterior (4.3).

## **5. Resultados e Discussão**

### **5.1. Resistência ao oídio em linhagens endogâmicas de soja**

Com o objetivo de identificar linhagens de soja para resistência ao oídio, foram avaliadas 109 famílias de linhagens endogâmicas recombinantes (RILs) originadas do cruzamento RI-75 x Kinoshita. Os primeiros sintomas da doença surgiram aproximadamente uma semana após a transferência das plantas da cultivar Embrapa 48 previamente inoculadas para a casa de vegetação. Durante o período de avaliação, a temperatura média registrada foi de 21°C. A medição foi feita com o auxílio de dois *data loggers* (Hobo® U10-003) presentes nas duas extremidades da casa de vegetação.

De acordo com Grau (2006), para seu desenvolvimento, o oídio necessita de temperaturas em torno de 18-24°C e baixa umidade relativa do ar. A época de condução do experimento, de maio a julho, favoreceu para que o fungo se disseminasse rapidamente entre todas as plantas presentes na casa de vegetação. Gonçalves et al. (2009) obtiveram resultados semelhantes conduzindo em casa de vegetação um experimento onde foi avaliado a reação de genótipos de soja ao oídio.

Com base nas avaliações fenotípicas, observou-se que as famílias apresentaram comportamentos distintos, variando desde a completa suscetibilidade até a resistência total, com ausência completa do fungo até o final do ciclo. Algumas famílias apresentaram resistência parcial, considerando

que no início das avaliações foram avaliadas como suscetíveis e com o passar dos dias os sintomas foram diminuídos, em alguns casos até o completo desaparecimento de sintomas, permanecendo apenas manchas ou sinais de infecção.

Estes comportamentos observados estão de acordo com as reações da soja ao oídio descritos na literatura, onde diversos estudos já relataram a resistência ao oídio controlada pelo loco de resistência *Rmd*, composto por três alelos distintos: *Rmd-c*, que confere resistência por todo o ciclo da planta; *Rmd* que confere resistência nos estádios de planta adulta; e *rmd* que condiciona a suscetibilidade (Lohnes e Bernard, 1992; Mignucci e Lim, 1980; Buzzell e Haas, 1978). Este comportamento observado nas famílias analisadas demonstra que é possível que o loco de resistência ao oídio *Red*, foco desse estudo, apresente características semelhantes ao loco *Rmd*.

Com base na avaliação realizada na geração F<sub>6</sub>, das 109 famílias avaliadas, 29 apresentaram o comportamento de resistência total ao oídio e 80 apresentaram presença de oídio com médias de infecção foliar variando de 0.01 a 7.15 (Tabela 5). Foi avaliado o primeiro trifólio de cada planta e conforme o nível de infecção observado (Figura 3), as plantas foram classificadas em três grupos distintos: Resistente (R), Moderadamente Resistente (MR) e Suscetível (S).

Baseado no teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade, pôde-se observar que as famílias apresentaram diferenças na reação em resposta ao oídio, o que permitiu serem distribuídas em seis diferentes grupos. Das 109 famílias avaliadas, 34 foram incluídas em um grupo com as maiores médias de infecção foliar entre 6,39 a 7,15; 22 famílias foram agrupadas em quatro grupos distintos com média de infecção variando de 1,24

a 6,35; e 53 famílias foram incluídas em outro grupo, no qual estão incluídas 29 famílias com ausência total de infecção e 23 que apresentaram médias de infecção variando de 0,01 a 0,90 (Tabela 5).

**Tabela 5.** Médias e grupos de reação das famílias avaliadas quanto ao nível de infecção de oídio. Resistente (R); Moderadamente Resistente (MR); Suscetível (S).

Família	Média	*	Reação	Família	Média	*	Reação	Família	Média	*	Reação	Família	Média	*	Reação
1	0,4	f	R	30	6,6	a	S	62	6,1	b	S	91	0,1	f	R
2	0,0	f	R	31	6,9	a	S	63	6,6	a	S	93	0,5	f	R
3	6,3	b	S	32	6,3	b	S	64	0,0	f	R	94	5,5	b	MR
4	7,0	a	S	34	0,4	f	R	65	5,7	b	MR	95	0,0	f	R
5	3,0	d	R	35	6,7	a	S	66	7,0	a	S	96	6,5	a	S
6	6,5	a	S	36	0,3	f	R	67	0,0	f	R	97	0,1	f	R
7	7,0	a	S	38	6,7	a	S	68	0,0	f	R	98	6,5	a	S
8	6,7	a	S	39	0,0	f	R	69	6,3	b	S	99	0,0	f	R
9	0,7	f	R	40	7,0	a	S	70	0,5	f	R	100	0,0	f	R
10	1,8	e	R	41	0,0	f	R	71	5,8	b	MR	101	6,8	a	S
11	0,0	f	R	42	0,5	f	R	72	3,2	d	MR	102	0,0	f	R
13	6,6	a	S	44	5,7	b	MR	73	6,5	a	S	103	6,4	a	S
14	3,6	c	MR	45	0,0	f	R	74	6,4	a	S	104	6,4	b	S
15	6,7	a	S	46	0,2	f	R	75	0,0	f	R	105	0,8	f	R
16	1,4	e	R	47	0,0	f	R	76	0,4	f	R	106	6,7	a	S
17	0,8	f	R	48	0,0	f	R	77	0,0	f	R	107	0,0	f	R
18	0,0	f	R	49	6,7	a	S	78	0,0	f	R	108	6,4	a	S
19	6,3	b	S	50	6,6	a	S	79	0,0	f	R	109	0,7	f	R
20	0,3	f	R	51	7,2	a	S	80	0,0	f	R	110	6,7	a	S
21	7,0	a	S	52	6,4	a	S	81	0,0	f	R	111	6,1	b	S
22	0,0	f	R	54	6,6	a	S	82	0,1	f	R	112	0,7	a	R
23	0,0	f	R	55	0,1	f	R	83	0,9	f	R	113	6,5	a	S
24	6,2	b	S	56	0,5	f	R	84	0,4	f	R	114	0,0	f	R
25	0,4	f	R	57	6,4	a	S	85	6,0	b	S	115	6,8	a	S
26	1,8	e	R	58	1,2	e	R	87	0,0	f	R	116	5,9	b	MR
27	0,0	f	R	59	0,0	f	R	88	0,0	f	R				
28	0,0	f	R	60	6,8	a	S	89	6,7	a	S				
29	6,7	a	S	61	4,0	c	MR	90	0,0	f	R				

\*Médias de valores de severidade seguidas por uma mesma letra minúscula agrupam entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Esses dados relacionados com o nível de infecção de oídio nas famílias avaliadas mostraram que ainda que tenham apresentado sintomas da doença, a maioria das famílias (58) foram consideradas resistentes. Das demais 52

famílias, apenas oito foram consideradas moderadamente resistentes e 43 foram consideradas suscetíveis. Esses resultados são semelhantes aos obtidos por Azevedo et al. (2005). Estes autores avaliaram a estabilidade de genótipos de soja quanto ao oídio e reportaram que a maioria dos genótipos avaliados se comportaram como resistentes ao oídio.

As famílias diferiram a 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey, o que sugere que existe um potencial a ser explorado naquelas que se comportaram como resistentes, principalmente nas 29 famílias que apresentaram ausência total de infecção.

Os resultados da análise de variância (ANOVA) para a característica resistência ao oídio mostraram que existem diferenças entre as famílias avaliadas. Foram constatadas diferenças significativas a 5% de probabilidade, pelo teste F ( $p < 0,0001$ ), entre as 109 famílias, comprovando que existe um comportamento diferente entre as famílias quanto a resistência ao oídio.

No entanto, o valor de F foi significativo tanto para as famílias quanto para os blocos. Isso pode ser explicado pelo fato de que os blocos foram instalados em diferentes locais da casa de vegetação, na entrada, no meio e no fundo. Foram verificadas variações de temperaturas na casa de vegetação, sendo que as temperaturas registradas no fundo são ligeiramente mais amenas que as registradas na entrada.

De acordo com Alves et al. (2009), as variações climáticas interferem no processo de desenvolvimento do oídio em soja. Dados reportados por estes autores mostraram que ocorreram interações significativas entre variações de temperatura e molhamento foliar em plantas de soja sob infecção de oídio.

Contudo, o valor de F foi maior entre as famílias quando comparado ao valor para efeito dos blocos. Este resultado indica que as diferenças são mais

significativas aos efeitos entre as famílias do que aos efeitos de variação nos blocos.

