



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA  
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES SNP (Single Nucleotide  
Polymorphism) ASSOCIADOS AO GENE DE RESISTÊNCIA  
*Rpp4* DA SOJA (*Glycine max* L. Merr.) A FERRUGEM  
(*Phakopsora pachyrhizi* Sidow)**

**CARLOS RENATO ECHEVESTE DA ROSA**

**TESE DE DOUTORADO EM AGRONOMIA**

Área de concentração: **Produção Sustentável**

Linha de pesquisa: **Recursos Genéticos e Melhoramento Vegetal**

**BRASÍLIA/DF  
NOVEMBRO/2015**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES SNP (Single Nucleotide  
Polymorphism) ASSOCIADOS AO GENE DE RESISTÊNCIA  
*Rpp4* DA SOJA (*Glycine max* L. Merr.) A FERRUGEM  
(*Phakopsora pachyrhizi* Sydow)**

**CARLOS RENATO ECHEVESTE DA ROSA**

**ORIENTADOR: CARLOS ROBERTO SPEHAR, PhD**

**TESE DE DOUTORADO EM AGRONOMIA**

**PUBLICAÇÃO: 037D/2015**

**BRASÍLIA/DF**  
**NOVEMBRO/2015**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES SNP (Single Nucleotide Polymorphism)**  
**ASSOCIADOS AO GENE DE RESISTÊNCIA *Rpp4* DA SOJA (*Glycine max* L. Merr.)**  
**À FERRUGEM (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow)**

**CARLOS RENATO ECHEVESTE DA ROSA**

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM AGRONOMIA NA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL.

**APROVADA POR:**

---

CARLOS ROBERTO SPEHAR, PhD. Professor Titular da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília (ORIENTADOR) CPF: 122.262.116-91  
Email: [spehar@unb.br](mailto:spehar@unb.br)

---

LUIZ EDUARDO BASSAY BLUM, PhD. Professor Associado do Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília (EXAMINADOR INTERNO) CPF: 333.965.071-34  
Email: [luizblum@unb.br](mailto:luizblum@unb.br)

---

MARIA APARECIDA DOS SANTOS, Dr. Genética e Melhoramento de Plantas, Cientista da Du Pont Pioneer (EXAMINADOR EXTERNO) CPF: 017.922.699-19  
Email: [maria.santos@pioneer.com](mailto:maria.santos@pioneer.com)

---

SEBASTIÃO PEDRO DA SILVA NETO, PhD. Pesquisador da Embrapa Cerrados (EXAMINADOR EXTERNO) CPF: 296.339.071-87 Email: [sebastiao.pedro@embrapa.br](mailto:sebastiao.pedro@embrapa.br)

---

TAISLENE BUTARELLO DE MORAES, Dr. Genética e Melhoramento de Plantas, Professor da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília (EXAMINADOR INTERNO) CPF: 269.394.408-28 Email: [taislene@unb.br](mailto:taislene@unb.br)

BRASÍLIA/DF, 05 de Novembro de 2015.

## FICHA CATALOGRÁFICA

Rosa, Carlos Renato Echeveste

Identificação de marcadores SNP (Single Nucleotide Polymorphism) associados ao gene de resistência *Rpp4* da soja (*Glycine max* L. Merr.) a ferrugem (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow). / Carlos Renato Echeveste da Rosa; orientação de Carlos Roberto Spehar. – Brasília (DF), 2015.

116 p.: il.

Tese de Doutorado (Dr.) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2015.

1. Marcadores moleculares. 2. Soja. 3. Ferrugem. I. Spehar, C.R. Prof. Titular da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília (UnB).

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ROSA, C.R.E. **Identificação de marcadores SNP (Single Nucleotide Polymorphism) associados ao gene de resistência *Rpp4* da soja (*Glycine max* L. Merr.) a ferrugem (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow).** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2015, 116 p. Tese de Doutorado.

## CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Carlos Renato Echeveste da Rosa

TÍTULO DA TESE DE DOUTORADO: Identificação de marcadores SNP (Single Nucleotide Polymorphism) associados ao gene de resistência *Rpp4* da soja (*Glycine max* L. Merr.) a ferrugem (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow).

GRAU: Doutor

ANO: 2015

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta tese de doutorado para única e exclusivamente propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta tese de doutorado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

---

Nome: Carlos Renato Echeveste da Rosa

Tel.: (61)8405.4119

Email: [carlos.echeveste@hotmail.com](mailto:carlos.echeveste@hotmail.com)

Dedico este trabalho a minha esposa Claudia  
e aos meus filhos Lucas e Pedro,  
pelo amor e apoio incondicionais.

Ofereço aos meus pais Carlos Renato e Suzana,  
pelo carinho e educação.

## AGRADECIMENTOS

A Universidade de Brasília (UnB) pela oportunidade de aprendizado.

Ao professor Carlos Roberto Spehar pela orientação e confiança.

A Du Pont Pioneer, na pessoa do Dr. Luis Prado, pelo amplo apoio durante a realização deste projeto.

Ao colega Thiago Souza pelo incentivo e apoio no início deste projeto.

Aos colegas Fernando Miranda, Jean Liu, Maria Santos, Welcimar Cunha e Wilacildo Matos pelas discussões e reflexões teóricas sobre a ferrugem da soja.

Aos técnicos Ari Carlos, Emerson Santos, Márcio Peres, Julio Chinaglia, Luis Dantas, Luis Antônio, Roberto Silva e Vilma Lamounier, pela dedicação e comprometimento durante a execução deste projeto.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO GERAL.....</b>	<b>xiii</b>
<b>GENERAL ABSTRACT.....</b>	<b>xiv</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>xv</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>xxii</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>xxiii</b>
<b>CAPÍTULO 1 - A RESISTÊNCIA A FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA.....</b>	<b>1</b>
RESUMO.....	2
ABSTRACT.....	3
INTRODUÇÃO.....	4
O HOSPEDEIRO.....	7
O PATÓGENO.....	9
VARIABILIDADE DO PATÓGENO.....	10
RESISTÊNCIA.....	12
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22
ANEXO.....	33
<b>CAPÍTULO 2 - VIRULÊNCIA DE ISOLADOS DE <i>Phakopsora pachyrhizi</i> A GENÓTIPOS DE SOJA CONTENDO DIFERENTES GENES DE RESISTÊNCIA.....</b>	<b>34</b>
RESUMO.....	35
ABSTRACT.....	36
INTRODUÇÃO.....	37
MATERIAL E MÉTODOS.....	40

RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
CONCLUSÕES.....	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
<b>CAPÍTULO 3 - IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES SNP (Single Nucleotide Polymorphism) ASSOCIADOS AO GENE DE RESISTÊNCIA <i>Rpp4</i> DA SOJA (<i>Glycine max</i> L. Merr.) A FERRUGEM (<i>Phakopsora pachyrhizi</i> Sydow).....</b>	<b>56</b>
RESUMO.....	57
ABSTRACT.....	58
INTRODUÇÃO.....	59
MATERIAL E MÉTODOS.....	62
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
CONCLUSÕES.....	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85



## ÍNDICE DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1. Ciclo biológico da ferrugem asiática da soja causada por *Phakopsora pachyrhizi* (REIS; BRESOLIN; CARMONA, 2006).....xvi

Figura 2. Princípio da análise de co-segregação de marcadores moleculares e características de interesse econômico (FALEIRO, 2011).....xxi

### CAPÍTULO 1

Figura 1. Lavoura de soja durante o período reprodutivo, intensamente atacada por *Phakopsora pachyrhizi* (A), e a mesma lavoura uma semana após apresentando severa desfolha (B).....4

Figura 2. Aspecto do dossel de lavouras de soja com (A) e sem aplicação de fungicidas (B) para o controle de *Phakopsora pachyrhizi*. Onde não foi realizada a aplicação de fungicidas, percebe-se intensa perda de folhas causada pela doença.....5

Figura 3. Os três tipos de resposta qualitativa da soja à infecção por *Phakopsora pachyrhizi*: imunidade ou resistência completa (A), lesões RB ou resistência incompleta (B) e lesões TAN indicativas de suscetibilidade (C).....14

### CAPÍTULO 2

Figura 1. Etapas ilustrando a coleta, dessecação e armazenamento de uredíniosporos dos isolados de *P. pachyrhizi* em laboratório.....41

Figura 2. Sequência de etapas de hidratação (A), preparo de suspensão de uredíniosporos (B/C), inoculação (D) e incubação de isolados de *P. pachyrhizi* em laboratório (E/F).....42

### CAPÍTULO 3

- Figura 1. Reações à ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi*) apresentadas pelos genótipos testados em casa de vegetação (IM: imune, reação indicativa de resistência completa; RB: reação de resistência parcial; TAN: reação de suscetibilidade).....64
- Figura 2. Condução dos genitores resistentes e suscetíveis em câmara de crescimento visando a criação de populações segregantes.....66
- Figura 3. Condução das plantas F<sub>1</sub> em câmara de crescimento visando o avanço de gerações e a obtenção de sementes F<sub>2</sub>.....66
- Figura 4. Caixas Gerbox preparadas para teste de folha destacada (A). Inoculação da superfície abaxial de folíolo de soja com suspensão de uredíniosporos de ferrugem asiática (B).....69
- Figura 5. Proporções fenotípicas obtidas no teste de inoculação das famílias F<sub>2:3</sub> pelo método da folha destacada com o isolado de ferrugem asiática.....75
- Figura 6. Índice de associação entre a variância fenotípica e a variância genotípica (LOD score) no estudo de identificação de marcadores SNPs associados a resistência a ferrugem asiática da soja.....81
- Figura 7. Representação gráfica do mapa de ligação G da soja produzido neste trabalho (A) e o mapa consenso da soja (B), indicando o posicionamento do gene *Rpp4* em relação aos marcadores referidos por Silva et al. (2008). O mapa consenso foi obtido na página do Soybase (<http://www.soybase.org>).....83

## ÍNDICE DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

Tabela 1. Principais acessos utilizados como fontes de genes de resistência a <i>Phakopsora pachyrhizi</i> mapeados no genoma da soja.....	20
--	----

### CAPÍTULO 2

Tabela 1. Relação de isolados de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> coletados a campo, dados geográficos, e normais climáticas dos locais de coleta dos meses de Janeiro a Março.....	44
---	----

Tabela 2. Reação de genótipos diferenciadores com diferentes genes de resistência à infecção por oito isolados de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> em teste de folha destacada.....	46
---	----

Tabela 3. Reação e nível de esporulação de plantas de genótipos diferenciadores com diferentes genes de resistência à infecção por oito isolados de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> em teste de folha destacada.....	47
---	----

Tabela 4. Somatório de plantas classificadas nas categorias resistente e suscetível, agrupadas por gene de resistência, inoculadas com oito isolados de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> em teste de folha destacada.....	48
---	----

Tabela 5. Resumo do somatório e porcentagem de plantas resistentes e suscetíveis, inoculadas com oito isolados de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> em teste de folha destacada.....	49
---	----

### CAPÍTULO 3

Tabela 1. Genótipos de soja ( <i>Glycine max</i> ) utilizados nos testes de inoculação artificial em casa de vegetação visando a identificação de fontes de alelos de resistência a ferrugem da soja ( <i>Phakopsora pachyrhizi</i> ).....	62
--	----

Tabela 2. Marcadores morfológicos avaliados na geração F <sub>1</sub> visando confirmar as hibridações entre o genótipo resistente e o genótipo suscetível a ferrugem da soja.....	67
Tabela 3. Reação de genótipos de soja portadores de genes de resistência inoculados com uma mistura de isolados de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> em casa de vegetação.....	72
Tabela 4. Relação de marcadores polimórficos e resultados do teste qui-quadrado obtidos na verificação de distorções de segregação das populações F <sub>2</sub> .....	74
Tabela 5. Segregação fenotípica de famílias F <sub>3</sub> oriundas das hibridações entre genótipo resistente e suscetível a ferrugem da soja ( <i>Phakopsora pachyrhizi</i> ).....	76
Tabela 6. Número de marcadores SNPs em cada cromossomo utilizados para a obtenção de dados genotípicos da população F <sub>2</sub> .....	77
Tabela 7. Teste qui-quadrado da segregação genotípica de 91 marcadores SNPs em população F <sub>2</sub> .....	79
Tabela 8. Resultado da análise estatística com o programa R/qtl para identificação de marcador molecular associado a gene de resistência a ferrugem asiática da soja.....	82

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES SNP (Single Nucleotide Polymorphism)  
ASSOCIADOS AO GENE DE RESISTÊNCIA *Rpp4* DA SOJA (*Glycine max* L. Merr.)  
A FERRUGEM (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow)**

**RESUMO GERAL**

A ferrugem asiática da soja (*Phakopsora pachyrhizi*) caracteriza-se como a doença foliar mais destrutiva da soja. No entanto, devido à limitada disponibilidade de variedades resistentes adaptadas, os fungicidas ainda são a principal ferramenta de manejo disponível. Assim, a transferência de genes de resistência, assistida por marcadores moleculares, é uma estratégia promissora para o desenvolvimento de variedades resistentes em programas de melhoramento. Os objetivos deste trabalho foram estudar a virulência de isolados de ferrugem frente a diferentes genes de resistência e identificar marcadores moleculares SNP (Single Nucleotide Polymorphism) associados a genes de resistência. Para isso, foram caracterizados isolados de *P. pachyrhizi* frente a genótipos portadores de diferentes genes de resistências. Também foram identificados marcadores moleculares foi realizada através do estudo de populações segregantes, geradas a partir do cruzamento entre genótipos resistentes e suscetíveis. Os resultados deste trabalho sugerem a ocorrência de variação na virulência de isolados de ferrugem asiática aos diferentes genes de resistência conhecidos, e a existência de marcador molecular SNP associado ao gene de resistência *Rpp4* no cromossomo 18 da soja.

**Palavras-chave:** Ferrugem asiática, *Phakopsora pachyrhizi*, soja, resistência, marcadores moleculares, SNPs.

**IDENTIFICATION OF SNP (Single Nucleotide Polymorphism) MARKERS  
ASSOCIATED WITH SOYBEAN (*Glycine max* L. Merr.) *Rpp4* RESISTANCE GENE  
TO RUST (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow)**

**GENERAL ABSTRACT**

The Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) is characterized as the most destructive foliar disease of soybean. Due the limited availability of resistant varieties fungicides are still the main available management tool. Thus, the transfer of resistance genes, by marker assisted selection in breeding programs, is a promising strategy for the development of resistant varieties. Our objectives were to study the virulence of rust isolates against different resistance genes and identify SNP (Single Nucleotide Polymorphism) molecular markers associated with resistance genes. To this, isolates of *P. pachyrhizi* were characterized against genotypes carrying different resistance genes. A SNP molecular markers were also identified through the study of segregating populations. The populations were generated from crosses between resistant and susceptible genotypes. The results of this research suggest the occurrence of variation in the virulence of Asian rust, and the presence of a SNP molecular marker associated to *Rpp4* resistance gene on chromosome 18 of soybean.

**Key Word:** Asian soybean rust, *Phakopsora pachyrhizi*, soybean, resistance, molecular markers, SNPs.

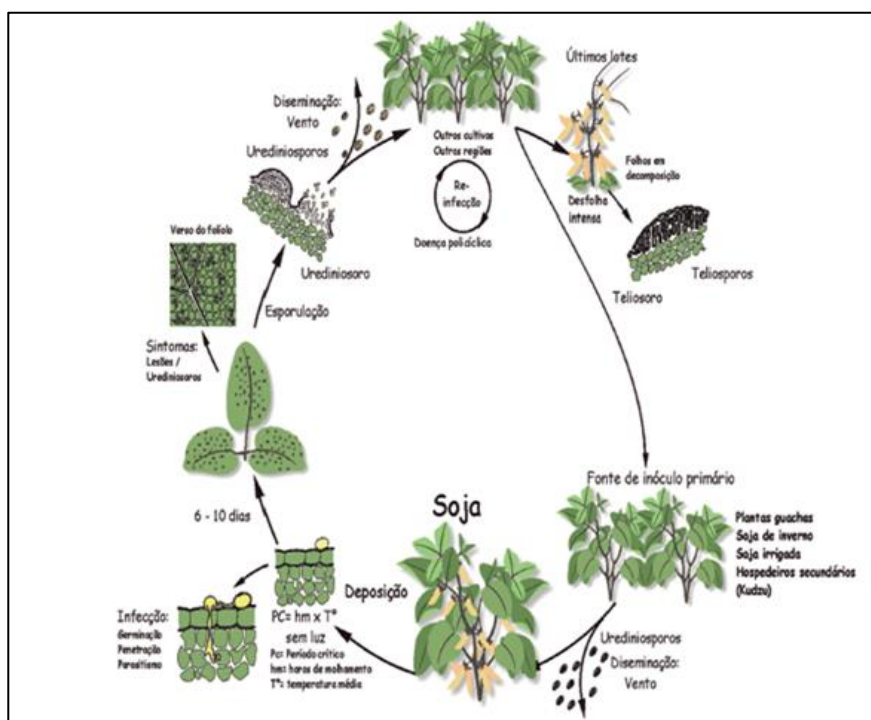
## INTRODUÇÃO GERAL

A importância econômica da soja (*Glycine max* L. Merr.) é grande, pois a cultura pode ser produzida com menores custos do que outras leguminosas. Dos grãos da planta se produz grande quantidade de óleo e proteína por unidade de área e tem uma longa capacidade de armazenamento. As sementes de soja contêm em torno de 40% de proteína, 20% de óleo, ótimo conteúdo de aminoácidos essenciais e nutrientes, e alto valor calórico (NAKAMURA, 1980). A soja representa a quarta maior área plantada e a principal oleaginosa cultivada e consumida no mundo (LEMES; GAVASSONI, 2015). No Brasil, a soja responde por 46% do total de grãos produzidos no país. Na safra de 2014, as exportações originadas pela cadeia produtiva da oleaginosa alcançaram quase US\$ 31 bilhões e representaram 31% do total exportado pelo agronegócio nacional (HIRAKURI; LAZZAROTTO, 2014).

A cultura da soja pode ser atacada por muitos patógenos, como fungos, bactérias, vírus e nematoides, que limitam o seu potencial de produção. No Brasil, já foram identificadas mais de 40 doenças de causa biótica na soja (YORINORI, 1997). Dentre todas elas, a ferrugem asiática tem sido considerada a mais destrutiva. A ferrugem da soja é causada por duas espécies de fungos. A espécie *P. pachyrhizi* (Syd. & Syd.), chamada de ferrugem asiática, reconhecida como mais agressiva e disseminada. E a espécie *P. meibomiae* (Arthur) Arthur, chamada de ferrugem americana, considerada um patógeno fraco e de limitada distribuição (ONO; BURITICA; HENNEN, 1992; BONDE et al., 2006). *P. pachyrhizi*, é um patógeno biotrófico, e depende completamente de um hospedeiro vivo para crescimento e reprodução (BROMFIELD, 1984). Esta ferrugem é de origem asiática e historicamente esteve confinada a áreas da Ásia e Austrália (ONO; BURITICA; HENNEN, 1992). Entretanto, recentemente tem se disseminado além de seu local de origem. A dispersão intercontinental, provavelmente através de correntes de vento (ISARD et al, 2005), permitiu que a ferrugem asiática chegasse ao Paraguai (2001), Brasil e Argentina (2002), Bolívia (2003) e Estados Unidos (2004)

(SCHNEIDER; HOLLIER; WHITMAN, 2005). No Brasil, devido ao clima favorável para sua sobrevivência, o fungo encontra-se disseminado em todas as regiões de cultivo de soja, principalmente nas áreas do cerrado tropical e sub-tropical.

Geralmente, durante seu ciclo de vida, as ferrugens podem produzir cinco estágios: estágio 0 (espermogônios produtores de espermiácias e hifas receptivas), estágio 1 (aecia produzindo aeciosporos), estágio 2 (uredia produzindo urediniosporos), estágio 3 (télia produzindo teliosporos) e estágio 4 (basídias produzindo basidiósporos) (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996). Em *P. pachyrhizi*, os estágios descritos até o momento foram uredinial, telial e basidial (GREEN, 1984). A representação do ciclo biológico da ferrugem asiática pode ser vista na Figura 1.



**Figura 1.** Ciclo biológico da ferrugem asiática da soja causada por *Phakopsora pachyrhizi* (REIS; CARMONA, 2006 citado por LEMES; GAVASSONI, 2015).

A produção assexual de urediniosporos sugere uma baixa diversidade genética do fungo no campo, com um reduzido número de linhagens clonais e eventos recorrentes



(TWIZEYIMANA; OJIAMBO; HAUDENSHIELD, 2011). Apesar do desconhecimento, ou ausência de ciclo sexual, a diversidade genética de *P. pachyrhizi* parece não estar enfraquecida. Isto pode ser explicado pela ocorrência de ciclo parassexual entre diferentes isolados após a fusão de tubos germinativos ou anastomose de hifas, uma característica já relatada em soja (VITTAL; YANG; HATMAN, 2012) e também em ferrugens de cereais (WANG; McCALLUM, 2009).

A resistência a *P. pachyrhizi* em soja é caracterizada por lesões castanho avermelhadas, também chamadas tipo RB (Reddish Brown), e pela ausência de lesões ou imunidade (IM). A resistência do tipo RB é incompleta, como evidenciado pela presença de urédias esporulantes no interior das lesões. A suscetibilidade, por sua vez, é caracterizada por lesões de coloração marrom claro, também chamadas do tipo TAN, e pode ser expressa em gradientes de suscetibilidade ou resistência parcial (MILES et al., 2011). Em estudos com inoculação artificial conduzidos em estufas, as combinações patógeno-hospedeiro, que resultam em reações do tipo RB, tendem a apresentar períodos de latência mais longos e com reduzido número de urédias, do que interações que produzem lesões suscetíveis do tipo TAN (BONDE et al., 2006; BROMFIELD, 1984; MARCHETTI; UECKER; BROMFIELD, 1975). A resistência específica a *P. pachyrhizi* é conhecida, e seis genes dominantes, foram identificados em cinco locos diferentes (BROMFIELD; HARTWIG, 1980; CALVO et al., 2008; CHAKRABORTY et al., 2009). Esses genes conhecidos conferem resistência a alguns isolados de *P. pachyrhizi*, mas não foram efetivos quando submetidos a outros isolados (PAUL; HARTMAN, 2009; PHAM et al., 2009).

O melhoramento de soja visando resistência a ferrugem asiática exige sólido conhecimento a respeito da origem, domesticação e evolução da cultura, métodos de testes, fontes de resistência, genética da resistência, métodos e estratégias de melhoramento, variabilidade do patógeno, equipes de pesquisa dedicadas e colaborando entre si, e recursos

durante longo período de tempo (SINGH; SCHWARTZ, 2011). Vários métodos de seleção podem ser utilizados para a identificação das progênies com as melhores combinações das características alvo. A escolha do método de seleção depende dos objetivos do melhoramento, da disponibilidade de maquinário e benfeitorias, e do tamanho e experiência da equipe.

Até o momento, a identificação de genótipos resistentes depende predominantemente de testes fenotípicos baseados em inoculações artificiais do patógeno. Além disso, como a resistência a ferrugem da soja é do tipo raça-específica, conferida por pelo menos seis genes distintos, a presença desses genes em um mesmo genótipo não pode ser verificada apenas com o auxílio de avaliações fenotípicas. A adoção de seleção assistida por marcadores moleculares permite a identificação, precisa e em gerações precoces, de genótipos portadores de genes de resistência, bem como a sua piramidação. Piramidação é a acumulação de genes em uma linhagem ou cultivar (MILACH; CRUZ, 1997). No entanto, a combinação de diferentes genes de resistência, via métodos tradicionais de melhoramento, encontra barreiras operacionais difíceis de serem resolvidas. Se vários genes de resistência específica são incorporados em um mesmo genótipo, e todos apresentam a mesma reação fenotípica frente ao patógeno, não é possível identificar quais indivíduos são portadores dos genes piramidados. Para isso, a seleção assistida por marcadores moleculares é uma ferramenta que fornece grande auxílio na identificação das progênies com os genes de resistência desejados.

