

**THIAGO DE CASTRO BROMMONSCHENKEL**

**HERANÇA E MAPEAMENTO DA RESISTÊNCIA DO ACESSO PI567102B AO  
ISOLADO PPUFV02 DE *Phakopsora pachyrhizi***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Aluizio Borém de Oliveira

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

B868L  
2023 Brommonschenkel, Thiago de Castro, 1997-  
Herança e mapeamento da resistência do acesso  
PI567102B ao isolado PPUFV02 de *Phakopsora pachyrhizi* /  
Thiago de Castro Brommonschenkel. – Viçosa, MG, 2023.  
1 dissertação eletrônica (42 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Aluizio Borém de Oliveira.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Agronomia, 2023.

Referências bibliográficas: f. 37-42.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.241>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. *Glycine max* - Genética. 2. Marcadores genéticos.  
3. Ferrugem asiática. I. Oliveira, Aluizio Borém de, 1959-.  
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Agronomia. Programa de Pós-Graduação em Genética e  
Melhoramento. III. Título.

CDD 22. ed 633.342

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto Pires CRB-6/2523


**THIAGO DE CASTRO BROMMONSCHENKEL**

**HERANÇA E MAPEAMENTO DA RESISTÊNCIA DO ACESSO PI567102B AO  
ISOLADO PPUFV02 DE *Phakopsora pachyrhizi***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.


APROVADA: 24 de fevereiro de 2023

Assentimento:

Documento assinado digitalmente  
 THIAGO DE CASTRO BROMMONSCHENKEL  
Data: 08/05/2023 11:32:34-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Thiago de Castro Brommonschenkel  
Autor

Documento assinado digitalmente  
 ALUIZIO BOREM DE OLIVEIRA  
Data: 08/05/2023 11:40:32-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Aluízio Borém de Oliveira  
Orientador

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelas oportunidades, conquistas alcançadas e por sempre iluminar o meu caminho;

Aos meus pais e meus irmãos por todo amor, apoio, incentivo e por sempre acreditarem em mim;

A toda minha família que sempre me incentivou e ensinou a ir atrás dos meus sonhos;

Ao professor Aluizio Borém de Oliveira por toda amizade, ensinamentos, orientação e oportunidades;

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de pós-graduação em Genética e Melhoramento por proporcionarem a oportunidade e condições para realização deste trabalho;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos;

Aos professores do curso de Agronomia e da pós-graduação em Genética e Melhoramento, pelos ensinamentos e pela contribuição à minha formação profissional;

Aos funcionários da Pós-Graduação em Genética e Melhoramento pela paciência e disponibilidade;

Aos colegas da graduação e pós-graduação pelo companheirismo e ajuda nos estudos;

A todos meus amigos que sempre buscaram estar por perto;

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## RESUMO

BROMMONSCHENKEL, Thiago, M.Sc., Universidade federal de Viçosa, fevereiro de 2023. **Herança e mapeamento da resistência do acesso PI567102B ao isolado PPUFV02 de *Phakopsora pachyrhizi***. Orientador: Aluizio Borém de Oliveira.

A ferrugem asiática da soja causada pelo fungo basidiomiceto *Phakopsora pachyrhizi* (Pp) é a principal doença fúngica da soja no Brasil. O uso de cultivares com genes de resistência (genes R) é uma ferramenta importante para o manejo desta doença, pois, além de reduzir as perdas de produtividade, diminui a pressão de seleção para resistência do fungo aos fungicidas. Sete loci (*Rpp1* a *Rpp7*) que contêm genes que conferem resistência a *P. pachyrhizi* já foram identificados em soja. O gene *Rpp6* derivado da PI567102B foi previamente mapeado em um intervalo de 207 kb no cromossomo 18 da soja, o qual contém 16 genes candidatos. Até o momento, não foram identificados, no Brasil, isolados capazes de suplantar a resistência da PI567102B, demonstrando o potencial de utilização desta fonte em programas de melhoramento visando a piramidação de genes de resistência à Pp em cultivares comerciais, processo que é facilitado e acelerado pela utilização de marcadores proximamente ligados aos diferentes genes de resistência. Portanto, este trabalho teve por objetivo o mapeamento genético de alta resolução do gene *Rpp6* visando delimitar a localização do gene a um único gene candidato e desenvolver e validar um marcador funcional para este gene de resistência. Para efetuar o mapeamento de alta resolução, foram desenvolvidas populações segregantes derivadas do cruzamento da variedade Conquista com a PI567102B, e desenvolvidos marcadores CAPS e dCAPS com base em polimorfismos genéticos identificados na região genômica onde o gene *Rpp6* foi mapeado. Para identificar os polimorfismos genéticos, a variedade Conquista e a PI567102B foram sequenciadas utilizando a tecnologia DNBSeg, que gera sequências pareadas de 100 bp, em uma cobertura final de 50X. A seguir, as sequências obtidas foram alinhadas no genoma de referência da cultivar Williams e as sequências contendo os polimorfismos entre os dois genótipos parentais foram utilizadas no desenho dos marcadores. As populações segregantes foram avaliadas quanto a resistência ao isolado PPUFV02 e com marcadores desenvolvidos que flanqueiam o intervalo de 207 kb. O padrão de segregação obtido indicou que a resistência da PI567102B é controlada por um gene dominante. Todavia, não se observou a segregação da resistência com os marcadores que flanqueiam ou que estão localizados no intervalo genômico onde *Rpp6* foi previamente mapeado, indicando que o gene *Rpp6* não é

efetivo contra PPUFV02 e que a PI567102B possui um outro gene capaz de conferir resistência a este isolado. Esses resultados foram confirmados por testes de progênies de plantas contendo eventos de recombinação entre os marcadores que flanqueiam o intervalo alvo, e estudos de herança e cossegregação em populações segregantes avançadas derivadas da PI 476905A que também possui o mesmo haplótipo da PI567102B na região genômica do gene *Rpp6*. Estudos de cossegregação da resistência com marcadores ligados aos loci *Rpp4* e *Rpp5* indicam que o novo gene da PI 567102B não está localizado nestes loci. Estudos adicionais utilizando a estratégia de análise de agrupamentos segregantes por meio de sequenciamento genético estão sendo conduzidos para localizar o novo gene de resistência no genoma da PI567102B e desenvolver marcas proximamente ligadas para usar no melhoramento assistido e para eventualmente clonar e caracterizar este gene.

Palavras-chave: *Glycine max*. Marcadores moleculares. Ferrugem asiática da soja.

## ABSTRACT

BROMMONSCHENKEL, Thiago, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2023. **Inheritance and mapping of access resistance PI567102B to isolate PPUFV02 from *Phakopsora pachyrhizi*.** Advisor: Aluizio Borém de Oliveira.

Asian soybean rust caused by the basidiomycete fungus *Phakopsora pachyrhizi* (Pp) is the main fungal disease of soybean in Brazil. The use of cultivars with resistance to Asian soybean rust is an important tool for managing this disease, since, in addition to reducing productivity losses, it also reduces the selection pressure for fungicide resistance development. Seven loci (*Rpp1* to *Rpp7*) that contain genes that confer resistance to *P. pachyrhizi* have already been identified in soybean. The *Rpp6* gene derived from PI567102B was previously mapped to a 207 kb interval on soybean chromosome 18, which contains 16 candidate genes. So far, no isolates capable of overcoming PI567102B resistance have been identified in Brazil, demonstrating the potential for using this gene in breeding programs aimed at pyramiding broad-spectrum Pp resistance genes in commercial cultivars, a process that is facilitated and accelerated by using molecular markers closely linked to the different resistance genes. Therefore, this work aimed at high-resolution genetic mapping of *Rpp6* to delimit the location of this gene to a single candidate gene and to develop a functional molecular marker. To carry out the high-resolution mapping, F2 segregating populations derived from Conquista x PI567102B were developed. To identify genetic polymorphisms to be used for fine mapping, the Conquista variety and PI567102B were whole genome sequenced using the DNBSeg technology which generates paired sequences of 100 bp, in a final coverage of 50X. Next, the sequences obtained were aligned onto the reference genome of the Williams cultivar and the sequences in the candidate interval containing the polymorphism between the two parental genotypes were used for designing CAPS and dCAPS markers. The segregating populations were evaluated for resistance to the PPUFV02 isolate and with the developed markers that flank the 207 kb interval. The segregation pattern obtained indicated that PI567102B resistance is controlled by a single dominant gene. However, it was not observed cosegregation of resistance gene with the *Rpp6* flanking markers, indicating that the *Rpp6* gene is not effective against PPUFV02 and that PI567102B has another gene capable of conferring resistance to this isolate. These results were confirmed by progeny-tests of plants with recombination events between the flanking marker and by studies of inheritance and cosegregation studies in advanced segregating populations derived from PI 476905A that also

have the same haplotype as PI567102B in the *Rpp6* genomic region. Resistance cosegregation studies with markers linked to the *Rpp4* and *Rpp5* genes indicate that the new PI 567102B gene is not located at these loci. Additional studies using the strategy of bulked segregant analysis and DNA sequencing are being conducted to locate this new resistance gene on PI567102B genome and to develop closely linked markers to be used in marker-assisted breeding, and to eventually clone and characterize this new gene.

Keywords: *Glycine max*. Molecular markers. Asian soybean rust.

## SUMÁRIO

1.	Introdução e objetivos .....	9
2.	Revisão de Literatura .....	13
2.1.	Cultura da soja no Brasil .....	13
2.2.	Doenças na cultura da soja.....	14
2.3.	Ferrugem asiática .....	14
2.4.	Sintomatologia da Ferrugem asiática da soja.....	16
2.5.	Formas de controle.....	17
2.6.	O gene <i>Rpp6</i> .....	17
2.7.	Mapeamento de precisão.....	21
3.	Materiais e Métodos.....	24
3.1.	Desenvolvimento das populações segregantes .....	24
3.2.	Herança da resistência da PI567102B ao isolado monopustular PPUFV02 .....	24
3.3.	Extração de DNA.....	25
3.4.	Sequenciamento dos genomas da PI567102B e "Conquista", identificação de polimorfismos genéticos (SNP) e desenvolvimento de marcadores CAPS e dCAPS para os estudos de cossegregação.....	26
4.	Resultados .....	28
4.1.	Reação fenotípica do PI57102B e Conquista ao isolado PPUFV02 .....	28
4.2.	Herança da resistência da PI567102B ao isolado PPUFV02 .....	28
4.3.	Herança da resistência nas populações segregantes avançadas com resistência derivada da PI476905A .....	29
4.4.	Análise de cossegregação da resistência ao isolado PPUFV02 com marcadores moleculares ligados ao gene <i>Rpp6</i> .....	30
5.	Discussão .....	35
6.	Referências.....	37

## 1. Introdução e objetivos

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill.) é uma das mais importantes culturas do agronegócio brasileiro, sendo uma ótima fonte de proteína e óleo vegetal, o que possibilita o seu emprego como adubo verde, na alimentação humana e animal, fabricação de biodiesel e de outros produtos (BEZERRA et al., 2022).

Esta cultura foi introduzida no Brasil no final do século XIX, no estado de São Paulo e a partir de 1950, graças a pesquisas fitotécnicas voltadas para o melhoramento da soja, sua área cultivada expandiu de forma rápida (EMBRAPA, 2013). Atualmente é cultivada em quase todo território nacional, ocupando uma área de aproximadamente 43,4 milhões de hectares na safra 2021/2022, sendo o Brasil o maior produtor mundial (IBGE, 2023).

As doenças desempenham um fator crucial no manejo da soja, sendo um dos principais limitantes na obtenção de maiores rendimentos. No Brasil cerca de 46 doenças já foram relatadas, sendo causadas por fungos, bactérias, nematóides e vírus. Cada doença tem uma importância diferente, variando por região produtora e por safra, em função da variação nas condições climáticas. As doenças são responsáveis por perdas de 15-20%, mas em algumas condições de ambiente e manejo podem chegar a 100% (GODOY et al., 2020).

A ferrugem asiática da soja (FAS) causada pelo fungo basidiomiceto *Phakopsora pachyrhizi* (Pp) é a principal doença da soja no Brasil (GODOY et al., 2016; GODOY et al., 2020). Essa doença foi relatada pela primeira vez no Brasil em 2001 e atualmente, devido à facilidade de disseminação do fungo pelo vento, é encontrada em praticamente todas as regiões produtoras de soja do país (GODOY et al., 2016; GODOY et al., 2020). Os sintomas da FAS podem ser observados em qualquer estágio de desenvolvimento da planta. Estes surgem como minúsculos pontos mais escuros que o tecido sadio, variando de coloração esverdeada a cinza-esverdeada. As lesões tendem a apresentar formato angular, podendo atingir 2-5 mm de diâmetro. A coloração das lesões depende da idade e da interação entre o genótipo da planta e o isolado do patógeno. As folhas infectadas, com alta densidade de lesões, amarelecem e caem precocemente, comprometendo assim a formação e o enchimento das vagens, o peso final e a qualidade dos grãos (GODOY et al., 2016). Segundo GODOY et al. (2016), os custos do controle da FAS em 2016 foram estimados em cerca de 2,2 bilhões de dólares, com uma média de três aplicações de fungicidas por época de cultivo.