Os dados resultantes da avaliação fenotípica obtidos no presente estudo possibilitaram identificar famílias resistentes e suscetíveis ao oídio da soja. Os resultados obtidos estão de acordo com os resultados de Sartorato e Yorinori (2001) e Alves et al. (2009). Para estes autores, além das variações climáticas, as variações na sintomatologia do oídio ocorrem em função da variabilidade genética das populações do patógeno, da resistência de cultivares, do estágio de desenvolvimento da planta e de práticas agronômicas adotadas.

Visando uma disponibilidade de cultivares com ampla resistência a doenças, linhagens que apresentem resistência completa ou moderada ao oídio são altamente desejáveis (Azevedo et al., 2005). Deste modo, os resultados obtidos no presente estudo mostraram que 29 famílias não apresentaram nenhum sintoma de infecção, podendo ser indicadas como promissoras para o desenvolvimento de cultivares resistentes ao oídio.

## **5.2. Análise Genômica da PI229358**

Destacado a importância do acesso PI229358 em relação a resistência a diversas doenças e pragas presentes na cultura da soja, incluindo o gene *Red* de resistência ao oídio, foi feito o sequenciamento do seu genoma. Os *reads* gerados foram alinhados ao genoma referência. Por meio de ferramentas de bioinformática foram identificados um total de 896.552 SNPs no genoma da PI229358, quando comparado com o genoma referência da cultivar Williams 82 (Schmutz, 2010). Destes SNPs, 137.233 estão presentes somente no cromossomo 06, onde se encontra o loco de resistência ao oídio *Red*. Na

região do gene *Red*, em um intervalo de 2 Mb (Chr06:44.738.459 – Chr06:46.820.83), foram encontrados 10.533 SNPs.

Com o objetivo de encontrar possíveis genes candidatos nessa região, foram feitas buscas no banco de dados Soybase, que contem a sequência do genoma referência da soja. Na região genômica que compreende o gene *Red* foram encontrados 66 modelos gênicos (*Glymas*), sendo que oito destes estão diretamente relacionados com resistência a doenças, pertencentes a classe de genes de resistência TIR-NBS-LRR (Tabela 6).

**Tabela 6.** Informações dos *Glymas* relacionados a resistência encontrados na região do gene *Red*.

<b>Glymas v2.0</b>	<b>Início</b>	<b>Fim</b>	<b>Descrição</b>
Glyma.06G261400	44785849	44803502	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class)
Glyma.06G261500	44829183	44833460	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class)
Glyma.06G263900	45140408	45148370	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class)
Glyma.06G265000	45230990	45235680	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class)
Glyma.06G265400	45287001	45291414	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class)
Glyma.06G267300	45555048	45558566	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class)
Glyma.06G268600	45721610	45724374	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class)
Glyma.06G275000	46596382	46598344	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class)

Baseado na média das avaliações realizadas nos 26 acessos nacionais, observou-se que nenhuma delas apresentaram resistência total ao oídio. Dentre os 26 acessos, 17 foram considerados moderadamente resistentes e nove foram considerados suscetíveis (Tabela 7).

O arquivo VCF gerado a partir das análises de bioinformática da PI229358 foi comparado com os arquivos VCF dos 26 acessos avaliados a fim de identificar SNPs que são exclusivos da PI229358 e dos acessos que foram considerados moderadamente resistentes, de modo que os mesmos não estejam presentes nos acessos suscetíveis.

**Tabela 7.** Avaliação dos acessos em resposta ao oídio da soja. Suscetível (S); Moderadamente Suscetível (MS); Moderadamente Resistente (MR) e Resistente (R).

Acesso	Severidade	Reação	Reação*	Referência
Anta 82	6,5	S	**	**
BR 16	7	S	S	Pereira et al., 2012
BRS 232	5,5	MR	MS	Embrapa, 2010
BRS 284	7	S	MS	Embrapa, 2010
BRS 360 RR	7	S	MR	Embrapa, 2015a
BRS 361	4	MR	MR	Embrapa, 2015b
BRS Sambaíba	5,5	MR	**	**
BRS Valiosa RR	4,5	MR	R	Multigen, 2015
BRS/GO 8360	4	MR	MR	Embrapa, 2015c
BRS/GO 8660	5,5	MR	**	**
BRS/GO Chapadões	4	MR	MS	Multigen, 2015
BRS/MG 850G RR	5	MR	MR	Embrapa, 2015d
BRS/MT Pintado	5	MR	MR	Rural Centro, 2015
BRS/MT Uirapuru	4,5	MR	R	Yorinori, J.T., 1997
CD 201	7	S	S	Costamilan et al., 2004
EMGOPA 301	6,5	S	**	**
FT Abyara	4,5	MR	R	Pereira et al., 2012
FT Cristalina	5	MR	S	Pereira et al., 2012
IAC 8	4	MR	**	**
IAS 5	4	MR	**	**
MG/BR46 Conquista	3,5	MR	R	Multigen, 2015
NA 5909 RG	7	S	MR	Lagoa Bonita, 2015
P98Y11	5	MR	**	**
Paraná	4,5	MR	S	Yorinori, J.T., 1997
PI229358	2	R	**	**
Santa Rosa	6,5	S	S	Yorinori, J.T., 1997
V MAX RR	6,5	S	R	Syngenta, 2015
Williams 82	7	S	**	**

\* De acordo com dados disponíveis na literatura.

\*\* Não foram encontradas informações na literatura.

Para uma melhor seleção dos SNPs, foram escolhidos apenas os SNPs que estão presentes na região dos oito *Glymas* relacionados a resistência a doenças na região do gene *Red* (Tabela 6). Yu et al. (2014) consideraram o mesmo critério de seleção de SNPs a fim de realizar um mapeamento fino do gene *Rpp2* que confere resistência a ferrugem asiática da soja.

Foram encontrados um total de 36 SNPs dispostos entre seis *Glymas* de resistência: Glyma.06G261400, Glyma.06G261500, Glyma.06G263900, Glyma.06G265000, Glyma.06G265400, Glyma.06G268600, e estão presentes exclusivamente nos acessos moderadamente resistentes BRS Valiosa,

BRS/GO Chapadões, BRS/MG 850G RR, MG/BR46 Conquista e FT Abyara (Figura 5). Nos outros dois *Glymas*, Glyma.06G267300 e Glyma.06G275000, não foram encontrados nenhum SNP significativo.

Posição	Williams 82	PI 229358	FT Abyara	BRS Valiosa RR	BRSMG 850G RR	Conquista	BRS/GO Chapadões	Gene
44794955	A	C	C	C	C	C	C	Glyma.06G261400
44802882	G	C	C	G	G	G	G	Glyma.06G261400
44802899	C	T	T	C	C	C	C	Glyma.06G261400
44803017	T	C	C	T	T	T	T	Glyma.06G261400
44803034	C	A	A	C	C	C	C	Glyma.06G261400
44803066	A	T	T	A	A	A	A	Glyma.06G261400
44803100	A	G	G	A	A	A	A	Glyma.06G261400
44803112	C	T	T	C	C	C	C	Glyma.06G261400
44803113	A	G	G	A	A	A	A	Glyma.06G261400
44832245	C	G	G	G	G	G	G	Glyma.06G261500
45142726	T	C	C	C	C	C	C	Glyma.06G263900
45143186	T	A	A	A	A	A	A	Glyma.06G263900
45143877	A	G	A	A	A	A	A	Glyma.06G263900
45144340	T	C	C	C	C	C	C	Glyma.06G263900
45144432	C	A	A	A	A	A	A	Glyma.06G263900
45144466	C	T	T	T	T	T	T	Glyma.06G263900
45144496	C	T	T	T	T	T	T	Glyma.06G263900
45144552	T	G	G	G	G	G	G	Glyma.06G263900
45144838	T	A	A	A	A	A	A	Glyma.06G263900
45232463	G	C	G	G	G	G	G	Glyma.06G265000
45232465	T	A	T	T	T	T	T	Glyma.06G265000
45232536	T	C	C	C	C	C	C	Glyma.06G265000
45233036	T	A	A	A	A	A	A	Glyma.06G265000
45233584	T	G	G	G	G	G	G	Glyma.06G265000
45233586	T	A	A	A	A	A	A	Glyma.06G265000
45233608	G	A	A	A	A	A	A	Glyma.06G265000
45235480	A	C	G	G	G	G	G	Glyma.06G265000
45235482	A	C	C	C	C	C	C	Glyma.06G265000
45288576	A	T	T	T	T	T	T	Glyma.06G265400
45288702	T	C	C	C	C	C	C	Glyma.06G265400
45290341	A	G	G	G	G	G	G	Glyma.06G265400
45721952	A	T	T	A	A	A	A	Glyma.06G268600
45722053	G	T	T	G	G	G	G	Glyma.06G268600
45722096	C	T	T	C	C	C	C	Glyma.06G268600
45722100	A	T	T	A	A	A	A	Glyma.06G268600
45722146	A	C	C	A	A	A	A	Glyma.06G268600

**Figura 5.** SNPs exclusivos da PI229358 e acessos moderadamente resistentes ao oídio localizados na região dos *Glymas* de resistência a doenças em soja na região do gene *Red*. Williams 82 é o acesso suscetível ao oídio.