Até meados da década de 60, os marcadores utilizados em estudos de genética e melhoramento eram controlados por genes associados a caracteres morfológicos, em geral fenótipos de fácil identificação visual, como nanismo, deficiência de clorofila, cor de pétala ou morfologia foliar. Entretanto, o pequeno número de marcadores morfológicos distintos em uma mesma linhagem reduzia a probabilidade de se encontrar associações significativas entre estes marcadores e caracteres de importância econômica através do estudo de populações segregantes. Portanto, só ocasionalmente é que marcadores morfológicos ligados a genes de

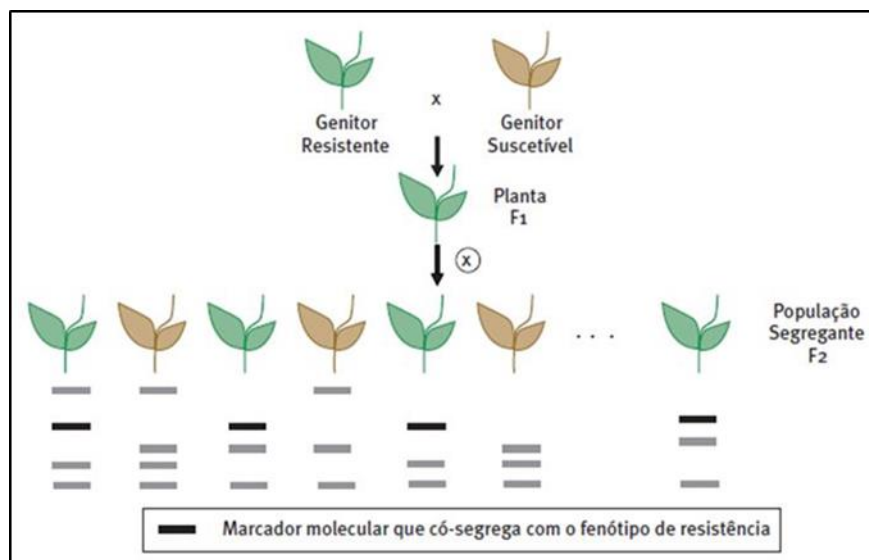
importância econômica eram identificados, limitando seu emprego em programas de melhoramento. A revolução neste quadro iniciou-se com o desenvolvimento de marcadores isoenzimáticos. O número de marcadores genéticos disponíveis foi ampliado em pelo menos uma ordem de magnitude, e a aplicabilidade da técnica passou a incluir potencialmente todas as espécies de plantas. Com o advento das técnicas modernas de biologia molecular, surgiram diversos métodos de detecção de polimorfismo genético diretamente ao nível de DNA. Aliadas, as técnicas de clonagem e sequenciamento de DNA tem possibilitado um rápido acúmulo de informações sobre a estrutura de genomas de eucariotos. Hoje, um número virtualmente ilimitado de marcadores moleculares altamente polimórficos pode ser obtido em qualquer organismo vivo, através de diversas técnicas. As principais vantagens dos marcadores moleculares e do seu uso na seleção assistida são: a) alto nível de polimorfismo dos marcadores, permitindo o estudo dos alelos de um grande número de locos em populações segregantes, oriundas de cruzamentos específicos; b) marcadores moleculares são, em geral, neutros em relação a efeitos fenotípicos, com mínimo ou nulo efeito epistático ou pleiotrópico; c) em geral, marcadores moleculares são co-dominantes, contendo maior quantidade de informação genética por loco; d) marcadores moleculares podem ser utilizados para caracterizar o genótipo de um indivíduo, a partir de amostras de células ou de tecidos, em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, possibilitando acelerar o processo de seleção e recombinação de indivíduos em programas de melhoramento; e) simplicidade da seleção assistida frente a métodos complexos de fenotipagem; f) a seleção assistida pode ser conduzida em qualquer estágio de desenvolvimento da população; g) os marcadores não sofrem influência do ambiente (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; CHAKRAVARTHI; NARAVANENI, 2006).

A ideia fundamental do uso de marcadores genéticos em melhoramento baseia-se no conceito de que se um determinado marcador de fácil identificação fenotípica estiver

fisicamente ligado à pequena distância de um gene que controla um caráter de interesse agrônômico, a seleção deste marcador resulta na seleção indireta do gene de interesse. A eficiência deste processo de seleção indireta, baseado na segregação conjunta do marcador e do gene, é uma função da distância entre os dois expressa em probabilidade de recombinação genética. Do ponto de vista teórico, o mapeamento de heranças monogênicas é bastante simples, uma vez que classes fenotípicas discretas ou semi-discretas são observadas. O esquema tradicional de mapeamento envolve o cruzamento de uma linhagem homocigota resistente com uma linhagem homocigota suscetível. A planta  $F_1$ , que pode ser suscetível ou resistente, dependendo se o alelo de resistência é dominante ou recessivo, é autofecundada para se obter a população  $F_2$  segregando para resistência e suscetibilidade. Esta população é submetida a uma pressão de inóculo do patógeno, e os fenótipos avaliados em condições controladas (Figura 2). Quando os fenótipos observados segregam de acordo com as proporções esperadas pelas leis de Mendel, a co-segregação do fenótipo e marcadores moleculares é analisada diretamente. Ou seja, a característica de resistência à doença é tratada como se fosse outro marcador (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). A partir da determinação do alelo ligado ao marcador molecular, as plantas que possuem o gene em particular ou QTL (Quantitative Trait Loci) podem ser identificadas a partir do genótipo em vez do fenótipo (JONAH et al., 2011).

Em muitas culturas, os marcadores moleculares têm sido utilizados com sucesso, onde os microssatélites e SNP (Single Nucleotide Polymorphism) têm sido os mais comumente utilizados para a seleção e mapeamento de regiões genômicas associadas com genes e QTL (Quantitative Trait Loci), como em soja (FUNGATI et al., 2004; MORCELI et al., 2008; DIAS et al., 2009), arroz (PINHEIRO et al., 2012) e milho (TEIXEIRA et al., 2013). A seleção assistida por marcadores moleculares (MAS) é utilizada em populações de soja desde 1990 na pré-seleção de características de herança simples (VISHNYAKOVA; SEFEROVA,

2013). Por definição, SNP (Single Nucleotide Polymorphism) é a variação de um único nucleotídeo em uma dada região do DNA genômico encontrada em mais de 1% da população (KIM; MISRA, 2007).



**Figura 2.** Princípio da análise de co-segregação de marcadores moleculares e características de interesse econômico (FALEIRO, 2011).

Para a realização deste trabalho, foram realizadas coletas de uredíniosporos de isolados de ferrugem asiática em diferentes locais de produção de soja. Estes isolados foram caracterizados quanto à reação causada em genótipos de soja contendo diferentes genes de resistência. A partir dessa caracterização foi traçado o perfil de virulência de cada isolado e a estabilidade relativa de cada gene frente aos diferentes isolados.

Genótipos com diferentes genes de resistência foram avaliados em casa de vegetação quanto a reação a *P. pachyrhizi*. Através da hibridação entre genótipos resistentes e suscetíveis foram geradas populações segregantes, onde a interação entre genótipo-fenótipo foi analisada com vistas à identificação de marcadores moleculares SNP (Single Nucleotide Polymorphism) associados a genes de resistência.

## OBJETIVOS

### Gerais

1. Fornecer uma visão ampla e profunda acerca da resistência da soja à ferrugem asiática, bem como servir como ferramenta para orientar futuras pesquisas a respeito do tema;
2. Identificar marcadores moleculares associados a genes de resistência à ferrugem asiática da soja;
3. Caracterizar fenotipicamente o perfil de virulência de isolados de *P. pachyrhizi* coletados em diferentes locais no Brasil.

### Específicos

1. Caracterizar fenotipicamente genótipos de soja candidatos a fontes de resistência a *P. pachyrhizi*;
2. Obter populações segregantes a partir de hibridações específicas entre genótipos resistentes e suscetíveis a ferrugem da soja;
3. Realizar inoculações artificiais de ferrugem nos indivíduos das populações visando identificar padrões de segregação fenotípica;
4. Obter isolados de *P. pachyrhizi* representativos de diferentes regiões produtoras de soja do Brasil;
5. Estabelecer uma metodologia para a coleta, isolamento, multiplicação e armazenamento de isolados de *P. pachyrhizi*;
6. Estudar a interação entre os diferentes isolados de *P. pachyrhizi* e genótipos de soja contendo diferentes genes de resistência.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXOPOULOS, G.J.; MIMS, W.; BLACKWELL, M. 1996. Introductory Mycology (4<sup>th</sup> Ed.). New York, Jhon Wiley e Sons.

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

BROMFIELD, K.R.; HARTWIG, E.E. 1980. Resistance to soybean rust and mode of inheritance. Crop Science 20:254-255.

BROMFIELD, K.R. 1984. Soybean Rust, Monograph No. 11. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.

CALVO, E.S.; KIIHL, R.A.S.; GARCIA, A.; HARADA, A.; HIROMOTO, D.M. 2008. Two major recessive soybean genes conferring soybean rust resistance. Crop Science 48:1350-1354.

CHAKRABORTY, N.; CURLEY, J.; FREDERICK, R.D.; HYTEN, D.L.; NELSON, R.L.; HARTMAN, G.L.; DIERS, B.W. 2009. Mapping and confirmation of a new allele at Rpp1 from soybean PI594538A conferring RB lesion-type resistance to soybean rust. Crop Science 49:783-790.

CHAKRAVARTY, B.K.; NARAVANENI, R. 2006. SSR marker based DNA fingerprinting and diversisty study in rice (*Oryza sativa* L.) African J. Biotech. 5(9):684-688.

DIAS, W.P.; SILVA, J.F.V.; CARNEIRO, G.E.S.; GARCIA, A.; ARIAS, C.A.A. 2009. Nematode de cisto da soja: biologia e manejo pelo uso da resistência genética. Nematologia Brasileira 33: 1-16.

FALEIRO, F.G. 2011. Princípios científico e análises genéticas utilizando marcadores moleculares. In: FALEIRO, F.G.; ANDRADE, S.R.M. 2011. Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. 730 p.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ªed. Brasília: Embrapa-Cenargen. 220 p.

FUNGATI, R.; BENEVENTI, M.A.; SILVA, J.F.V.; ARIAS, C.A.A.; MARIN, S.R.R.; BINNECK, E.; NEPOMUCENO, A.L. 2004. Identificação de marcadores moleculares de microssatélites para seleção de genótipos de soja resistentes a *Meloidogyne javanica*. Nematologia Brasileira 28: 125-130.

GREEN, A. 1984. Soybean Rust. Pests Not Known to Occur in the United States or of Limited Distribution. United States Department of Agriculture: USDA publication no. 56.

HIRAKURI, M.; LAZZAROTTO, J.J. 2014. O agronegócio da soja nos contextos mundial e brasileiro. Londrina: Embrapa Soja, 2014. 70 p.

ISARD, S.A.; GAGE, S.H.; COMTJOIS, P.; RUSSO, J.M. 2005. Principles of the atmospheric pathway for invasive species applied to soybean rust. BioScience 55: 851-861.

JONAH, P.M.; BELLO, L.L.; LUCKY, O.; MIDAU, A.; MORUPPA, S.M. 2011. The importance of Molecular Markers in Plant Breeding Programmes. Global Journal of Science Frontier Research Volume 11 Issue 5 Version 1.0.

KIM, S.; MISRA, A. 2007. SNP Genotyping: Technologies and Biomedical Applications. Annu. Rev. Biomed. Eng. 9: 289-320.

LEMES, E.; GAVASSONI, W.L. 2015. Ferrugem asiática da soja. In: Doenças da soja: melhoramento genético e técnica de manejo. Campinas, SP: Millennium Editora, 2015.



MILACH, S.C.K.; CRUZ, R.P. 1997. Piramidização de genes de resistência as ferrugens em cereais. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.27, n.4, p.685-689.

MILES, M.R.; BOMDE, M.R.; NESTER, S.E.; BERNER, D.K.; FREDERICK, R.D.; HARTMAN, G.L. 2011. Characterizing resistance to *Phakopsora pachyrhizi* in soybean. *Plant Dis.* 95:577-581.

MARCHETTI, M.A.; UECKER, F.A.; BROMFIELD, K.R. 1975. Uredial development of *Phakopsora pachyrhizi* in soybeans. *Phytopathology* 65:822-823.

MORCELI, T.G.S.; TREVISOLI, S.H.U.; MORCELI JUNIOR, A.A.; KIIHL, R.A.S.; CALVO, E.S.; DI MAURO, A.O.; GARCIA, A. 2008. Identificação e validação de marcadores microssatélites ligados ao gene Rpp5 de resistência a ferrugem asiática da soja. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 43: 1525-1531.

NAKAMURA, H. 1980. Desirable qualities of soybeans: Japanese view point. In: World Soybean Research Conference 11. Frederick, T.C. (Ed.), pp.1-7. March 26-27, 1979, Granada, Spain.

ONO, Y.; BURITICA, P.; HENNEN, J. 1992. Delimitation of *Phakopsora*, *Physopella*, and *Cerotylum* and their species on Leguminosae. *Mycological Research* 96:825-850.

PAUL, C.; HARTMAN, G.L. 2009. Sources of soybean rust resistance challenged with single-spored isolates of *Phakopsora pachyrhizi* collected from the USA. *Crop Sci.* 49:1781-1785.

PHAM, T.A.; MILES, M.R.; FREDERICK, R.D.; HILL, C.B.; HARTMAN, G.L. 2009. Differential responses of resistant soybean entries to isolates of *Phakopsora pachyrhizi*. *Plant Dis.* 93:224-228.

PINHEIRO, T.M.; ARAUJO, L.G.; SILVA-LOBO, V.L.; PRABHU, A.S.; FILIPPI, M.C. 2012. Tagging microsatellite marker to a blast resistance gene in the irrigated rice. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 12: 164-170.

SCHENEIDER, R.W. HOLLIER, C.A.; WHITMAN, H.K. 2005. First report of soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* in the continental United States. *Plant Disease* 89: 773-779.

TEIXEIRA, F.F.; COSTA, F.M.; SABATO, E.O. LEITA, C.E.P.; MEIRELES, W.F.; GUIMARÃES, C.T.; BELICUAS, N.J. 2013. Pré-melhoramento de milho quanto a resistência a enfezamentos. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 48: 51-58.

TWIZEYIMANA, M.; OJIAMBO, P.S.; HAUDENSHIELD, J.S. 2011. Genetic structure and diversity of *Phakopsora pachyrhizi* isolates from soybean. *Plant Pathology* 60: 719-729.

SINGH, S.P.; SCHWARTZ, H.F. 2011. Review: Breeding common bean for resistance to insect pests and nematodes. *Can. J. Plant Sci.* 91:239-250.

VISHNYAKOVA, M.; SEFEROVA, I. 2013. Soybean: A dawn to the legume world. *The journal of the International Legume Society* Issue. 1:1-7.

VITTAL, R.; YANG, H.C.; HARTMAN, G.L. 2012. Anastomosis of germ tubes and migration of nuclei in germ tube networks of the soybean rust pathogen, *Phakopsora pachyrhizi*. *Eur. J. Plant Pathol.* 132, 163-167. doi: 10.1007/s10658-011-9872-5

WANG, X.; McCALLUM, B. 2009. Fusion body formation, germ tube anastomosis, and nuclear migration during the germination of urediniospores of the wheat leaf rust fungus, *Puccinia triticina*. *Phytopathology* 99, 1355-1364. doi: 10.1094/PHYTO-99-12-1355

YORINORI, J.T. Fitopatologia. In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 19. 1997, Jaboticabal. Ata e Resumos.... Londrina: Embrapa, CNPSo, 1997. 362p.

## **CAPÍTULO 1 - A RESISTÊNCIA A FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA**

(Trabalho aceito para publicação no *Journal of Plant Pathology & Microbiology*)

## A RESISTÊNCIA A FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA

### RESUMO

A ferrugem asiática da soja (*P. pachyrhizi*) ocorre em todas as regiões produtoras de soja do mundo. Atualmente é considerada a doença foliar mais destrutiva da soja e pode causar perdas superiores a 80%. Até o momento, seis genes de resistência raça-específica foram identificados em introduções de plantas. No entanto, raças de *P. pachyrhizi* capazes de superar a resistência conferida por estes genes evoluem rapidamente. Devido a limitada disponibilidade de variedades resistentes, aplicação de fungicida é a única ferramenta de manejo disponível para os agricultores, o que aumenta significativamente o custo de produção e o risco de contaminação ambiental e humana. Assim, a transferência de genes de resistência através do melhoramento clássico, assistida por marcadores moleculares, permite o desenvolvimento de variedades resistentes e a sua utilização como um método eficiente e de baixo custo para controlar a ferrugem da soja. O objetivo desta revisão é fornecer uma visão ampla da resistência a ferrugem asiática da soja, e ser uma ferramenta útil para orientar futuras pesquisas.

**Palavras-chave:** Ferrugem asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, soja, *Glycine max*, resistência genética, gene *Rpp*.

## THE ASIAN SOYBEAN RUST RESISTANCE

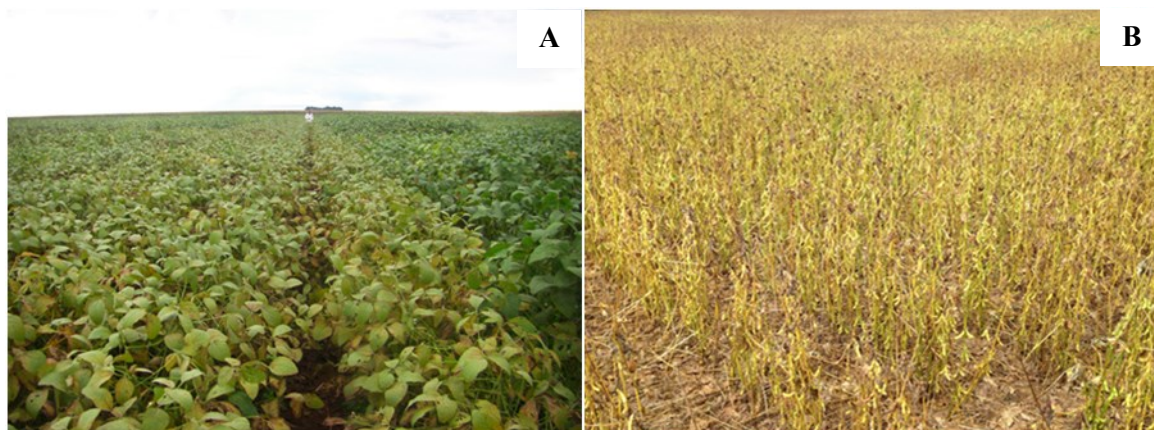
### ABSTRACT

Asian soybean rust caused by *P. pachyrhizi*, occurs in all soybean production regions of the world. Rust is the most destructive foliar disease of soybean and can cause yield losses of over 80%. To date, six race-specific resistance genes have been identified in plant introductions. However, races of *P. pachyrhizi* able to overcome the resistance conferred by these genes have evolved. Due to the limited availability of resistant varieties, fungicide application is the only management tool available for farmers, which significantly raises the production cost and the risk of environmental and human contamination. Thus, the transfer of resistance genes through classical breeding followed by marker-assisted selection allows the development of resistant varieties and their use as an efficient and cost-effective method for controlling soybean rust. The objective of this review is to provide a broad overview of the Asian soybean rust resistance, and a useful tool to guide future researches as well.

**Key Words:** Asian soybean rust, *Phakopsora pachyrhizi*, soybean, *Glycine max*, genetic resistance, *Rpp* gene.

## INTRODUCAO

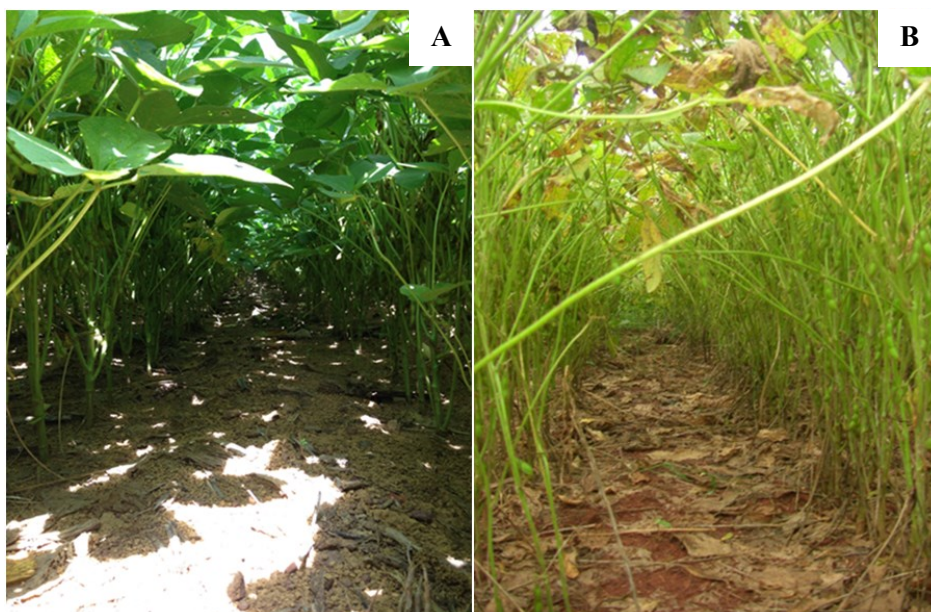
Atualmente a soja é uma das culturas oleaginosas mais importantes como fonte de proteína e óleo para alimentação humana e animal. Estresses bióticos, tais como patógenos, insetos e plantas daninhas podem causar impactos negativos na sua produção. Entre as doenças que atacam a cultura, a ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow & Sydow) é a mais destrutiva, e perdas acima de 80% são comuns quando as condições ambientais são favoráveis ao desenvolvimento da doença (Figura 1).



**Figura 1.** Lavoura de soja durante o período reprodutivo intensamente atacada por *Phakopsora pachyrhizi* (A), e a mesma lavoura, uma semana após, apresentando severa desfolha (B).

As plantas atacadas sofrem desfolha e maturação antecipada em relação a plantas não infectadas pela ferrugem, o que provoca redução no peso e qualidade dos grãos produzidos. Atualmente, devido a limitada disponibilidade de cultivares resistentes, a aplicação de fungicidas é a única ferramenta de controle disponível aos agricultores, o que eleva significativamente o custo de produção e o risco de contaminação ambiental e humana (Figura 2). Além disso, algumas populações do patógeno têm apresentado aumento na tolerância a certos fungicidas (GODOY et al., 2009). Em uma amostra de 82 isolados de *P. pachyrhizi* coletados na safra 2013/2014, 84% apresentaram a mutação F129L no gene do citocromo *b*.

Essa mutação causa a perda da sensibilidade aos fungicidas do grupo das estrobilurinas (KLOSOWSKI et al., 2015). Desse modo, a busca por cultivares resistentes é uma estratégia promissora como alternativa de controle economicamente e ambientalmente sustentável.



**Figura 2.** Aspecto do dossel de lavouras de soja com (A) e sem aplicação de fungicidas (B) para o controle de *Phakopsora pachyrhizi*. Onde não foi realizada a aplicação de fungicidas, percebe-se intensa perda de folhas causada pela doença.