Diversas estratégias de manejo têm sido preconizadas para o manejo dessa doença, dentre elas a eliminação de plantas de soja voluntárias e a ausência de cultivo de soja na entressafra, através do vazio sanitário, com a duração de 60 a 90 dias; a realização das semeaduras no início

da época recomendada combinada com a utilização de cultivares de ciclo precoce; a utilização de fungicidas recomendados e registrados e a utilização de cultivares resistentes (GODOY et al., 2020).

O uso de cultivares com gene(s) de resistência (genes R) à ferrugem-asiática da soja é uma ferramenta importante para o manejo da doença, pois, além de serem menos sujeitas a perdas de produtividade, ajudam a reduzir a pressão de seleção para resistência do fungo aos fungicidas (GODOY et al, 2020). Entretanto, devido ao potencial adaptativo de *P. pachyrhizi*, quando a cultivar apresenta poucos genes R, a quebra da resistência ocorre rapidamente (ROSA, 2015). Desta forma, tem sido sugerido a piramidação dos genes de resistência em uma mesma cultivar objetivando uma maior vida útil das cultivares melhoradas (YAMANAKA et al., 2012).

Desde o aparecimento dessa doença no Brasil, empresas públicas e privadas buscam desenvolver cultivares de soja que sejam resistentes à ferrugem asiática. Desde o ano de 2009, a empresa Tropical Melhoramento Genético (TMG) tem estudado e desenvolvido tecnologias que, quando presente nas cultivares, sejam responsáveis por proporcionar resistência, como é o caso da Tecnologia Inox, a qual tem se destacado no manejo da doença na região sul do Brasil. A EMBRAPA em parceria com a Fundação Meridional, lançou no mercado uma cultivar chamada BRS539, a qual apresenta a tecnologia *Shield*®, conferindo moderada resistência contra a ferrugem da soja (EMBRAPA SOJA, 2018). Ambas as tecnologias são baseadas no uso de genes de resistência nativos. Recentemente, as empresas GDM e BASF lançaram novas cultivares, denominadaS BMX CromoTF IPRO (GDM) e SOYTECH 591 I2X (BASF), relatadas como tolerantes contra esta doença. Entretanto, cultivares que contêm um único gene de resistência, estão tendo sua resistência suplantada devido a enorme variabilidade genética do patógeno presente na natureza (KATO, 2017). Dessa forma, para obter variedades que apresentem uma resistência duradoura, é necessário realizar a combinação de diferentes genes (YAMANAKA et al., 2012).

Atualmente, sete loci (*Rpp1* a *Rpp7*) que contém genes que conferem a resistência da soja a *Phakopsora pachyrhizi* foram identificados e mapeados no genoma da soja (CHILDS et al., 2018; LI, 2012). Os genes nestes loci podem ser encontrados na forma de alelos dominantes, parcialmente dominantes ou recessivos. Nos genótipos considerados resistentes a resistência se manifesta pela ausência total de sintoma (fenótipo de imunidade) ou pela presença de lesões com coloração vermelho-amarronzada com reduzida esporulação (lesões RB, do inglês *Reddish-Brown*) (GODOY et. al, 2016; KATO, 2017; CHILDS et al., 2018; GODOY et al., 2020). Já nos genótipos considerados suscetíveis são observadas lesões com coloração

bronzada (lesões TAN) com abundante esporulação (GODOY et al., 2016; KATO, 2017; CHILDS et al., 2018; GODOY et al., 2020).

Diferente dos outros genes de resistência à *Phakopsora pachyrhizi*, o gene *Rpp6* ainda não foi completamente caracterizado. LI et al. (2012) estudaram a herança da resistência do acesso PI567102B ao isolado norte-americano Louisiana 04-1, e concluíram que a resistência deste PI é conferida por um único gene R dominante denominado *Rpp6*. Posteriormente, através do mapeamento genético utilizando outras duas populações segregantes, fenotipadas com os isolados norte-americanos MS06-1 ou LA04-, estes autores verificaram que este gene está localizado no cromossomo 18, numa posição diferente dos genes *Rpp1* e *Rpp4*, que haviam sido previamente mapeados neste mesmo cromossomo. As plantas resistentes de ambas as populações apresentaram o fenótipo de imunidade ou RB quando desafiadas com os isolados MS06-1 ou LA04-1.

Até o momento não foram identificados no Brasil, isolados capazes de suplantar a resistência da PI567102B (PAES & BROMMONSCHENKEL, resultados não publicados), demonstrando o potencial de utilização deste gene em programas de melhoramento visando a piramidação de genes de resistência à *Phakopsora pachyrhizi* em cultivares comerciais e obtenção de uma resistência mais duradoura. A piramidação é facilitada e acelerada pela utilização de marcadores proximamente ligados aos diferentes genes de resistência, pois permite o monitoramento da segregação de genes diferentes nas populações segregantes, sem a necessidade de se recorrer ao uso de múltiplos isolados com padrão de virulência conhecido (MUNDT, 2018; YAMANAKA, 2019).

Ainda não se conhece o mecanismo molecular associado com a resistência conferida pelo gene *Rpp6*. A maioria dos genes de resistência (genes R) clonados codificam proteínas imuno receptoras citoplasmáticas com domínios de ligação a nucleotídeos (NBS, *nucleotide binding domain*) e repetições ricas em aminoácidos do tipo leucina (LRR, *leucine-rich repeats*), sendo por isso denominadas proteínas NLR (JONES et al., 2016). As proteínas NLR são capazes de reconhecer direta ou indiretamente proteínas do patógeno importantes para o processo de patogênese (ditas proteínas efetoras) e sinalizar para a ativação de diversas respostas de defesa como a ativação da morte celular no sítio de infecção (resposta de hipersensibilidade ou “HR”), a produção de espécies reativas de oxigênio, o fortalecimento da parede celular, e a produção de enzimas hidrolíticas e compostos antimicrobianos, dentre outras (JONES et al., 2016; BURDETT et al., 2019; POK et al., 2022).

O fenótipo de resistência RB associado com a resistência conferida por *Rpp6* sugere o envolvimento de um mecanismo molecular associado com a indução de HR. KING et al. (2016) mapearam o gene *Rpp6* no intervalo GMS0440-GSM0427 (cerca de 207 kb) no cromossomo 18 da soja, que contém 16 genes candidatos. Entretanto, nenhum deles possui os domínios NBS e LRR típicos de proteínas codificadas por genes de resistência já clonados e associados com resposta de resistência baseadas em HR, indicando que a resistência conferida por *Rpp6* pode envolver um novo mecanismo de ação. Os genes candidatos no intervalo delimitado por KING et al. (2016) e que codificam proteínas envolvidas em sinalização e, ou, morte celular, são o Glyma.18g064400, que codifica uma proteína Myb, e o Glyma.18g066300, que codifica uma proteína com o domínio DCD (*Development and Cell Death*; TENHAKEN et al., 2005). Genes que codificam proteínas com domínio DCD apresentam um incremento de expressão durante o desenvolvimento das plantas e morte celular programada, sugerindo que este domínio está envolvido nas rotas de sinalização envolvidas nestes processos (TENHAKEN et al., 2005). Até o momento, não se comprovou que, de fato, que o Glyma.18g066300 seja o gene *Rpp6*.

Portanto, este trabalho teve por objetivos principais: 1) o mapeamento genético de alta resolução do gene *Rpp6* visando delimitar a localização do gene a um único gene candidato e, 2) desenvolver e validar um marcador derivado deste único gene para uso no piramidamento de genes *Rpp* e desenvolvimento de variedades de soja com resistência duradoura à FAS.

## 2. Revisão de Literatura

### 2.1. Cultura da soja no Brasil

A soja (*Glycine max* L.) é uma espécie da família das Fabaceae (leguminosas) originária do leste da Ásia, mais especificamente no nordeste da China, sendo conhecida desde 3000 anos A.C., e sua disseminação do Oriente para o Ocidente ocorreu através das navegações. É originada pelo cruzamento entre duas espécies de soja selvagem que foram domesticadas ainda na antiga China (EMBRAPA, 2013).

Embora os relatos indicarem a presença de soja na alimentação do Oriente há mais de cinco mil anos, o cultivo desse grão em países ocidentais ocorreu somente na segunda década do século vinte, por meio da exploração comercial do cultivo nos Estados Unidos (BONATO & BONATO, 1987; PRIOLLI et al., 2004; DALL'AGNOL et al., 2007). O primeiro relato dessa cultura no Brasil ocorreu no ano de 1882, no estado da Bahia. Em 1908, imigrantes japoneses introduziram a soja em São Paulo, porém por mais que nessa região a soja apresentasse melhor desenvolvimento que na Bahia, este ainda não foi satisfatório (SEDIYAMA et al., 2009). Dessa forma, foi no estado do Rio Grande do Sul em que a soja encontrou condições climáticas ideais para o seu desenvolvimento, visto que estas eram semelhantes às regiões de origem das cultivares trazidos para o Brasil (SEDIYAMA et al., 2009).

As décadas de 80 e 90 marcaram a expansão da cultura para as regiões tropicais do Brasil. No começo dos anos 70, apenas 2% da produção era derivada dessa região e ao final de 1990 essa marca superou os 40%. Diversos fatores são responsáveis por esse incremento na produção, dentre eles, merecem destaque: a boa topografia da região, incentivos fiscais do governo e, principalmente, investimentos em pesquisas fitotécnicas e a implantação de novos programas de melhoramento genético (DALL'AGNOL et al., 2002). O entendimento fitotécnico da cultura e as novas cultivares desenvolvidas, permitiram ao Brasil ser o único país do mundo capaz de produzir soja em grande escala em regiões tropicais (BEZERRA et al., 2022).

Dentre os grãos cultivados, a soja merece destaque em função da expansão das áreas cultiváveis e ao aumento da produção no país. Isso ocorre pelo fato de a cultura ser uma *commodity* padronizada e uniforme, podendo, portanto, ser produzida e negociada por produtores de diversos países, apresentando alta liquidez, demanda e rentabilidade (LAZZAROTTO & HIRAKURI, 2010). A CONAB, através do seu levantamento da safra 22/23, estimou que houve um incremento de 4,6% de área plantada em relação à safra anterior, totalizando cerca de 43,4 milhões de hectares destinados à produção da soja (CONAB, 2022).

Atualmente, os cinco maiores produtores de soja são o Brasil, Estados Unidos, Argentina, China e Índia (USDA, 2022). No ano de 2020, a produção de soja brasileira ultrapassou a americana e o Brasil tornou-se o maior produtor desse grão, atingindo uma produtividade média de 3.536 kg/ha e produção de aproximadamente 153,5 milhões de toneladas previstas para a safra 2022/23 (CONAB, 2022). No país, dentre os 15 estados produtores de soja, destaca-se o Mato Grosso, com uma produção de 41.490 milhões de toneladas, o Goiás com 17.290 milhões de toneladas e o Paraná com 12.104,1 milhões de toneladas (CONAB, 2022). Já o estado de Minas Gerais ocupa a sexta posição, com produção em torno de 7.590 milhões de toneladas (CONAB, 2022). A elevada produtividade brasileira associada com as diferentes formas de utilização deste grão, demonstra a grande importância e o valor econômico que a produção de soja tem no país e no mundo.

## **2.2. Doenças na cultura da soja**

O aumento da produtividade da cultura da soja está diretamente relacionado com a redução dos fatores limitantes. Dentre esses fatores, a ocorrência de doenças merece um destaque especial. Estima-se que estas são responsáveis por perda de 15-20% na produção, todavia em condições favoráveis algumas doenças podem causar até 100% de perdas (ALMEIDA et. al, 2005; EMBRAPA, 2013). No Brasil cerca de 46 doenças causadas por fungos, bactérias, nematoides e vírus já foram relatadas na cultura da soja. (GODOY et al. 2016).

A importância de cada doença é variável de acordo com as condições climáticas de cada safra e de cada região, também é dependente do estágio de desenvolvimento da cultura, das cultivares plantadas e do sistema de plantio utilizado. Entretanto, algumas doenças ocorrem de forma generalizada nas principais regiões de plantio. A ferrugem asiática, oídio, o mofo-branco, as manchas foliares, as podridões, o cancro da haste, a antracnose e as doenças causadas por nematoides são doenças frequentemente encontradas nas lavouras de soja. (HENNING, 2009; EMBRAPA, 2013). Dentre essas, a ferrugem asiática, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, é a principal doença da cultura, pode ser de rápido progresso podendo causar perdas de produção de até 90%. No Brasil, essa doença foi reportada pela primeira vez no ano de 2001 e atualmente está presente nos campos de produção de todo o país (GODOY et al., 2016).