Dentre os SNPs selecionados, no Glyma.06G261400 apenas um SNP está presente na PI229358 comparado com os cinco acessos MR e oito são exclusivos dos acessos PI229358 e FT Abyara. Para o Glyma.06G261500, foi encontrado somente um SNP que está presente em todos os acessos MR. No Glyma.06G263900 foi encontrado um SNP exclusivo da PI229358 e oito presentes em todas os acessos MR. No Glyma.06G265000, três SNPs estão presentes exclusivamente na PI229358 e seis em todos os acessos MR. No Glyma.06G265400 foram encontrados três SNPs que estão presentes em

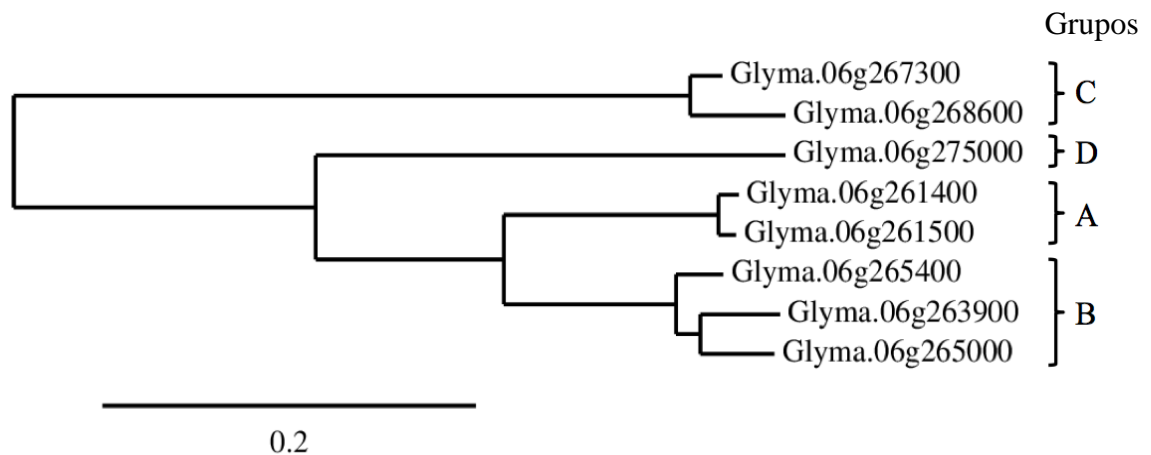
todos os acessos MR. Por fim, no Glyma.06G268600 foram identificados cinco SNPs exclusivos da PI229358 e do acesso FT Abyara.

Um dado importante a se levar em consideração são os 19 SNPs encontrados na PI229358 que também estão presentes nos cinco acessos MR. Os mesmos não são encontrados em nenhum dos acessos suscetíveis analisados, bem como no genoma referência da soja.

Pearson e Manolio (2008) observaram que em estudos que visam à associação de SNPs com a variação fenotípica é importante selecionar os SNPs que possam estar afetando o gene ou QTL envolvido no controle da característica de interesse. Neste caso, estes 19 SNPs presentes nos seis *Glymas* relacionados à resistência a doenças podem ser considerados como promissores para futuras análises de genotipagem de modo a realizar um mapeamento fino da região do gene de resistência ao oídio em soja, *Red*.

### **5.3. Análise de expressão gênica**

Visando identificar potenciais genes envolvidos na resistência ao oídio presentes no loco *Red*, foi avaliada a expressão de genes de resistência em acessos com diferentes respostas ao oídio. Os oito genes de resistência previamente identificados (Tabela 6) foram alinhados com o auxílio do programa Clustal X (Larkin et al., 2007), resultando em quatro grupos de genes, com base em suas similaridades: Grupo A (Glyma.06g261400 e Glyma.06g261500); Grupo B (Glyma.06g263900, Glyma.06g265000 e Glyma.06g265400); Grupo C (Glyma.06g267300 e Glyma.06g268600) e Grupo D (Glyma.06g275000). Uma árvore filogenética foi criada com base no resultado do alinhamento (Figura 6).

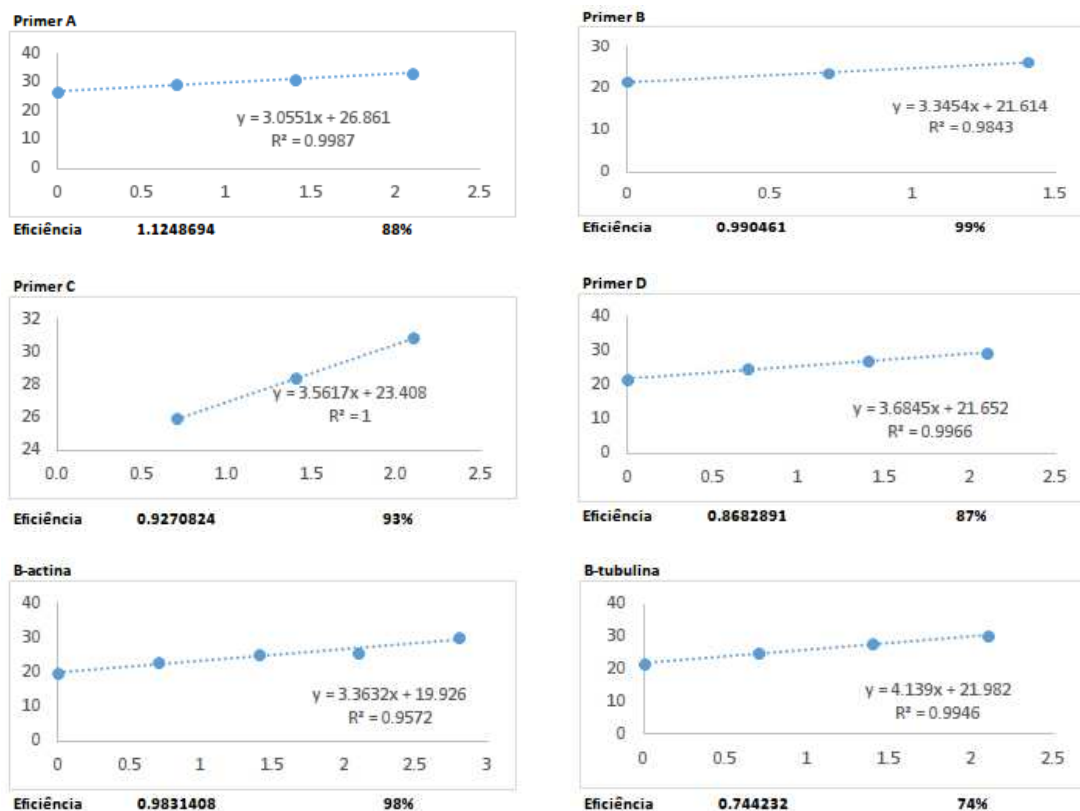


**Figura 6.** Grupos obtidos a partir do alinhamento dos oito genes de resistência.

Para cada um desses grupos de genes foram sintetizados *primers*, para serem usados nas análises de PCR em tempo real, baseados nas regiões comuns de cada grupo (Tabela 2).

Para avaliar a melhor concentração a ser utilizada na quantificação relativa, foram geradas curvas de eficiência para os quatro *primers* gerados, a partir de diferentes diluições de cDNA e utilizando como controles endógenos os genes para  $\beta$ -tubulina e  $\beta$ -actina.

Para a análise dos níveis de expressão dos genes, foi escolhido como concentração de trabalho, o cDNA 5x. A eficiência da amplificação é medida pela fórmula:  $E=10^{(-1/\text{slope})}-1$ , onde o *slope* indica a inclinação da reta, cujo valor próximo a 3,3 indica uma eficiência próxima de 100% (Bustin et al., 2009, Stratagene, 2004). Com base nos resultados da eficiência para os quatro *primers*, considerando o valor próximo de 100% dos coeficientes de determinação ( $R^2$ ), todos os *primers* (A, B, C e D) obtiveram resultados satisfatórios, obtendo, respectivamente, 88%, 99%, 93% e 87% de eficiência (Figura 7).