A ferrugem asiática da soja está presente na maioria dos países que cultivam a soja. As primeiras epidemias de ferrugem surgiram por volta de 1914 em países do sudoeste asiático. Mas até a metade do século passado o fungo havia sido relatado apenas no leste da Ásia e na Austrália. Em 1970 foi relatada na Índia (BROMFIELD, 1984), em 1976 foi descrita em Porto Rico (VAKILI; BROMFIELD, 1976) e em 1994 no Hawai (KILLGORE; HEU; GARDNER, 1994). No continente africano, a introdução da ferrugem asiática em 1975 se deu provavelmente pelo transporte de uredíniosporos em correntes aéreas provenientes do oeste da Índia (CALDWELL; LAING, 2002). Em 2001 o fungo foi detectado pela primeira vez no Brasil e no Paraguai (MOREL, 2001; YORINORI et al., 2002; YORINORI et al., 2005;



COSTAMILAN; BERTAGNOLLI; YORINORI, 2002; REIS; CASA; MICHEL, 2002) e em 2003 na Argentina (IVANCOVICH, 2005; YORINORI et al., 2005; COSTAMILAN; BERTAGNOLLI; YORINORI, 2002; REIS; CASA; MICHEL, 2002). Nos Estados Unidos, o patógeno foi relatado pela primeira vez em 2004 (SCHNEIDER et al., 2005), onde as epidemias de ferrugem têm se limitado aos estados do Sul, com reduzido movimento em direção às regiões produtoras do Norte (CHRISTIANO; SCHERM, 2007). Não há relatos de efeitos econômicos negativos devido à ferrugem asiática nos Estados Unidos, embora reduções de produtividade acima de 33% tenham sido documentadas em experimentos de controle não tratados com fungicida (KEMERAIT et al., 2006). Na Argentina, epidemias de ferrugem asiática ocorrem todos os anos, mas a doença tipicamente somente é encontrada tardiamente durante a estação de crescimento e perdas significativas se limitam a alguns locais ao norte do país (IVANCOVICH, 2005).

A principal diferença no efeito da ferrugem asiática entre Argentina, Brasil e Estados Unidos está relacionada às características únicas do Brasil que aumentam o risco a ferrugem. O fungo *P. pachyrhizi* encontra condições de sobrevivência muito mais favoráveis no Brasil do que nos Estados Unidos ou Argentina. Nestes dois países, o inóculo sobrevive apenas nas regiões sul ou norte, respectivamente, devido às baixas temperaturas durante o inverno em altas latitudes (PIVONIA; YANG, 2004). Quando consideramos regiões de clima muito favorável do Brasil, como o cerrado tropical e o sul subtropical, com alto regime hídrico no verão, o risco de perdas substanciais causadas pela ferrugem asiática é muito alto quando comparado com a Argentina e os Estados Unidos. No Brasil, os principais agravantes das epidemias de ferrugem são a grande extensão das lavouras e a monocultura continuada, favorecendo a maior produção de inoculo e disseminação deste, além do aparecimento de diferentes isolados do patógeno. O clima favorável, falhas nas aplicações de fungicidas, alta densidade de plantas, período de semeadura que se estende de setembro a janeiro,

sobrevivência do patógeno em plantas voluntárias de soja e hospedeiros secundários que sobrevivem no período da entressafra, são fatores suplementares que diminuem a eficiência das medidas de controle da doença (YORINORI, NUNES JÚNIOR, 2006).

A resistência específica a *P. pachyrhizi* é conhecida, e seis genes dominantes já foram identificados: *Rpp1* (McLEAN; BYTH, 1980), *Rpp2* (BROMFIELD; HARTWIG, 1980), *Rpp3* (HARTWIG; BROMFIELD, 1983), *Rpp4* (HARTWIG, 1986), *Rpp5* (GARCIA et al., 2008) e *Rpp6* (LI et al., 2012). Esses genes conferem resistência a alguns isolados de *P. pachyrhizi*, mas não são efetivos contra todas as populações do patógeno (PHAM et al., 2009). A transferência desses genes de resistência através do melhoramento genético clássico ou através da seleção assistida por marcadores moleculares permite a obtenção de variedades resistentes e o seu uso como um método eficiente e de baixo custo para o controle da ferrugem da soja. Assim, o estudo a respeito dos genes responsáveis pela resistência à ferrugem, e de sua herança, é de extrema utilidade no desenvolvimento de cultivares. Alguns desses genes já identificados têm sido utilizados com relativo sucesso em programas de melhoramento de soja, embora a diversidade de isolados de ferrugem presentes na natureza seja um grande desafio a ser suplantado no futuro. O objetivo desta revisão é fornecer uma visão ampla e profunda acerca da resistência da soja à ferrugem asiática, bem como servir como ferramenta para orientar futuras pesquisas a respeito do tema.

## **O HOSPEDEIRO**

A soja (*Glycine max* L. Merr.) é originária do nordeste da China, onde surgiu como planta domesticada por volta do século XI A.C. A soja pertence ao Reino *Plantae*, Divisão *Magnoliophyta*, Classe *Magnoliopsida*, Ordem *Fabales*, Família *Fabaceae*, Gênero *Glycine*, Espécie *Glycine max* (USDA, 2015). Das 18 espécies conhecidas do gênero *Glycine*, a

espécie domesticada é a *Glycine max*, que possui número cromossômico igual a 20, e é cultivada nas regiões temperadas e subtropicais com fonte de óleo e proteína.

A soja é uma espécie que possui grande adaptabilidade a diferentes latitudes, solos e condições climáticas. Tem grande importância na dieta alimentar humana e animal, sendo considerada a mais importante fonte de proteína e óleo vegetal. Os grãos de soja contêm aproximadamente 20% de óleo e 40% de proteína na forma de aminoácidos essenciais. O óleo é utilizado predominantemente para consumo humano e como matéria-prima industrial, e os grãos, após a extração do óleo, são utilizados para alimentação animal (NAKAMURA, 1980).

No Brasil, a introdução da soja em escala comercial ocorreu na década de 1930, com o uso de cultivares norte-americanas originalmente adaptadas ao cultivo no sul dos EUA. No entanto, o grande aumento da área e da produção de soja deu-se na década de 80, quando o êxito obtido no melhoramento genético permitiu a expansão da cultura para áreas do cerrado (MATSUO, 2012). De uma área igual a 1,29 milhões de hectares e uma produção de 2,2 milhões de toneladas em 1980, a região passou a cultivar 5,08 milhões de hectares, com uma produção de 10,3 milhões de toneladas, em 1989. Atualmente a soja é uma das mais importantes culturas produzidas no Brasil e responde por 46% do total de grãos produzidos no País. Na safra 2014/15, a produção brasileira de soja atingiu 96 milhões de toneladas, representando um incremento de 11,5% em relação à safra anterior (CONAB, 2015). As exportações originadas pela cadeia produtiva da oleaginosa alcançaram quase US\$ 31 bilhões e representaram 31% do total exportado pelo agronegócio nacional (HIRAKURI; LAZZAROTTO, 2014). Em nível mundial a soja é cultivada em aproximadamente 118 milhões de hectares, com uma produção estimada em 315 milhões de toneladas (USDA, 2015). O Brasil é o segundo produtor mundial e responde por aproximadamente 30% da produção mundial da oleaginosa. Em primeiro lugar estão os Estados Unidos, com uma

produção de 108 milhões de toneladas em uma área de 33,6 milhões de hectares, o que representa 34% do total produzido mundialmente.

## O PATÓGENO

O fungo causador da ferrugem asiática da soja pertence ao Reino Fungi, Filo Basidiomycota, Subfilo Pucciniomycotina, Classe Pucciniomycetes, Ordem Pucciniales, Família Phakopsoraceae, Genero *Phakopsora*, Espécie *Phakopsora pachyrhizi* (CABI,2015). Até o presente momento, os estádios descritos do fungo foram o uredinial, telial e basidial. Os estádios espermogonial e aecial ainda não foram relatados (GREEN, 1984). Como os demais fungos do grupo, *P. pachyrhizi* é um fungo biotrófico que requer um hospedeiro vivo para parasitar e sobreviver.

Naturalmente, *P. pachyrhizi* infecta 31 espécies de leguminosas em 17 gêneros (SINCLAIR; HARTMAN, 1996). Citam-se como os principais hospedeiros *Glycine max*, *G. soja*, *Pachyrhizus erosus*, *Pueraria lobata* e *Vigna unguiculata*. Complementando, Yeh et al. (1981) relatam que o fungo pode atacar até 87 hospedeiros. Já segundo Bromfield (1984), esse número pode chegar a até 95 hospedeiros.

Os sintomas causados pela ferrugem da soja são diferentes daqueles causados pelos demais tipos de ferrugens. Como os corpos de frutificação são pouco evidentes, não é possível distinguir a olho nu as pústulas ferruginosas comuns a este grupo de doenças. Os sintomas caracterizam-se por pequenas lesões ou pontos de coloração parda a marrom escuro, com uma ou mais uredínias, principalmente na face inferior dos folíolos. As lesões tendem a ter contornos angulares com 2 a 5 mm de diâmetro. Podem ocorrer nos pecíolos, vagens e hastes. A coloração das lesões varia com a idade e com a interação entre o genótipo do hospedeiro e o isolado do patógeno. As lesões novas são inicialmente mais claras, tornando-se escuras à medida que envelhecem.

Os uredíniosporos são o principal inoculo da ferrugem asiática da soja. Estes são uredíniosporos assexuais, pequenos e leves, que são removidos das uredínias quando a superfície foliar infectada encontra-se seca. Após a remoção, podem ser transportados por correntes aéreas a longas distâncias, o que explica sua disseminação de um continente a outro. Na presença de água líquida e temperatura entre 21 e 25 °C, os uredíniosporos depositados na superfície foliar do hospedeiro iniciam o processo de germinação e infecção. A penetração do parasita ocorre através da cutícula e da parede da célula epidérmica do hospedeiro. A penetração direta, em vez de através dos estômatos, é uma característica que diferencia *P. pachyrhizi* de outros fungos causadores de ferrugens. A colonização inicia-se logo após a penetração, pela formação do primeiro septo separando a hifa de penetração da hifa primária. A ramificação da hifa primária dá origem a formação de um micélio denso, preenchendo os espaços intercelulares e inserindo haustórios nas células do mesófilo e epidérmicas. A reprodução inicia-se aproximadamente aos oito dias após a inoculação, e a primeira evidência disto é a agregação de hifas formando o primórdio uredínial. As uredínias tem aparência pardo-clara a pardo-avermelhada, sendo subepidérmicas e erumpentes. Em torno de 3-4 dias mais tarde, inicia-se a produção de uredíniosporos. Segundo Alves et al. (2006), o período de latência, que é o intervalo de tempo entre a inoculação e o aparecimento de 50% das lesões esporulantes, varia em função da temperatura, sendo menor em temperaturas em torno de 23 °C, concordando com estudos anteriores de Melching et al. (1989).

## **VARIABILIDADE DO PATÓGENO**

Em relação à variabilidade do patógeno, a produção assexual de uredíniosporos sugere uma baixa diversidade genética no campo, com um reduzido número de linhagens clonais e eventos recorrentes (TWIZEYIMANA; OJIAMBO; HAUDENSHIELD, 2011). Em geral, dados moleculares de diferentes marcadores mostram que a diversidade genética em *P.*

*pachyrhizi* é baixa entre grandes áreas geográficas e alta quando é considerada a variação dentro das populações locais. A alta capacidade de dispersão a longas distâncias possibilita que genótipos virulentos de *P. pachyrhizi* movam-se rapidamente entre diferentes populações. Na Nigéria, *P. pachyrhizi* apresenta aproximadamente 90% de sua diversidade genética dentro dos campos de soja, com pequena diversidade distribuída entre os campos (TWIZEYIMANA; OJIAMBO; HAUDENSHIELD, 2011; FREIRE; OLIVEIRA; ALMEIDA, 2008; FREIRE et al., 2012; ZHANG; FREIRE; LE, 2012).

Por outro lado, a presença de genes de resistência no hospedeiro não leva à redução da frequência de genes de virulência em populações do patógeno. A provável explicação para este fato é que a reprodução assexual não é o único modo de reprodução de *P. pachyrhizi*. A anastomose do tubo germinativo e das hifas, e a possibilidade de ocorrência de ciclo parassexual (VITTAL; YANG; HARTMAN, 2012; ISARD et al., 2005), contribuem para o aumento da diversidade genética do patógeno a nível local. Desse modo, o melhoramento genético visando resistência à doença, não deve negligenciar a probabilidade de conversão de isolados avirulentos em isolados virulentos. Além disso, o desenvolvimento local de variedades contendo apenas um gene de resistência expõe essas variedades a populações do patógeno contendo a gama completa de variação genética presente a nível regional.

O tamanho do genoma de *P. pachyrhizi* foi estimado entre 300 e 950 Mb, dependendo do método de análise utilizado (BUIRAGO-POSADA; BOORE; FREDERICK, 2005). Informação similar foi fornecida por Igor Grigoriev, sugerindo um genoma maior que 850 Mb (DUPLESSIS; JOLY; DODDS, 2012). Entretanto, devido ao desconhecimento a respeito do grau de heterozigotidade entre ou dentro do genoma dicariótico do fungo, este tamanho pode estar superestimado. É possível que o genoma de *P. pachyrhizi* tenha sofrido um alto nível de duplicação de genes durante sua evolução juntamente com uma importante atividade de

elementos transponíveis, o que pode explicar a enorme tamanho do genoma estimado para essa espécie.

## **RESISTÊNCIA**

As plantas geralmente apresentam dois mecanismos de defesa contra patógenos, resistência raça-específica e resistência inespecífica. A resistência raça-específica é controlada pelos genes R e geralmente é menos durável. Por outro lado, a resistência inespecífica é poligênica e mais durável (GILL; LEE; MYSORE, 2015).

Durante as primeiras fases da infecção, todas as classes de patógenos liberam moléculas efetoras nas células da planta para favorecer seu estabelecimento. Em resposta, as plantas evoluíram sistemas imunes dinâmicos como defesa contra os patógenos. A percepção de padrões associados a patógenos (PAMPs – pathogens associated molecular patterns) por parte dos receptores extracelulares de reconhecimento de patógenos (PRRs – pathogens recognition receptors) é o primeiro estágio de defesa basal das plantas. As moléculas PAMPs são estruturas ou componentes essenciais conservados por todas as classes de patógenos, e englobam oligogalacturonídeos, ergosterol, flagelina, xylanases, proteínas de choque-térmico e lipopolissacarídeos. Tal resposta é referida como imunidade disparada por PAMP (PTI – PAMP triggered immunity) e ativa uma miríade de processos, incluindo a cascata de proteínas quinases (MAPK - mitogen-activated protein kinase) e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS – reactive oxygen species). De acordo com o modelo zig-zag proposto por Jones e Dangl (2006), as plantas possuem numerosos receptores do tipo PRR para reconhecimento de moléculas PAMPs e iniciar as respostas basais de defesa. Entretanto, alguns patógenos podem secretar efetores chamados ETS (effector-triggered susceptibility) para evadir o reconhecimento pelas moléculas PRR e para o crescimento e virulência do patógeno. Em resposta, as plantas disparam proteínas R que interagem direta ou indiretamente

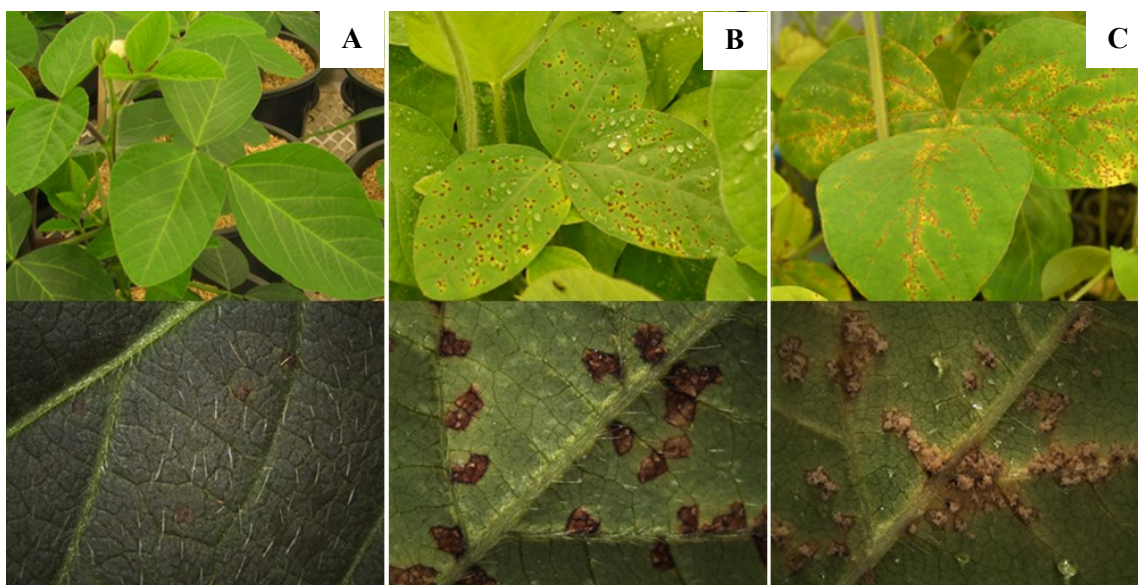
com os efetores ou proteínas do patógeno induzindo forte resposta de defesa, chamada de imunidade disparada por efetores (ETI – effector-triggered immunity). A ETI dispara a síntese de ácido salicílico e sinalização, levando à resistência sistêmica adquirida contra patógenos biotróficos (GILL; LEE; MYSORE, 2015).

De acordo com Van de Mortel et al. (2007), uma resposta genica bi-fásica ocorre em genótipos resistentes e suscetíveis como resposta à infecção por *P. pachyrhizi*. A primeira resposta transcricional observada em plantas suscetíveis e resistentes pode representar uma resposta geral não-específica de reconhecimento de qualquer patógeno, presumivelmente através da interação com moléculas PAMPs. Em contraste, a segunda resposta parece relacionada com a detecção de *P. pachyrhizi* pelos genes R mediada pela rota ETI. Tipicamente a rota ETI culmina na resposta de hipersensibilidade que retarda o crescimento do patógeno, particularmente nas interações envolvendo patógenos produtores de haustórios.

Existem três tipos de resposta da soja à infecção por *P. pachyrhizi*, que tem se mostrado associadas a genes de resistência qualitativa (Figura 3). O primeiro tipo é a imunidade ou resistência completa, onde não se observa a formação de sinais macroscópicos da infecção do patógeno, nem a presença de estruturas reprodutivas, como uredínias ou uredíniosporos. O segundo tipo são as lesões denominadas RB, associadas a reação de resistência incompleta, devido à presença de uredínias esporulantes no interior das lesões. Segundo Parlevliet (1979) e Ribero Do Vale et al. (2001), resistência incompleta é definida como a resistência que permite algum crescimento ou reprodução do patógeno nos tecidos do hospedeiro. Por último, as lesões classificadas como TAN, indicativas de suscetibilidade (MILES et al., 2011). Estudos de interação patógeno-hospedeiro mostram que as lesões do tipo RB tendem a apresentar período de latência mais longo, uredínias menores e em menor número do que em lesões do tipo TAN. Embora as lesões do tipo RB possam apresentar variações na coloração, desde vermelho-claro até o vermelho-escuro, e lesões algumas vezes



maiores do que as do tipo TAN. Estas observações sugerem que a cor das lesões possa não ser um indicativo confiável de resistência ou suscetibilidade (BONDE et al., 2006; BROMFIELD, 1984; MARCHETTI; UECKER; BROMFIELD, 1975).



**Figura 3.** Os três tipos de resposta qualitativa da soja à infecção por *Phakopsora pachyrhizi*: imunidade ou resistência completa (A), lesões RB ou resistência incompleta (B) e lesões TAN indicativas de suscetibilidade (C).

A ampla variação no tipo de reação em relação a cor e intensidade da esporulação observada no campo pode ser um fator de dificuldade em estudos de caracterização de genótipos (WALKER et al., 2014). Embora o tipo de lesão seja amplamente utilizado em estudos com plântulas e folhas destacadas em inoculações com isolados específicos, o surgimento de lesões de ferrugem em plantas adultas é frequentemente diferente das lesões RB e TAN relatadas originalmente por Bomfield & Hartwig (1980). Além da influência do genótipo do hospedeiro e do patógeno nos níveis de esporulação, a coloração da lesão em plantas adultas é influenciada pela idade da lesão, especialmente no campo onde os eventos de infecção são mais ou menos contínuos. No trabalho de Miles et al. (2011), as reações do tipo RB e imunidade foram consideradas as únicas formas de expressão da resistência. Entretanto,

a resistência parcial também ocorreu na interação entre *P. pachyrhizi*-soja, visto que foram observadas diferenças entre os acessos que apresentaram lesões do tipo TAN. A variação no número de uredínias dentro de lesões do tipo TAN é um dos parâmetros a serem considerados na diferenciação de genótipos com resistência parcial e está inversamente correlacionado com a produtividade (BONDE et al., 2006; BROMFIELD, 1984; YEH; SINCLAIR; TSCHANZ, 1982; WANG; HARTMAN, 1992).

A interação incompatível mediada pelo gene *Rpp1* apresenta fenótipo imune (MILES; FREDERICK; HARTMAN, 2006), enquanto a resistência conferida pelos outros genes é caracterizada por limitado crescimento e esporulação do fungo e a formação de lesões do tipo RB (BONDE et al., 2006). Linhagens de soja com resistência parcial são classificadas como moderadamente resistentes em avaliações de campo devido ao desenvolvimento de poucas lesões e limitada esporulação durante a estação de crescimento (WANG; HARTMAN, 1992). Resistência inespecífica também tem sido observada. Atua reduzindo a quantidade e a taxa de desenvolvimento da ferrugem, mesmo se o tipo de infecção produzida for semelhante ao de cultivares altamente suscetíveis (BROMFIELD, 1984). Este tipo de resistência pode ser efetiva contra a maioria das populações do patógeno, sendo mais útil que a resistência raça-específica. As dificuldades associadas com ambos tipos de resistência, raça-específica e parcial, têm levado à busca por novos tipos de resistência, como a tolerância, que pode ser utilizada para minimizar as perdas de produtividade (AVRDC, 1992). A tolerância é definida como a habilidade relativa da soja em produzir sob o estresse causado pela ferrugem. Este tipo tem sido utilizado para minimizar as perdas de produtividade associadas com a ferrugem da soja (TSCHANZ; TSAI, 1983; KAWUKI; TUKAMUHABWA; ADIPALA, 2004).

O primeiro relato de resistência específica da soja a *P. pachyrhizi* ocorreu na década de 70 (YANG, 1977). No ano de 1975, o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), em cooperação com o Centro de Pesquisa e Desenvolvimento Vegetal da Ásia

(AVRDC), testou aproximadamente 16.000 entradas contra uma mistura de cinco isolados, onde aproximadamente 805 acessos apresentaram baixa severidade ou lesões do tipo RB. Estes acessos foram considerados fontes potenciais de resistência. No entanto, não foi possível determinar se tais acessos resistentes representavam fontes de novos genes ou apenas fontes alternativas para os mesmos quatro genes já conhecidos naquela época. Esta ainda é uma questão importante a ser respondida a respeito das novas fontes de resistência identificadas em trabalhos recentes. Estudos realizados na Austrália por McLean (1979) e McLean & Byth (1980) constataram que a resistência da PI200492 a certas raças de *P. pachyrhizi* é controlada por um gene dominante simples e o denominaram com as letras *Rpp*. Paralelamente, Singh & Thapliyal (1977), na Índia, relataram que o acesso PI462312 também carrega um gene dominante simples.