## **2.3. Ferrugem asiática**

A ferrugem da soja foi relatada pela primeira vez no Japão, em 1902, onde o patógeno causador desta doença era chamado de *Uredo sojae* (GODOY et al., 2016). Até o começo da década de 90, acreditava-se que uma única espécie de fungo era responsável por causar essa

doença, então denominada *Phakopsora pachyrhizi*. Os relatos iniciais dessa doença no continente americano aconteceram ao final dos anos 70, seguido de Porto Rico, em 1976 e no Brasil, em 2001. Ainda que, inicialmente, o patógeno fosse descrito como *P. pachyrhizi*, seu comportamento era muito distinto e menos agressivo do que se observava nos países asiáticos, o que levou diversos pesquisadores a estudarem os isolados presentes nesta época e concluírem a partir da análise da morfologia dos estágios anamorfos e teleomorfos das populações, que se tratava da espécie *Phakopsora meibomiae* (GODOY et al., 2016).

As duas espécies fúngicas causadoras da ferrugem da soja, *P. pachyrhizi* e *P. meibomiae*, possuem uma vasta gama de hospedeiros, o que as tornam diferente dos outros patógenos causadores de ferrugens (BONDE et al., 2006). Segundo Goellner et al. (2010), no campo, *P. pachyrhizi* consegue infectar 31 espécies em 17 gêneros diferentes de plantas leguminosas e em condições laboratoriais, é capaz de infectar mais de 60 espécies de outros gêneros. Em compensação, *P. meibomiae* infecta 42 espécies de 19 gêneros de leguminosas, em condições de infecção natural somadas a outras 18 espécies que podem ser infectadas quando é feita a inoculação artificial (SINCLAIR & HARTMAN, 1999).

A introdução de *P. pachyrhizi* no Brasil ocorreu em 2001, ano em que aconteceu os primeiros relatos do patógeno no oeste e norte do Paraná e, posteriormente, a doença se espalhou por todo o território brasileiro (HENNING, 2009), causando perdas de produção que chegaram a um total de 100% em áreas não protegidas (ANDRADE & ANDRADE., 2002). Atualmente, devido a elevada capacidade de causar danos nas lavouras e o alto valor investido no controle dessa doença, a ferrugem asiática, causada por *Phakopsora pachyrhizi* que predomina em todas as regiões produtoras, é considerada a principal doença da soja no Brasil (GOELLNER et al., 2010).

A ferrugem asiática da soja é uma doença policíclica, isto é, o fungo causador da doença é capaz de realizar múltiplos ciclos de infecção durante um único ciclo do hospedeiro (GODOY & LAZZAROTTODA, 2005), garantindo uma produção massiva e a disseminação rápida dos uredósporos dentro da mesma lavoura de cultivo da soja e áreas adjacentes às lavouras pelo vento (BROWN & HOVMOLLER, 2002). Por *P. pachyrhizi* ser um fungo biotrófico, que necessita da presença de tecidos vivos de suas plantas hospedeiras para extrair os nutrientes necessários para sobreviver e se multiplicar, na ausência de plantas de soja infectadas, a introdução do patógeno em lavouras saudáveis, pode ocorrer a partir de hospedeiros alternativos e/ou plantas voluntárias (BROMFIELD, 1984). A multiplicação e a permanência dos

uredósporos nestas plantas também favorecem a sobrevivência do fungo no período entressafra, antecipando o surgimento da doença na safra seguinte (YORINORI et al., 2004).

#### **2.4. Sintomatologia da Ferrugem asiática da soja**

Os sintomas da ferrugem se iniciam no terço inferior da planta de soja, com pequenas pontuações, cerca de 1 mm de diâmetro, mais escuras do que o tecido sadio com uma coloração esverdeada a cinza-esverdeada, com correspondente uredínias na face abaxial da folha, podendo, raramente, aparecer na face adaxial. Em cultivares suscetíveis, as células infectadas pelo patógeno morrem somente após a ocorrência de abrangente esporulação. Conforme ocorre a morte dos tecidos infectados, as pontuações aumentam de tamanho, atingindo cerca de 1 a 4 mm de diâmetro e adquirem coloração castanho-avermelhada. Com o desenvolvimento da doença, nos locais das pontuações, observam-se minúsculas protuberâncias, correspondente às urédias. Posteriormente, as protuberâncias adquirem coloração castanha abrindo um poro em sua superfície, onde são liberados os uredósporos, que inicialmente possuem coloração transparente e depois bege (YORINORI et al., 2004; EMBRAPA, 2013; GODOY et al., 2016). Em consequência do progresso da esporulação e queda dos esporos, novas lesões são formadas em torno das lesões primárias.

As lesões podem adquirir coloração castanho clara ou bronzeada, denominadas lesões do tipo TAN, ou marrom-avermelhadas também conhecidas como lesões do tipo RB. As lesões TAN, não geram necrose extensiva, mas apresentam grande número de urédias que produzem um grande número de uredósporos (GODOY et al., 2016). Já lesões do tipo RB, possuem extensa necrose com poucas urédias produzindo um pequeno número de esporos, indicando resistência moderada à doença (GODOY et al., 2016). Com o aumento do número de lesões nas folhas, essas tendem a amarelecer e cair precocemente. Quanto mais cedo ocorrer a ferrugem na lavoura, maior será a porcentagem de desfolha e, conseqüentemente, menor será a taxa fotossintética, impactando diretamente na formação dos grãos e enchimento de vagens, acarretando uma menor produtividade da lavoura (YORINORI et al., 2004; RUPE & SCONYERS, 2008; EMBRAPA, 2013).

Em plantas resistentes pode também ser observado o fenótipo de imunidade (reação imune), que é caracterizado pela ausência completa de sintomas e sinais do patógeno ou a presença de pequenas pontuações necróticas, denominadas de flecks (reação imuno fleck, IF) (BURDON, 1987).

## 2.5. Formas de controle

Para um controle eficiente que seja capaz de mitigar as perdas no rendimento final da lavoura de soja, é necessário combinar diferentes medidas de manejo, como por exemplo, a eliminação de plantas de soja voluntárias e a ausência de cultivo de soja na entressafra, por meio do vazio sanitário; a utilização de cultivares de ciclo precoce e semeaduras no início da época recomendada, evitando alta carga de esporos do patógeno; o monitoramento da lavoura; a utilização de fungicidas de forma preventiva e/ou no aparecimento de sintomas da doença; e a utilização de cultivares resistentes (GRIGOLLI, 2015; GODOY et al., 2016).

O uso de cultivares com resistência à ferrugem-asiática da soja é uma ferramenta importante para o manejo da doença, pois além de sofrerem menores perdas de produtividade, também ajudam a reduzir a pressão de seleção para resistência do fungo aos fungicidas (GODOY et al, 2020). Todavia, devido ao potencial adaptativo de *P. pachyrhizi*, a "quebra" da resistência quando a cultivar apresenta poucos genes R pode ocorrer rapidamente (ROSA, 2015). Dessa forma, tem sido sugerido a piramidação dos genes de resistência em uma mesma cultivar objetivando uma maior vida útil das cultivares melhoradas (YAMANAKA et al., 2012).

Foram identificados e mapeados no genoma da soja sete loci (*Rpp1* a *Rpp7*) que contém genes que conferem a resistência da soja a *Phakopsora pachyrhizi* (LI, 2012; CHILDS et al., 2018). Os genes nestes loci podem ser encontrados na forma de alelos dominantes, parcialmente dominantes ou recessivos, sendo, até o momento, já descritos onze alelos: *Rpp1* (HYTEN et al. 2007), *Rpp2* (SILVA et al. 2008; YU et al. 2015), *Rpp3* (HYTEN et al. 2009), *Rpp4* (SILVA et al. 2008), *Rpp5* (BATISTA, 2008), *Rpp6* (LI et al. 2012), *Rpp7* (CHILDS et al. 2017), *Rpp1-b* (KIM et al. 2012), *Rpp?* (Hyuuga) (MONTEROS et al. 2006), *rpp2* e *rpp5* (GARCIA et al. 2008).

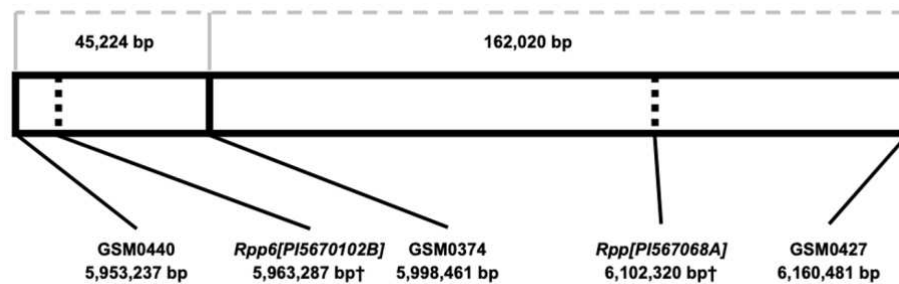
## 2.6. O gene *Rpp6*

O gene *Rpp6* foi descrito por LI et al. (2012) na PI567102B que tinha sido previamente identificada como resistente à ferrugem asiática da soja no Paraguai e a isolados de *P. pachyrhizi* de diferentes estados norte-americanos (Alabama, Flórida, Geórgia, Louisiana, Mississippi, Carolina do Sul e Texas). Estes autores estudaram a herança da resistência do acesso PI567102B ao isolado Louisiana 04-1 e concluíram que a resistência deste PI era conferida por um único gene R dominante, que denominaram *Rpp6*. Por meio de mapeamento em duas populações independentes, que foram fenotipadas com os isolados MS06-1 ou LA04-, LI et al. (2012) verificaram que este gene está localizado no cromossomo 18 entre os marcadores microsatélite Satt324 e Satt394, num intervalo cromossômico superior a 4 Mpb e em

localização diferente dos loci *Rpp1* e *Rpp4*, que foram previamente mapeados neste mesmo cromossomo. As plantas resistentes de ambas as populações apresentaram o fenótipo de imunidade ou RB quando desafiadas com os isolados MS06-1 ou LA04-1.

HARRIS et al. (2015) verificaram que a resistência do acesso PI 567068A é também conferida por um gene dominante, que pode ser um novo gene de um loco ligado ao loco *Rpp6* do acesso PI 567102B ou um outro alelo do loco *Rpp6*. Os resultados das análises de agrupamentos segregantes (*Bulked segregant analysis*, BSA) indicaram que a resistência da PI 567068A estava localizada em um intervalo de 5cM que contém o loco *Rpp6*. O acesso PI 567068A foi suscetível (lesão TAN) aos isolados ZM01-1, AU79-1, SA01-1 e TW72-1, para os quais PI 567102B foi resistente (lesão RB). Além disso, esta PI não apresentou os mesmos alelos de haplótipos definidos por HARRIS et al. (2015) para os locos *Rpp1* e *Rpp4*, que também estão localizados no cromossomo 18.

KING et al. (2016) efetuaram o mapeamento de alta resolução do loco *Rpp6* dos acessos PI 567102B e PI 567068A para verificar se o PI 567068A contém um novo alelo do loco *Rpp6* ou um alelo de um novo loco fortemente ligado a *Rpp6*. Por meio da análise de ligação gênica utilizando marcadores SNP (*Single nucleotide polymorphism*), eles mapearam o *Rpp6* da PI 567102B no intervalo 5,953,237 a 5,998,461pb (LOD score de 58.3) e a resistência do PI 567068A no intervalo 5,998,461 a 6,160,481 pb (LOD score of 4.4) do cromossomo 18 (genoma de referência Wm82. versão a.1) (Figura 1). Os picos de significância do mapeamento dos genes foram localizados 139,033 pb um do outro e os resultados de análise de haplótipos demonstrou que PI567102B e PI567068A compartilham o mesmo haplótipo no loco *Rpp6*, indicando que esses acessos possuem alelos diferentes do mesmo loco, que foram designados *Rpp6/Rpp [PI567068A]*. Entretanto, os autores concluíram que estudos adicionais eram necessários para determinar se *Rpp [PI567068A]* é, de fato, alélico de *Rpp6* ou um novo gene de resistência muito próximo de *Rpp6*.