**Figura 7.** Eficiência dos *primers* utilizados nas reações de RT-qPCR.

Marx (2013) e Donnelly (2015) destacaram a importância da realização da eficiência dos *primers* antes das análises de quantificação relativa. Segundo os autores, um grupo de pesquisa que realizou a normalização dos dados baseado em um gene de referência encontrado na literatura obteve resultados instáveis e não confiáveis. Segundo Bustin et al. (2009), a validação dos *primers* é um dos passos mais importantes para as análises de PCR, e ensaios precisos de PCR estão geralmente relacionados com a eficiência dos *primers*.

A eficiência dos controles endógenos foi de 74% para o  $\beta$ -tubulina e 98% para o  $\beta$ -actina. Posteriormente, ambos foram submetidos à análise no programa GeNorm v3.5 (*Normalization of real-time PCR expression data*) onde verificou-se que o valor de M obtido foi o mesmo para ambos os *primers* (M=0,041).

Vandesompele et al. (2002) definiram como parâmetro para quantificar a estabilidade de genes candidatos a controle endógenos um valor da média da estabilidade de expressão (M), onde um baixo valor de M é indicativo de uma expressão mais estável. No entanto, embora o valor de M tenha sido baixo para ambos os *primers*, devido a maior eficiência obtida pelo  $\beta$ -actina, este foi escolhido para ser utilizado como controle endógeno nas análises de quantificação relativa.

Todas as amostras foram analisadas em triplicatas. Segundo Marx (2013), utilizar pelo menos três repetições é aconselhável, o que leva a uma ideia realista de quanto de variação ocorre em um determinado sistema, deste modo, com o uso de triplicatas a qualidade de análise dos dados é aumentada.

Devido ao experimento ser realizado em um espaço relativamente pequeno (Fitotron), não foi possível utilizar controle negativo (planta não inoculada). Deste modo, como calibrador para ambos os acessos resistentes (PI229358 e RI-75) e para o acesso suscetível (PI200487) utilizou-se o tempo 0h. Em um estudo realizado por Chugh et al. (2010) também foi considerado o tempo 0h para normalizar o nível basal de expressão dos genes.

As análises de quantificação relativa dos quatro *primers* nos três acessos estudados permitiu constatar a expressão diferencial dos genes candidatos a envolvimento no mecanismo de resistência ao oídio da soja sob situação de estresse causado pela infecção (Tabela 8).

Os resultados obtidos para os quatro genes candidatos mostram um padrão linear de expressão nas fases de infecção do fungo. A primeira resposta de expressão gênica em 12 horas após a infecção (hai) poderia estar associada com a penetração do fungo nas células epidérmicas.

**Tabela 8.** Nível de expressão dos acessos sob diferentes tempos de infecção ao oídio.

<b>Acesso</b>	<b>Tempo (hai)</b>	<b>Primer A</b>	<b>Primer B</b>	<b>Primer C</b>	<b>Primer D</b>
Kinoshita	12h	0,97	1,17	1,21	0,99
	24h	0,85	0,88	0,77	0,33
	48h	0,45	0,51	0,57	0,42
	96h	0,35*	0,49	0,42	0,32*
RI-75	12h	2,04	1,33	1,48	1,14
	24h	1,64	1,44	1,02	1,28
	48h	1,52	1,63	1,67	1,03
	96h	1,96	2,07	3,06	3,88*
PI229358	12h	1,17	1,28	1,36	1,13
	24h	2,23	2,32	1,88	1,56
	48h	1,69	1,59	1,55	2,50*
	96h	1,35	3,11	1,97	1,21

\*Os números seguidos de asterisco apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) pelo teste t.

Um estudo detalhado do processo de germinação, de infecção e de reprodução do oídio foi realizado por Mignucci e Chamberlain (1978). De acordo com esses autores, a germinação ocorre 3 hai, sendo que a maioria dos conídios germinam em 6 hai. Aproximadamente em 8 hai ocorre a penetração nas células epidérmicas e inicia a formação do tubo de germinação e haustório. Com o passar das horas ocorrem a formação de novos tubos de germinação. Os conidiósporos começam a se formar em aproximadamente 108 hai, e com 144 hai eles já se encontram bem definidos e os sintomas começam a ser visíveis.

Resultados semelhantes foram identificados em estudos de expressão gênica em soja inoculadas com *Phakopsora pachyrhizi*, fungo causador da ferrugem asiática (Morales et al., 2013; Schneider et al., 2011; van de Mortel et al., 2007). Esses autores observaram que a resposta de defesa da planta ao fungo se comporta de uma maneira bifásica, tanto nos genótipos resistentes como nos suscetíveis. Nos três estudos ocorreu uma primeira resposta de

expressão gênica no início da infecção do fungo, 12 hai. Uma resposta basal ocorreu nos períodos de 24 e 48 hai, onde não foi diferenciada a expressão entre os genótipos resistente e suscetível. Segundo Schneider et al. (2011), neste período de repouso, entre 24 e 48 hai, o fungo continua a se desenvolver mas não induz fortes respostas ao hospedeiro. A partir de 72 hai, assim como em 96 hai, ocorreu uma segunda fase da expressão intensa do gene.

No presente estudo foi observado que após os períodos de 24, 48 e 96 hai, os três genes estudados tiveram a expressão regulada positivamente em ambos os acessos resistentes enquanto que no acesso suscetível foram regulados negativamente, mostrando que esses grupos de genes selecionados podem estar envolvidos com a resistência a oídio modulada pelo loco *Red*.

#### **5.4. Silenciamento gênico induzido por vírus**

Para avaliar o envolvimento dos genes selecionados com a resistência ao oídio, foi promovido o silenciamento gênico por meio da técnica de VIGS. Para isso, fragmentos amplificados de cada grupo de genes foram inseridos no vetor BPMV-IA1033 e posteriormente inoculado em plantas de soja resistentes (PI229358 e RI-75) e suscetíveis ao oídio (PI200487).

Aproximadamente três semanas após a inoculação do vetor viral contendo as construções (*Rub*), as plantas de soja foram inoculadas com o fungo causador do oídio, através do contato com dez vasos de plantas suscetíveis previamente contaminados.

Foram realizadas três avaliações, com intervalo de sete dias entre elas. Foram utilizados como controle para avaliação fenotípica os acessos resistentes PI229358 e RI-75 e o acesso suscetível PI200487 (Kinoshita). Para

confirmar o silenciamento, folhas de cada uma das repetições para cada construção foram coletadas e unidas em 16 diferentes *bulks* conforme descrito na Tabela 9.

**Tabela 9.** *Bulks* desenvolvidos a partir das folhas coletadas e avaliação fenotípica do experimento. Plantas silenciadas (PS); Vetor Vazio (VV).

<i>Bulks</i>	Acesso	Tratamento	Construção	Severidade
<i>Bulk 1</i>	PI229358	PS	1	5,2
<i>Bulk 2</i>	PI229358	PS	2	6,6
<i>Bulk 3</i>	PI229358	PS	3	6,4
<i>Bulk 4</i>	PI229358	PS	4	5,8
<i>Bulk 5</i>	PI229358	VV	1	1,2
<i>Bulk 6</i>	PI229358	VV	2	2
<i>Bulk 7</i>	PI229358	VV	3	1,2
<i>Bulk 8</i>	PI229358	VV	4	1,4
<i>Bulk 9</i>	RI-75	PS	1	2,6
<i>Bulk 10</i>	RI-75	PS	2	3,8
<i>Bulk 11</i>	RI-75	PS	3	3
<i>Bulk 12</i>	RI-75	PS	4	3,6
<i>Bulk 13</i>	RI-75	VV	1	0,2
<i>Bulk 14</i>	RI-75	VV	2	0
<i>Bulk 15</i>	RI-75	VV	3	0,4
<i>Bulk 16</i>	RI-75	VV	4	0
-	PI229358	Controle	-	1
-	RI-75	Controle	-	1
-	Kinoshita	Controle	-	8