Na década de 1980 surgiram os primeiros relatos indicando a ocorrência de variabilidade na população do patógeno. Em teste realizado por Bromfield & Hartwig (1980), os acessos PI200492, Tainung 3, Tainung 4 e PI462312, apresentaram suscetibilidade ao isolado proveniente de Taiwan e resistência ao isolado oriundo da Índia. Por outro lado, os acessos PI230970 e PI230971 apresentaram apenas lesões do tipo RB, indicativas de resistência, quando inoculados com isolados provenientes da Austrália, Índia, Taiwan e Filipinas. Nessa mesma linha, os resultados de Hartwig & Bromfield (1983) indicam que os genes *Rpp1*, *Rpp2* e *Rpp3* não apresentam o mesmo espectro de ação contra diferentes isolados de ferrugem. Enquanto os genes *Rpp1* e *Rpp3* conferiram resistência unicamente ao isolado proveniente da Índia, o gene *Rpp2* conferiu resistência aos isolados oriundos da Índia e de Taiwan. Quando associados, os genes *Rpp1* e *Rpp3* conferiram reação intermediária entre imunidade e resistência incompleta. Esses resultados permitiram aos autores concluir que os acessos PI200492, PI230970 e PI462312 carregam diferentes genes de resistência dominantes localizados em locos diferentes. Segundo a interpretação dos autores, os isolados capazes de

atacar a PI200492 tornaram-se prevalentes na população do fungo em Taiwan. Uma vez que os acessos PI230971 e PI230971, provenientes do Japão, foram os únicos que apresentaram resistência aos quatro isolados testados, passaram a ser de fundamental importância para os programas de melhoramento da época. Nesse período, um conjunto de 11 diferenciadoras contendo genes que conferem resistência raça-específica: PI200492, PI462312, PI230970, PI230971, PI293871A, PI239871B, PI459024, PI459025, Tainung 4, Taita Kaohsiung No.5 e Wayne, passaram a ser recomendadas pelo Centro Asiático de Desenvolvimento de Pesquisa Vegetal (AVRDC) para a diferenciação de isolados de ferrugem (TSCHANZ; SHANMUGASUNDARAM, 1985).

Entre os anos 2000 e 2010, com a incorporação dos genes *Rpp1* e *Rpp2* em programas de melhoramento na Ásia, a partir dos acessos PI200492 e PI230970, respectivamente, a resistência desses genes foi rapidamente suplantada (HARTMAN; MILES; FREDERICK, 2005). De modo semelhante, a efetividade desses genes foi perdida apenas dois anos após a ferrugem asiática ter sido identificada no Brasil (YORINORI et al., 2005). Por outro lado, a resistência conferida pelos genes *Rpp2* e *Rpp4*, oriundos dos acessos PI230970 e PI459025, permaneceram efetivos durante esse período (GARCIA et al., 2008; SILVA et al., 2008).

Em estudos realizados por Miles et al. (2011), a severidade da ferrugem não mostrou relação com o tipo de lesão. Entre os acessos com reação do tipo RB, as PI561356 e PI594538A mostraram menores níveis de severidades do que as PI230970, PI423972 e PI459025B, que estavam entre os acessos com mais altos índices de severidade. Por outro lado, entre os acessos que apresentaram reação do tipo TAN e baixos níveis de severidade, as PI548463, PI548484 e PI549017 produziram uredínias similares em tamanho e número por lesão daquelas apresentadas pela cultivar suscetível Williams, indicando ausência de relação entre a severidade da doença e a reprodução do fungo.

Walker et al. (2014), estudando a reação a ferrugem de acessos com genes de resistência já relatados na literatura, em experimentos a campo no sul dos Estados Unidos, observaram que os genes *Rpp1*, presente na PI200492, e o gene *Rpp6*, identificado na PI567102B, conferiram altos níveis de resistência na maioria dos locais. Os acessos portadores dos genes *Rpp2*, *Rpp3*, *Rpp4* e *Rpp5*, apresentaram resistência incompleta e desenvolveram níveis moderados de ferrugem quando comparadas com as testemunhas suscetíveis. Embora os genes *Rpp2*, *Rpp3* e *Rpp4* tenham condicionado menores níveis de resistência do que os genes *Rpp1* e *Rpp6* no campo, esta moderada resistência foi estável nos diferentes locais observados. Em relação aos acessos relatados na literatura como resistentes, mas cujos genes ainda não foram mapeados, a PI567104B apresentou níveis de resistência equivalentes aos da PI567102B (*Rpp6*). Coincidentemente estes dois acessos são oriundos do mesmo centro de pesquisa na Indonésia, embora o grau de parentesco entre eles seja desconhecido. Os acessos PI416826A, PI417125, PI567024, PI567025A, PI567034 e PI605823 também apresentaram bons níveis de resistência contra a maioria das populações de *P. pachyrhizi*. Ainda nesse trabalho, o autor discute que as variações observadas na intensidade da ferrugem entre os diferentes anos do estudo concordam com os resultados obtidos em testes em casa de vegetação e folha destacada, que mostraram a existência de variação de virulência entre os isolados de *P. pachyrhizi* oriundos do sul dos Estados Unidos (TWIZEYIMANA; OJIAMBO; HAUDENSHIELD, 2011). Os autores relatam ausência de imunidade entre os acessos testados e a ocorrência, em baixa frequência, de uredínias esporulantes, mesmo nos acessos altamente resistentes, como as PI200492 e PI567102B. Isto indica que, provavelmente em alguns locais, a população do fungo é heterogênea e contém um ou mais isolados em pequena frequência capazes de suplantar a resistência conferida pelos genes *Rpp1* e *Rpp6*. Observaram também que a moderada resistência condicionada por alguns genes pode dificultar a distinção entre resistência quantitativa e resistência monogênica a *P.*

*pachyrhizi*. Um exemplo é o caso da PI506764 (Hyuuga), portadora de genes de resistência nos locus *Rpp3* e *Rpp5* (KENDRICK et al., 2011), mas cuja classificação a campo foi a mesma da PI200492 (*Rpp1*) e da PI462312 (*Rpp3*).

Recentemente Chen et al. (2015) identificaram um novo alelo de resistência localizado no cromossomo 18, onde já foram identificados vários alelos do grupo *Rpp1*. Segundo os autores, o loco identificado difere daqueles anteriormente identificados nas PI200492 (HYTEN et al., 2007), PI587886 e PI587880A (RAY et al., 2009), PI561356 (KIM et al., 2012) e PI594538A (CHAKRABORTY et al., 2009). Segundo Ray et al. (2009), a resistência observada nos acessos PI587886 e PI587880A é controlada por um alelo do gene *Rpp1* com dominância incompleta. A presença de lesões do tipo RB nos indivíduos heterozigotos (*Rpp1/rpp1*), e imunidade ou lesões TAN nos indivíduos homozigotos (*Rpp1/Rpp1* ou *rpp1/rpp1*), são indicativos dessa forma de controle genético da resistência para esse gene. Além disso, a presença de três classes de lesões (Imunidade, RB e TAN) nas populações de mapeamento é um indicativo de dominância incompleta.

Até o momento, alelos de resistência à ferrugem asiática da soja foram identificados e mapeados em diversos locos dos cromossomos 3, 6, 16 e 18 (Tabela 1).

**Tabela 1.** Principais acessos utilizados como fontes de genes de resistência a *Phakopsora pachyrhizi* mapeados no genoma da soja.

ACESSO	GENE	CROMOSSOMO (GRUPO DE LIGAÇÃO)	MARCADOR MOLECULAR	REFERÊNCIAS
PI200492	<i>Rpp1</i>	18 (G)	Satt191 - Sat064	McLean & Byth, 1980; Hyten et al., 2007.
PI587866	<i>Rpp1</i>	18 (G)	Satt191 - Sat064	Ray et al., 2009.
PI587880A	<i>Rpp1</i>	18 (G)	Satt191 - Sat372	Ray et al., 2009.
PI561356	<i>Rpp1</i>	18 (G)	SSSR50 - SSSR1859	Kim et al., 2012.
PI587905	<i>Rpp1</i>	18 (G)	Sat064 - SSR66	Hossain et al., 2014.
PI594760B	<i>Rpp1</i>	18 (G)	Sat117 - Sct187	Garcia et al., 2011.
PI594767A	<i>Rpp1</i>	18 (G)	Sat064 - Satt191	Hossain et al., 2014.
PI594538A	<i>Rpp1-b</i>	18 (G)	Sat064 - Sat372	Chakraborty et al., 2009.
PI230970	<i>Rpp2</i>	16 (J)	Sat255 - Satt620	Hartwig & Bromfield, 1980; Silva et al., 2008.
PI224270	<i>rpp2</i>	16 (J)	Satt215 - Sat361	Garcia et al., 2008.
PI462312	<i>Rpp3</i>	6 (C2)	Satt460 - Sat263	Hartwig & Bromfield, 1983; Hyten et al., 2009.
PI416764	<i>Rpp3</i>	6 (C2)	Sat263 - Satt307	Hossain et al., 2014.
PI567099	<i>rpp3</i>	6 (C2)	Satt460 - Staga001	Ray et al., 2011.
PI506764	<i>Rpp3/Rpp5</i>	6/3 (C2/N)	Satt460 - Sat263/Sat275 - Sat280	Monteros et al., 2007; Kendrick et al., 2011.
PI200487	<i>Rpp3/Rpp5</i>	6/3 (C2/N)	Satt460 - Sat263/Sat275 - Sat280	Garcia et al., 2008; Kendrick et al., 2011.
PI471904	<i>Rpp3/Rpp5</i>	6/3 (C2/N)	Satt460 - Sat263/Sat275 - Sat280	Kendrick et al., 2011.
PI459025	<i>Rpp4</i>	18 (G)	Satt288 - AF162283	Hartwig, 1986; Silva et al., 2008.
PI459025B	<i>Rpp4</i>	18 (G)	Satt288 - AF162283	Silva et al., 2008.
PI200456	<i>rpp5</i>	3 (N)	Sat275 - Sat280	Garcia et al., 2008.
PI200526	<i>Rpp5</i>	3 (N)	Sat275 - Sat280	Garcia et al., 2008.
PI567102B	<i>Rpp6</i>	18 (G)	Satt324 - Satt394	Li et al., 2012.

Cultivares resistentes são ferramentas úteis na redução das perdas econômicas provocadas pela doença, no entanto, cultivares com um único gene de resistência tendem a ser rapidamente quebradas (BROMFIELD, 1984; HARTMAN; MILES; FREDERICK, 2005; YORINORI, 2008). A efetividade da resistência específica, muitas vezes é de curta duração, especialmente quando associada à patógenos biotróficos, com alto potencial de variabilidade da virulência, como é o caso de *P. pachyrhizi*. Genótipos com dois genes de resistência piramidados tendem a expressar maior resistência que genótipos com um único gene (MAPHOSA; TALWANA; TUKAMUHABWA, 2012; YAMANAKA et al., 2011). Lemos et al. (2011) e Yamanaka et al. (2013) relataram que um genótipo com três genes de resistência (*Rpp2*, *Rpp4* e *Rpp5*) apresentou significativamente maior resistência do que seu ancestral, mostrando que a estratégia de piramidação é efetiva para aumentar a resistência a ferrugem.

Os principais fatores que determinam quais estratégias e métodos devem ser empregados no melhoramento de soja visando resistência a ferrugem incluem a distância genética entre a cultivar a ser melhorada e o germoplasma doador da resistência, os métodos

de screening disponíveis, a genética da resistência e o número de características a serem melhoradas (SINGH et al., 2011). O melhoramento de soja para resistência a ferrugem tem se concentrado em genes de efeito qualitativo, os quais apresentam conhecidas limitações de estabilidade no controle de doenças. Além disso, a presença de múltiplos genes de virulência na população do patógeno e a falta de múltiplos genes de resistência no hospedeiro confere uma vantagem competitiva à ferrugem, e torna a resistência raça-específica pouco efetiva e de curta duração (TSCHANZ; WANG; TSAI, 1985). Nesse sentido, Ribeiro et al. (2009) sugerem o melhoramento visando resistência poligênica seja mais efetivo na obtenção de resistência durável. Com a obtenção e liberação de novas cultivares resistentes, espera-se que naturalmente surjam novas raças de ferrugem. Assim, é fundamental a contínua identificação de novos genes, acompanhada pelo desenvolvimento de marcadores moleculares que permitam o uso da seleção assistida em programas de melhoramento.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AVRDC, 1992. Annotated bibliography of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow). Asian Vegetable Research and Development Center (AVRDC). Library Bibliography series 4-1, Tropical Vegetable Information Service. AVRDC. 160 pp.

BONDE, M.R.; NESTER, S.E.; AUSTIN, C.N.; STONE, C.L.; FREDERICK, R.D.; HARTMAN, G.L.; MILES, M.R. 2006. Evaluation of virulence of *Phakopsora pachyrhizi* and *P. meibomia*e isolates. Plant Disease 90, 708-16.

BROMFIELD, K.R.; HARTWIG, E.E. 1980. Resistance to soybean rust and mode of inheritance. Crop Science 20, 254-55.

BROMFIELD, K.R. 1984. Soybean Rust. Monograph no.11. St. Paul, USA: American Phytopathological Society, Dissertation.

BUITRAGO-POSADA, M.L.; BOORE, J.L.; FREDERICK, R.D. 2005. Soybean Rust Genome Sequencing Project. In: Proceedings of the National Soybean Rust Symposium, Nashville, USA.

CABI, 2015. Invasive Species Compendium. Disponível em: [www.cabi.org/isc/datasheet/40019](http://www.cabi.org/isc/datasheet/40019). Data de consulta: 15/11/2015.

CALDWELL, P.; LAING, M. 2002. Soybean rust – A new disease on the move. Characterization of *Phakopsora pachyrhizi* (Uredinia and telia) in Argentina. Plant Disease 89, 109.

CHAKRABORTY, N.; CURLEY, J.; FREDERICK, R.D.; HYTEN, D.L.; NELSON, R.L.; HARTMAN, G.L.; DIERS, B.W. 2009. Mapping and confirmation of a new allele at *Rpp1*

from soybean PI594538A conferring RB lesion-type resistance to soybean rust. *Crop Science* 49, 783-90.

CHEN, H.; ZHAO, S.; YANG, Z.; SHA, A.; WAN, Q.; ZHANG, C.; CHEN, L.; YUAN, S.; QIU, D.; CHEN, S.; SHAN, Z.; ZHOU, X. 2015. Genetic analysis and molecular mapping of resistance gene to *Phakopsora pachyrhizi* in soybean germplasm SX6907. *Theor Appl Genet* Online [doi: 10.1007/s00122-015-2468-2].

CHRISTIANO, R.C.S.; SCHERM, H. 2007. Quantitative aspects of the spread of Asian soybean rust in the southeastern United States, 2005 to 2006. *Phytopathology* 97, 1428-33.

CONAB, 2015. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. Brasília, Brasil: CONAB publication n. 6. (<http://www.conab.gov.br>).

COSTAMILAN, L.M.; BERTAGNOLLI, P.F.; YORINORI, J.T. 2002. Perda de rendimento de grãos de soja causada pela ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*). *Fitopatologia Brasileira* 27, 100.

DUPLESSIS, S.; JOLY, D.J.; DODDS, P.N. 2012. Rust Effectors. In: Martin F, Kamoun S, eds. *Effectors in Plant-Microbe Interaction*. Chichester: John Wiley and Sons, Ltd, 155-93.

FREIRE, M.C.M.; OLIVEIRA, L.O.; ALMEIDA, A.M.R. 2008. Evolutionary history of *Phakopsora pachyrhizi* (the Asian soybean rust) in Brazil based on nucleotide sequence of the internal transcribed spacer region of the nuclear ribosomal DNA. *Genetics and Molecular Biology* 31, 920-31.

FREIRE, M.C.M.; SILVA, M.R.; ZHANG, X.C.; ALMEIDA, A.M.R.; STACEY, G.; OLIVEIRA, L.O. 2012. Nucleotide polymorphism in the 5.8S nrDNA gene and internal

transcribed spacers in *Phakopsora pachyrhizi* viewed from structural models. *Fungal Genetics and Biology* 49, 95-100.

GARCIA, A.; CALVO, E.S.; KIIHL, R.A.D.; HARADA, A.; HIROMOTO, D.M.; VIEIRA, L.G.E. 2008. Molecular mapping of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) resistance genes: discovery of a novel locus and alleles. *Theor. Appl. Genet.* 117, 545-53.

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

GILL, U.S.; LEE, S.; MYSORE, K.S. 2015. Host versus nonhost resistance: Distinct wars with similar arsenals. *Phytopathology* 105, 580-87.

GODOY, C.V.; SILVA, L.H.C.P.; UTIAMADA, C.M.; SIQUERI, F.V.; LOPES, I.O.N.; ROESE, A.D.; MACHADO, A.Q.; FORCELINI, C.A.; PIMENTA, C.B.; NUNES, C.D.M.; CASSETARI NETO, D.; JACCOUD FILHO, D.S.; FORNAROLLI, D.A.; WRUCK, D.S.; RAMOS JUNIRO, E.U.; BORGES, E.P.; JULIATTI, F.C.; FEKSA, H.R.; CAMPOS, H.D.; NUNES JUNIOR, J.; SILVA, J.R.C.; COSTAMILAN, L.M.; CARNEIRO, L.C.; SATO, L.N.; CANTERI, M.G.; ITO, M.A.; IAMAMOTO, M.M.; ITO, M.F.; MEYER, M.C.; COSTA, M.J.N.; DIAS, M.D.; MARTINS, M.C.; LOPES, P.V.; SOUZA, P.I.M.; BARROS, R.; BALARDIN, R.S.; IGARADHI, S.; SILVA, S.A.; FURLAN, S.H.; CARLIN, V.J. 2009. Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2009/10: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Londrina, Brasil: Embrapa Soja publication n. 69.

GREEN, A. 1984. Soybean Rust. Pests Not Known to Occur in the United States or of Limited Distribution. United States Department of Agriculture: USDA publication no. 56.

HARTMAN, G.L.; MILES, M.R.; FREDERICK, R.D. 2005. Breeding for resistance to soybean rust. *Plant Disease* 89, 664-66.

HARTWIG, E.E.; BROMFIELD, K.R. 1983. Relationships among three genes conferring specific resistance to rust in soybeans. *Crop Science* 23, 237-39.

HARTWIG, E.E. 1986. Identification of a fourth major genes conferring to rust in soybeans. *Crop Science* 26, 1135-36.

HIRAKURI, M.H.; LAZZAROTTO, J.J. 2014. O agronegócio da soja nos contextos mundial e brasileiro. Londrina, Brasil: Embrapa Soja publication n. 349. (Documentos)

HYTEN, D.L.; HARTMAN, G.L.; NELSON, R.L.; FREDERICK, R.D.; CONCIBIDO, V.C.; NARVEL, J.M.; CREGAN, P.B. 2007. Map location of the Rpp1 locus that confers resistance to soybean rust in soybean. *Crop Science* 47, 837-40. [doi:10.2135/cropsci2006.07.0484]

IVANCOVICH, A. 2005. Soybean rust in Argentina. *Plant Disease* 89, 667-68.

JONES, J.D.G.; DANGL, J.L. 2006. The plant immune system. *Nature* 444, 323-329.

KAWUKI, R.S.; TUKAMUHABWA, P.; ADIPALA, E. 2004. Soybean rust severity, rates of rust development and tolerance as influenced by maturity period and seasons. *Crop Protection* 23, 447-55.

KEMERAIT, R.C.; SCONYERS, L.E.; JOST, P.H.; MILLS, W.A. 2006. Evaluation of fungicides for control of Asian soybean rust in Attapulcus, Georgia, 2005. *Fungicides & Nematicides Tests*, v.61. p.FC072.

KENDRICK, M.D.; HARRIS, D.K.; HA, B.K.; HYTEN, D.L.; CREGAN, P.B.; FREDERICK, R.D.; BOERMA, H.R.; PEDLEY, K.F. 2011. Identification of a second Asian soybean rust resistance gene in Hyuuga soybean. *Phytopathology* 101, 535-43.

KILLGORE, E.; HEU, R.; GARDNER, D.E. 1994. First report of soybean rust in Hawaii. *Plant Disease* 78, 1216.

KIM, K.; UNFRIED, J.R.; HYTEN, D.L.; FREDERICK, R.D.; HARTMAN, G.L.; NELSON, R.L.; SONG, Q.; DIERS, B.W. 2012. Molecular mapping of soybean rust resistance in soybean accession PI 561356 and SNP haplotype analysis of the *Rpp1* region in diverse germplasm. *Theor Appl Genet* 125, 1339-52.

KLOSOWSKI, A.; De MIO, L.L.M.; MIESSNER, S.; RODRIGUES, R.; STAMMLER, G. 2015. Detection of the F129L mutation in the cytochrome *b* gene in *Phakopsora pachyrhizi*. *Pest Management Science* (in press). DOI 10.1002/ps.4099.

LE MOS, N.G.; BRACCINI, A.L.; ABDELNOOR, R.V.; OLIVEIRA, M.C.N.; SUENAGA, K.; YAMANAKA, N. 2011. Characterization of genes *Rpp2*, *Rpp4*, and *Rpp5* for resistance to soybean rust. *Euphytica* 182, 53-64.

LI, S.; SMITH, J.R.; RAY, J.D.; FREDERICK, R.D. 2012. Identification of a new soybean rust resistance gene in PI567102B. *Theor Appl Genet* 125, 133-42.

MAPHOSA, M.; TALWANA, H.; TUKAMUHABWA, P. 2012. Enhancing soybean rust resistance through *Rpp2*, *Rpp3* and *Rpp4* pair wise gene pyramiding. *African Journal of Agricultural Research* 7, 4271-77.

MARCHETTI, M.A.; UECKER, F.A.; BROMFIELD, K.R. 1975. Uredial development of *Phakopsora pachyrhizi* in soybeans. *Phytopathology* 65, 822-23.

MATSUO, E. 2012. Resistência da soja à ferrugem asiática: hibridação, herança e identificação de marcadores microssatélites. Viçosa, Brasil: Universidade Federal de Viçosa, PhD thesis.

McLEAN, R.J. 1979. Histological studies of resistance to soybean rust *Phakopsora pachyrhizi*. Australian Journal Agriculture Research 30, 77-84.

McLEAN, R.J.; BYTH, D.E. 1980. Inheritance of resistance to rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in soybeans. Australian Journal Agriculture Research 31, 951-56.

MELCHING, J.S.; DOWLER, W.M.; KOOGLE, D.L.; ROYER, M.H. 1989. Effect of duration, frequency, and temperature of leaf wetness period on soybean rust. Plant Disease 73, 117-22.

MILES, M.R.; BONDE, M.R.; NESTER, S.E.; BERNER, D.K.; FREDERICK, R.D.; HARTMAN, G.L. 2011. Characterizing resistance to *Phakopsora pachyrhizi* in soybean. Plant Disease 95, 577-81.

MOREL, W. Roya de la soja. 2001. Comunicado tecnico – Reporte oficial. Serie Fitopatologica n 1 – Junho de 2001. Ministerio da Agricultura y Ganaderia. Subsecretaria de Agricultura. Direccion de Investigacion Agricola. Centro de Investigacion Agricola (CRIA) Capitan Miranda, Itapua, Paraguay.

NAKAMURA, H. 1980. Desirable qualities of soybeans: Japanese view point. In: Frederick TC, eds. World Soybean Research Conference 1980. Granada, Spain: 26-27.

PARLEVLIET, J.E. 1979. Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. Annual Review of Phytopathology 17, 203-22.

PHAM, T.A.; MILES, M.R.; FREDERICK, R.D.; HILL, C.B.; HARTMAN, G.L. 2009. Differential responses of resistant soybean genotypes to ten isolates of *Phakopsora pachyrhizi*. *Plant Disease* 93, 224–28.

PIVONIA, S.; YANG, X.B. 2004. Assessment of potential year round establishment of soybean rust throughout the world. *Plant Disease* 88, 523-29.

RAY, J.D.; MOREL, W.; SMITH, J.R.; FREDERICK, R.D.; MILES, M.R. 2009. Genetics and mapping of adult plant rust resistance in soybean PI 587886 and PI 587880A. *Theor Appl Genet* 119, 271-80.