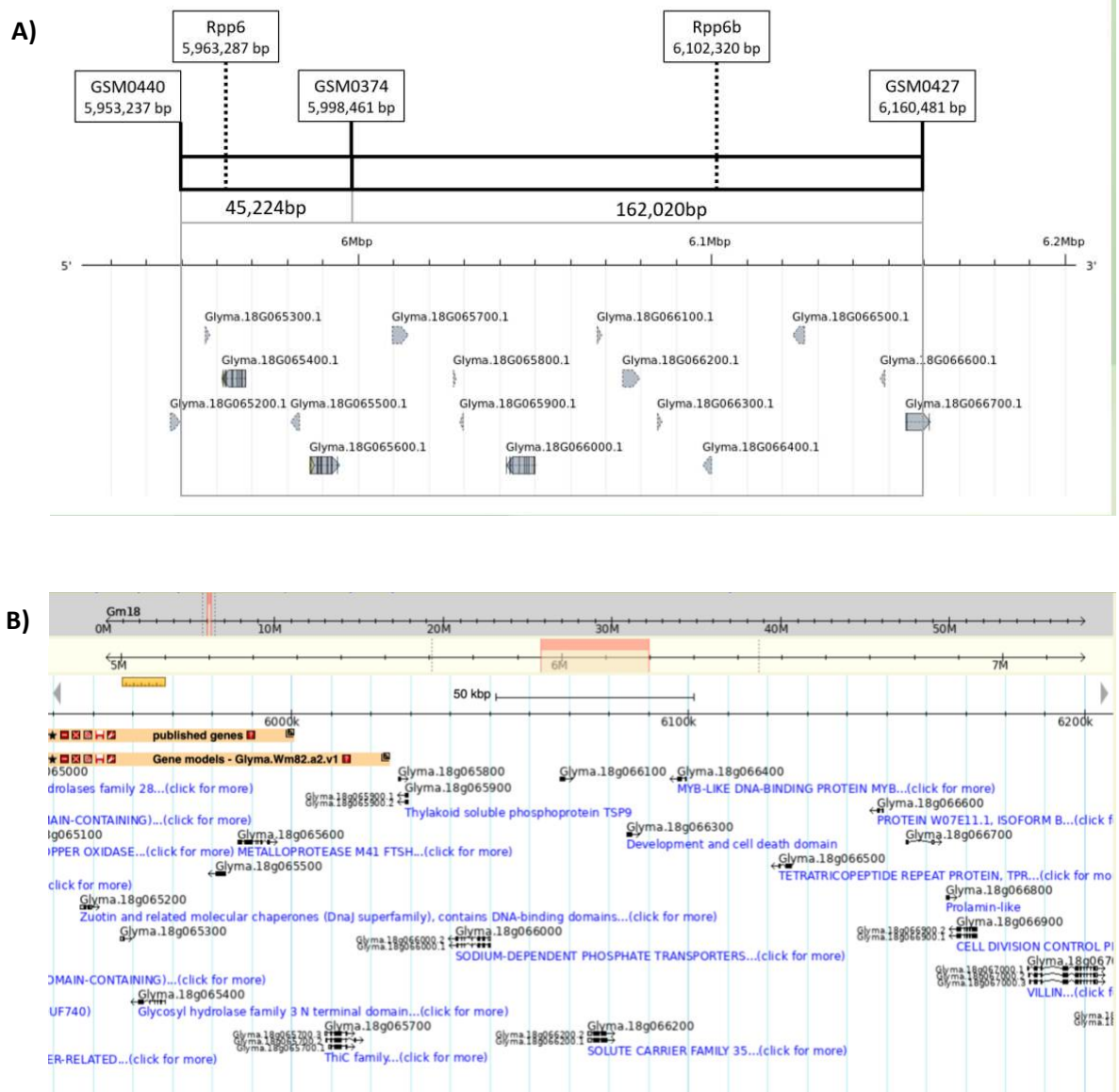


**Figura 1** - Intervalo físico onde *Rpp6* e *Rpp[PI567068A]* mapeiam no Cromossomo 18 da soja, com base na versão Wm82.a1 do genoma da cultivar Williams 82. As posições são estimadas com base nas análises de ligação executadas por KING et al. (2016). *Rpp6* and *Rpp[PI567068A]* estão representados por linhas pontilhadas. As linhas verticais em cinza representam os intervalos que contêm *Rpp6* (45,224 bp) e *Rpp[PI567068A]* (162,020 bp), conforme localização dos marcadores SNP utilizados. O intervalo que contém *Rpp6* e *Rpp [PI567068A]*, destacado pela linha cinza pontilhada é 139,033 pb (Adaptado de KING et al., 2016).

Os genes que conferem resistência a doenças em plantas normalmente codificam proteínas que são capazes de reconhecer direta ou indiretamente proteínas do patógeno importantes para o processo de patogênese (ditas proteínas efetoras) e sinalizar para a ativação de diversas respostas de defesa como a ativação da morte celular no sítio de infecção (resposta de hipersensibilidade ou “HR”), a produção de espécies reativas de oxigênio, o fortalecimento da parede celular, e a produção de enzimas hidrolíticas e compostos antimicrobianos, dentre outras (JONES et al., 2016; BURDETT et al., 2019; POK et al., 2022). Esse conjunto de respostas, também conhecido por ETI (*Effector-Triggered Immunity*) (JONES et al., 2016) restringem o desenvolvimento do patógeno no sítio de infecção, evitando a colonização dos tecidos e reprodução, o que impede ou reduz o progresso da doença durante o desenvolvimento da cultura no campo. Congruente com essas funções de reconhecimento e ativação de respostas de defesa, a maioria dos genes de resistência (genes R) clonados codificam proteínas imuno receptoras citoplasmáticas com domínios de ligação a nucleotídeos (NBS, *nucleotide binding domain*) e repetições ricas em aminoácidos do tipo leucina (LRR, *leucine-rich repeats*), sendo por isso denominadas proteínas NLR (JONES et al., 2016). As proteínas NLR podem ser subdivididas em duas grandes famílias, dependendo da presença do domínio TIR (*Toll interleukin Receptor*) ou CC (*Coiled-Coil*) na região amino-terminal (JONES et al., 2016). As proteínas TIR-NLR ou CC-NLR ativam diferentes vias de transdução de sinais envolvidas nas respostas de defesa (JONES et al., 2016; BURDETT et al., 2019; POK et al., 2022).

O fenótipo de resistência RB associado com a resistência conferida por *Rpp6* parece ser resultante de um mecanismo de morte celular (HR, *hypersensitive response*) (Figura 3). O

intervalo GMS0440-GSM0427, de 207 kb, onde *Rpp6* e seu alelo putativo *Rpp[PI567068A]* foram mapeados por KING et al. (2016) contém 16 genes candidatos (Figura 2), entretanto nenhum deles possui os domínios NBS e LRR típicos das proteínas NLR, normalmente associadas com a indução de uma resposta de resistência baseadas em HR, indicando que a resistência conferida por *Rpp6* pode envolver um novo mecanismo de ação. Os genes candidatos no intervalo que codificam proteínas envolvidas em sinalização e, ou morte celular, são o Glyma.18g064400, que codifica uma proteína Myb, e o Glyma.18g066300 que codifica uma proteína com o domínio DCD (*Development and Cell Death*; TENHAKEN et al., 2005). Genes que codificam proteínas com domínio DCD apresentam um incremento de expressão durante o desenvolvimento das plantas e morte celular programada, sugerindo que este domínio está envolvido nas rotas de sinalização envolvidas nestes processos (TENHAKEN et al., 2005). Já as proteínas com domínio Myb, são fatores de transcrição que desempenham uma função crítica na biossíntese de compostos secundários e resposta de plantas a estresses abióticos como seca, salinidade e frio (WANG et al., 2021). Estudos adicionais de mapeamento genético e análise funcional são necessários para confirmar que *Rpp6* corresponde a um desses genes descritos por KING et al. (2016).



**Figura 2** - Intervalo físico do cromossomo 18 que contém *Rpp6* e *Rpp* [*PI567068A*], compreendido pelos marcadores GSM0440(CAPS\_6042557) e GSM0427 (dCAPS\_6160480), com base no estudo de KING et al. (2016) (A), e anotação de genes no intervalo físico, descrita no portal Phytozome (B).

## 2.7. Mapeamento de precisão

Diferentes tipos marcadores de DNA são utilizados para identificar fatores genéticos que controlam características de interesse e para introduzi-los de forma mais eficiente em cultivares elite. Mudanças em uma única base nucleotídica, chamadas polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), são a fonte mais abundante de variação em genomas de plantas; os SNPs incluem também pequenas inserções e deleções (*indels*) de bases (GUPTA et al., 2001). Em comparação com repetições de sequência simples (SSRs), ou microssatélites, os SNPs são mais adequados aos ensaios de genotipagem automatizados e de alto rendimento, possibilitando uma

genotipagem mais rápida e econômica do que com SSRs (SCHLÖTTERER, 2004). As tecnologias de detecção de SNP evoluíram de processos caros, demorados e trabalhosos para alguns dos métodos mais altamente automatizados, eficientes e relativamente baratos de detecção de marcadores de DNA. Questões como alta repetibilidade e robustez, e facilidade de padronização dos ensaios trouxeram grandes vantagens para a implementação de diferentes testes com diferentes plataformas e em diferentes laboratórios (SCHLÖTTERER, 2004).

O melhoramento de precisão é uma abordagem do melhoramento genético na qual uma característica fenotípica de interesse é selecionada por meio da identificação de um marcador funcional (MF) que é derivado sítios polimórficos dentro de genes causalmente envolvidos na variação de características fenotípicas (SALGOTRA & STEWART, 2020). MFs são 100% preditivos do fenótipo correspondente, reduzindo as chances de perda e falsa seleção do gene de resistência devido a eventos de recombinação entre o marcador e o gene de interesse (ANDERSEN & LÜBBERSTEDT, 2003).

O desenvolvimento de MFs requer primeiro a identificação de um gene de interesse que afete a característica fenotípica, a determinação de sua sequência de nucleotídeos e caracterização funcional. A identificação do gene pode ser alcançada por uma série de abordagens, dentre elas a clonagem baseada em mapeamento genético, que é baseada na identificação de marcadores SNPs proximamente ligados ou no gene de interesse, por meio do mapeamento genético de alta resolução. Posteriormente, os genes candidatos no intervalo são caracterizados funcionalmente, para determinar o gene responsável pela característica de interesse (MUNDT, 2018). Normalmente essa caracterização funcional é feita pela transformação genética de uma cultivar que não possui a característica de interesse para se observar o ganho de função (manifestação fenotípica da característica de interesse mapeada).

Os MFs facilitam o processo de transferência simultânea de vários genes de interesse em uma única cultivar, como no caso de piramidamento de genes de resistência (MUNDT, 2018). Com exceção do gene *Rpp1*, todos os demais genes *Rpp* conferem o mesmo fenótipo RB; além disso o fenótipo de imunidade é dominante sobre o fenótipo RB. Portanto a sua seleção conjunto de diferentes genes *Rpp* por métodos convencionais, requer a disponibilidade de isolados (raças) capazes de diferenciar os diferentes genes e sua inoculação sequencial nas populações segregantes, tornando a identificação de uma única planta contendo mais de um gene R muito complexa e laboriosa. Comparativamente a marcadores moleculares ligados ao gene de interesse, a utilização de MFs também reduz as chances de perda e falsa seleção do gene de

resistência, e reduz a possibilidade de arraste de alelos desfavoráveis ligado ao loco selecionado (*linkage-drag*) (APPLEBY et al., 2009).

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Desenvolvimento das populações segregantes

Para obtenção da população segregante para estudo da herança da resistência ao isolado PPUFV02 de *P. pachyrhizi*, que representa o padrão de virulência encontrado nas principais regiões produtoras de soja do Brasil, foi realizado o cruzamento entre o genitor resistente PI567102B e o genitor suscetível “Conquista”, obtendo as populações F2 segregantes utilizadas no estudo. Duas populações F2 GMX33.005 (98 plantas) e GMX35.009 (100 plantas) foram utilizadas nos estudos de cossegregação, cada uma derivada de uma única planta híbrida.

Para confirmação dos resultados dos estudos de cossegregação também foram utilizadas três populações F<sub>2:3</sub> fornecidas pela empresa TMG (Tropical e Melhoramento Genético S/A). No desenvolvimento dessas populações foi utilizada como genitor resistente a linhagem pré-melhorada KCB19-1008, que possui o gene *Rpp6* derivado da PI476905A. Como reportado por KING et al. (2016), essa PI possui o mesmo haplótipo da PI 567102B na região que contém *Rpp6*. As populações TMGB20-2-13330-1 e TMGB20-213330-2 são derivadas do cruzamento TMG7058 x KCB19-1008 e a população TMGB20-0-13126 é derivada do cruzamento de uma linhagem que possui os genes *Rpp4* e *Rpp5* com KCB19-1008.