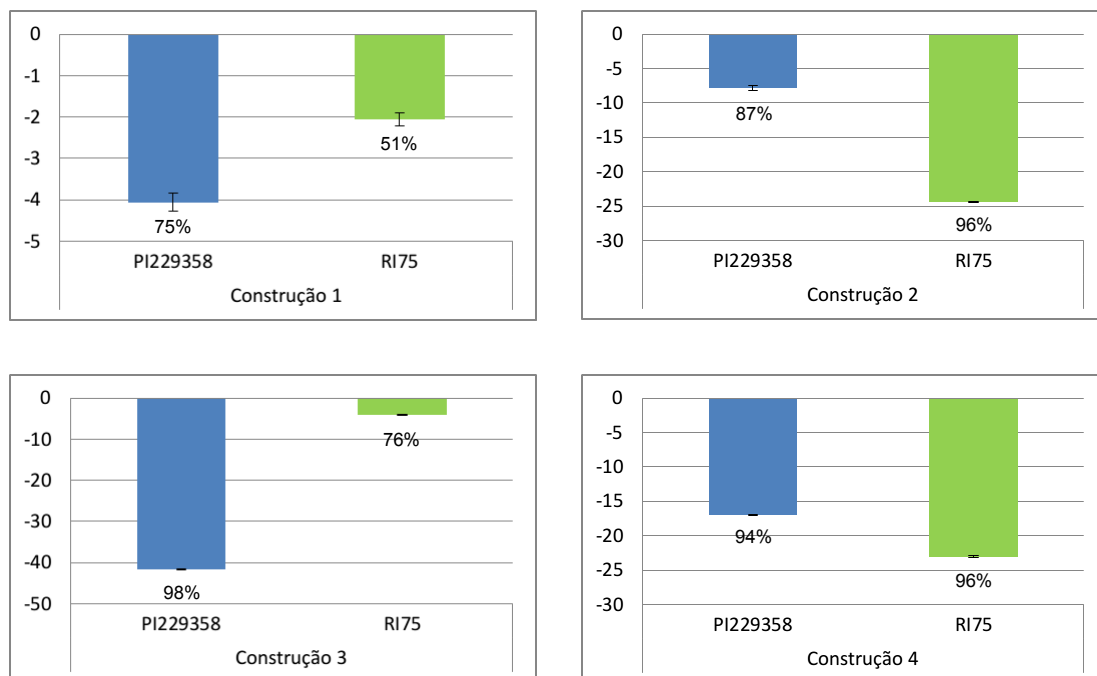
Assim como o experimento realizado por Pandey et al. (2011), para cada planta silenciada foi utilizada uma planta contendo o vetor BPMV IA-1033 vazio como controle negativo. Este estudo permitiu verificar que as plantas dos acessos resistentes (PI229358 e RI-75) transformadas com as construções de silenciamento, apresentaram uma severidade da doença maior que as mesmas plantas transformadas com o vetor vazio, para as quatro construções aqui estudadas. Foram consideradas as médias das notas da última avaliação para cada *bulk*.

Observou-se que na primeira avaliação realizada já foi possível identificar os primeiros sintomas do silenciamento. Com o passar das semanas, os sintomas presentes nas plantas silenciadas foram aumentando gradativamente enquanto que nas plantas contendo o vetor vazio, os sintomas ficaram relativamente estabilizados.

O nível de expressão dos genes alvos a silenciamento foi realizada através da técnica de PCR em tempo real utilizando o aparelho StepOnePlus™ (*Applied Biosystems*). Nesta etapa não foi realizada a curva de eficiência, visto que os *primers* aqui utilizados foram os mesmos empregados no experimento de expressão gênica, descrito no item anterior (5.3).

Assim como foi observado na caracterização fenotípica, as plantas contendo as construções de silenciamento apresentaram uma expressão reduzida dos genes alvos quando comparadas com as plantas que continham o vetor BPMV IA-1033 vazio. A regulação negativa da expressão dos genes alvos, provenientes das quatro construções, pelo silenciamento gênico acarretou a perda de resistência em ambos os acessos resistentes ao oídio da soja, indicando que alguns dos genes alvo do silenciamento podem ter algum envolvimento na resistência.

Com base nas análises de quantificação relativa, pôde-se constatar que as construções 1, 2, 3 e 4 para o acesso PI229358 apresentaram respectivamente os seguintes valores de expressão: 0,25, 0,13, 0,02 e 0,06, obtendo uma porcentagem de silenciamento de respectivamente 75%, 87%, 98% e 94%. Para o acesso RI-75 apresentaram respectivamente os valores de expressão: 0,49, 0,04, 0,24 e 0,04, obtendo uma porcentagem de silenciamento de, respectivamente, 51%, 96%, 76% e 96% (Figura 8).



**Figura 8.** Nível de expressão das quatro construções avaliadas.

Diversos estudos relataram a eficiência do vetor viral BPMV no silenciamento gênico em soja (Cooper et al., 2013; Gupta et al., 2013; Kandoth et al., 2013; Liu et al., 2015; Pandey et al., 2011; Zhang et al., 2009; Zhang et al., 2010). Além do uso do vetor viral BPMV na soja, estudos comprovam a eficácia do silenciamento gênico utilizando este vetor em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) (Díaz-Camino et al., 2011; Pflieger et al., 2014; Zhang et al. (2013).

Liu et al. (2012), ao testar o silenciamento gênico em soja resistente ao nematoide de cisto utilizando o vetor BPMV, observou o aumento da suscetibilidade em plantas resistentes silenciadas quando comparado com plantas inoculadas com o vetor vazio, obtendo uma taxa de silenciamento de 74%.

Cooper et al. (2013), Meyer et al. (2009) e Pandey et al. (2011) obtiveram resultados semelhantes aos obtidos neste estudo silenciando cultivares de soja resistentes a ferrugem asiática. Estes autores observaram um aumento do crescimento do patógeno nas plantas silenciadas ao comparar

com o vetor vazio, concluindo que ocorreu a quebra de resistência a ferrugem asiática em cultivares resistentes silenciadas com o vetor BPMV.

Neste estudo comprovou-se a eficiência do vetor BPMV IA-1033, em acessos de soja resistentes ao oídio, nas quatro construções avaliadas. Até o presente momento não existem relatos do uso do vetor viral BPMV no silenciamento gênico em relação ao oídio em soja.

O método de VIGS descrito neste estudo provém uma nova ferramenta para identificar genes envolvidos nas interações entre soja e oídio. O resultado da avaliação fenotípica foi comprovado pela regulação negativa da expressão dos genes ocorrida nas quatro construções analisadas. Em conjunto, estes resultados demonstraram uma correlação entre o aumento da infecção do fungo e a perda de resistência de ambos os acessos resistentes ocasionada pelo silenciamento gênico induzido por vírus.

## **6. Conclusões**

- Esse estudo permitiu identificar linhagens endogâmicas de soja com reação de imunidade ao oídio, mostrando a eficiência do loco *Red* para uma resistência efetiva a essa doença. A população endogâmica recombinante será de grande utilidade para trabalhos futuros de mapeamento fino do loco *Red*.
- Foram identificados nesse estudos um grande número de SNPs localizados dentro de genes relacionados a resistência a doenças presentes na região do loco *Red* de resistência ao oídio da soja. Vários desses SNPs estão presentes exclusivamente em plantas com moderada resistência ao fungo, quando comparadas com os acessos suscetíveis. Uma vez validados,

esses SNPs serão de grande utilidade em trabalhos de mapeamento genético e para uso em seleção assistida.

- Através de análise de expressão gênica pela técnica de PCR em tempo real concluiu-se que os genes candidatos presentes no loco *Red* apresentaram expressão diferencial em acessos de soja inoculados com oídio sob diferentes tempos de infecção.
- Verificou-se que as quatro construções testadas foram eficientes para silenciar os quatro grupos de genes alvo nos dois acessos resistentes avaliados. O vetor viral BPMV demonstrou ser eficiente no silenciamento de genes de soja pela técnica de VIGS.
- Esse estudo permitiu avaliar o envolvimento de oito genes potenciais na resistência ao oídio da soja modulada pelo gene *Red*. Esses genes demonstraram expressão diferencial quando submetidos a infecção com o fungo e também, quando foram silenciados por VIGS, tornaram plantas resistentes em suscetíveis.
- Estudos mais detalhados são necessários para verificar se todos ou apenas alguns desses genes estão envolvidos na resistência ao oídio e se algum deles se confirma ser o gene *Red*.