REIS, E.M.; CASA, R.T.; MICHEL, C. 2002. Ocorrência de epidemia da ferrugem da soja no Rio Grande do Sul na safra 2001/2002. *Fitopatologia Brasileira* 27, 198-99.

RIBEIRO DO VALE, F.X.; PARLEVLIET, J.E.; ZAMBOLIM, L. 2001. Concepts in plant disease resistance. *Brazilian Phytopathology* 26, 577-89.

RIBEIRO, A.S.; TOLEDO, J.F.F.; RAMALHO, M.A.P. 2009. Interferência da interação genótipos x ambientes no controle genético da resistência à ferrugem asiática da soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 44, 1160-67.

SCHENEIDER, R.W.; HOLLIER, C.A.; WHITAM, H.K.; PALM, M.E.; McKEMY, J.M.; HERNANDEZ, J.R.; LEVY, L.; DeVRIES-PATERSON, R. 2005. First report of soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* in the continental United States. *Plant Disease* 89, 774.

SILVA, D.; YAMANAKA, N.; BROGIN, R.; ARIAS, C.; NEPOMUCENO, A.; DI MAURO, A.; PEREIRA, S.; NOGUEIRA, L.; PASSIANOTTO, A.; ABDELNOOR, R. 2008. Molecular mapping of two loci that confer resistance to Asian rust in soybean. *Theor. Appl. Genet.* 117:57-63.

SINCLAIR, J.B.; HARTMAN, G.L. 1996. Soybean rust workshop. Urbana, Illinois, USA: College of Agricultural, Consumer, and Environmental Sciences, National Soybean Research Laboratory publication n. 1.

SINGH, B.B.; THAPLIYAL, P.N. 1977. Breeding for resistance to soybean rust in India. In: Ford RE, Sinclair JB, eds. Rust of soybeans, the problem and research needs. Urbana, Illinois, USA: Int. Agric. Pub., INTSOY publication n. 12.

SINGH, R.P.; HODSON, D.P.; HUERTA-ESPINO, J.; JIN, Y.; BHAVANI, S.; NJAU, P.; HERRERA-FOESSEL, S.; SINGH, P.K.; SINGH, S.; GOVIDAN, V. 2011. The emergence of Ug99 races of the stem rust fungus is a threat to world wheat production. *Annual Review of Phytopathology* 49, 465-81.

TSCHANZ, A.T.; TSAI, M.C. 1983. Evidence of tolerance to soybean rust in soybeans. *Soybean Rust Newsletter* 6, 28-31.

TSCHANZ, A.T.; SHANMUGASUNDARAM, S. 1985. Soybean Rust. In: Shibles R, ed. *Proceedings of the 3rd World Soybean Research Conference*, Ames, Iowa, USA: 562-67.

TSCHANZ, A.T.; WANG, T.C.; TSAI, B.Y. 1985. Recent advances in soybean rust research. In: SHANMUGASUNDARAM, S.; SULZBERGER, E.W.; McLEAN, B.T. eds. *Soybean in tropical and subtropical cropping systems*. Shanhua, Taiwan: AVRDC, 237-45.

TWIZEYIMANA, M.; OJIAMBO, P.S.; HAUDENSHIELD, J.S. 2011. Genetic structure and diversity of *Phakopsora pachyrhizi* isolates from soybean. *Plant Pathology* 60, 719-29.

USDA, 2015. *World Agricultural Production*. Foreign Agricultural Service. United States Department of Agriculture: USDA circular series.



USDA, 2015. Natural Resources Conservation Service. United States Department of Agriculture: Plants Database. Disponível em: <http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=glma4>. Data de consulta: 17/11/2015.

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 Interaction* 20, 887-889.

VAKILI, N.G.; BROMFIELD, K.R. 1976. *Phakopsora* rust on soybeans and other legumes in Puerto Rico. *Plant Disease Report* 60, 995-99.

VITTAL, R.; YANG, H.C.; HARTMAN, G.L. 2012. Anastomosis of germ tubes and migration of nuclei in germ tube networks of the soybean rust pathogen, *Phakopsora pachyrhizi*. *European Journal of Plant Pathology* 132, 163-67.

WALKER, D.R.; HARRIS, D.K.; KING, Z.R.; LI, Z.; BOERMA, H.R.; BUCKLEY, J.B.; WEAVER, DB.; SIKORA, E.J.; SHIPE, E.R.; MUELLER, J.D.; BUCK, J.E.; SCHENEIDER, R.W.; MAROIS, J.J.; WRIGHT, D.L.; NELSON, R.L. 2014. Evaluation of soybean germplasm accessions for resistance to *Phakopsora pachyrhizi* populations in the southeastern United States, 2009-2012. *Crop Science* 54, 1673-89.

WANG, T.C.; HARTMAN, G.L. 1992. Epidemiology of soybean rust and breeding for host resistance. *Plant Prot. Bull.* 34, 109-24.

YAMANAKA, N.; YAMAOKA, Y.; KATO, M.; LEMOS, N.G.; PASSIANOTTO, A.L.L.; SANTOS, J.V.M.; BENITEZ, E.R.; ABDELNOOR, R.V.; SOARES, R.M.; SUENAGA, K. 2011. Development of classification criteria for resistance to soybean rust and differences in virulence among Japanese and Brazilian rust population. *Tropical Plant Pathology* 35, 153-62.

YAMANAKA, N.; LEMOS, N.G.; UNO, M.; AKAMATSU, H.; YAMAOKA, Y.; ABDELNOOR, R.V.; BRACCINI, A.L.; SUENAGA, K. 2013. Resistance to Asian soybean rust in soybean lines with the pyramided three Rpp genes. *Crop Breed Appl Biotech* 13, 75-82.

YANG, C.Y. 1977. Soybean rust in the Eastern Hemisphere. In: Ford RE, Sinclair JB, eds. *Rust of Soybean: The problem and research needs*. Urbana, Illinois, USA: 22-33. 1977.

YEH, C.C.; TSCHANZ, A.T.; SINCLAIR, J.B. 1981. Induced teliospore formation by *Phakopsora pachyrhizi* on soybeans and other hosts. *Phytopathology* 71, 1111-12.

YEH, C.C.; SINCLAIR, J.B.; TSCHANZ, A.T. 1982. *Phakopsora pachyrhizi*: uredial development, uredospore production and factors affecting teliospore formation on soybeans. *Australian Journal Agriculture Research* 33, 25-31.

YORINORI, J.T.; PAIVA, W.M.; FREDERICK, R.D.; COSTAMILAN, L.M.; BERTAGNOLLI, P.F.; HARTMAN, G.E.; GODOY, C.V.; NUNES JUNIRO, J. 2002. Epidemias de ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi*) no Brasil e no Paraguai, nas safras 200/01 e 2001/02. In: *Congresso Brasileiro de Soja*. Foz do Iguaçu, Brazil: 94.

YORINORI, J.T.; PAIVA, W.M.; FREDERICK, R.D.; COSTAMILAN, L.M.; BERTAGNOLLI, P.F.; HARTMAN, G.L.; GODOY, C.V.; NUNES, J. 2005. Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001-2003. *Plant Disease* 89, 675-77.

YORINORI, J.T.; NUNES JUNIOR, J. 2006. Soybean germplasm with resistance and tolerance to “Asian” rust and screening methods. In: *South American Workshop On Soybean Rust, 2006*. Londrina, Brasil: Embrapa Soybean, 13.

YORINORI, J.T. 2008. Soybean germplasm with resistance and tolerance to Asian rust and screening methods. In: Kudo H, Suenaga K, Soares RM, Toledo A, eds. Facing the challenge of soybean rust in South America. Tsukuba, Japan: JIRCAS Working Report 58, 70-87.

ZHANG, X.C.; FREIRE, M.C.M.; LE, M.H.G. 2012. Genetic diversity and origins of *Phakopsora pachyrhizi* isolates in the United States. Asian Journal of Plant Pathology 6, 52-65.

ANEXOS – Artigo publicado no *Journal of Plant Pathology and Microbiology*

## Asian Soybean Rust Resistance: An Overview

Carlos Renato Echeveste da Rosa<sup>1\*</sup>, Carlos Roberto Spehar<sup>2</sup> and Jean Q. Liu<sup>3</sup><sup>1</sup>Du Pont Pioneer - Soybean Plant Pathology, 73310-970, Planaltina, DF, Brazil<sup>2</sup>Universidade de Brasilia - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 70910-970, Brasilia, DF, Brazil<sup>3</sup>ARQ Solutions, Chicago, IL, 60613, USA**Abstract**

Asian soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi*, occurs in all soybean production regions of the world. Rust is the most destructive foliar disease of soybean and can cause yield losses of over 80%. To date, six race-specific resistance genes have been identified in plant introductions. However, races of *P. pachyrhizi* able to overcome the resistance conferred by these genes have evolved. Due to the limited availability of resistant varieties, fungicide application is the only management tool available for farmers, which significantly raises the production cost and the risk of environmental and human contamination. Thus, the transfer of resistance genes through classical breeding followed by marker-assisted selection allows the development of resistant varieties and their use as an efficient and cost-effective method for controlling soybean rust. The objective of this review is to provide a broad overview of the Asian soybean rust resistance, and a useful tool to guide future researches as well.

**CAPÍTULO 2 - VIRULÊNCIA DE ISOLADOS DE *Phakopsora pachyrhizi* A  
GENÓTIPOS DE SOJA CONTENDO DIFERENTES GENES DE RESISTÊNCIA**

## VIRULÊNCIA DE ISOLADOS DE *Phakopsora pachyrhizi* A GENÓTIPOS DE SOJA CONTENDO DIFERENTES GENES DE RESISTÊNCIA

### RESUMO

O melhoramento de soja (*Glycine max*) visando resistência a ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) encontra inúmeros desafios, entre eles identificar genes que confirmam resistência completa e com amplo espectro de ação. Mas para isso, é fundamental estudar o perfil de virulência dos isolados que compõem a população do fungo, e a sua interação os diferentes genes de resistência. Com o objetivo de estudar a virulência de diferentes isolados de *P. pachyrhizi*, foram realizadas coletas isolados de ferrugem em diferentes regiões onde tradicionalmente é realizado o cultivo de soja e onde existem relatos de ocorrência da doença anualmente. A manutenção, multiplicação e caracterização dos isolados obtidos foi realizada através de inoculações de uredíniosporos pelo método da folha destacada, uma vez que *P. pachyrhizi* é um patógeno biotrófico. Como diferenciadores da virulência foram utilizados genótipos de soja contendo diferentes genes de resistência. Através destes estudos foi possível constatar que os isolados coletados diferem quanto à virulência aos diferentes genes de resistência. Também foi possível observar variações na interação dos isolados com diferentes plantas de um mesmo genótipo e com diferentes fontes do mesmo gene de resistência. Os resultados sugerem que genótipos com piramidação natural de genes apresentam maior estabilidade na resistência a ferrugem asiática da soja.

**Palavras chave:** Virulência, *Phakopsora pachyrhizi*, soja, genes de resistência.

**VIRULENCE OF *Phakopsora pachyrhizi* ISOLATES TO SOYBEAN GENOTYPES  
CONTAINING DIFFERENT RESISTANCE GENES**

**ABSTRACT**

Soybean breeding for rust resistance faces numerous challenges, including identifying genes that confer complete resistance and broad spectrum of action. To reach this, is essential to know the virulence profile of the fungus population and their interaction with different resistance genes. In order to study the virulence of *P. pachyrhizi* isolates against different resistance genes, we collected rust urediniospores from different soybean crop regions in Brazil. Since *P. pachyrhizi* is a biotrophic pathogen, the maintenance, propagation and characterization of these isolates was performed by the detached leaf method. Soybean genotypes containing different resistance genes were used as differentials to characterize the isolates. Through this study it was found that the rust isolates differ in their virulence against different resistance genes. Also, it was observed variation in the interaction among the isolates and different plants of the same genotype, and among the isolates and different sources of the same resistance gene. The results suggest that genotypes with natural pyramiding of genes have more stable resistance to Asian soybean rust.

**Key Words:** Virulence, *Phakopsora pachyrhizi*, soybean, resistance genes.

## INTRODUÇÃO

A variabilidade natural presente nas populações de *P. pachyrhizi* gera nos programas de melhoramento uma incessante busca por genes de resistência capazes de conferir proteção efetiva contra um grande número de isolados e durante o mais longo tempo possível. A alternativa que melhor atende essa necessidade é o desenvolvimento de cultivares contendo múltiplos genes de resistência, também conhecida como piramidação de genes. Neste sentido, os marcadores moleculares são ferramentas auxiliares fundamentais para a identificação e transferência desses genes, permitindo maior agilidade no desenvolvimento de cultivares.

Há relatos da identificação de nove raças de ferrugem da soja no Centro de Pesquisa e Desenvolvimento Vegetal da Ásia, em Taiwan. No entanto, a raça predominante nesse estudo foi compatível com dez dos onze genótipos utilizados como diferenciadores, e todas as raças foram compatíveis com pelo menos três dos genótipos estudados (HARTMAN et al., 1999). A partir da reação diferencial de cinco cultivares de soja, Yeh (1983) identificou três raças de *P. pachyrhizi* em Taiwan. Observou também que a distribuição das três raças variou entre os locais onde foram coletadas as amostras de uredíniosporos do fungo. Por outro lado, Yamaoka et al. (2002) obtiveram quatro raças de *P. pachyrhizi* a partir de uredíniosporos coletados em um mesmo local e em uma mesma cultivar, indicando que é possível que várias raças estejam presentes em um mesmo campo de soja.

Também é relatado na literatura que as fontes de resistência identificadas até o momento são específicas a determinados isolados (BONDE et al., 2006). No Japão, foram identificadas dezoito raças em amostras coletadas em plantas de soja e hospedeiros selvagens (YAMAOKA et al., 2002). No Brasil, estudos realizados pela Embrapa Soja identificaram onze cultivares com resistência à ferrugem (YORINORI et al., 2002), sendo essa resistência quebrada rapidamente com isolado do fungo proveniente do Mato Grosso. Atualmente, os seis genes dominantes, que condicionam resistência vertical, denominados *Rpp1* (McLEAN;



BYTH, 1980), *Rpp2* (BROMFIELD; HARTWIG, 1980), *Rpp3* (HARTWIG; BROMFIELD, 1983), *Rpp4* (HARTWIG, 1986), *Rpp5* (GARCIA et al., 2008) e *Rpp6* (LI et al., 2012), apresentam deficiência de estabilidade frente a isolados coletados em diferentes locais ao redor do mundo.

A origem assexual dos uredíniosporos de *P. pachyrhizi* sugere uma baixa diversidade genética das populações desse patógeno (TWIZEYIMANA et al., 2011). Além disso, dados de marcadores microssatélites (TWIZEYIMANA et al., 2011) e análise de sequenciamento de DNA (FREIRE et al., 2008; FREIRE et al., 2012; ZHANG et al., 2012) demonstraram uma pequena estrutura genética de *P. pachyrhizi* entre diferentes regiões geográficas, e maiores variações dentro dos locais estudados. Segundo Jorge et al. (2014), apenas 6,3% da variância molecular total pode ser atribuída a diferenças entre locais, enquanto 93,7% ocorre dentro dos locais. Esses resultados sugerem a existência de eficientes mecanismos de dispersão a longas distâncias e intenso fluxo gênico do patógeno entre campos de soja. Na Nigéria, *P. pachyrhizi* apresenta aproximadamente 90% de sua diversidade genética dentro dos campos de soja, com pequena diversidade distribuída entre os campos (TWIZEYIMANA et al., 2011; FREIRE et al., 2008; FREIRE et al., 2012; ZHANG et al., 2012).

Por outro lado, a presença de genes de resistência no hospedeiro não leva à redução da frequência de genes de virulência em populações do patógeno. A provável explicação para este fato é que a reprodução assexual não é o único modo de reprodução de *P. pachyrhizi*. A anastomose de tubos germinativos e hifas, e a possibilidade de ocorrência de ciclo parassexual (VITTAL et al., 2012) aumenta a possibilidade de haver alta diversidade genética em *P. pachyrhizi*. Jorge et al. (2014) observaram alto nível de variação nas sequências dos genes ITS (internal transcribed spacer) e ARF (ADP-ribosylation factor), sugerindo que as taxas de mutação no patógeno são altas. Além disso, a alta capacidade de dispersão a longas distâncias permite a rápida movimentação de genótipos virulentos entre diferentes populações de *P.*

*pachyrhizi*. A falta de estrutura genética e variação entre populações de diferentes regiões geográficas sugere que o estabelecimento anual da doença se deve principalmente ao inóculo transportado por correntes aéreas de diferentes locais.

Historicamente, genes que conferem resistência raça-específica perdem sua efetividade rapidamente. Por exemplo, a cultivar Komata (*Rpp1*) apresentava resistência a ferrugem entre os anos 1961 e 1963 em avaliações na Austrália. Entretanto, em 1966 apareceram as primeiras lesões TAN em experimentos de campo, levando ao seu total abandono como fonte de resistência em 1970 (KOCHMAN, 1977). De modo semelhante, a cultivar Ankur (*Rpp3*) que era resistente na Índia no início dos anos 1970, ficou totalmente suscetível em 1980 (BROMFIELD, 1984).

Segundo Agrios (2004), virulência é a habilidade relativa de um patótipo na indução de uma dada quantidade de doença sobre um genótipo definido do hospedeiro, sob determinada condição do ambiente. O termo não deve ser utilizado como sinônimo de patogenicidade, mas como adjetivo quantitativo para descrever graus de patogenicidade. Conforme Plank (1975), virulência envolve diversidade genética. Virulento é o organismo altamente patogênico capaz de causar infecção severa no hospedeiro, com a manifestação de todo quadro sintomatológico típico da doença em um hospedeiro suscetível. Avirulento é o organismo não patogênico, incapaz de infectar e causar doença no hospedeiro. Gene de avirulência é o gene que codifica para avirulência.

Considerando-se somente dois níveis de reações patogênicas (resistente e suscetível), uma série de  $n$  hospedeiros diferenciais, cuja reação à infecção estivesse regida por um só par de genes, poder-se-iam diferenciar  $2^n$  raças. Utilizando-se este mesmo raciocínio para a interação entre *P. pachyrhizi* e soja, e considerando a existência de seis genes de resistência descritos, poderiam existir  $64 (2^6)$  raças fisiológicas de ferrugem.

O objetivo geral deste trabalho foi caracterizar fenotipicamente o perfil de virulência de isolados de *P. pachyrhizi* coletados em diferentes locais no Brasil. Para isso, foram definidos os seguintes objetivos específicos: obter isolados de *Phakopsora pachyrhizi* representativos de diferentes regiões produtoras de soja do Brasil, estabelecer uma metodologia para a coleta, isolamento, multiplicação e armazenamento de isolados de *P. pachyrhizi* e estudar a interação entre os diferentes isolados de *P. pachyrhizi* e genótipos de soja contendo diferentes genes de resistência.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

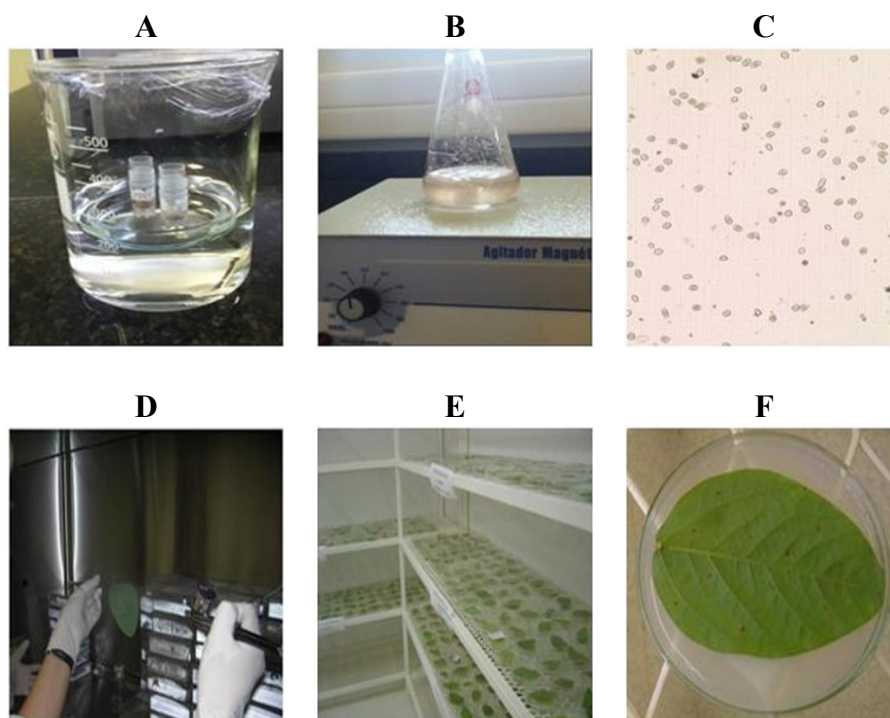
### Coleta de isolados

Cada isolado foi composto por uma população de uredíniosporos coletados em folhas infectadas por ferrugem, obtidas em campos de soja no Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Pará, Paraná e Tocantins. Primeiramente, foram selecionadas lavouras com alta incidência da doença, localizadas em regiões onde tradicionalmente é realizado o cultivo da soja. No interior dessas áreas foi realizada a coleta de folíolos altamente infectados por ferrugem e isentos de qualquer outra doença. Imediatamente após a coleta, os folíolos foram acondicionados em folhas de papel jornal, para que fosse retirado o excesso de umidade dos mesmos. No laboratório, com o auxílio de uma bomba de vácuo e de um coletor de uredíniosporos, os uredíniosporos foram retirados das lesões. Após coletados, os uredíniosporos foram submetidos a um período de 24 horas de dessecação em sílica gel (FURTADO, 2008). Em seguida, foram armazenados em nitrogênio líquido para posterior utilização no processo de caracterização (ZAMBENEDETTI, 2007). Todo o material utilizado para a coleta de uredíniosporos foi previamente higienizado com álcool 92° e autoclavado a 120 °C durante 20 minutos (Figura 1).



**Figura 1.** Etapas ilustrando a coleta, dessecação e armazenamento de urediniosporos dos isolados de *P. pachyrhizi* em laboratório.

No momento da caracterização, os urediniosporos dos isolados foram retirados do Nitrogênio líquido e submetidos à quebra de dormência através de choque térmico em banho-maria a 40 °C durante 5 minutos. Em seguida os urediniosporos foram reidratados em câmara úmida durante 12 horas (FURTADO, 2008). Para a inoculação dos folíolos foi utilizada uma suspensão na concentração  $10^4$  urediniosporos/ml, preparada em tubos de ensaio contendo solução de tween 20 a 0,05%. Os folíolos utilizados na inoculação foram acondicionados em placas de Petri contendo duas folhas de papel filtro umedecidos com água destilada esterilizada. A inoculação foi realizada com atomizador, aspergindo a superfície abaxial do folíolo com a suspensão de urediniosporos até o ponto de escorrimento. Os folíolos inoculados foram mantidos no escuro por 24 horas a 25 °C. Após esse período, foram transferidos para câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 horas até o surgimento das lesões. O processo foi repetido até a obtenção de um volume de urediniosporos adequado para os experimentos de caracterização.



**Figura 2.** Sequência de etapas de hidratação (A), preparo de suspensão de urediniosporos (B/C), inoculação (D) e incubação de isolados de *P. pachyrhizi* em laboratório (E/F).

### Caracterização de isolados

Para a caracterização, os isolados foram inoculados em uma série diferenciadora de genótipos de soja portadores de alelos de resistência e suscetibilidade através do método da folha destacada (TWIZEYIMANA, 2007). Os folíolos utilizados para a caracterização foram coletados em plantas produzidas em câmara de crescimento, em vasos plásticos de 5 litros, utilizado o substrato orgânico Carolina Soil (turfa de Sphagno 70%, palha de arroz torrefada 20%, perlita 10%, calcário dolomítico, gesso agrícola e NPK). Em cada vaso foram semeados os genótipos a serem caracterizados, em repetições de três plantas por genótipo. Os vasos foram conduzidos em câmara de crescimento, em regime de irrigação artificial por gotejamento e controle de luz, de modo a favorecer a produção de trifólios saudáveis.