#### 3.2. Herança da resistência da PI567102B ao isolado monopustular PPUFV02

Para determinar a herança da resistência do acesso PI567102B ao isolado PPUFV02, as plantas F2 foram inoculadas no estágio V2-V3. Os uredósporos do isolado PPUFV02 foram previamente multiplicados em plantas da cultivar suscetível “Conquista”, desidratados e armazenados em um ultrafreezer -80°C. Para execução da inoculação, os uredósporos foram submetidos a um procedimento de “quebra de dormência” através de um choque térmico de 40°C por 10 minutos em banho-maria, seguido por uma reidratação em câmara úmida por 24 horas. A inoculação foi realizada com o auxílio de um atomizador de ar direto e utilizando uma suspensão de esporos e água destilada acrescida de Tween 20 (0,01%) e ajustada para  $1,0 \times 10^5$  uredósporos/mL. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em uma câmara de nevoeiro, a temperatura ambiente e no escuro, durante 24 horas, e, posteriormente, realocadas para a casa de vegetação onde permaneceram até a colheita das sementes. Além da população segregante, foram inoculadas plantas dos genitores, Cultivar “Conquista” e acesso PI567102B, os quais serviram como controle suscetível e controle resistente da inoculação, respectivamente.

As avaliações foram realizadas onze e quatorze dias após a inoculação (dpi), classificando as plantas qualitativamente de acordo com o tipo de lesões (fenótipo) apresentado, de acordo

com a metodologia descrita por Bromfield (1984). As plantas que apresentarem lesões com coloração castanho-clara e com pouca necrose foram classificadas como “TAN”, plantas que apresentaram lesões com coloração castanho-avermelhada e com necrose extensa foram classificadas como RB (“*redish-brown*”) e as plantas que não apresentaram lesões foram classificadas como imunes (“I”). As proporções fenotípicas, resistência/suscetibilidade, observadas nas populações foram submetidas a um teste de aderência ao modelo de segregação monogênica dominante ou controlados por dois ou três genes independentes pelo método de qui-quadrado ( $\chi^2$ ).

### 3.3. Extração de DNA

A extração do DNA de folíolos dos genitores e das plantas das populações segregantes foi realizada empregando-se o protocolo de Doyle & Doyle (1987) adaptado pelo Laboratório de Genômica e Genética de interação Planta-Patógeno (LGGIPP). Para isso, o tecido foliar de cada planta, aproximadamente 100 mg, foi coletado separadamente em microtubos de 2,0 mL, que foram mantidos em gelo até o início da extração. Em cada microtubo foram adicionadas três esferas de aço inoxidável e, com auxílio do equipamento TissueLyser (QIAGEN), o material foi então macerado. Ao tecido macerado adicionou-se 1,0mL de tampão de extração (2% (v/v) (p v -1) CTAB, 100mM Tris-HCl (pH 8,0), 20mM EDTA (pH 8,0), 1,4 M NaCl, 2% (p v -1) PVP 40) pré-aquecido a 65°C, seguido da homogeneização com uso de vortex e incubação a 65°C por dez minutos, efetuando-se a inversão dos tubos a cada cinco minutos. Após deixar cinco minutos na temperatura ambiente adicionou-se 700µL de CIA (clorofórmio: álcool isoamílico, na proporção 24:1) gelado a cada tubo que foram invertidos várias vezes até se observar a formação de uma emulsão. A seguir, os microtubos foram centrifugados por cinco minutos a 13.000 rpm. A fase aquosa foi transferida para um novo microtubo ao qual se acrescentou 480µL de isopropanol gelado e 65µL de CTAB 10% (m/v). Os tubos foram invertidos algumas vezes e a seguir incubados -20°C por trinta minutos para precipitação do DNA. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por sete minutos. O sobrenadante foi descartado e os pellets lavados com etanol 70%. Após a lavagem, os microtubos foram posicionados invertidos sobre uma folha de papel toalha para secar e depois o DNA de cada microtubo foi ressuspensionado em 50µL de TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) com RNase (50µg/mL) com a 37°C por uma hora. A concentração, a quantidade e qualidade do DNA extraído foi verificada com o uso do NanoDrop 1000 Spectrophotometer. O DNA foi diluído para a concentração final de 25ng/µL e armazenado em congelador a -20°C.

### **3.4. Sequenciamento dos genomas da PI567102B e "Conquista", identificação de polimorfismos genéticos (SNP) e desenvolvimento de marcadores CAPS e dCAPS para os estudos de cossegregação.**

Após a extração, as amostras de DNA foram enviadas para a preparação de bibliotecas e sequenciamento na plataforma DNBseq (BGI), leituras (reads) curtas de 100 pb, cobertura 50X. As sequências recebidas foram visualizadas individualmente no FastQC (ANDREWS et al., 2010), para uma inspeção dos resultados das corridas de sequenciamento. Quando necessário, a ferramenta Trimmomatic foi utilizada, visando mascarar bases com valores baixos de QV, remover *reads* curtas ou de qualidade geral baixa, remoção de bases em regiões finais 5' e 3' com baixo QV e de sequências de adaptadores. As sequências foram alinhadas no genoma de referência da cultivar William 82 (SCHMUTZ et al., 2010), utilizando os algoritmos BWA (LI & DURBIN, 2010). Os arquivos de alinhamento foram indexados, convertidos para o formato BAM e visualizados no IGV (ROBINSON et al., 2011). As mudanças em genes localizadas no intervalo genômico-alvo do cromossomo 18 foram identificadas, e as sequências contendo o SNPs localizados em genes (cerca de 500pb, 250pb de cada lado do SNP), que flanqueiam ou localizados dentro do intervalo-alvo, foram utilizadas para desenhar pares de oligonucleotídeos para os ensaios CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphism*, KONIECZNY & AUSUBEL, 1993) e dCAPS (*derived Cleaved Amplified Polymorphism*, NEFF et al., 1988), com o auxílio dos *softwares* dCAPS Finder 2.0 (<http://helix.wustl.edu/dcaps/>) e Primer3 v.4.1.0 (<https://primer3.ut.ee/>).

### **3.5. Genotipagem com marcadores moleculares**

Foram desenvolvidos 15 marcadores moleculares (Tabela 1). Estes marcadores foram inicialmente avaliados para confirmar a existência de polimorfismo entre os genitores resistentes e suscetíveis, o que permitiu a sua posterior utilização na caracterização das populações segregantes.

**Tabela 1:** Sequência *forward* e *reverse* dos 15 marcadores CAPS e dCAPS denhados com base em polimorfismos genéticos detectados na região onde o gene *Rpp6* foi mapeado.

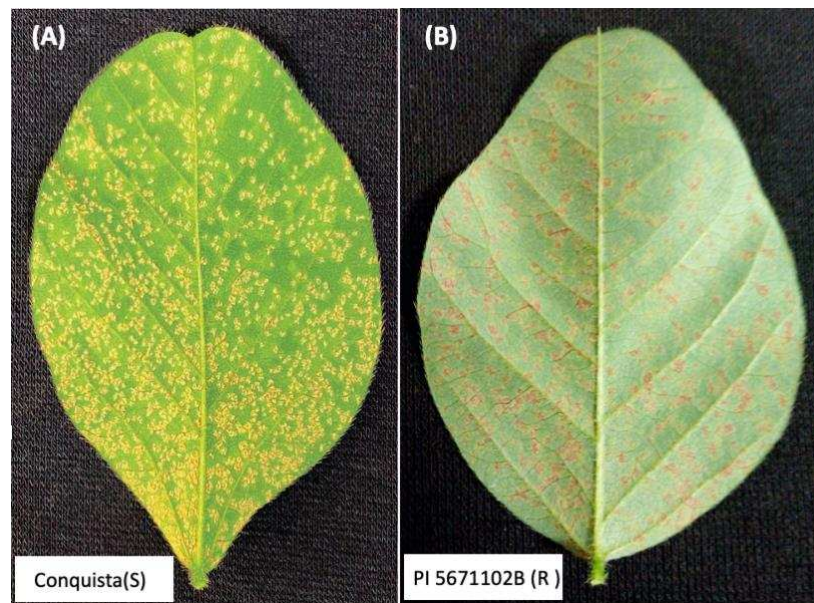
Marcador	Sequência Forward	Sequência Reverse	Enzima de Restrição
CAPS_18G066300	AGAATGTCAAGCAAAACAACCTTT	TGAGGGATTTCATTGTTAACACTA	EcoRI
dCAPS_18G066300	TGTTAACATGCAACACTGAAATATTGT	ATGTACATTTTCCCCTGCTAGAA	RsaI
dCAPS_18G066300	TCATTACCTGCTTCCTTTAGCATTTCCTCCG	TGCTTGAAGCTCCTTECTTTTCTA	HpaII
dCAPS_18G066300	TCATTACCTGCTTTTTCAGCATTTCCTCCG	ITCACCCCTTCACTATTgCTTITA	HhaI
dCAPS_18G66300PT	GTTGAAGAAGCTGCCGGCTTTCAAATAATA	TGGTATGCATATTTGAGGATTACA	RsaI
CAPS_18G66400	TGTGATGTGAGTTTTTGTTTAG	TCTCCAAGACTACATAAAAGCTT	HinfI
dCAPS_18G66400	TTGATAGGAGCATGAGGAGTAGTA	CAAGGAGAATAATGCCAATAATGTTGT	RsaI
dCAPS_18G066500	CCATCGAGTAAACCGTGAAATTC	GATTATTCGGCGAACATCGAACGGAAATC	TaqI
dCAPS_18G066500	CACTGACGCTTTTTGATTATC	CTTCTTCGTCAAACACGCGAATC	HhaI
CAPS_18G066600	GGAATTGAAAGGCTAAAAGATCGA	AATTCGTTGATTATAAACACGCCA	DdeI
dCAPS_6038535	GTTCCAACCAAGGTTTTCCCAAAGACACCTTTTGGC	AGAACCTAAGTCCCTCAATTGATC	HhaI
CAPS_6042557	AAGTCTTAGAATGTGAGGCCAATAC	CCCAAAATTTAAGTGAGCCTATCC	NdeI
dCAPS_6160481	TGGCATATTTTACAAGAAGT	CACTAATTTGTGGCACTATGACATTTTAAAGGTA	RsaI
dCAPS_6160481	AAGAGTCTTTTAAATCAGTGTCT	CACTAATTTGTGGCACTATGACATTTTAAAGGTA	RsaI
dCAPS_6020398	ACCCTAAATTTACTCCTAACCTAAGCTCTGT	GAAGAGGATAAGTCAGAGATGTGC	RsaI

A amplificação das regiões contendo os marcadores identificados foi feita através de PCR, utilizando-se termocicladores Veriti com 96 poços nas seguintes condições de termociclagem: 95°C por 15 minutos, seguidos de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 30 segundos na temperatura de anelamento do par de oligonucleotídeos, 72°C por 40 segundos e uma etapa final de 72°C por 5 minutos. Para as reações foi utilizado 4µL de DNA (100ng), 1µL de Tampão de PCR (HOT FIREPol 10x Buffer B2), 0,8 µL de dNTP (2,5µM), 0,8µL de MgCl<sub>2</sub> (25µM), 0,6µL de do par de oligonucleotídeos (10,0µM) e 0,1µL de HOT FIREPol DNA Polymerase (5U) (SOLIS) e completando-se o volume de reação para 10µL. Após a amplificação, os produtos da amplificação foram digeridos com a enzima de restrição adequada (Tabela 1), adicionando-se a cada poço 10µL de mix contendo 2µL de tampão de digestão 10X, 0,3µL da enzima de digestão e 7,7µL de água destilada. O tampão de digestão utilizado e temperatura de digestão utilizadas foram as recomendadas pelo fabricante da enzima. Após a digestão por 12-16 horas (overnight) os produtos de digestão foram resolvidos no sistema de eletroforese capilar QIAxcel Advanced System. As plantas homocigotas para o alelo resistente (PI 567102B) receberam a nota 1, as homocigotas para o alelo suscetível ("Conquista") nota 3 e as heterocigotas a nota 2. Plantas com eventos de recombinação dentro do intervalo flanqueado pelos marcadores CAPS\_6042557 e dCAPS\_6160480 foram selecionadas e autofecundadas para obtenção de famílias F<sub>2:3</sub>. No mínimo 20 plantas de cada família foram avaliadas quanto à resistência ao isolado PPUFV02 e genotipadas com os marcadores moleculares apropriados para a confirmar a localização do gene de resistência no intervalo genômico onde *Rpp6* foi mapeado.

## 4. Resultados

### 4.1. Reação fenotípica do PI57102B e Conquista ao isolado PPUFV02

Todas as plantas do genitor resistente PI567102B apresentaram reações do tipo RB (*reddish brown*), quando inoculadas com o isolado PPUFV02 de *Phakopsora pachyrhizi*. Essa reação foi caracterizada por lesões necróticas com pouca ou nenhuma esporulação (Figura 3B). Já as plantas da cultivar Conquista foram todas suscetíveis, apresentando lesões bronzeadas do tipo TAN, com intensa esporulação (Figura 3A).



**Figura 3** - Sintomas observados em Conquista e no acesso PI 567102B aos quinze dias após a inoculação com  $2 \times 10^4$  uredósporos do isolado monopustular PPUFV02 de *Phakopsora pachyrhizi*. (A) - Conquista, lesões tipo TAN com intensa esporulação e (B) - PI 567102B, lesões RB com pouca ou nenhuma esporulação.