## 7. Referências

- Almeida, A.M.R., Binneck, E., Piuga, F.F., Marin, S.R.R., Valle, P.R.Z.R.do, Silveira, C.A. 2008. Characterization of powdery mildews strains from soybean, bean, sunflower, and weeds in Brazil using rDNA-ITS sequences. **Tropical Plant Pathology**. 1: 20-26.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**. 25: 3389-3402.
- Alves, M.C., Pozza, E.A., Costa, J.C.B., Ferreira, J.B., Araújo, D.V. 2009. Intensidade do oídio *Microsphaera diffusa* CKE. & PK. em cultivares de soja [*Glycine max* (L.) Merr.] sob diferentes temperaturas e períodos de molhamento foliar. **Ciência e Agrotecnologia**. 33: 1926-1930.
- Arias C.A.A., Ribeiro A.S., Kiihl S.A. 2004. **Single gene determining high level of resistance to powdery mildew**. In: VII World Soybean Research Conference / IV International Soybean Processing and Utilization Conference / III Congresso Mundial de Soja, Foz do Iguaçu Proceedings / VII World Soybean Research Conference / IV International Soybean Processing and Utilization Conference / III Congresso Mundial de Soja. Londrina: Embrapa Soja. 95-96.
- Azevedo, P.H., Azevedo, V.H., Sedyama, T., Reis, M.S., Teixeira, R.C., Cecon, P.R. 2005. Estabilidade de genótipos de soja quanto ao oídio (*Microsphaera diffusa*). **Bioscience Journal**. 1: 27-34.
- Baulcombe, D.C. 1999. Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. **Current Opinion in Plant Biology**. 2: 109-113.
- Baulcombe, D.C. 2004. RNA silencing in plants. **Nature**. 431: 356-363.
- Bedendo I.P. 2011. **Oídios**. In: Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A. Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos. São Paulo: Agronômica Ceres.
- Boethel, D.J. 1999. **Assessment of soybean germplasm for multiple insect resistance**. In SL Clement and SS Quisenbury (Eds.) Global Plant Genetic Resources for Insect-Resistant Crops. CRC Press, Boca Raton, FL, pp.101-129.
- Borém, A., Caixeta, E.T. **Marcadores moleculares**. 2 ed. Viçosa-MG: UFV, 2009. 532p.
- Botstein, D., Risch, N. 2003. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. **Nature Genetics**. 33: 228-237.
- Brookes, A. J. 1999. The essence of SNPs. **Gene**. 243: 177-186.
- Bustin S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer,

- C.T. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**. 2009. 55: 611-22.
- Buzzell, R.I, Hass, J.H. 1978. Inheritance of adult plant resistance to powdery mildew in soybeans. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**. 20: 151-153.
- Caixeta, E.T., Oliveira, A.C.B., Brito, G.G., Sakiyama, N.S. **Tipos de marcadores moleculares**. In: Borém, A., Caixeta, E.T. (Eds.). Marcadores moleculares. Viçosa, 2009. v.2, p.11-94.
- Catelli, L.L. 2009. **Resistência da soja a ferrugem asiática e ao oídio: herança de caracteres quali-quantitativos e mapeamento genético**. 106p. Tese, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Campus de Jaboticabal.
- Chen, J.C., Jiang, C.Z., Gookin, T.E., Hunter, D.A., Clark, D.G. and Reid, M.S. 2004. Chalcone synthase as a reporter in virus-induced gene silencing studies of flower senescence. **Plant Molecular Biology**. 55: 521-530.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**. 162: 156-159.
- Chugh, P., Tamburro, K., Dittmer, D. P. 2010. Profiling of Pre-micro RNAs and microRNAs using Quantitative Real-time PCR (qPCR) Arrays. **Journal of visualized experiments**. 46: e2210.
- Collins, F.S., Brooks, L.D., Charkravarti, A. 1998. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. **Genome Research**. 8: 1229-1231.
- CONAB (Companhia Nacional de Agricultura e Abastecimento). **Levantamentos de Safra**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t=>>>. Acesso em: 02 abr. 2015.
- Cooper, B., Campbell, K.B., McMahon, M.B., Luster, D.G. 2013. Disruption of Rpp1-mediated soybean rust immunity by virus-induced gene silencing. **Plant Signaling & Behavior**. 8: e27543.
- Costamilan, L.M., Bertagnolli, P.F., Bonato, ER. 2004. **Oídio: Avaliação de Severidade em Genótipos de Soja, Safra 2003/04**. Disponível em: <[http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p\\_do39\\_8.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do39_8.htm)>. Acesso em: 13 mar 2015.
- Díaz-Camino, C., Annamalai, P., Sanchez, F., Kachroo, A., Ghabrial, S.A. 2011. An effective virus-based gene silencing method for functional genomics studies in common bean. **Plant Methods**.7: 16.
- Donnelly, J. 2015. **The Importance of Primer Validation in Real-time PCR and New Tools That Make It Easier**. Disponível em: <<http://www.biosciencetechnology.com/articles/2014/10/importance-primer-validation-real-time-pcr-and-new-tools-make-it-easier>>. Acesso em: 13 jun 2015.

- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2010. **Cultivares de Soja – Regiões Sul e Central do Brasil 2010/2011**. Londrina: Embrapa Soja, 2010. 62p.
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2013. **Sistemas de Produção 16: Tecnologias de Produção de Soja - Região Central do Brasil 2014**. Londrina: Embrapa Soja, 2013. 265p.
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2015a. **Embrapa lança cultivar de soja BRS 360 RR**. Disponível em: <[http://www.cnpso.embrapa.br/noticia/ver\\_noticia.php?cod\\_noticia=842](http://www.cnpso.embrapa.br/noticia/ver_noticia.php?cod_noticia=842)>. Acesso em 13 mar 2015.
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2015b. **Produtos, Processos e Serviços - Soja - BRS 361**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-produtos-processos-e-servicos/-/produto-servico/184/soja---brs-361>>. Acesso em 13 mar 2015.
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2015c. **Produtos, Processos e Serviços - Soja – BRS GO 8360**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-produtos-processos-e-servicos/-/produto-servico/153/soja---brsgo-8360>>. Acesso em 13 mar 2015.
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2015d. **BRS/MG 850GRR**. Disponível em: <[http://www.catalogosnt.cnptia.embrapa.br/catalogo20/catalogo\\_de\\_produtos\\_e\\_servicos/arvore/CONT000fqgth70502wyiv80ba8jan8fmaeos.html](http://www.catalogosnt.cnptia.embrapa.br/catalogo20/catalogo_de_produtos_e_servicos/arvore/CONT000fqgth70502wyiv80ba8jan8fmaeos.html)>. Acesso em 13 mar 2015.
- Faivre-Rampant, O., Gilroy, E.M., Hrubikova, K., Hein, I., Millam, S., Loake, G.J., Birch, P., Taylor, M. and Lacomme, C. 2004. Potato virus X-induced gene silencing in leaves and tubers of potato. **Plant Physiology**. 134: 1308-1316.
- Farias, J.R.B., Nepomuceno, A.L., Neumaier, N. 2007. **Ecofisiologia da Soja**. Londrina: Embrapa Soja. Circular Técnica 48. 9p.
- Fugi, C.G.Q., Lourenção, A.L., Parra, J.R.P. 2005. Biology of *Anticarsia gemmatalis* on soybean genotypes with different degrees of resistance to insects. **Scientia Agricola**. 62: 31-35.
- Garcia, A., Calvo, É.S, de Souza Kiihl, R., Harada A., Hiromoto, D., Vieira L. 2008. Molecular mapping of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) resistance genes: discovery of a novel locus and alleles. **Theoretical and Applied Genetics**. 117: 545-553.
- Gazzoni, D.L. **Avaliação de genótipos de soja (*Glycine max* L. Merrill) resistentes a lagarta da soja**. In: Reunião de pesquisa de soja da região central do Brasil, 16., 1994, Dourados. Ata e resumos. Dourados: EMBRAPA-CPAO, 1994. p.111. (EMBRAPA-CPAO. Documentos, 3).
- Ghini, R., Kimati, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. 1ª ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 78 p.