As avaliações foram realizadas quinze dias após a inoculação através da análise visual dos folíolos em microscópio estereoscópico com aumento de vinte vezes. Seguindo a escala

proposta por Miles et al. (2011) para tipo de lesão, os folíolos foram classificados em imunes (IM), lesões do tipo “redish-brown” (RB) ou lesões do tipo “tan” (TAN).

Também foi avaliado o nível de esporulação das lesões de acordo com a escala proposta por Akamatsu et al. (2013), onde: 0 – nenhuma esporulação; 1 – pouca esporulação; 2 – moderada esporulação; e 3 – abundante esporulação.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### Obtenção de isolados

A soja é uma espécie que possui grande adaptabilidade a diferentes latitudes, solos e condições climáticas, e atualmente é cultivada desde a região norte até o sul do Brasil. Segundo Yorinori et al. (2005), a maioria das regiões brasileiras são favoráveis ao estabelecimento de *P. pachyrhizi* e frequentemente são relatadas severas epidemias na ausência de medidas efetivas de controle. No entanto, diversos processos do ciclo de vida do fungo (MELCHING et al., 1989) bem como a dinâmica das epidemias são fortemente influenciados pelas condições ambientais (DEL PONTE et al., 2006). Temperaturas ótimas para a germinação dos uredíniosporos estão entre 12 e 21 °C (MELCHING; BROMFIELD, 1975). Bonde et al. (2007) estudando quatro isolados de *P. pachyrhizi* provenientes de Taiwan, Zimbábue, Hawai e Brasil verificaram que as temperaturas ótimas para o crescimento do tubo germinativo e início da infecção estão entre 17 e 28 °C. Tan et al. (1996) relata que temperaturas ótimas para infecção estão entre 22 e 26 °C. O menor período entre gerações de esporulação foi observado em temperaturas entre 17 e 27 °C (KOCHMAN, 1979). O desenvolvimento da ferrugem foi reduzido em temperaturas médias noturnas abaixo de 15 °C (TSCHANZ et al., 1984; CASEY, 1981). Por outro lado, temperaturas médias noturnas acima de 25 °C não parecem afetar o desenvolvimento da ferrugem (TSCHANZ et al., 1984), ao contrário do observado por Casey (1981) onde temperaturas médias diárias entre 18 e 26 °C, e

10 horas de molhamento foliar, foram necessários para o desenvolvimento de epidemias de ferrugem.

Buscando representar uma possível diversidade na virulência de *P. pachyrhizi*, foram coletados oito isolados em regiões produtoras de soja nas safras 2012 e 2014 (Tabela 1). Em uma análise preliminar, os isolados podem ser divididos em dois grupos de acordo com a altitude e temperatura média dos locais de coleta. Os isolados de Brasília, Guarapuava e Pinhão são oriundos de regiões de altitudes acima de 1.000 metros e temperaturas médias entre 19 e 21 °C. Já os isolados de Paragominas, Palmas, Primavera do Leste e Rio Verde representam regiões de altitudes inferiores a 800 metros e temperaturas médias entre 23 e 27 °C.

**Tabela 1.** Relação de isolados de *Phakopsora pachyrhizi* coletados a campo, dados geográficos, e normais climáticas dos locais de coleta dos meses de Janeiro a Março.

ISOLADO	LOCAL DE COLETA	ANO	LATITUDE	LONGITUDE	ALTITUDE (m)	T MIN <sup>1</sup> (°C)	T MAX <sup>2</sup> (°C)	T MÉDIA <sup>3</sup> (°C)	CHUVA <sup>4</sup> (mm)
BSB1112	Brasília, DF	2012	17°39'38" S	53°29'09" W	1,100	17.4	26.9	21.3	645
BSB1314	Brasília, DF	2014	17°39'38" S	53°29'09" W	1,100	17.4	26.9	21.3	645
GRV1314	Guarapuava, PR	2014	25°59'26" S	51°49'11" W	1,020	15.6	26.0	19.9	510
PGM1314	Paragominas, PA	2014	3°40'14" S	47°35'35" W	49	22.3	30.6	25.8	1,080
PLM1314	Palmas, TO	2014	10°49'53" S	48°33'41" W	239	20.8	30.9	25.3	633
PNH1314	Pinhão, PR	2014	26°12'53" S	52°38'25" W	1,077	15.6	26.0	19.9	510
PRL1112	Primavera do Leste, MT	2012	15°29'04" S	54°04'30" W	660	23.1	32.7	26.6	864
RVD1314	Rio Verde, GO	2014	18°26'20" S	51°13'48" W	745	19.2	29.5	23.4	660

<sup>1</sup> T MIN: temperatura média mínima; <sup>2</sup> T MAX: temperatura média máxima; <sup>3</sup> T MÉDIA: temperatura média; <sup>4</sup> CHUVA: precipitação acumulada.

Fonte: INMET, 2015.

Os dados climáticos dos meses de Janeiro a Março, período onde normalmente ocorrem as epidemias de ferrugem da soja, indicam uma ampla adaptação de *P. pachyrhizi* as condições de temperatura prevalentes nos locais de coleta, concordando com Del Ponte et al. (2006) que encontrou uma fraca correlação entre a temperatura e a severidade máxima da

ferrugem, sugerindo que a faixa de temperatura na maioria das regiões do Brasil não é limitante para a ocorrência de epidemias de ferrugem.

Nesse mesmo sentido, as normais de precipitação acumulada no período de Janeiro a Março indicam que este fator não é limitante para as epidemias de ferrugem nos locais de coleta dos isolados. Segundo Del Ponte et al. (2006), a severidade final da ferrugem durante o período reprodutivo é altamente correlacionada com a precipitação acumulada.

### Caracterização de isolados

Como esperado, todos os isolados apresentaram reação de compatibilidade (TAN) e abundante esporulação na cultivar 98C81, utilizada como testemunha suscetível, comprovando a ausência de genes de resistência raça-específica nessa cultivar.

Por outro lado, as diferenciadoras contendo genes de resistência, não apresentaram uniformidade nas reações frente aos diferentes isolados. Sumarizando os resultados, quando todas as plantas avaliadas de uma diferenciadora apresentaram reação IM ou RB, independentemente da proporção, esta foi classificada como resistente (R). Por outro lado, quando todas as plantas apresentaram reação TAN, a diferenciadora foi classificada como suscetível (S). Nos casos onde as diferentes plantas testadas apresentaram reações IM, RB e TAN, a diferenciadora foi classificada como variável (V) (Tabela 2). Essa variação intraespecífica observada nas diferenciadoras pode ser devido a impureza genética da fonte de sementes ou a segregação natural dos genes de resistência, uma vez que esses genótipos não foram purificados para essa característica.



**Tabela 2.** Reação de genótipos diferenciadores com diferentes genes de resistência à infecção por oito isolados de *Phakopsora pachyrhizi* em teste de folha destacada.

DIFERENCIADORA	GENE DE RESISTÊNCIA	Nº PLANTAS AVALIADAS	ISOLADOS DE <i>Phakopsora pachyrhizi</i>							
			BSB1112	BSB1314	GRV1314	PGM1314	PLM1314	PNH1314	PRL1112	RVD1314
98C81	-	8	S	S	S	S	S	S	S	S
PI506679	<i>Rpp1</i>	6	V	V	V	V	V	V	V	V
PI587880A	<i>Rpp1</i>	4	R	R	R	R	V	R	R	R
PI587886	<i>Rpp1</i>	4	V	V	R	R	V	V	V	R
PI200487	<i>Rpp3+Rpp5</i>	3	R	R	R	R	V	R	V	R
PI471904	<i>Rpp3+Rpp5</i>	4	R	R	R	V	V	V	V	R
GC84058214	<i>Rpp4</i>	3	R	R	R	S	R	V	V	R
PI459025B	<i>Rpp4</i>	6	V	V	V	V	V	S	V	R

R: Resistente; S: Suscetível; V: Variável.

A princípio a segunda hipótese parece ser a mais correta, pois a análise dos resultados de plantas individuais mostra que somente uma planta da PI506679 apresentou reação uniforme (TAN) para todos os isolados (Tabela 3). Todas as demais plantas diferenciadoras apresentaram algum nível de resistência para determinado isolado, sugerindo a presença de genes de resistência. A exposição continuada desses genótipos a diversos isolados de *P. pachyrhizi* em seus respectivos centros de origem, pode ter favorecido a manutenção da diversidade natural de genes de resistência, explicando a segregação intraespecífica observada.

Esta observação é de fundamental importância no planejamento de hibridações visando o desenvolvimento de cultivares resistentes à ferrugem asiática. Recomenda-se um criterioso estudo das plantas a serem utilizadas como progenitores.

**Tabela 3.** Reação e nível de esporulação em lesões de plantas de genótipos diferenciadores à infecção por oito isolados de *Phakopsora pachyrhizi* em teste de folha destacada.

DIFERENCIADORA	GENE DE RESISTÊNCIA	ISOLADO DE <i>Phakopsora pachyrhizi</i>															
		BSB1112		BSB1314		GRV1314		PGM1314		PLM1314		PNH1314		PRL1112		RVD1314	
		REAC <sup>1</sup>	ESP <sup>2</sup>	REAC	ESP	REAC	ESP	REAC	ESP	REAC	ESP	REAC	ESP	REAC	ESP	REAC	ESP
98C81		TAN	3	TAN	3	TAN	3	TAN	3	TAN	3	TAN	3	TAN	3	TAN	3
PI506679	<i>Rpp1</i>	TAN	3	TAN	1	TAN	3	TAN	3	RB	3	IM	0	TAN	3	TAN	3
PI506679	<i>Rpp1</i>	RB	1	RB	1	RB	0	IM	0	IM	0	RB	2	IM	0	RB	3
PI506679	<i>Rpp1</i>	TAN	3	RB	1	RB	0	IM	0	RB	2	IM	0	IM	0	TAN	2
PI506679	<i>Rpp1</i>	TAN	3	TAN	3	TAN	3	TAN	3	TAN	2	TAN	3	TAN	3	TAN	3
PI506679	<i>Rpp1</i>	TAN	1	RB	3	IM	0	IM	0	IM	0	RB	3	TAN	3	TAN	3
PI506679	<i>Rpp1</i>	RB	2	RB	1	TAN	3	RB	3	TAN	3	RB	2	IM	0	TAN	3
PI587880A	<i>Rpp1</i>	IM	0	IM	0	RB	0	IM	0	TAN	3	IM	0	IM	0	IM	0
PI587880A	<i>Rpp1</i>	IM	0	IM	0	RB	0	IM	0	RB	0	IM	0	RB	1	IM	0
PI587880A	<i>Rpp1</i>	IM	0	IM	0	RB	0	IM	0	IM	0	IM	0	IM	0	IM	0
PI587880A	<i>Rpp1</i>	RB	0	IM	0	RB	0	IM	0	RB	0	IM	0	IM	0	IM	0
PI587886	<i>Rpp1</i>	RB	2	RB	2	RB	3	RB	3	RB	2	-	-	IM	0	RB	3
PI587886	<i>Rpp1</i>	TAN	3	TAN	3	RB	3	RB	3	TAN	2	-	-	IM	0	RB	2
PI587886	<i>Rpp1</i>	RB	3	RB	2	RB	3	RB	3	RB	3	RB	0	RB	3	RB	3
PI587886	<i>Rpp1</i>	RB	2	RB	0	RB	3	RB	3	TAN	3	RB	2	TAN	3	RB	2
PI200487	<i>Rpp3+Rpp5</i>	RB	1	RB	0	IM	0	RB	0	RB	1	RB	2	RB	2	IM	0
PI200487	<i>Rpp3+Rpp5</i>	IM	0	RB	1	IM	0	IM	0	TAN	3	IM	0	TAN	3	IM	0
PI200487	<i>Rpp3+Rpp5</i>	RB	3	RB	1	RB	3	RB	0	RB	1	RB	3	TAN	3	RB	3
PI471904	<i>Rpp3+Rpp5</i>	RB	3	RB	0	RB	0	-	-	RB	2	IM	0	TAN	3	RB	0
PI471904	<i>Rpp3+Rpp5</i>	RB	1	RB	1	RB	0	IM	0	TAN	1	IM	0	IM	3	RB	1
PI471904	<i>Rpp3+Rpp5</i>	RB	1	RB	1	IM	0	IM	0	RB	0	IM	0	IM	0	RB	1
PI471904	<i>Rpp3+Rpp5</i>	RB	1	RB	1	RB	0	-	-	RB	0	TAN	3	RB	1	RB	0
GC84058214	<i>Rpp4</i>	RB	1	RB	1	RB	3	TAN	3	IM	0	TAN	3	IM	0	RB	1
GC84058214	<i>Rpp4</i>	RB	2	RB	0	RB	3	TAN	3	RB	1	RB	0	IM	0	RB	1
GC84058214	<i>Rpp4</i>	RB	3	RB	0	RB	3	TAN	3	RB	2	RB	3	TAN	3	IM	0
PI459025B	<i>Rpp4</i>	RB	1	RB	1	TAN	3	TAN	2	RB	3	TAN	3	RB	2	RB	2
PI459025B	<i>Rpp4</i>	RB	2	RB	2	RB	3	RB	1	RB	2	TAN	3	TAN	3	RB	1
PI459025B	<i>Rpp4</i>	RB	2	RB	3	RB	1	TAN	3	TAN	3	TAN	3	RB	2	RB	1
PI459025B	<i>Rpp4</i>	RB	2	-	-	RB	3	TAN	3	TAN	-	TAN	3	TAN	3	RB	1
PI459025B	<i>Rpp4</i>	RB	2	RB	0	IM	0	RB	3	RB	3	TAN	3	IM	0	RB	1
PI459025B	<i>Rpp4</i>	RB	2	RB	1	IM	0	RB	1	TAN	3	TAN	3	IM	0	RB	3

<sup>1</sup> REAC: reação à ferrugem (IM, RB, TAN); <sup>2</sup> ESP: nível de esporulação (0, 1, 2, 3).

Também é possível verificar que os isolados apresentaram graus variados de virulência em relação às diferenciadoras, merecendo destaque a PI587880A, a qual apresenta grande estabilidade na resistência frente aos diferentes isolados. Segundo Hossain et al. (2015) o alelo do gene *Rpp1* presente nesse genótipo apresenta resistência a mais de 80% dos isolados da América do Sul.

Agrupando as plantas que apresentaram reações IM e RB na categoria resistentes e as plantas de reação TAN na categoria suscetíveis, podemos comparar os resultados obtidos com os diferentes isolados para cada gene de resistência (Tabela 4).

**Tabela 4.** Somatório de plantas classificadas nas categorias resistente e suscetível, agrupadas por gene de resistência, inoculadas com oito isolados de *Phakopsora pachyrhizi* em teste de folha destacada.

GENE DE RESISTÊNCIA	REAÇÃO	ISOLADO DE <i>Phakopsora pachyrhizi</i>							
		BSB1112	BSB1314	GRV1314	PGM1314	PLM1314	PNH1314	PRL1112	RVD1314
<i>Rpp1</i>	RES <sup>1</sup>	9	11	11	12	9	11	10	9
	SUS <sup>2</sup>	5	3	3	2	5	1	4	5
<i>Rpp3+Rpp5</i>	RES	7	7	7	5	5	6	4	7
	SUS	0	0	0	0	2	1	3	0
<i>Rpp4</i>	RES	9	8	8	3	6	2	6	9
	SUS	0	0	1	6	3	7	3	0

1 RES: Resistente; 2 SUS: Suscetível.

A partir dessa análise podemos inferir que, em relação ao gene *Rpp1*, os isolados BSB1314, GRV1314, PMG1314, PNH1314 e PRL1112 apresentaram baixa virulência. Já os isolados BSB1112, PLM1314 e RVD1314 podem ser classificados como mais virulentos a esse gene.

Quando analisamos os dados referentes aos genes *Rpp3+Rpp5*, é possível constatar que todos os isolados apresentaram baixa virulência, com exceção do isolado PRL1112, onde a virulência foi média. Estes resultados concordam com os obtidos por Yamanaka et al. (2015), que afirmam que a piramidação de genes é capaz de conferir altos níveis de resistência de amplo espectro em genótipos de soja. Segundo os autores, a piramidação dos genes *Rpp4* e *Rpp5* causou efeito sinérgico na resistência de genótipos de soja.

A análise dos dados de reação das diferenciadoras contendo o gene *Rpp4* indica que os isolados BSB1112, BSB1314, GRV1314 e RVD1314 apresentam baixa virulência. Enquanto que os isolados PGM1314, PLM1314, PNH1314 e PRL1112 apresentaram virulência média a alta para esse gene.

Quando os resultados das avaliações foram sumarizados sem distinção do gene de resistência presente nas diferenciadoras, foi possível observar que os isolados testados apresentaram níveis de virulência que podem ser classificados como baixos a moderados (Tabela 5). Esta é uma situação hipotética, pois nenhum dos genótipos diferenciadores possui

todos os genes de resistência agrupados, mas indica que a piramidação desses diferentes genes pode conferir níveis estáveis de resistência contra os isolados de estudados.

**Tabela 5.** Resumo do somatório e porcentagem de plantas resistentes e suscetíveis, inoculadas com oito isolados de *Phakopsora pachyrhizi* em teste de folha destacada.

GENE DE RESISTÊNCIA	REAÇÃO	ISOLADO DE <i>Phakopsora pachyrhizi</i>							
		BSB1112	BSB1314	GRV1314	PGM1314	PLM1314	PNH1314	PRL1112	RVD1314
<i>Rpp1 Rpp3</i> <i>Rpp4 Rpp5</i>	RES <sup>1</sup>	25	26	26	20	20	19	20	25
	SUS <sup>2</sup>	5	3	4	8	10	9	10	5
	% RES	83%	90%	87%	71%	67%	68%	67%	83%
	% SUS	17%	10%	13%	29%	33%	32%	33%	17%

1 RES: Resistente; 2 SUS: Suscetível.

## CONCLUSÕES

- As condições de temperatura e precipitação das regiões produtoras de soja do Brasil não são limitantes para a sobrevivência de isolados virulentos de *P. pachyrhizi*;
- Com base nas reações fenotípicas, concluímos que os isolados de *P. pachyrhizi* estudados apresentam diversidade de virulência frente a diferentes fontes de resistência;
- As diferenciadoras testadas não são geneticamente puras para a característica resistência à ferrugem da soja;
- Genótipos com genes piramidados apresentaram maior estabilidade na resistência frente aos isolados estudados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G.N. 2004. Plant Pathology. 5<sup>a</sup>ed. 922 p.

AKAMATSU, H.; YAMANAKA, N.; YAMAOKA, Y. 2013. Pathogenic diversity of soybean rust in Argentina, Brazil, and Paraguay. *Journal of General Plant Pathology* 79, 28–40.

BARRUS, M.F. 1911. Variation of cultivars of beans in their susceptibility to anthracnose. *Phytopathology* 1:190-195.

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

BONDE, M.R.; BERNER, D.K.; NESTER, S.E.; FREDERICK, R.D. 2007. Effects of temperature on urediniospore germination, germ tube growth, and initiation of infection in soybean by *Phakopsora* isolates. *Phytopathology*, v.97, p.997-1003.

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

BROMFIELD, K.R. 1984. Soybean Rust. Monogr. No. 11. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, 63 p.

DEL PONTE, E.M.; GODOY, C.V.; LI, X.; YANG, X.B. 2006. Predicting severity of Asian soybean rust with empirical rainfall models. *Phytopathology*, v. 96, p.797-803.

ERIKSSON, J. 1894. Ueber die specialisierung des parasitismus bei den getreiderostpilzen. *Berlin Devt. Botanical Ges.* 12:44-46.

FREIRE, M.C.M.; OLIVEIRA, L.O.; ALMEIDA, A.M.R. 2008. Evolutionary history of *Phakopsora pachyrhizi* (the Asian soybean rust) in Brazil based on nucleotide sequence of the internal transcribed spacer region of the nuclear ribosomal DNA. *Genetics and Molecular Biology* 31: 920-931.

FURTADO, G.Q.; ALVES, S.A.M.; CZERMAINSKI, A.B.C.; MASSOLA JR, N.S. 2008. Preservation of *Phakopsora pachyrhizi* uredospores. *J. Phytopathology* 156, 62-64.

GARCIA, A.; CALVO, E.S.; KIIHL, R.A.D.; HARADA, A.; HIROMOTO, D.M.; VIEIRA, L.G.E. 2008. Molecular mapping of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) resistance genes: discovery of a novel locus and alleles. *Theor. Appl. Genet.* 117:545-553.

HARTMAN, G.L.; SINCLAIR, J.; RUPE, J. 1999. *Compendium of soybean diseases*. APS Press.

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

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

HOSSAIN, M.M.; AKAMATSU, H.; MOROSHITA, M.; MORI, T.; YAMAOKA, Y.; SUENAGA, K.; SOARES, R.M.; BOGADO, A.N.; IVANCOVICH, A.J.G.; YAMANAKA, N. 2015. Molecular mapping of Asian soybean rust resistance in soybean landraces PI 594767A, PI 587905 and PI 416764. *Plant Pathology* 64: 147-156.

JORGE, V.R.; SILVA, M.R.; GUILLIN, E.A.; FREIRE, M.C.M.; SCHUSTER, I.; ALMEIDA, A.M.R.; OLIVEIRA, L.O. 2014. The origin and genetic diversity of the causal agent of Asian soybean rust, *Phakopsora pachyrhizi*, in South America. *Plant Pathology* 64, 729-37.

KOCHMAN, J.K. 1977. Soybean rust in Australia. Pages 44-48 in: Rust of Soybean – The Problem and Research Needs. R.E. Ford and J.B. Sinclair, eds. International Agricultural Publications, Manila, The Philippines.

KOCHMAN, J.K. 1979. The effect of temperature on development of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*). Australian Journal of Agricultural Research, v.30, p.273-277.

LI, S.; SMITH, J.R.; RAY, J.D.; FREDERICK, R.D. 2012. Identification of a new soybean rust resistance gene in PI567102B. Theor Appl Genet 125:133-142.

McLEAN, R.J.; BYTH, D.E. 1980. Inheritance of resistance to rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in soybeans, Australian Journal Agriculture Research, v.31, p. 951-956.

MELCHING, J.S.; BROMFIELD, K.R. 1975. Factors influencing spore germination and infection by *Phakopsora pachyrhizi* and intensification and spread of soybean rust under controlled conditions. Proceedings of the American Phytopathological Society, v.2, p.125.

MELCHING, J.S.; DOWLER, W.M.; KOOGLE, D.L.; ROYER, M.H. 1989. Effects of duration, frequency, and temperature of leaf wetness periods on soybean rust. Plant Disease, v.73, p.117-122.

MILES, M.R.; BONDE, M.R.; NESTER, S.E.; BERNER, D.K.; FREDERICK, R.D.; HARTMAN, G.L. 2011. Characterizing resistance to *Phakopsora pachyrhizi* in soybean. Plant Dis. 95:577–581.

TAN, Y.J.; YU, Z.; YANG, C.Y. 1996. Soybean rust. Beijing: China Agricultural Press. 99p.

TWIZEYIMANA, M.; OJIAMBO, P.S.; IKOTUN, T.; HARTMAN, G.L.; BANDYOPADHYAY, R. 2007. Comparison of field, greenhouse, and detached-leaf evaluations of soybean germplasm for resistance to *Phakopsora pachyrhizi*. Plant Disease, 91: 1116-1169.