### 4.2. Herança da resistência da PI567102B ao isolado PPUFV02

Nas populações segregantes GMX 33.005, GMX 35.009, TMGB20- 2-13330 e TMGB20-0-13126, foram verificados dois tipos de reações ao isolado PPUFV02: lesões RB, semelhantes às apresentadas nos genitores resistentes, e lesões TAN, que são semelhantes à apresentada pelo genitor suscetível. Dentro da população segregante, foi possível diferenciar também reações RB que apresentavam menor (denominada RB) ou maior esporulação (denominada RB+), dependendo do número de dias após a inoculação que a avaliação fenotípica era efetuada, sendo difícil, às vezes, diferenciar a lesão RB+ de uma lesão TAN observada no controle suscetível na mesma época de avaliação. Por essa razão, padronizou-se a avaliação final aos 14-15 dias após a inoculação, que foi o momento onde a diferenciação de RB, RB+ e TAN era mais clara.

Para efeitos da análise de segregação da resistência, as plantas com fenótipo RB e RB+ foram consideradas resistentes e as plantas com fenótipo TAN, suscetíveis.

As proporções fenotípicas observadas para as populações GMX 33.005 e GMX 35.009 apresentaram aderência às proporções esperadas para a razão 3:1, indicativa do controle genético por um único gene dominante (Tabela 1). Esse controle genético é também corroborado pela análise conjunto dos dados fenotípicos das duas populações (Tabela 1).

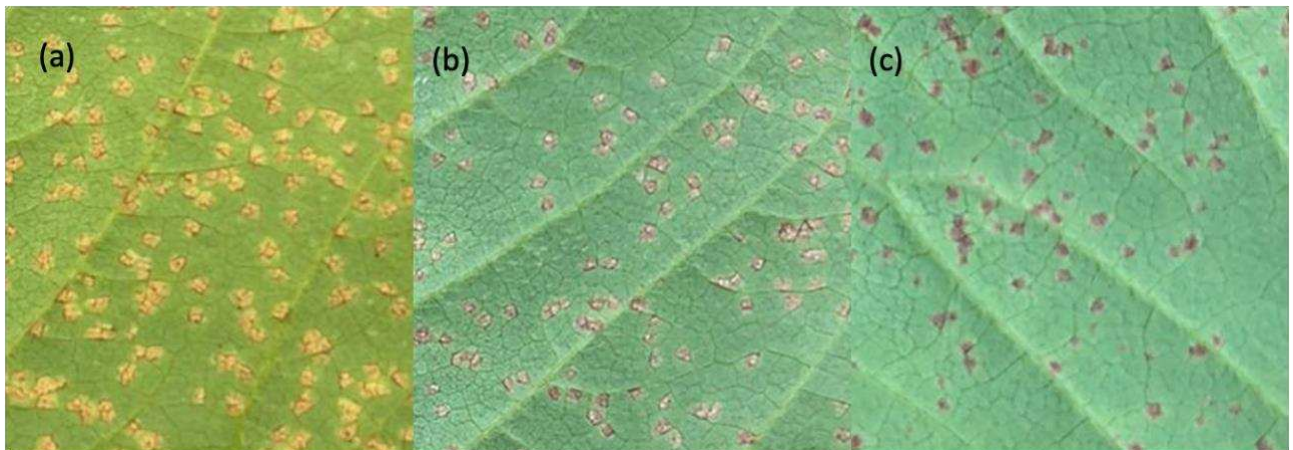
**Tabela 2:** Análise da segregação da resistência nas populações GMX33.005 e GMX35.009 derivadas do cruzamento entre Conquista e PI567102B, avaliadas 14 dias após a inoculação com  $2 \times 10^4$  uredósporos do isolado monopustular PPUFV02 de *Phakopsora pachyrhizi*

População	Fenótipo		Esperado (3:1)		Hipótese	$\chi^2$	Probabilidade
	Observado		RB	TAN			
	RB	TAN	RB	TAN			
GMX 33.005 (98 plantas)	74	24	73,5	24,5	(3:1)	0,0136*	90,71%
GMX 35.009 (100 plantas)	76	24	75	25	(3:1)	0,0533*	81,74%
Total	150	48	148,5	49,5	(3:1)	0,0606*	80,55%

\* Como  $\chi^2_{Obs} < \chi^2_{\alpha 5\%}$ , aceita-se a hipótese de que a segregação está de acordo com a razão Mendeliana 3:1.

#### 4.3 Herança da resistência nas populações segregantes avançadas com resistência derivada da PI476905A

Todas as plantas do genitor resistente KCB19-10008-1 foram avaliadas como resistentes apresentando reações do tipo RB (*redish brown*), quando inoculadas com o isolado PPUFV02. Nas populações segregantes TMGB20-2-13330(1) e TMGB20-2-13330(2) observou-se a ocorrência dos fenótipos RB, RB+ e TAN (Figura 4). Considerando-se as plantas RB e RB+ como resistentes, verificou-se aderência à razão 3:1, indicando que a resistência derivada da PI476905A e introgridida na linhagem pré-melhorada KCB19-10008-1 é governada por um único gene dominante (Tabela 3). Na população TMGB20-0-13126 também foi possível distinguir os fenótipos RB, RB+ e TAN. A proporção de plantas com o fenótipo RB nessa população foi maior que nas populações TMGB20-2-13330(1) e TMGB20-2-13330(2). Considerando as plantas RB, RB+ e como resistentes, a proporção observada apresentou aderência à proporção esperada de 15:1, indicativa da segregação de dois genes dominantes independentes (Tabela 3). Todavia, o modelo da população TMGB20-0-13126 tem que ser considerado com reserva, pois os marcadores moleculares avaliados nesta população apresentaram uma distorção da segregação esperada 1:2:1 e a análise com marcadores moleculares revelou a segregação dos genes *Rpp4* e *Rpp5*.



**Figura 4** - Fenótipos observados nas populações segregantes TMGB20-2-13330(1), TMGB20-2-13330(2) e TMGB20-0-13126, aos quinze dias após a inoculação com  $2 \times 10^4$  uredósporos do isolado monopustular PPUFV02 de *Phakopsora pachyrhizi*. (a) lesão TAN com abundante esporulação, indicativa de suscetibilidade, (b) lesão RB+, com esporulação, indicativa de resistência e (c), lesão RB sem esporulação, indicativa de resistência.

**Tabela 3:** Análise da segregação da resistência nas subpopulações derivadas do cruzamento entre TMG7058 e KCB19-10008, avaliadas 14 dias após a inoculação com  $2 \times 10^4$  uredósporos do isolado monopustular PPUFV02 de *Phakopsora pachyrhizi*

População	Fenótipo				Hipótese	$\chi^2$	Probabilidade
	Observado		Esperado				
	RB	TAN	RB	TAN			
TMGB20- 2-13330(1) (79 plantas)	52	27	59,25	19,75	(3:1)	3,55*	5,96%
TMGB20- 2-13330(2) (83 plantas)	67	16	62,25	20,75	(3:1)	1,45*	22,86%
TMGB20-0-13126 (91 plantas)	86	5	85,3125	5,68575	(15:1)	0,09*	76,59%

\* Como  $\chi^2_{\text{Obs}} < \chi^2_{\alpha 5\%}$ , aceita-se a hipótese de que a segregação está de acordo com a razão Mendeliana 3:1 e 15:1.

#### 4.4 Análise de cossegregação da resistência ao isolado PPUFV02 com marcadores moleculares ligados ao gene *Rpp6*

Efetua-se inicialmente a genotipagem das plantas das populações segregantes GMX35.005 e GMX 35.009 com os marcadores CAPS\_6042557 e dCAPS\_6160480, que limitam o intervalo de 117.924 bp onde o gene *Rpp6* foi anteriormente mapeado. Nessas populações observou-se a aderência da segregação observada para os marcadores com a proporção 1:2:1 esperada para marcadores codominantes (Tabela 4).

**Tabela 4:** Análise do padrão de segregação dos marcadores CAPS\_6042557 e dCAPS\_6160480 nas populações GMX 33.005 e GMX 35.009 derivadas do cruzamento entre Conquista e PI567102B.

População	Marcador	Plantas			Hipótese	$\chi^2$	Probabilidade
		Genótipo	Observado	Esperado			
GMX 33.005 (98 plantas)	CAPS_6042557	RR	24	24,5	1	3,30*	19,17%
		Rr	57	49	2		
		rr	17	24,5	1		
GMX 33.005 (98 plantas)	dCAPS_6160481	RR	25	24,5	1	2,09*	35,09%
		Rr	42	49	2		
		rr	29	24,5	1		
GMX 35.009 (100 plantas)	CAPS_6042557	RR	21	25	1	1,98*	37,15%
		Rr	57	50	2		
		rr	22	25	1		
GMX 35.009 (100 plantas)	dCAPS_6160481	RR	21	25	1	0,96*	61,88%
		Rr	54	50	2		
		rr	25	25	1		

\* Como  $\chi^2_{Obs} < \chi^2_{\alpha 5\%}$ , aceita-se a hipótese de que a segregação dos marcadores está de acordo com a proporção 1:2:1, indicativo de ligação ao gene de resistência.

Contrastando os dados genotípicos com os dados fenotípicos não se observou a cossegregação da resistência com as marcas que delimitam o intervalo genômico que contém *Rpp6*, de acordo com KING et al. (2016). Foram observadas plantas suscetíveis homocigotas ou heterocigotas para o intervalo derivado da PI567102A e plantas resistentes homocigotas ou heterocigotas para o mesmo intervalo (Tabela 5 e Tabela 6). Se o gene segregando fosse o gene *Rpp6*, era esperado encontrar a região derivada da PI567102B somente nas plantas resistentes.

**Tabela 5:** Plantas da população GMX 33.005 com fenótipos discrepantes com o genótipo para os marcadores CAPS\_6042557 e dCAPS\_6160480.

Plantas	Fenótipo	Marcadores	
		CAPS_6042557	dCAPS_6160480
GMX 33.005.06	RB	3	3
GMX 33.005.14	RB	3	3
GMX 33.005.15	RB	3	3
GMX 33.005.29	RB	3	3
GMX 33.005.32	TAN	2	2
GMX 33.005.46	TAN	2	2
GMX 33.005.47	RB	3	3
GMX 33.005.51	TAN	2	2
GMX 33.005.53	RB	3	3
GMX 33.005.62	TAN	2	2
GMX 33.005.63	RB	3	3
GMX 33.005.64	RB	3	3
GMX 33.005.87	RB	3	3
GMX 33.005.89	TAN	2	2
GMX 33.005.91	RB	3	3
GMX 33.005.97	RB	3	3
PI567102B	RB	1	1
Conquista	TAN	3	3

**Tabela 6:** Plantas da população GMX 35.009 com fenótipos discrepantes com o genótipo para os marcadores CAPS\_6042557 e dCAPS\_6160480.

Plantas	Fenótipo	Marcadores	
		CAPS_6042557	dCAPS_6160480
GMX 35.009.23	RB	3	3
GMX 35.009.26	RB	3	3
GMX 35.009.28	TAN	2	2
GMX 35.009.29	TAN	2	2
GMX 35.009.31	RB	3	3
GMX 35.009.35	TAN	2	2
GMX 35.009.38	TAN	2	2
GMX 35.009.40	RB	3	3
GMX 35.009.42	RB	3	3
GMX 35.009.60	RB	3	3
GMX 35.009.61	RB	3	3
GMX 35.009.63	TAN	2	2
GMX 35.009.75	RB	3	3
GMX 35.009.79	RB	3	3
GMX 35.009.82	RB	3	3
GMX 35.009.85	TAN	2	2
GMX 35.009.91	RB	3	3
GMX 35.009.94	RB	3	3
PI567102B	RB	1	1
Conquista	TAN	3	3

Para confirmar esse resultado, plantas com eventos de recombinação entre os marcadores CAPS\_6042557 e dCAPS\_6160480 (Tabela 7) foram selecionadas, autofecundadas e as progênies fenotipadas e genotipadas. Os resultados dos testes de progênie confirmaram mais uma vez que o gene da PI567102A que confere resistência ao isolado PPUFV02 não está localizado dentro do intervalo (Tabela 7). Por exemplo, as progênies GMX 33.005.40 e GMX 33.005.69 segregam para o marcador CAPS\_6042557 e foram 100% resistentes.

Concordante com os resultados relatados, a geração do mapa de ligação revelou que o gene que confere resistência da PI567102B não está localizado no intervalo onde *Rpp6* foi mapeado, indicando se tratar de outro gene possivelmente localizado no cromossomo 18 (Figura 5).

**Tabela 7:** Plantas das populações GMX 33.005 e GMX 35.009 com eventos de recombinação para os marcadores CAPS\_6042557 e dCAPS\_6160480.