- Godge, M.R., Purkayastha, A., Dasgupta, I., Kumar, P.P. 2008. Virus-induced gene silencing for functional analysis of selected genes. **Plant Cell Reports**. 27: 209-219.
- Gonçalves, E.C.P., di Mauro, A.O., Centurion, M.A.P.C., 2002. Genetics of resistance to powdery mildew *Microsphaera diffusa* in Brazilian soybean populations. **Genetics and Molecular Biology**. 25: 339-342.
- Graham, M.A., Marek, L.F., Shoemaker, R.C. 2002. PCR sampling of disease resistance-like sequences from a disease resistance gene cluster in soybean. **Theoretical and Applied Genetics**. 105: 50-57.
- Grau, C.R. 1984. **Powdery mildew, a sporadic but damaging disease of soybean**. Proceedings of the III World Soybean Research Conference. Shibles R (Ed.) Iowa, USA. Westview Press, Boulder. pp. 568-574.
- Grau, C.R. 2006. **Powdery Mildew of Soybean**. Disponível em: <[http://fyi.uwex.edu/fieldcroppathology/files/2010/12/powdery\\_mildew\\_06.pdf](http://fyi.uwex.edu/fieldcroppathology/files/2010/12/powdery_mildew_06.pdf)>. Acesso em: 12 Jun. 2014.
- Grau, C.R., Laurence, J.A. 1975. Observations on resistance and heritability of resistance to powdery mildew of soybean. **Plant Disease Reporter**. 59: 458-460.
- Grigolli, J.F.J. **Manejo de Doenças na Cultura da Soja**. In: Lourenção, A.L.F., Grigolli, J.F.J., Melotto, A.M., Pitol, C., Gitti, D. de C., Roscoe, R. (Ed.). Tecnologia e produção: Soja 2013/2014. Maracaju, MS: Fundação MS, 2014. p.205-231.
- GRIN - **Germplasm Resources Information Network**. Disponível em: <<http://www.ars-grin.gov>>. Acesso em: 02 abr. 2015.
- Grølund, M., Constantin, G., Piednoir, E., Kovacev, J., Johansen, I.E., Lund, O.S. 2008. Virus-induced gene silencing in *Medicago truncatula* and *Lathyrus odorata*. **Virus Research** 135: 345-349.
- Gupta, B., Saha, J. Sengupta, A. Gupta, K. 2013. Recent Advances on Virus Induced Gene Silencing (VIGS) Plant Functional Genomics. **Plant Biochemistry & Physiology**. 1: 5.
- Gupta, P. K., Roy, J. K., Prasad, M. 2001. Single nucleotide polymorphisms: A new paradigm for molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants. **Current Science**. 80: 4524-535.
- Hartman, G.L., Sinclair, J.B., Rupe, J.C. **Compendium of soybean diseases**. 4. ed. Minnesota: APS Press, 1999. 100p.
- Hatchett, J. H., Beland, G. L., Kilen, T. C. 1979. Identification of Multiple Insect Resistant Soybean Lines. **Crop Science**. 19: 557-559.
- Igarashi, S., Oliveira, G.M., Camargo, L.C.M., Falkoski Filho, J., Gardiano, C.G., Balan, M.G. 2010. Danos causados pela infecção de oídio em diferentes estádios fenológicos da soja. **Arquivos do Instituto Biológico**. 77: 245-250.

- Kandoth, P.K., Heinz, R., Yeckel, G., Gross, N.W., Juvale, P.S., Hill, J., Whitham, S.A., Baum, T.J., Mitchum, M.G. 2013. A virus-induced gene silencing method to study soybean cyst nematode parasitism in *Glycine max*. **BMC Research Notes**. 6: 255.
- Lagoa Bonita. 2015. **Cultivares**. Disponível em: <<http://lagoabonitasementes.com.br/soja?c=na-5909-rg>>. Acesso em: 13 mar 2015.
- Lambert, L., Kilen, T.C. 1984. Insect Resistance Factor in Soybean PI's 229358 and 227687 Demonstrated by Grafting. **Crop Science**. 24: 163-165.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**. 23: 2947-2948.
- Lima, A.C.S., Lara, F.M. 2004. Resistência de Genótipos de soja à mosca-branca *Bemisia tabaci* (Genn.) biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae). **Neotropical Entomology**. 33: 71-75.
- Liu, J.Z., Graham, M.A., Pedley, K.F., Whitham, S.A. 2015. Gaining insight into soybean defense responses using functional genomics approaches. **Briefings in Functional Genomics**. pii: elv009.
- Liu, S., Kandoth, P.K., Warren, S.D., Yeckel, G., Heinz, R., Alden, J., Yang, C., Jamai, A., El-Mellouki, T., Juvale, P.S., Hill, J., Baum, J.B., Cianzio, S., Whitham, S.A., Korkin, D., Mitchum M.G., Meksen, K. 2012. A soybean cyst nematode resistance gene points to a new mechanism of resistance to pathogens. **Nature**. 492: 256-260.
- Liu, Y., Nakayama, N., Schiff, M., Litt, A., Irish, V.F. and Dinesh-Kumar, S.P. 2004. Virus induced gene silencing of a DEFICIENS ortholog in *Nicotiana benthamiana*. **Plant Molecular Biology**. 54: 701-711.
- Liu, Y., Schiff, M., Dinesh-Kumar, S.P. 2002. Virus-induced gene silencing in tomato. **The Plant Journal**. 31: 777-786.
- Lohnes, D.G., Bernard, R.L. 1992. Inheritance of resistance to powdery mildew in soybeans. **Plant Disease**. 76: 964-965.
- Lu, R., Malcuit, U., Moffett, P., Ruiz, M.T., Peart, J., Wu, A.J., Rathjen, J.P., Bendahmane, A., Day, L., Baulcombe, D.C. 2003. High throughput virus-induced gene silencing implicates heat shock protein 90 in plant disease. **EMBO Journal**. 22: 5690-5699.
- MAPA - Ministério da Agricultura. **Soja**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/soja>>. Acesso em: 03 abr. 2015.
- Marx, V. 2013. PCR: living life amplified and standardized. **Nature Methods**. 10: 391-395.

- Mattiazzi, P. 2003. **Efeito do oídio (*Microsphaera diffusa* Cooke e Peck) na produção e duração da área foliar sadia da soja**. 2003. 49 p. Dissertação, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- Meyer, J.D.F., Silva, D.C.G., Yang, C., Pedley, K.F., Zhang, C., van de Mortel, M., Hill, J.H., Shoemaker, R.C., Abdelnoor, R.V., Whitham, S.A., Graham, M.A. 2009. Identification and analyses of candidate genes for Rpp4-mediated resistance to Asian soybean rust in Soybean. **Plant Physiology**. 150: 295-307.
- Mignucci, J.S., Boyer, S.J. 1979. Inhibition of photosynthesis and transpiration in soybean infected by *Microsphaera diffusa*, **Phytopathology**. 69: 227-230.
- Mignucci, J.S., Chamberlain, D.W. 1978. Interactions of *Microsphaera diffusa* with soybeans and other legumes. **Phytopathology**. 68: 169-173.
- Mignucci, J.S., Lim, S.M. 1980. Powdery mildew (*Microsphaera diffusa*) development on soybeans with adult-plant resistance. **Phytopathology**. 70: 919-921.
- Mignucci, J.S., Lim, S.M., Hepperly, P.R. 1977. Effects of temperature on reaction of soybean seedlings to powdery mildew. **Plant Disease Reporter**. 61: 122-124.
- Morales, A., O'Rourke, J.A., Van De Mortel, M., Schneider, K., Bancroft, T., Borem, A., Nelson, R., Nettleton, D., Baum, T., Shoemaker, R.C., Frederick, R.D., Abdelnoor, R.V., Pedley, K.F., Whitham, S.A., Graham, M.A. 2013. Transcriptome analyses and virus induced gene silencing identify genes in the Rpp4-mediated Asian soybean rust resistance pathway. **Functional Plant Biology**. 40: 1029-47.
- Mulrooney, B. 2009. **Soybean Disease Update**. University of Delaware Cooperative Extension. Disponível em: <<http://agdev.anr.udel.edu/weeklycropupdate/?p=1477>>. Acesso: 14 jun 2014.
- Multigen. 2015. **Características de cultivares de soja**. Disponível em: <<http://multigen.com.br/tabela.pdf>>. Acesso em: 13 mar 2015.
- Pandey, A.K., Yang, C., Zhang, C., Graham, M.A., Horstman, H.D., Lee, Y., Zobotina, O.A., Hill, J.H., Pedley, K.F., Whitham, S.A. 2011. Functional analysis of the asian soybean rust resistance pathway mediated by Rpp2. **Molecular Plant Microbe Interactions**. 24: 194-206.
- Pearson, T.A., Manolio, T.A. 2008. How to interpret a genome-wide association study. **Journal of the American Medical Association**. 299: 1335-1344.
- Pereira, D.G., Sedyama, T., Reis, M.S., Cruz, C.D., Gomes, J.L.L., Teixeira, R.C. 2012. Avaliação da severidade do oídio [*Erysiphe diffusa* (U. Braun & S. Takam)] em genótipos de soja, em condições de campo. **Revista Caatinga**, 25: 25-30.
- Pérez-Vega, E., Trabanco, N., Campa, A., Ferreira, J.J. 2013. Genetic mapping of two genes conferring resistance to powdery mildew in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**. 6: 1503-1512.