TWIZEYIMANA, M.; OJIAMBO, P.S.; HAUDENSHIELD, J.S.; CAETANO-ANOLLES, G.; PEDLEY, K.F.; BANDYOPADHYAY, R.; HARTMAN, G.L. 2011. Genetic structure and diversity of *Phakopsora pachyrhizi* isolates from soybean. *Plant Pathology* 60: 719-729.

VAN DER PLANK, J.E. 1975. *Principles of Plant Infection*. New York: Academic Press. 216 p.

VITTTAL, R.; YANG, H.C.; HARTMAN, G.L. 2012. Anastomosis of germ tubes and migration of nuclei in germ tube networks of the soybean rust pathogen, *Phakopsora pachyrhizi*. *European Journal of Plant Pathology* 132: 163-167.

YAMANAKA, N.; MORISHITA, M.; MORI, T.; LEMOS, N.G.; HOSSAIN, M.M.; AKAMATSU, H.; KATO, M.; YAMAOKA, Y. 2015. Multiple *Rpp*-gene pyramiding confers resistance to Asian soybean rust isolates that are virulent on each of the pyramided genes. *Tropical Plant Pathology* 40: 283-290.

YAMAOKA, Y.; FUJIWARA, Y.; KAKISHIMA, M.; KATSUYA, K.; YAMADA, K.; HAGIWARA, H. 2002. Pathogenic races of *Phakopsora pachyrhizi* on soybean and wild host plants collected in Japan. *Journal of Genetic Plant Pathology*, v.68, p.52-56.

YEH, C.C. 1983. Physiological races of *Phakopsora pachyrhizi* in Taiwan. *Journal of Agricultural Research in China*, 32(1): 69-74.

YORINORI, J.T.; PAIVA, W.M.; FREDERICK, R.D.; COSTAMILAN, L.M.; BERTAGNOLLI, P.F.; HARTMAN, G.E.; GODOY, C.V.; NUNES JUNIOR, J. 2002. Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) no Brasil e no Paraguai, nas safras 2000/01 e 2001/02. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, Foz do Iguaçu, PR. Anais... p.94.

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

ZAMBENEDETTI, E.B.; ALVES, E.; POZZA, E.A.; ARAUJO, D.V. 2007. Germinação de urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi* em diferentes métodos de armazenamento. *Summa Phytopathologica*, 33(1): 83-85.

ZHANG, X.C.; FREIRE, M.C.M.; LE, M.H.G. 2012. Genetic diversity and origins of *Phakopsora pachyrhizi* isolates in the United States. *Asian Journal of Plant Pathology* 6: 52-65.

**CAPÍTULO 3 - IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES SNP (Single Nucleotide Polymorphism) ASSOCIADOS AO GENE DE RESISTÊNCIA *Rpp4* DA SOJA (*Glycine max* L. Merr.) A FERRUGEM (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow)**

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES SNP (Single Nucleotide Polymorphism)  
ASSOCIADOS AO GENE DE RESISTÊNCIA *Rpp4* DA SOJA (*Glycine max* L. Merr.)  
A FERRUGEM (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow)**

**RESUMO**

A ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) é a doença foliar mais destrutiva da soja. Atualmente a estratégia de controle amplamente utilizada pelos agricultores é o controle químico, o que eleva o custo de produção e o risco de contaminação ambiental e humana, além de favorecer o surgimento de isolados do patógeno insensíveis aos fungicidas. Nesse cenário, o melhoramento genético visando a obtenção de cultivares resistentes à ferrugem asiática, surge como uma alternativa econômica e ambientalmente promissora. Nesse sentido, o melhoramento genético clássico assistido por marcadores moleculares, resultaria em economia de tempo e maior eficiência na utilização de recursos econômicos. O objetivo deste trabalho foi identificar marcadores moleculares do tipo SNP (Single Nucleotide Polymorphism) associados a genes de resistência a ferrugem asiática da soja. Através de hibridações entre os genótipos GC84058214, resistente, e BG4184, suscetível, foram criadas populações F<sub>3</sub> as quais foram caracterizadas fenotipicamente através do método da folha destacada. A caracterização genotípica foi realizada nas plantas das populações F<sub>2</sub>. Um marcador molecular SNP associado ao gene *Rpp4* de resistência à ferrugem asiática da soja foi identificado neste trabalho.

**Palavras chave:** Marcador molecular SNP, ferrugem asiática, gene *Rpp4*.

**IDENTIFICATION OF SNP (Single Nucleotide Polymorphism) MARKERS  
ASSOCIATED WITH SOYBEAN (*Glycine max* L. Merr.) *Rpp4* RESISTANCE GENE  
TO RUST (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow)**

**ABSTRACT**

The Asian rust (*Phakopsora pachyrhizi*) is the most destructive foliar disease of soybean. Currently, the fungicide spray is the widely control strategy used by farmers, which raises the production costs and the risk of environmental and human contamination. In addition, it favors the development of fungicide tolerant isolates. In this scenario, the breeding for Asian rust resistance is an economic and environmental promising alternative. In this sense, the classical breeding methods, associated with the marker assisted selection, would result in more efficient use of time and economic resources. The objective of this research was to identify SNP (Single Nucleotide Polymorphism) markers associated with Asian rust resistance genes. Through hybridization between the resistant GC84058214 and the susceptible BG4184 the F<sub>3</sub> populations were created and characterized phenotypically by the detached leaf method. Genotypic characterization was performed in plants of the F<sub>2</sub> populations. In this research a SNP molecular marker associated with the *Rpp4* gene of Asian soybean rust resistance was identified.

**Key Words:** Molecular marker, *Rpp4* gene, Asian soybean rust.

## INTRODUÇÃO

O ponto de partida do melhoramento genético é a hibridação entre genitores previamente selecionados com base em características agronômicas superiores, como alta produtividade e resistência a doenças. No entanto, usualmente essas características não se encontram agrupadas em um único genitor, sendo necessária a combinação de genótipos e seleção de suas progênes ao longo de muitas gerações. Neste ponto entram em cena os conhecimentos e habilidades do melhorista de plantas, na busca por combinações específicas que agreguem valor ao produto final. No método de melhoramento clássico, são necessárias várias gerações até que se consiga identificar a progênie que reúna todas as características agronômicas desejadas. O uso de marcadores moleculares torna esse processo mais rápido e eficiente, uma vez que estes podem ser utilizados em gerações precoces e independem de fatores ambientais para se expressarem.

A ferrugem asiática da soja é a doença mais destrutiva que ataca a cultura, podendo causar perdas de mais de 80% em regiões tropicais e sub-tropicais. As plantas atacadas sofrem desfolha e maturação antecipada, o que provoca redução no peso e qualidade dos grãos produzidos. Atualmente, devido a reduzida disponibilidade de cultivares resistentes, a utilização de fungicidas é a ferramenta de controle mais amplamente adotada pelos agricultores, o que eleva significativamente o custo de produção e aumenta os riscos de contaminação ambiental. Além disso, existem relatos de populações do patógeno tolerantes a certos fungicidas (GODOY et al., 2009).

Neste cenário, a melhor estratégia para evitar as perdas decorrentes da doença é o desenvolvimento de cultivares resistentes. No entanto, cultivares com um único gene tendem a ter sua resistência rapidamente suplantada pelo patógeno (BROMFIELD, 1984; HARTMAN et al., 2005; YORINORI, 2008). A efetividade da resistência específica, muitas vezes é de curta duração, especialmente quando associada a patógenos biotróficos, com alto

potencial de variabilidade, como é o caso de *Phakopsora pachyrhizi*. Genótipos com dois genes de resistência piramidados tendem a expressar maior resistência que genótipos com um único gene (MAPHOSA et al., 2012; YAMANAKA et al., 2011).

Em muitas culturas, os marcadores moleculares têm sido utilizados com sucesso, como em soja (FUNGATI et al., 2004; MORCELI et al., 2008; DIAS et al., 2009), arroz (PINHEIRO et al., 2012) e milho (TEIXEIRA et al., 2013). A ideia de que os cromossomos contêm as unidades informacionais transferidas de uma geração para a outra foi proposta ainda no século passado. Entretanto, a identificação e descrição do DNA como a molécula que contém esta informação só ocorreu na primeira metade deste século. Cada cromossomo contém uma longa e única molécula de DNA, além de proteínas que atuam no empacotamento desta molécula. As tecnologias de análise molecular da variabilidade do DNA permitem determinar pontos de referência nos cromossomos, tecnicamente denominados “marcadores moleculares”. Por marcador molecular define-se todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso de isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA. A sequência de nucleotídeos e a função de um marcador molecular podem ou não ser conhecidas. Ao se verificar o seu comportamento de acordo com as leis básicas de herança mendeliana, um marcador molecular é adicionalmente definido como marcador genético. Diversas técnicas de biologia molecular estão hoje disponíveis para a detecção de variabilidade genética ao nível de sequência de DNA, ou seja, para a detecção de polimorfismo genético. Estas técnicas permitem a obtenção de um número virtualmente ilimitado de marcadores moleculares cobrindo todo o genoma do organismo. Tais marcadores podem ser utilizados para as mais diversas aplicações, tanto no estudo de genética como na prática de melhoramento de plantas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

A coexistência de alelos múltiplos em um loco é denominada polimorfismo genético. Qualquer sítio que possua alelos múltiplos como componentes estáveis da população é, por

definição, polimórfico. Uma mudança em um único nucleotídeo, quando os alelos são comparados, é denominada polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) (do inglês: *single nucleotide polymorphism*). SNPs podem ser detectados por diversos meios, desde a comparação direta das sequências até a espectroscopia de massa ou métodos bioquímicos que detectam diferenças baseadas em variações de sequência em uma região definida (LEWIN, 2009).

Recentemente, uma nova classe de marcadores moleculares, denominada SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms), foi disponibilizada para a comunidade científica. Estes marcadores genéticos se baseiam na detecção de polimorfismos resultantes da alteração de uma única base no genoma. Para que a variação seja considerada SNP, ela tem de ocorrer em pelo menos 1% da população. Em princípio, a maioria dos polimorfismos classificados como SNPs são bi-alelicos e englobam quatro tipos: C/T (G/A), C/A (G/T), C/G (G/C) e T/A (A/T) (BROOKES, 1999). O sequenciamento em larga escala tem permitido evidenciar a presença de SNPs em espécies como *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Glycine max*, *Cucumis melo* e *Zea mays* (BORÉM; CAIXETA, 2009).

Os marcadores genéticos SNPs, geralmente, possuem natureza bi-alelica e são abundantes no genoma, podendo ocorrer tanto em regiões expressas quanto em não expressas. Devido à sua frequência e distribuição, SNPs surgem como importantes marcadores genéticos para a obtenção de mapas de alta resolução. A sua alta densidade no genoma, somada ao desenvolvimento de tecnologias de genotipagem de alto rendimento, abrem novas possibilidades para a aplicação dos SNPs, os quais poderão ser utilizados no melhoramento assistido por marcadores moleculares (BORÉM; CAIXETA, 2009).

Este trabalho teve como objetivo geral identificar marcadores moleculares associados a genes de resistência à ferrugem asiática da soja. E como objetivos específicos caracterizar fenotipicamente genótipos de soja candidatos a fontes de resistência a *P. pachyrhizi*, obter



populações segregantes a partir de hibridações específicas entre genótipos resistentes e suscetíveis a ferrugem da soja, realizar inoculações artificiais de ferrugem nos indivíduos das populações visando identificar padrões de segregação fenotípica e identificar marcadores moleculares associados a genes de resistência em populações segregantes.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Avaliação das fontes de resistência e teste em casa de vegetação

Dezoito genótipos contendo distintos genes de resistência à *P. pachyrhizi*, previamente conhecidos, foram utilizados para os testes fenotípicos (Tabela 1). Para confirmar a resistência à ferrugem, os genótipos selecionados foram inoculados em casa de vegetação com uma mistura de uredíniosporos coletados no Mato Grosso, Goiás, Bahia e Distrito Federal. A partir do resultado obtido, foram selecionados genótipos específicos para hibridações visando a obtenção de populações segregantes para mapeamento molecular de genes de resistência.

**Tabela 1.** Genótipos de soja (*Glycine max*) utilizados nos testes de inoculação artificial em casa de vegetação visando a identificação de fontes de alelos de resistência a ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi*).

FONTE DE RESISTÊNCIA	GENE	ORIGEM	REFERÊNCIA
PI200492 (Komata)	<i>Rpp1</i>	Japão	McLean & Byth, 1980.
PI587880A (Huang dou)	<i>Rpp1</i>	China	Ray et al., 2009.
PI587886 (Bai dou)	<i>Rpp1</i>	China	Ray et al., 2009.
PI587905 (Xiao huang dou)	<i>Rpp1</i>	China	Hossain et al., 2014.
PI594760B (Gou jiao huang dou)	<i>Rpp1</i>	China	Garcia et al., 2011.
PI594767A (Zhao ping hei dou)	<i>Rpp1</i>	China	Hossain et al., 2014.
PI594538A (Min hou bai sha wan dou)	<i>Rpp1-b</i>	China	Chakraborty et al., 2009.
PI224270 (Howgyoku)	<i>rpp2</i>	Japão	Garcia et al., 2008.
PI230970	<i>Rpp2</i>	Japão	Bromfield & Hartwig, 1980.
PI416764 (Akasaya)	<i>Rpp3</i>	Japão	Hossain et al., 2014.
PI462312 (Ankur)	<i>Rpp3</i>	India	Hartwig & Bromfield, 1983.
PI200487 (Kinoshita)	<i>Rpp3/Rpp5</i>	Japão	Garcia et al., 2008.
PI471904 (Orba)	<i>Rpp3/Rpp5</i>	Indonésia	Garcia et al., 2008.
PI635027 (GC84058214)	<i>Rpp4</i>	Taiwan	USDA, 2015.
PI459025A (Big Nan)	<i>Rpp4</i>	China	Hartwig, 1986.
PI459025B	<i>Rpp4</i>	China	Silva et al., 2008.
PI200456 (A washima Zairai)	<i>rpp5</i>	Japão	Calvo et al., 2008.
PI567102B	<i>Rpp6</i>	Indonésia	Li et al., 2012.

Os experimentos de inoculação foram conduzidos em uma casa de vegetação localizada no Distrito Federal, na Unidade de Produção e Pesquisa da Du Pont Pioneer, a uma altitude de 1.100 metros, latitude 17°39'38" S e longitude 53°29'09" W. A temperatura média da casa de vegetação durante o período do experimento foi de 25 °C, variando de 23 °C à noite a 28 °C durante as horas mais quentes do dia. Para a realização dos testes, foram semeadas vinte sementes de cada genótipo em sulcos de um metro de comprimento, com espaçamento de 45 cm entre os sulcos, com duas repetições por genótipo. A cada dez ruas de plantio foram inseridas sementes da cultivar BG4184 como testemunha suscetível para monitoramento da eficiência da inoculação e também como fonte de novos uredíniosporos da doença. Após a completa emergência, foi realizado o desbaste, deixando apenas dez plantas por sulco. Quando as plantas atingiram o estágio V5 (FEHR; CAVINESS, 1977), foram inoculadas com uma mistura de uredíniosporos de ferrugem coletados nas principais regiões produtoras de soja do Brasil, na concentração de  $10^5$  uredíniosporos/ml (TWIZEYIMANA, 2007). O preparo da suspensão foi realizado através da adição dos uredíniosporos em um volume conhecido de água destilada e esterilizada contendo 0,05% v/v de Tween 20. O ajuste da concentração de uredíniosporos na suspensão, quando necessário, foi realizado com o auxílio de contagem em câmara de Neubauer em microscópio estereoscópico. A inoculação foi realizada ao entardecer, através da pulverização da suspensão sobre as plantas utilizando-se uma bomba costal com capacidade para 20 litros. Imediatamente após a inoculação, a casa de vegetação foi mantida sob regime de nebulização intermitente em intervalos de uma hora durante vinte e quatro horas. O método de inoculação adotado foi adaptado de Twizeyimana et al. (2007). A irrigação das plantas foi realizada através de um sistema de microaspersão automático, com uma lâmina de 2 mm de água, duas vezes ao dia, em turnos de rega de 30 minutos. Vinte dias após a inoculação, todas as plantas foram avaliadas individualmente e

classificadas em IM, RB ou (TAN), segundo a escala proposta por Miles et al. (2011) (Figura 2). A definição da reação dos genótipos foi estabelecida de acordo com a proporção de plantas RESISTENTES (IM+RB) nas duas repetições, segundo os intervalos: 0% a 39% (SUSCETÍVEIS), 40% a 59% (MODERADAMENTE SUSCETÍVEIS), 60% a 79% (MODERADAMENTE RESISTENTES) e 80% a 100% (RESISTENTES).



**Figura 1.** Reações à ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi*) apresentadas pelos genótipos testados em casa de vegetação (IM: imune, reação indicativa de resistência completa; RB: reação de resistência parcial; TAN: reação de suscetibilidade).

No momento da avaliação, as plantas classificadas como resistentes foram identificadas e conduzidas individualmente até a maturação para a obtenção de sementes. Após a colheita, as sementes produzidas foram armazenadas em câmara fria a 10 °C, para posterior utilização nas hibridações.

Uma vez que os genótipos testados são de origem exótica e não adaptados às condições ambientais do Brasil, foi necessária a utilização de suplementação artificial de luz para evitar o florescimento precoce. O regime de luz utilizado para a condução dos experimentos foi de 16 horas de luz e 8 horas de escuro.

### Desenvolvimento de populações segregantes

A população segregante utilizada neste trabalho foi desenvolvida a partir do cruzamento entre dois genótipos contrastantes para resistência a *P. pachyrhizi*. O genótipo GC84058214 usado como receptor de pólen é resistente e possui o gene *Rpp4* (USDA, 2015). Possui flor roxa, pubescência marrom e ausência do gene de tolerância ao glifosato. Já o genótipo BG4184 utilizado como doador de pólen, é suscetível ao patógeno, flor branca, pubescência cinza e é tolerante ao glifosato. A produção das plantas visando a criação das populações foi feita em vasos plásticos de 5 litros, utilizado o substrato comercial Carolina Soil (turfa de Sphagno 70%, palha de arroz torrefada 20%, perlita 10%, calcário dolomítico, gesso agrícola e NPK). Em cada vaso foram semeados os genótipos a serem cruzados, em cinco repetições de três plantas por genótipo. O experimento foi conduzido em câmara de crescimento, em regime de irrigação artificial por gotejamento onde foram aplicados 300 ml de água em dois turnos de rega de 60 minutos (Figura 3). Durante a fase de crescimento vegetativo as plantas foram mantidas em regime de 16 horas de luz e oito horas de escuro. Quando as plantas atingiram o estágio V8 (FEHR; CAVINESS, 1977), o regime foi ajustado para 12 horas visando a indução do florescimento.



**Figura 2.** Condução dos genitores resistentes e suscetíveis em câmara de crescimento visando a criação de populações segregantes.

Durante o florescimento, procederam-se as hibridações entre a GC84058214 e a BG4184, utilizando o primeiro como receptor e o segundo como doador de pólen. Depois de finalizadas as hibridações, as plantas foram conduzidas até a maturação para a colheita das sementes. As plantas  $F_1$  obtidas foram conduzidas em câmara de crescimento, para a produção das sementes da geração  $F_2$  (Figura 4).



**Figura 3.** Condução das plantas  $F_1$  em câmara de crescimento visando o avanço de gerações e a obtenção de sementes  $F_2$ .

O método de condução foi o mesmo utilizado na produção das plantas durante as hibridações. Durante o plantio, condução e colheita, as plantas  $F_1$  foram identificadas e

conduzidas individualmente de modo a possibilitar o estudo da segregação genotípica das populações F<sub>2</sub> nas próximas etapas do trabalho. Durante o avanço da geração F<sub>1</sub>, foram avaliados marcadores morfológicos contrastantes entre os genitores, como cor de flor, cor da pubescência e tolerância ao glifosato (Tabela 3).

**Tabela 2.** Marcadores morfológicos avaliados na geração F<sub>1</sub> visando confirmar as hibridações entre o genótipo resistente e o genótipo suscetível a ferrugem da soja.

Genitor	Flor <sup>1</sup>	Pubescência <sup>2</sup>	Tipo <sup>3</sup>
GC84058214	R	M	CN
BG4184	B	C	TG

1. Cor da flor (R: roxa; B: branca)

2. Cor da pubescência (M: marrom; C: cinza)

3. Tolerância ao glifosato (CN: convencional; TG: tolerante)

Logo após a colheita das sementes, foram selecionadas três populações F<sub>2</sub> para avanço de gerações em casa de vegetação e produção de sementes da geração F<sub>2:3</sub>. A semeadura foi realizada em ruas de 1 metro de comprimento, com espaçamento de 45 centímetros. No momento do plantio as sementes foram tratadas com o inseticida Fipronil associado aos fungicidas Piraclostrobina e Tiofanato Metílico, na dose de 200 ml do formulado comercial Standak<sup>®</sup> Top por 100 kg de sementes. Durante a condução em casa de vegetação, foram coletadas amostras de tecido das plantas das populações F<sub>2</sub> para extração de DNA utilizado em estudos de distorção de segregação e genotipagem. A verificação de possíveis distorções de segregação nas populações F<sub>2</sub> foi realizada através do teste qui-quadrado a 5% de probabilidade de erro.

No momento da colheita, as sementes produzidas por cada planta foram mantidas separadas, constituindo as famílias F<sub>2:3</sub>, que posteriormente foram utilizadas nos experimentos de inoculação artificial de ferrugem para a obtenção dos dados fenotípicos.

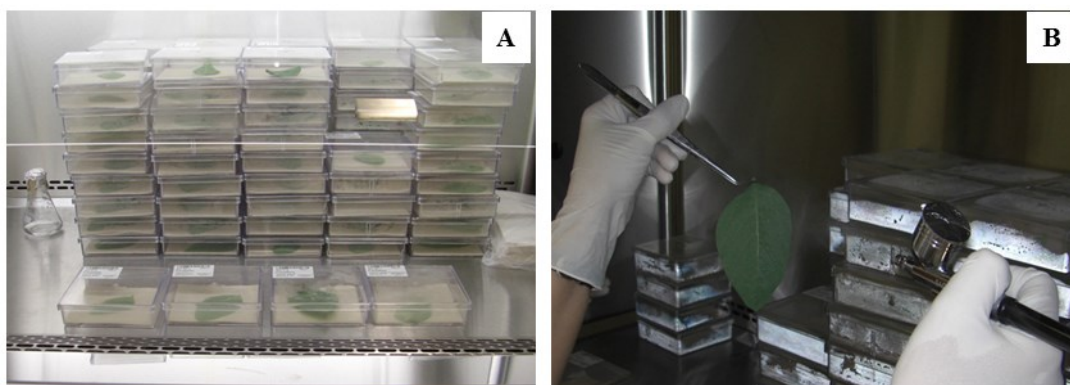
### Fenotipagem da população F<sub>2.3</sub>

Os dados fenotípicos das 230 famílias F<sub>2.3</sub> foram obtidos em experimentos de inoculação artificial de ferrugem em folha destacada (TWIZEYIMANA, 2007). Este teste foi realizado com o isolado PLM1213, coletado em Palmas-TO, na safra 2012-2013. Para a obtenção dos dados fenotípicos foram selecionadas 230 famílias F<sub>3</sub>, das quais foram produzidas 15 plantas em vasos de 5 litros, com três plantas por vaso, em câmara de crescimento. Quando as plantas atingiram o estágio V3 (FEHR; CAVINESS, 1977) foram coletados três folíolos por planta para a montagem dos experimentos de inoculação em folha destacada (TWIZEYIMANA, 2007). Para a montagem do teste, foram utilizadas caixas de poliestireno transparente, medindo 11x11x3,5 cm (Gerbox), contendo duas folhas de papel filtro de 10x10 cm, previamente esterilizadas por 30 minutos em autoclave a 120 °C. Durante a montagem do teste, as folhas de papel filtro foram umedecidas com 1 ml de água destilada esterilizada. Os folíolos coletados foram posicionados no interior das caixas Gerbox (Figura 5A) e inoculados com uma suspensão de uredíniosporos ajustada para 10<sup>5</sup> uredíniosporos/ml. O preparo da suspensão de uredíniosporos foi realizado seguindo o mesmo procedimento utilizado nos testes em casa de vegetação. A inoculação foi realizada em câmara de fluxo, com o auxílio de um atomizador, aspergindo a suspensão de uredíniosporos em toda a superfície abaxial do folíolo (Figura 5B). Em seguida, os folíolos foram incubados no escuro por 24 horas a 23 C°. Após esse período, o regime de luz foi ajustado para 12 horas de luz por 12 horas de escuro. Diariamente as caixas Gerbox foram inspecionadas, sendo acrescentada água destilada esterilizada sempre que necessário para manutenção da umidade próximo da saturação.