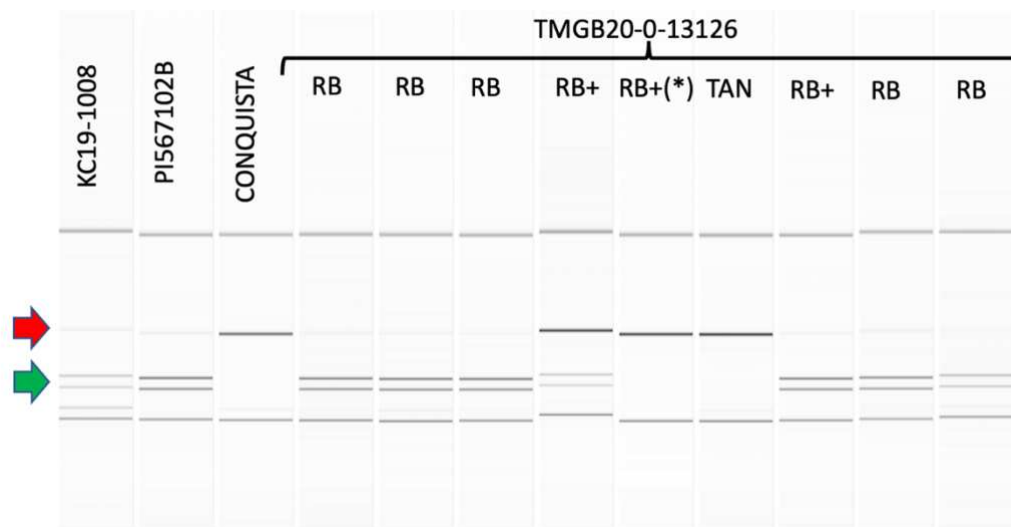
Recombinantes	Fenótipo	Marcadores			Resultado do teste de progênie
		CAPS_6042557	CAPS_18G066300	dCAPS_6160480	
GMX 33.005.26	RB	2	2	1	29 R : 0 S
GMX 33.005.34	RB	2	3	3	20 R : 10 S
GMX 33.005.40	RB	2	3	3	29 R : 1 S
GMX 33.005.69	RB	2	3	3	26 R : 0 S
GMX 33.005.83	RB	2	3	3	20 R : 10 S
GMX 33.005.100	RB	2	3	3	22 R : 8 S
GMX 35.009.46	RB	2	3	3	24 R : 6 S
PI567102B	RB	1	1	1	-
Conquista	TAN	3	3	3	-



**Figura 5:** Mapa de ligação contendo os marcadores CAPS\_6042557 e dCAPS\_6160480, que limitam o intervalo genômico onde o gene *Rpp6* foi mapeado por KING et al. (2016), e o gene de resistência (gene R) da PI567102B que confere resistência ao isolado PPFV02 de *Phakopsora pachyrhizi*. O mapa foi gerado com JoinMap 5 considerando a função de mapeamento Haldane.

Análise de KCB19-10008 e das progênes TMGB20-2-13330(1), TMGB20-2-13330(2) com o marcador CAPS\_18G066300, derivado do gene Glyma.18g066300, que codifica a proteína com o domínio DCD, melhor candidato no intervalo CAPS\_6042557 e dCAPS\_6160480 a ser *Rpp6*, revelou a presença e segregação do mesmo polimorfismo genético presente na PI567102A (Figura 6). Porém, não se verificou a cossegregação absoluta desta marca com o fenótipo de resistência, como seria esperado para um marcador funcional. Na população TMGB20-0-13126 também foi observada a segregação do marcador CAPS\_18G066300 (Figura 6), mas novamente não se observou a sua cossegregação com a

resistência. Nesta população também foi observada a segregação dos marcadores para os genes *Rpp4* e *Rpp5* (dados não mostrados), corroborando as informações repassadas pela TMG e os dados de segregação da resistência que sugeriram a segregação de mais de um gene independente conferindo resistência ao isolado PPUFV02. A segregação de múltiplos genes nesta população explica a maior amplitude de fenótipos observados e o efeito aditivo dos genes. A lesão RB mais restritiva do desenvolvimento de *P. pachyrhizi* (Figura 4C) pode ser o resultado do piramidamento dos genes *Rpp4*, *Rpp5* e *Rpp?* derivado da linhagem pré-melhorada KCB19-10008 (PI567102B).



**Figura 6** Análise da segregação do marcador CAPS\_18G066300 na população F2 TMGB20-0-13126. KC19-1008 e PI567102B possuem o mesmo alelo do marcador (seta verde), que difere do alelo da cultivar suscetível Conquista (seta vermelha). A segregação do marcador é observada na amostra da população TMGB20-0-13126. É possível observar uma planta avaliada como resistente RB+(\*), homocigota para o alelo suscetível do marcador CAPS\_18G066300.

## 5. Discussão

Por meio do estudo da herança da resistência, confirmou-se que a PI567102A tem um gene dominante que confere resistência ao isolado brasileiro PPUFV02 de *P. pachyrhizi*. Todavia, os estudos de mapeamento genético conduzidos neste trabalho não localizaram este gene no intervalo onde o gene dominante *Rpp6* descrito nesta PI tinha sido previamente mapeado por King et al. (2016). Esta discrepância de resultados pode ter sido causada pelo emprego de diferentes isolados nos dois trabalhos. Li et al. (2012) utilizaram os isolados norte-americanos Louisiana 2004 (LA04-1) e Mississippi 2006 (MS06-01) nos estudos de mapeamento do gene *Rpp6* e diversos estudos demonstram a existência de diferença na virulência entre isolados americanos e isolados brasileiros. Por exemplo, o gene *Rpp-1b* derivado da PI594538A e o gene *Rpp1* da PI587880A não conferem resistência a isolados norte-americanos e conferem resistência completa a isolados da América do Sul (RAY et al. 2009; PAUL et al., 2015). Já o gene *Rpp1* da PI 200492 que é capaz de conferir resistência a isolados norte-americanos, é totalmente ineficaz contra isolados brasileiros. O mesmo ocorre com o gene *Rpp3* derivado da PI 462312. Assim é possível que a PI567102A possui dois genes de resistência, sendo um o gene *Rpp6* efetivo contra isolados norte-americanos e inefetivo contra isolados brasileiros representados por PPUFV02 e, um outro efetivo contra PPUFV02 e inefetivo contra isolados americanos. Esta hipótese poderia ser comprovada inoculando as populações desenvolvidas neste trabalho ou os indivíduos com eventos de recombinação no intervalo que contém *Rpp6* em homozigose com um isolado norte-americano de *P. pachyrhizi*. Ressalte-se que é muito pouco provável que a discrepância de resultados seja devido a erros de fenotipagem, pois a diferença de posicionamento do gene efetivo contra PPUFV02 é muito diferente da relatada para *Rpp6*.

A análise de segregação em populações derivadas da linhagem pré-melhorada KC19-1008, derivada da PI 476905A, que possui o mesmo haplótipo da PI567102B, na região que contém o loco *Rpp6*, também corrobora a ausência de um fator de resistência ao isolado PPUFV02 na região onde *Rpp6* está localizado. O estudo de herança da resistência nas populações TMGB20-2-13330(1), TMGB20-2-13330(2) revelou a segregação de um gene dominante conferindo resistência ao isolado PPUFV02 derivado da KC19-1008. Todavia não se observou a co-segregação com o marcador CAPS\_18G066300, derivado do gene Glyma.18g066300 que codifica uma proteína com o domínio DCD, o melhor candidato no intervalo CAPS\_6042557 e dCAPS\_6160480 que contém *Rpp6* de acordo com os estudos de KING et al. (2016), por ser

uma proteína envolvida em morte celular, fenótipo associado com a resistência conferida por *Rpp6*.

Estudos de mapeamento genético, aproveitando as populações fenotipadas neste trabalho, deverão ser efetuados para identificar com precisão a localização do gene derivado da PI567102A associado com a resistência ao isolado PPUFV02. Os dados de segregação sugerem que o gene pode estar localizado no braço do cromossomo 18 onde *Rpp4* e *Rpp1* foram mapeados. Ensaio com marcadores ligados a esses loci não confirmam a possibilidade de o gene ser um alelo do loco *Rpp1* ou *Rpp4* (dados não mostrados).

Para melhorar a precisão do mapeamento genético, plantas F2 homocigotas resistentes e suscetíveis foram selecionadas por meio de testes de progênie. DNA dessas plantas será utilizado para formar bulks R e S que serão sequenciados (ABE et al., 2012; HYTEN et al., 2009). Com base nas sequências obtidas, polimorfismos ligados com o loco de resistência serão identificados utilizando a estratégia MutMap descrita por ABE et al. (2012). Polimorfismos proximamente ligados ao gene de resistência poderão ser utilizados para desenvolver ensaios moleculares para monitoramento do gene em populações segregantes e o seu piramidamento em cultivares comerciais. É evidente, pelos resultados de fenotipagem da população TMGB20-0-13126, a possibilidade de se obter um fenótipo de resistência mais robusto piramidando-se diferentes genes de resistência que conferem individualmente um fenótipo de resistência caracterizado por lesões RB e diferentes níveis de esporulação. Esta estratégia pode contribuir para o desenvolvimento de uma resistência mais durável, conforme sugerido por MUNDT (2018) e YAMANKA et al. (2012).

## 6. Referências

- ABE, A.; KOSUG, S.; YOSHIDA, K.; NATSUME, S.; TAKAGI, H.; KANZAKI, H.; MATSUMURA, H.; YOSHIDA, K.; MITSUOKA, C.; TAMIRU, M.; INNAN, H.; CANO, L.; KAMOUN, S.; TERAUCHI, R. Genome sequencing reveals agronomically important loci in rice using MutMap. **Nat Biotechnol** 30(2):174–178, 2012. DOI: 10.1038/nbt.2095.
- ALMEIDA, A. M. R.; FERREIRA, L. P.; YORINORI, J. T.; SILVA, J. F. V.; HENNING, A. A. **Doenças da soja**. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Ed.) **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4.ed. São Paulo: Agronômica Ceres. v. 2., p. 516-530, 2005.
- ANDERSEN, J.R.; LUBBERSTEDT, T. Functional markers in plants. **Trends Plant Sci.** 8, 554–560, 2003.
- ANDRADE, P. J. M.; ANDRADE, D. F. A. A. Ferrugem asiática: uma ameaça à sojicultura brasileira. Dourados: **Embrapa Pecuária Oeste**. 11p, 2002.
- ANDREWS, S. FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data [Online], 2010. Disponível online em: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- APPLEBY, N.; EDWARDS, D.; BATLEY, J. New technologies for ultra-high throughput genotyping in plants. In: SOMERS, D.; LANGRIDGE, P.; GUSTAFSON, J. (Ed), **Plant Genomics Methods and Protocols**. New York: Humana Press. p. 19-39, 2009.
- BATISTA, C E. A. **Mapeamento de genes associados à resistência da soja a ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*)**. 2008. 56 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.
- BONATO, E. R.; BONATO, A. L. V. A soja no Brasil: história e estatística. Londrina: EMBRAPA CNPSo, **Documentos**,21, 61 p, 1987.
- BONDE, M. R.; NESTER, S. E.; AUSTIN, C. N.; STONE, C. L.; FREDERICK, R. D.; HARTMAN, G. L.; MILES, M. R. Evaluation of virulence of *Phakopsora pachyrhizi* and *P. meibomia* isolates. **Plant Disease**, v. 90, n. 6, p. 708-716, 2006.
- BEZERRA, A.R.G.; SEDIYAMA, T.; BORÉM, A.; SOARES, M. M. Importância econômica. In: SILVA, F.; BORÉM, A.; SEDIYAMA, T.; CÂMARA, G. (Ed.). **Soja: do plantio à colheita**. São Paulo, SP: Oficina de Textos, 2022. p. 9-20, 2022.
- BROMFIELD, K.R. Soybean rust. St. Paul: American Phytopathological Society. 65p, 1984.
- BROWN, J. K. & HOVMOLLER, M. S. Aerial dispersal of pathogens on the global and continental scales and its impact on plant disease. **Science**, v. 297, n. 5581, p. 537-541, 2002.

BURDETT, H.; BENTHAM, R.; WILLIAMS, S.J.; DODDS, P.N.; ANDERSON, P.A.; BANFIELD, M.J.; KOBE, B. The Plant "Resistosome": Structural Insights into Immune Signaling. **Cell Host Microbe**, 26(2):193-201, 2019. DOI: 10.1016/j.chom.2019.07.020.

BURDON, J. J. Phenotypic and genetic patterns of resistance to the pathogen *Phakopsora pachyrhizi* in populations of *Glycine canescens*. **Oecologia**, v. 73, n. 2, p. 257-267, 1987.

CHILDS, S. P.; KING, Z. R.; WALKER, D. R.; HARRIS, D. K.; PEDLEY, K. F.; BUCK, J. W.; BOERMA, H. R.; LI, Z. Discovery of a seventh Rpp soybean rust resistance locus in soybean accession PI 605823. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 131, n. 1, p. 27-41, 2017.