- Pflieger, S., Blanchet, S., Meziadi, C., Richard, M.M.S., Thareau, V., Mary, F., Mazoyer, C., Geffroy, V. 2014. The “one-step” Bean pod mottle virus (BPMV)-derived vector is a functional genomics tool for efficient overexpression of heterologous protein, virus-induced gene silencing and genetic mapping of BPMV R-gene in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) **BMC Plant Biology**. 14: 232.
- Phillips, D.V. 1984. Stability of *Microsphaera diffusa* and the effect of powdery mildew on yield of soybean. **Plant Disease**. 68: 953-956.
- Polzin, K.M., Lohnes, D.G., Nickell, C.D., Shoemaker, R.C. 1994. Integration of Rps2, Rmd and Rj2 Into Linkage Group-J of the Soybean Molecular Map. **Journal of Heredity**. 85: 300-303.
- Rafalski, A. 2002. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. **Current Opinion in Plant Biology**. 5: 94-100.
- Rector, B.G., All, J.N., Parrott, W.A., Boerma, H.R. 1998. Identification of molecular markers linked to quantitative trait loci for soybean resistance to corn earworm. **Theoretical and Applied Genetics**. 96: 786-790.
- Rector, B.G., All, J.N., Parrott, W.A., Boerma, H.R. 2000. Quantitative trait loci for antibiosis resistance to corn earworm in soybean. **Crop Science**. 40: 233-238.
- Resende, M.D.V., Lopes, P.S., Silva, R.L., Pires, I.E. 2008. Seleção genômica ampla (GWS) e maximização da eficiência do melhoramento genético. **Pesquisa Florestal Brasileira** 56: 63-77.
- Robinson, J.T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E.S., Getz, G., Mesirov, J.P. 2011. Integrative genomics viewer. **Nature Biotechnology**. 29: 24-26.
- Rogers, D.J., Sullivan, M.J. 1987. Growth of *Geocoris punctipes* (Hemiptera: Lygaeidae) on attached and detached leaves of pest resistant soybeans. **Journal of Entomological Science** 22: 282-285.
- Rural Centro. 2015. **Semente de Soja BRSMT Pintado Sementes Adriana**. Disponível em: < <http://mercado.ruralcentro.com.br/produtos/2066/semente-de-soja-brsmt-pintado-sementes-adriana>>. Acesso: 13 mar 2015.
- Ryu, C.M., Anand, A., Kang, L. and Mysore, K.S. 2004. Agrodrench: a novel and effective agroinoculation method for virus-induced gene silencing in roots and diverse solanaceous species. **The Plant Journal**. 40: 322-331.
- Santos, J.V.M. dos. 2015. **Resequenciamento de genomas de cultivares brasileiras de soja: Análise estrutural e associativa**. 113p. Tese, Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR.
- Sartorato, A., Yorinori, J.T. 2001. **Oídios de Leguminosas: Feijoeiro e Soja**. In: Sadnik, M.J., Rivera, M.C. Oídios. Jaguariúna, SP. Embrapa Meio Ambiente, pp 262-284.
- SAS Institute. **SAS/STAT® 9.3 User's Guide**, 2º edição. Cary, NC: SAS Institute Inc.

- Schmutz, J., Cannon, S.B., Schlueter, J., Ma, J., Mitros, T., Nelson, W., Hyten, D.L., Song, Q., Thelen, J.J., Cheng, J., Xu, D., Hellsten, U., May, G.D., Yu, Y., Sakurai, T., Umezawa, T., Bhattacharyya, M.K., Sandhu, D., Valliyodan, B., Lindquist, E., Peto, M., Grant, D., Shu, S., Goodstein, D., Barry, K., Futrell-Griggs, M., Abernathy, B., Du, J., Tian, Z., Zhu, L., Gill, N., Joshi, T., Libault, M., Sethuraman, A., Zhang, X.C., Shinozaki, K., Nguyen, H.T., Wing, R.A., Cregan, P., Specht, J., Grimwood, J., Rokhsar, D., Stacey, G., Shoemaker, R.C., Jackson, S.A. 2010. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. **Nature**. 463: 178-183.
- Schneider, K.T., Van De Mortel, M., Bancroft, T.J., Braun, E., Nettleton, D., Nelson, R.T., Frederick, R.D., Baum, T.J., Graham, M.A., Whitham, S.A. 2011. Biphasic gene expression changes elicited by *Phakopsora pachyrhizi* in soybean correlates with fungal penetration and haustoria formation. **Plant Physiology**. 157: 335-371.
- Scott, A.J., Knott, M.A.A. 1974. Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**. 30: 507-512.
- Senthil-Kumar, M., Gowda, H.V.R., Hema, R., Mysore, K.S., Udayakumar, M. 2008. Virus-induced gene silencing and its application in characterizing genes involved in water-deficit-stress tolerance. **Journal of Plant Physiology**. 165: 1404-1421.
- Sharma, H.C. 2009. **Biotechnological Approaches for Pest Management and Ecological Sustainability**. CRC Press, New York, NY. 526p.
- Silva Neto, S.P. da. **A evolução da produtividade da soja no Brasil**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011. Disponível em: <<http://www.cpac.embrapa.br/noticias/artigosmidia/publicados/335/>>. Acesso em: 23/01/2015.
- Silva, O.C., Seganfredo R. 1999. **Quantificação de danos ocasionados por doenças de final de ciclo e oídio, em duas variedades de soja**. In: Congresso brasileiro de soja, Embrapa Soja, Londrina, Brasil, p 460.
- Song, Q., Hyten, D.L., Jia, G., Quigley, C.V., Fickus, E.W., Nelson, R.L., Cregan, P.B. 2013. Development and evaluation of SoySNP50K, a high-density genotyping array for soybean. **PLoS One** 8:e54985.
- Stratagene. **Introduction to Quantitative PCR - Methods and Application Guide**. La Jolla, CA, 48p, 2004.
- Student. 1908. The probable error of a mean. **Biometrika**. 6: 1-25.
- Syngenta. 2015. **Vmax RR**. Disponível em: <<http://www3.syngenta.com/country/br/pt/produtosemarcas/sementes/Pages/SOJA-VMAX-RR.aspx>>. Acesso em: 13 mar 2015.
- Toppa, E.V.B., Jadoski, C.J. 2013. O uso dos marcadores moleculares no melhoramento genético de plantas. **Scientia Agraria Paranaensis**. 12: 1-5.
- Tukey, J.W. 1949. One degree of freedom for non-additivity. **Biometrics**. 5: 232-242.

- Unêda-Trevisoli, S.H., di Mauro, A.O., Costa, M.M., Ariel, N.H.C., Capeloto, A., Bárbaro, I.M., Muniz, F.R.S. 2002. Avaliação da herança de resistência ao oídio (*Microsphaera diffusa*) e do potencial agrônômico em populações de soja. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**. 6: 627-634.
- Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., Leunissen, J.A. 2007. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Research**. 35: W71-W74.
- Unver, T., Budak, H. 2009. Virus-induced gene silencing, a post transcriptional gene silencing method. **International Journal of Plant Genomics**. 198680.
- van de Mortel, M., Recknor, J.C., Graham, M.A., Nettleton, D., Dittman, J.D., Nelson, R.T., Godoy, C.V., Abdelnoor, R.V., Almeida, A.M.R., Baum, T.J., Whitham, S.A. 2007. Distinct biphasic mRNA changes in response to Asian soybean rust infection. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 20: 887–899.
- Van Duyn, J.W., Turnipseed, S.G., Maxwell, J.D. 1971. Resistance in soybeans to the Mexican bean beetle. I. Sources of resistance. **Crop Science**. 11: 572-573.
- Vandesompele, J., de Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., de Paepe, A., Speleman, F. 2002. Accurate normalization of real-timequantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal controlgenes. **Genome Biology**. 3:7.
- Wahl, C.V. 1921. Schädlinge an der Sojabohne. **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten** 31: 194-196.
- Wray, G.A. 2007. The evolutionary significance of cis-regulatory mutation. **Nature Reviews Genetics**. 8: 206.
- Yorinori, J.T. 1997. **Oídio da Soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1997. 5p. (EMBRAPA-CNPSo. Comunicado Técnico, 59).
- Yu, N., Kim, M., King, Z.R., Harris, D.K., Buck, J.W., Li, Z., Diers, B.W. 2014. Fine mapping of the Asian soybean rust resistance gene Rpp2 from soybean PI 230970. **Theoretical and Applied Genetics**. 128: 387-96.
- Zhang C., Yang, C., Whitham, S.A., Hill, J.H. 2009. Development and use of an efficient DNA-based viral gene silencing vector for soybean. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. 22: 123–131.
- Zhang, C., Bradshaw, J.D., Whitham, S.A., Hill, J.H. 2010. The development of an efficient multipurpose bean pod mottle virus viral vector set for foreign gene expression and RNA silencing. **Plant Physiology**. 153: 52-65.
- Zhang, C., Whitham, S.A., Hill, J.H. 2013. Virus-induced gene silencing in soybean and common bean. **Methods in Molecular Biology**. 975: 149-156.