CHILDS, S. P.; BUCK, J. W.; LI, Z. Breeding soybeans with resistance to soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*). **Plant Breeding**, v. 137, n. 3, p. 250-261, 2018. DOI: 10.1111/pbr.12595.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, terceiro levantamento, Dezembro 2022**. Brasília: CONAB, 2022. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>.

DALL'AGNOL, A. Sem medo de competir. **AgroANALYSIS**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 42-43, 2002.

DALL'AGNOL, A.; ROESSING, A. C.; LAZZAROTTO, J. J.; HIRAKURI, M. H.; OLIVEIRA, A. B. O complexo agroindustrial da soja brasileira. Londrina: **Embrapa Soja**. 12 p, 2007.

DOYLE J. J. & DOYLE J. L. A rapid DNA isolation method for small quantities of fresh tissues. **Phytochem Bull. Botanical Society of América**, Saint Lois, v.19, p.11-15, 1987.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Tecnologias de Produção de Soja - Região Central do Brasil 2014. Londrina: **EMBRAPA – Soja, Sistemas de produção**, 16, 266p, 2013.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Tecnologia Shield: proteção ferrugem asiática. **EMBRAPA – Soja**, 2018.

GARCIA, A.; CALVO, E. S.; KIIHL, R. A. S. K.; HARADA, A.; HIROMOTO, D. M.; VIEIRA, L. G. E. Molecular mapping of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) resistance genes: discovery of a novel locus and alleles. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 117, n. 4, p. 545, 2008.

GODOY, C. V. & LAZZAROTTODA, J. J. Ferrugem: Escolhendo a arma. In: **Grandes Culturas Cultivar**. Ano VI, n. 69, p. 24-25, 2005.

GODOY, C. V.; ALMEIDA, A. M. R.; CASTAMILAN, L. M.; MEYER, M. C.; DIAS, W.P.; SEIXAS, C. D. S.; SOARES, R. M.; HENNING, A. A.; YORINORI, J. T.; FERREIRA, L. P.; SILVA, J. F. V. Doenças da soja. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Eds.). **Manual de Fitopatologia**. 5 ed, v. 2, p. 657–675, 2016.

GODOY, C.V.; SEIXAS, C.D.S; MEYER, M.C.; SOARES, R.M. Ferrugem-asiática da soja: bases para o manejo da doença e estratégias antirresistência. **Embrapa Soja**, 39 p., 2020. (Documentos / Embrapa Soja, ISSN 2176-2937; n. 428).

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

GRIGOLLI, J. F. J.; Manejo de doenças na cultura da soja. In: LOURENÇÃO, A. L. F. (Ed.); **Tecnologia e Produção: Soja 2014 / 2015**. Curitiba: Midiograf, P. 134 – 156, 2015.

GUPTA, P.K.; ROY, J.K.; PRASAD, M. Single nucleotide polymorphisms: A new paradigm for molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants. *Curr. Sci*, 80, 524–535, 2001.

HARRIS, D.K.; KENDRICK, M.D.; KING, Z.R.; PEDLEY, K.F.; WALKER, D.R.; CREGAN, P.B.; BUCK, J.W.; PHILLIPS, D.V.; LI, Z.; BOERMA, H.R. Identification of unique genetic sources of soybean rust resistance from the USDA soybean germplasm collection. **Crop Science**, v.55, p.2161-2176, 2015. DOI: 10.2135/cropsci2014.09.0671.

HENNING, A.A. Manejo de doenças da soja (*Glycine max* L. Merrill). **Informativo Abrates**, v. 19, p. 9–12, 2009.

HYTEN, D. L.; HARTMAN, G. L.; NELSON, R. L.; FREDERICK, R. D.; CONCIBIDO, V. C.; NARVEL, J. M.; CREGAN, P. B. Map location of the *Rpp1* locus that confers resistance to soybean rust in soybean. **Crop Science**, v. 47, n. 2, p. 837–840, mar. 2007.

HYTEN, D. L.; SMITH, J. R.; FREDERICK, R. D.; TUCKER, M. L. Bulk segregant analysis using the goldengate assay to locate the *Rpp3* locus that confers resistance to soybean rust in soybean. **Crop Science**, v. 49, n. 1, p. 265–271, jan. 2009.

LAZZAROTTO, J. J. & HIRAKURI, M. H. Evolução e perspectiva de desempenho econômico associadas com a produção de soja no contexto mundial e brasileiro. Londrina: **Embrapa Soja**, 46p., 2010.

LSPA - Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. IBGE, 2023. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9201-levantamento-sistemico-da-producao-agricola.html?=&t=resultados>>, acessado em 25 de janeiro de 2023.

JONES, J.D.G.; VANCE, R.E.; DANGL, J. L. Intracellular innate immune surveillance devices in plants and animals. **Science**, 354, Issue 6316, 2016. DOI: 10.1126/science.aaf6395.

KATO, M. Effectiveness of resistance genes to the soybean rust pathogen *Phakopsora pachyrhizi*. *JARQ* 51(3):199-207, 2017.

KIM, K-S.; UNFRIED, J. R.; HYETEN, D. L., FREDERICK, R. D., HARTMAN, G. L.; NELSON, R. L.; SONG, Q.; DIERS, B. W. Molecular mapping of soybean rust resistance in

soybean accession PI 561356 and SNP haplotype analysis of the *Rpp1* region in diverse germplasm. **Theoretical and Applied Genetics**. V.125, p. 1339–1352, out 2012.

KING, Z.R.; HARRIS, D.K.; PEDLEY, K.F.; SONG, Q.; WANG, D.; WEN, Z.; BUCK, J.W.; LI, Z.; BOERMA, H.R. A novel *Phakopsora pachyrhizi* resistance allele (*Rpp*) contributed by PI 567068A. **Theoretical and Applied Genetics**. 129(3):517-34, 2016. doi: 10.1007/s00122-015-2645-3.

KONIECZNY, A.; AUSUBEL, F. M. A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. **Plant J**.4(2):403-10, 1993. DOI: 10.1046/j.1365-313x.1993.04020403.x.

LI, H. & DURBIN, R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. **Bioinformatics**. 26(5):589-95, 2010. doi: 10.1093/bioinformatics/btp698. PMID: 20080505; PMCID: PMC2828108.

LI, S.; SMITH, J. R.; RAY, J. D.; FREDERICK, R. D. Identification of a new soybean rust resistance gene in PI 567102B. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 125, n. 1, p. 133–142, 2012.

MONTEROS, M. J.; MISSAOUI, A. M.; PHILLIPS, D. V., WALKER, D. R.; BOERMA, H. R. Mapping and confirmation of the ‘Hyyuga’ red-brown lesion resistance gene for Asian soybean rust. **Crop Science**, Madison, v. 47, p. 829-834, jul 2006.

MUNDT, C. C. Pyramiding for Resistance Durability: Theory and Practice. **Pythopathology** 108:792–802, 2018. DOI:10.1094/PHYTO-12-17-0426-RVW.

NEFF, M.M.; NEFF, J.D.; CHORY, J.; PEPPER, A.E. dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in Arabidopsis thaliana genetics. **Plant J**, 14(3):387-92, 1998. DOI: 10.1046/j.1365-313x.1998.00124.x. PMID: 9628033.

PAUL, C.; FREDERICK, R.D.; HILL, C.B.; HARTMAN, G.L.; WALKER, D.R. Comparison of pathogenic variation among *Phakopsora pachyrhizi* isolates collected from United States and international locations, and identification of soybean genotypes resistant to U.S. isolates. **Plant Disease**. v. 99, p. 1059–1069, 2015.

POK MAN NGOU, B.; DING, P.; JONES, J.D.G. Thirty years of resistance: Zig-zag through the plant immune system. **The Plant Cell**, Volume 34, Issue 5, Pages 1447–1478, 2022. DOI: [10.1093/plcell/koac041](https://doi.org/10.1093/plcell/koac041).

PRIOLLI, R. H. G.; MENDES-JUNIOR, C. T.; SOUSA, S. M. B.; SOUSA, N. E. A. Diversidade genética da soja entre períodos e entre programas de melhoramento no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 10, p. 967- 975, 2004.

RAY, J. D.; MOREL, W.; SMITH, J. R.; FREDERICK, R. D.; MILES, M. R. Genetics and mapping of adult plant rust resistance in soybean PI 587886 and PI 587880A. **Theor. Appl. Genet.** v. 119, p. 271-280, 2009. DOI:10.1007/s00122-009-1036-z.

ROBINSON, J.T.; THORVALDSDÓTTIR, H.; WINCKLER, W.; GUTTMAN, M.; LANDER, E.S.; GETZ, G.; MESIROV, J.P. Integrative genomics viewer. **Nat Biotechnol**, 29(1):24-6, 2011. DOI: 10.1038/nbt.1754.

ROSA, C. R. E. Resistência genética da soja à ferrugem asiática. Agronegócio em foco. Set. 2015. Disponível em: <http://www.pioneersementes.com.br/blog/114/resistencia-genetica-dasoja-a-ferrugem-asiatica>. Acesso em: 5 de setembro de 2022.

RUPE, J.; SCONYERS, L. Ferrugem asiática da soja. **The Plant Health Instructor**. 2008. Portuguese translation by Rubens Cherubini Alves and Emerson M. Del Ponte, 2008. Disponível em: <https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/Basidiomycetes/Pages/SoybeanRustPort.aspx>. Acesso em: 5 de Julho de 2018.

SALGOTRA, R.K.; STEWART, C.N.JR. Functional Markers for Precision Plant Breeding. **International Journal of Molecular Sciences**, 21(13):4792, 2020. DOI: DOI:10.3390/ijms21134792.

SCHMUTZ, J.; CANNON, S. B.; SCHLUETER, J. et al. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. **Nature**, 463(7278), p. 178–183, 2010. DOI: [10.1038/nature08670](https://doi.org/10.1038/nature08670).

SCHLÖTTERER, C. The evolution of molecular markers — just a matter of fashion. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, p. 63-69, 2004.

SEDIYAMA, T. Origem, evolução e importância econômica. In: **Tecnologia de produção e usos da soja**. – [Editado por: Sedyama, T.] – Londrina, PR: Mecenaz, p. 1-5, 2009.

SILVA, D. C. G.; YAMANAKA, N.; BROGIN, R. L.; ARIAS, C. A. A.; NEPOMUCENO, A. L.; DI MAURO, A. O.; PEREIRA, S. S.; NOGUEIRA, L. M.; PASSIANOTTO, A. L. L.; ABDELNOOR, R. V. Molecular mapping of two loci that confer resistance to Asian rust in soybean. **Theoretical and Applied Genetics**. V.117, p. 57–63, 2008.

SINCLAIR, J. B. & HARTMAN, G. L. Soybean rust. In: Hartman, G. L., Sinclair, J. B. & Rupe, J. C. Compendium of soybean diseases. **American Phytopathological Society**, Saint Paul, 4 ed., p.3-4, 1999.

TENHAKEN, R.; DOERKS, T.; BORK, P. DCD - a novel plant specific domain in proteins involved in development and programmed cell death. **BMC Bioinformatics**, 11;6:169, 2005 DOI: 10.1186/1471-2105-6-169.

USDA - United States Department of Agriculture. Soybean World Production, 2022. Disponível em: <https://ipad.fas.usda.gov/cropexplorer/cropview/commodityView.aspx?cropid=2222000>. Acesso em: 27 de dez. de 2022.

WANG, X.; NIU, Y. & ZHENG, Y. Multiple Functions of MYB Transcription Factors in Abiotic Stress Responses. **Int J Mol Sci**, 7;22(11):6125, 2021. DOI: 10.3390/ijms22116125.

YAMANAKA, N.; LEMOS, N. G.; UNO, M.; AKAMATSU, H.; YAMAOKA, Y.; ABDELNOOR, R. V.; BRACCINI, A. L.; SUENAGA, K. Resistance to Asian soybean rust in soybean lines with the pyramided three *Rpp* genes. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**. V. 13, p. 75-82, 2012.

YAMANAKA, N.; HOSSAIN, M.M. Pyramiding three rust-resistance genes confers a high level of resistance in soybean (*Glycine max*). **Plant Breeding**, 138:686–695, 2019. DOI: [DOI: 10.1111/pbr.12720](https://doi.org/10.1111/pbr.12720).

YORINORI, J.T.; JUNIOR, J. N.; LAZZAROTTO, J.J. Ferrugem "asiática" da soja no Brasil: evolução, importância econômica e controle. Londrina PR. **Embrapa Soja, Documentos**, 247. 2004.

YU, N.; KIM, M.; KING, Z. R.; HARRIS, D. K.; BUCK, W. J.; LI, Z.; DIERS, B. W. Fine mapping of the Asian soybean rust resistance gene *Rpp2* from soybean PI 230970. **Theoretical and Applied Genetics**. V.128, p. 387–396, 2015.