As avaliações fenotípicas foram realizadas 15 dias após a inoculação através da análise visual dos folíolos em microscópio estereoscópico com aumento de vinte vezes. Durante a

avaliação, os folíolos foram classificados segundo a escala proposta por Miles et al. (2011) em imunes (IM), lesões do tipo “redish-brown” (RB) ou lesões do tipo “tan” (TAN).

Também foi avaliado o nível de esporulação das lesões de acordo com a escala proposta por Akamatsu et al. (2013), onde: 0 – nenhuma esporulação; 1 – pouca esporulação; 2 – moderada esporulação; e 3 – abundante esporulação.



**Figura 4.** Caixas Gerbox preparadas para teste de folha destacada (A). Inoculação da superfície abaxial de folíolo de soja com suspensão de urediniosporos de ferrugem asiática (B).

A partir da avaliação fenotípica dos folíolos, as plantas das famílias foram classificadas individualmente nas categorias resistentes (RES), quando os folíolos apresentaram reações IM ou RB, e suscetíveis (SUS), quando a reação dos folíolos foi do tipo TAN. A partir da classificação individual das plantas, o fenótipo das famílias foi definido segundo a proporção de plantas em cada categoria. Quando a proporção de plantas RES foi maior que 80%, as famílias foram definidas como RESISTENTES. E quando a proporção de plantas RES foi menor que 20%, as famílias foram definidas como SUSCETÍVEIS. As famílias onde a proporção de plantas RES foi menor que 80%, e maior que 20%, foram definidas como HETEROZIGOTAS. Assim, os dados fenotípicos utilizados posteriormente nas análises estatísticas visando a identificação de marcadores moleculares associados ao gene de resistência, foram o número de famílias nas categorias RESISTENTES, HETEROZIGOTAS



e SUSCETÍVEIS. A partir dos dados fenotípicos das famílias F<sub>3</sub> foi possível inferir o genótipo das populações F<sub>2</sub>.

### Genotipagem da população F<sub>2</sub>

#### Extração de DNA de soja

Para a realização dos estudos moleculares, foram extraídos 50 miligramas de amostras individuais de tecido foliar das 230 plantas das populações F<sub>2</sub>. Depois de liofilizadas, as amostras foram enviadas para laboratório para extração de DNA através do protocolo HotSHOT (Hot Sodium Hydroxide and Tris) (TRUETT et al., 2000).

O método HotSHOT é rápido, de baixo custo e permite a automação através do emprego de placas com capacidade para 96 tubos em um processo de genotipagem de alto rendimento (TRUETT et al., 2000). Para o preparo de 100 ml do tampão alcalino de lise foram utilizados 25 ml de NaOH 100 mM e 0.4 ml de Na<sub>2</sub> EDTA 50 mM (pH8) dissolvidos em 74.6 ml de ddH<sub>2</sub>O (água destilada e deionizada). O pH das soluções se ajusta automaticamente. Não é necessário armazenar sob refrigeração, mas deve-se verificar as soluções antes de nova utilização.

Para o processo de extração do DNA, foram pipetados 50 µL do tampão alcalino de lise nos microtubos contendo as amostras de tecido foliar. Em seguida as amostras foram incubadas a 95 °C por 30 minutos, e na sequência colocadas no gelo por 4-5 minutos e centrifugadas. Após, foram adicionados 50 µL de solução ácida de neutralização e novamente centrifugadas. Para a PCR foram utilizados 1-5 µL.

#### Genotipagem

Para a genotipagem dos 230 indivíduos F<sub>2</sub> foram usados 121 marcadores do tipo SNP (Single Nucleotide Polymorphism). Após a eliminação dos marcadores monomórficos,

heterozigotos, não informativos, distorcidos, em alto desequilíbrio de ligação e com mais de 90% de dados perdidos, restaram 91 marcadores que foram utilizados para genotipagem. A genotipagem das plantas das populações F<sub>2</sub> foi obtido utilizando-se o protocolo TaqMan® SNP Genotyping Assay (Applied Biosystem, 2011).

Visando identificar possíveis distorções de segregação, foram selecionados aleatoriamente no cromossomo 18, três marcadores polimórficos entre os genitores para estudo da estrutura genotípica das populações F<sub>2</sub>.

#### Mapeamento de QTLs (Quantitative Trait Loci)

Os dados genotípicos, juntamente com os dados fenotípicos (tipo de lesão), foram submetidos a análise estatística com o programa R/qtl (versão 1.37-11, 2015) visando identificar marcadores ligados aos genes de resistência. O valor limite 6.64 (LOD treshold) para a detecção de QTLs foi baseado em 500 permutações. Para a confecção do mapa de ligação foi utilizado o programa MapChart<sup>©</sup> 2.3 (Voorrips, 2002).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### Testes em casa de vegetação

Os resultados dos testes em casa de vegetação demonstraram que os genótipos utilizados como fontes de resistência não são homogêneos na reação à ferrugem (Tabela 2). Uma das causas dessas variações pode ser de origem genética, uma vez que estes genótipos não foram purificados previamente para esta característica. É provável que os mesmos sejam formados por uma mistura de plantas resistentes e suscetíveis. Outra provável causa de variação está relacionada a origem do inóculo utilizado. Como o mesmo foi formado a partir de

urediniosporos coletados em diferentes locais no campo, sem purificação e caracterização prévias, é possível que sejam formados por uma população de isolados.

**Tabela 3.** Reação de genótipos de soja portadores de genes de resistência inoculados com uma mistura de isolados de *Phakopsora pachyrhizi* em casa de vegetação.

FONTE DE RESISTÊNCIA	GENE	% DE PLANTAS RESISTENTES	REAÇÃO*
PI200492	<i>Rpp1</i>	18%	SUS
PI587880A	<i>Rpp1</i>	30%	SUS
PI587886	<i>Rpp1</i>	20%	SUS
PI587905	<i>Rpp1</i>	33%	SUS
PI594760B	<i>Rpp1</i>	50%	MS
PI594767A	<i>Rpp1</i>	35%	SUS
PI594538A	<i>Rpp1-b</i>	33%	SUS
PI224270	<i>rpp2</i>	47%	MS
PI230970	<i>Rpp2</i>	67%	MR
PI416764	<i>Rpp3</i>	60%	MR
PI462312	<i>Rpp3</i>	4%	SUS
PI200487	<i>Rpp3/Rpp5</i>	92%	RES
PI471904	<i>Rpp3/Rpp5</i>	38%	SUS
GC84058214	<i>Rpp4</i>	80%	RES
PI459025A	<i>Rpp4</i>	38%	SUS
PI459025B	<i>Rpp4</i>	60%	MR
PI200456	<i>rpp5</i>	67%	MR
PI567102B	<i>Rpp6</i>	70%	MR

\*RES: Resistente; MR: Moderadamente Resistente; MS: Moderadamente Suscetível; SUS: Suscetível.

Os resultados obtidos nos testes em casa de vegetação concordam com Hartman (1999) e Yamaoka et al. (2002), que citam a existência de raças de ferrugem compatíveis com genótipos portadores de genes de resistência. No entanto, neste trabalho foram observadas diferenças nas reações apresentadas por alguns genótipos, como por exemplo, PI200492, PI459025, PI587880A e PI587905. Em Yamaoka et al. (2002), os genótipos citados apresentaram resistência à um grupo de isolados coletados no Japão, enquanto que neste trabalho apresentaram suscetibilidade a uma mistura de isolados coletados no Brasil. As variações observadas podem ser explicadas pela origem geográfica diferente dos isolados de *P. pachyrhizi* utilizados.

A precisão na identificação de marcadores moleculares ligados a genes de resistência da soja à ferrugem depende diretamente da qualidade dos dados fenotípicos obtidos nos testes de inoculação de populações. Assim, considerando as causas de variação citadas acima, foram adotadas duas estratégias visando minimizar sua influência nas demais etapas do trabalho. A primeira medida foi purificar os genótipos testados. Para isso, as plantas avaliadas foram colhidas individualmente e as sementes produzidas pelas plantas classificadas como resistentes foram novamente multiplicadas em casa de vegetação até a obtenção de volume suficiente para a realização das hibridações. Desse modo, buscamos assegurar a pureza genética dos genitores em relação à característica selecionada. A segunda medida adotada foi a utilização de um único isolado nos experimentos de caracterização fenotípica das populações de mapeamento. Com base nos resultados dos testes de virulência, foi selecionado o isolado PLM1213, coletado em Palmas-TO, na safra 2012-13, o qual mostrou-se incompatível com o genótipo GC84058214 (*Rpp4*).

#### Desenvolvimento de populações segregantes

A partir das hibridações entre o genótipo resistente GC84058214 (*Rpp4*) e o genótipo suscetível BG4184, foram obtidas 11 plantas F<sub>1</sub>, as quais foram conduzidas individualmente em vasos, em câmara de crescimento, para a produção das sementes F<sub>2</sub>. Durante o avanço de gerações da F<sub>1</sub>, foram avaliados marcadores morfológicos contrastantes entre os genitores, como cor da flor, cor da pubescência e tolerância ao glifosato. A tolerância ao glifosato foi a característica contrastante utilizada para a confirmação das hibridações, onde três plantas F<sub>1</sub> foram confirmadas como sendo híbridos do cruzamento entre os genitores selecionados. As sementes obtidas dessas plantas constituíram as populações F<sub>2</sub> e, posteriormente, as famílias F<sub>2:3</sub>, as quais foram objeto dos estudos visando a identificação de marcadores moleculares.

Em estudos moleculares visando a identificação de marcadores ligados a genes de resistência, além da qualidade dos dados fenotípicos, é fundamental que a estrutura genética da população avaliada não tenha sofrido alterações significativas durante o processo de avanço de gerações. Desse modo, visando detectar a presença de possíveis distorções, foram selecionados três marcadores moleculares tipo SNP (Single Nucleotide Polymorphism) polimórficos entre os genitores para estudos de segregação durante a condução das populações F<sub>2</sub> em casa de vegetação (Tabela 4).

**Tabela 4.** Relação de marcadores polimórficos e resultados do teste qui-quadrado obtidos na verificação de distorções de segregação das populações F<sub>2</sub>.

POPULAÇÃO	MARCADOR	SNPs GENITORES			GENOTIPO OBSERVADO NA F <sub>2</sub>				ESPERADO	$\chi^2_{0.05}$
		GEN A <sup>1</sup>	GEN B <sup>2</sup>	HET <sup>3</sup>	GEN A	HET	GEN B	TOTAL		
População 1	S02791-1	G	C	C,G	22	50	25	97	1:2:1	0.28 <sup>ns</sup>
	S04925-1	A	T	A,T	22	43	27	92	1:2:1	0.93 <sup>ns</sup>
	S06987-1	T	G	G,T	23	45	28	96	1:2:1	0.93 <sup>ns</sup>
População 2	S02791-1	G	C	C,G	20	28	22	70	1:2:1	2.91 <sup>ns</sup>
	S04925-1	A	T	A,T	15	29	23	67	1:2:1	3.12 <sup>ns</sup>
	S06987-1	T	G	G,T	17	30	23	70	1:2:1	2.46 <sup>ns</sup>
População 3	S02791-1	G	C	C,G	18	48	12	78	1:2:1	5.08 <sup>ns</sup>
	S04925-1	A	T	A,T	19	48	12	79	1:2:1	4.90 <sup>ns</sup>
	S06987-1	T	G	G,T	19	49	12	80	1:2:1	5.28 <sup>ns</sup>

1.GEN A: Genitor resistente.

2.GEN B: Genitor suscetível.

3.HET: Heterozigoto.

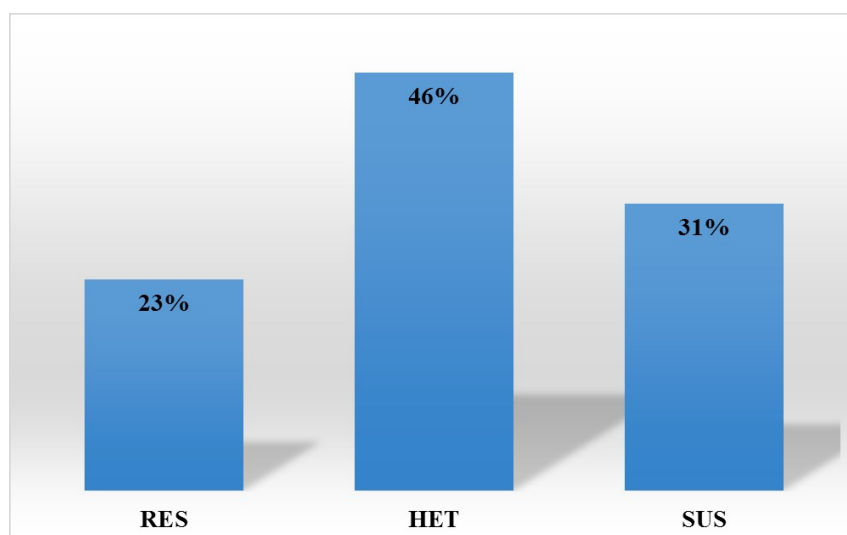
Em genética, os resultados numéricos observados em um experimento são frequentemente comparados com aqueles esperados com base em alguma hipótese (RAMALHO, 2004). Comparando os valores observados com os esperados para cada marcador, obtivemos o desvio de segregação. Para saber se esse desvio é significativo, ou seja, não foi devido ao acaso, lançamos mão de testes estatísticos, como o teste qui-quadrado. No caso deste experimento, espera-se que os marcadores polimórficos entre os genitores da população F<sub>2</sub> segreguem na proporção 1:2:1.

Conforme os dados relacionados na Tabela 4, o teste qui-quadrado mostrou que, a 5% de probabilidade de erro, os desvios não foram significativos. Portanto, podemos afirmar com

95% de certeza que as populações  $F_2$  avaliadas não apresentaram distorções de segregação, e, portanto, apresentaram-se aptas para utilização nos experimentos de identificação de marcadores moleculares associados a genes de resistência. Assim, as três populações foram avançadas para os experimentos de fenotipagem.

### Fenotipagem da população $F_{2:3}$

Utilizando-se o método da folha destacada (TWIZEYIMANA, 2007), plantas das 230 famílias  $F_3$  foram testadas individualmente contra o isolado de ferrugem selecionado. Após o cálculo do valor fenotípico conforme o método já descrito, as famílias foram classificadas em 53 resistentes, 105 heterozigotas e 72 suscetíveis, representadas em proporções na Figura 6. A partir dos resultados fenotípicos obtidos na geração  $F_3$ , foram inferidos os genótipos dos indivíduos da geração  $F_2$  e realizadas as análises dos desvios de segregação utilizando o teste qui-quadrado a 5% de probabilidade de erro.



**Figura 5.** Proporções fenotípicas obtidas no teste de inoculação das famílias  $F_{2:3}$  pelo método da folha destacada com o isolado de ferrugem asiática.

Na análise da segregação fenotípica, verificou-se que os valores observados não diferiram significativamente dos valores de segregação esperados pelo modelo de segregação 1:2:1, embora o resultado do teste qui-quadrado tenha sido significativo para uma das populações. Desse modo, o resultado da segregação fenotípica para resistência à ferrugem asiática da soja sugere a presença de um único gene dominante no genótipo GC84058214 (Tabela 5).

**Tabela 5.** Segregação fenotípica de famílias F<sub>3</sub> oriundas das hibridações entre genótipo resistente e suscetível a ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi*).

POPULAÇÃO	OBSERVADO			TOTAL	ESPERADO			$\chi^2_{0.05}$
	RES <sup>1</sup>	HET <sup>2</sup>	SUS <sup>3</sup>		RES	HET	SUS	
População 1	15	46	32	93	23	47	23	6.23*
População 2	16	31	17	64	16	32	16	0.09 <sup>ns</sup>
População 3	22	28	23	73	18	37	18	3.99 <sup>ns</sup>
<b>TOTAL</b>	<b>53</b>	<b>105</b>	<b>72</b>	<b>230</b>	<b>57</b>	<b>116</b>	<b>57</b>	<b>4.88<sup>ns</sup></b>

1.RES: número de plantas resistentes; 2.HET: número de plantas heterozigotas; 3.SUS: número de plantas suscetíveis.

### Obtenção de dados genotípicos da população F<sub>2</sub>

Durante o processo de extração, o DNA necessário para as análises genéticas pode estar contaminado por lípidos, proteínas, polissacáridos e outras impurezas, que podem interferir nos métodos de análise e na qualidade do DNA obtido. No entanto, os métodos tradicionais para o isolamento de DNA são demorados e os reagentes utilizados são dispendiosos. No método HotSHOT, as amostras são incubadas brevemente em NaOH quente e, em seguida, neutralizadas por tampão Tris. Este método mostrou ser rápido, confiável e pouco dispendioso para o isolamento de DNA. Embora a preparação de DNA pela técnica HotSHOT seja limitada a aplicações de PCR, a economia de tempo e reagentes em relação aos métodos

tradicionais é substancial, e a qualidade dos resultados é tão bom ou ligeiramente melhor do que o DNA preparado por métodos tradicionais.

O isolamento do DNA geralmente começa com a lise das células, o que é essencial para a destruição das estruturas proteicas e também permite a liberação dos ácidos nucleicos a partir do núcleo. Nesta técnica de extração, o hidróxido de sódio é usado principalmente para quebrar a parede celular e interromper a ligação do hidrogênio com as bases nitrogenadas. Ele também atua na conversão do DNA de cadeia dupla em DNA de cadeia simples. Este processo é chamado de desnaturação e é a parte central deste procedimento de extração de DNA. Como a presença de hidróxido de sódio torna a solução de extração muito básica ou alcalina, utiliza-se o Tris-HCl para manter o pH da solução.

A partir da análise de amostras de DNA dos 230 indivíduos da população F<sub>2</sub>, foram obtidos dados genotípicos de 121 marcadores moleculares do tipo SNP. Após uma primeira análise, marcadores não informativos, monomórficos ou heterozigotos entre os genitores, distorcidos, em alto grau de desequilíbrio de ligação, e marcadores com mais de 90% de perda de dados foram removidos da análise. Isto resultou em 91 marcadores válidos utilizados para mapeamento nas populações. As informações alélicas dos marcadores foram convertidas em A (Genitor GC84058214), B (Genitor BG4184) e H (Heterozigoto) para as análises moleculares. Neste trabalho, os marcadores selecionados para análise apresentaram ampla distribuição nos cromossomos, aumentando a probabilidade de identificação de associação significativa com genes de resistência (Tabela 6).

**Tabela 6.** Número de marcadores SNPs em cada cromossomo utilizados para a obtenção de dados genotípicos da população F<sub>2</sub>.

GRUPO DE LIGAÇÃO	D1a (1)	D1b (2)	N (3)	C1 (4)	A1 (5)	C2 (6)	M (7)	A2 (8)	K (9)	O (10)	B1 (11)	H (12)	F (13)	B2 (14)	E (15)	J (16)	D2 (17)	G (18)	L (19)	I (20)
MARCADORES	6	8	3	4	6	6	3	7	3	3	5	3	4	4	4	4	4	7	3	4



Os dados de segregação genotípica dos 91 marcadores na população F<sub>2</sub> indicaram a presença de vários marcadores candidatos ao longo dos vinte cromossomos (Tabela 7). De acordo com o teste qui-quadrado, apenas 17% dos marcadores apresentaram segregação genotípica significativamente diferente do esperado. Por este motivo, estes marcadores foram desconsiderados das análises subsequentes. Os demais marcadores, juntamente com os dados fenotípicos, foram utilizados nas análises estatísticas para identificação de possíveis marcadores associados a genes de resistência.

**Tabela 7.** Teste qui-quadrado da segregação genotípica de 91 marcadores SNPs em população F<sub>2</sub>.

MARCADOR	CROMOSSOMO	OBSERVADO				ESPERADO	$\chi^2_{0.05}$
		RES <sup>1</sup>	HET <sup>2</sup>	SUS <sup>3</sup>	TOTAL		
S03327-1	D1a (1)	55	113	56	224	1:2:1	0.03ns
S03266-1	D1a (1)	51	123	54	228	1:2:1	1.5ns
S01313-1	D1a (1)	54	121	45	220	1:2:1	2.94ns
S00591-1	D1a (1)	56	119	43	218	1:2:1	3.55ns
S00469-1	D1a (1)	42	128	50	220	1:2:1	6.47*
S00191-1	D1a (1)	36	135	50	221	1:2:1	12.21*
S07043-2	D1b (2)	57	108	46	211	1:2:1	1.26ns
S00290-1	D1b (2)	47	123	55	225	1:2:1	2.35ns
S01085-1	D1b (2)	53	128	49	230	1:2:1	3.3ns
S00359-1	D1b (2)	43	124	56	223	1:2:1	4.3ns
S02748-1	D1b (2)	46	0	65	111	1:2:1	116.46*
S04287-1	D1b (2)	47	71	77	195	1:2:1	23.52*
S04678-1	D1b (2)	44	131	52	227	1:2:1	5.94ns
S01201-1	D1b (2)	48	121	52	221	1:2:1	1.96ns
S01852-1	N (3)	44	101	67	212	1:2:1	5.46ns
S06101-1	N (3)	43	119	57	219	1:2:1	3.43ns
S04733-1	N (3)	41	120	60	221	1:2:1	4.75ns
S01259-1	C1 (4)	37	116	50	203	1:2:1	5.78ns
S01097-1	C1 (4)	34	139	57	230	1:2:1	14.96*
S01047-1	C1 (4)	55	109	56	220	1:2:1	0.03ns
S01725-1	C1 (4)	50	104	49	203	1:2:1	0.14ns
S00858-1	A1 (5)	46	112	51	209	1:2:1	1.18ns
S05087-1	A1 (5)	49	129	45	223	1:2:1	5.62ns
S01054-1	A1 (5)	50	108	53	211	1:2:1	0.21ns
S01375-1	A1 (5)	56	110	55	221	1:2:1	0.03ns
S03108-1	A1 (5)	68	113	43	224	1:2:1	5.6ns
S00518-1	A1 (5)	52	113	51	216	1:2:1	0.47ns
S01752-1	C2 (6)	54	129	43	226	1:2:1	5.86ns
S04861-1	C2 (6)	54	129	48	231	1:2:1	3.46ns
S01438-1	C2 (6)	41	126	60	227	1:2:1	5.91ns
S07871-1	C2 (6)	55	93	55	203	1:2:1	1.42ns
S04156-1	C2 (6)	47	125	57	229	1:2:1	2.62ns
S00456-1	C2 (6)	53	106	61	220	1:2:1	0.87ns
S04117-1	M (7)	48	112	56	216	1:2:1	0.89ns
S02210-1	M (7)	46	118	63	227	1:2:1	2.89ns
S05091-1	M (7)	39	124	65	228	1:2:1	7.68*
S01872-1	A2 (8)	58	123	42	223	1:2:1	4.65ns
S07160-1	A2 (8)	54	122	46	222	1:2:1	2.95ns
S01099-1	A2 (8)	54	98	48	200	1:2:1	0.44ns
S01401-1	A2 (8)	54	117	43	214	1:2:1	3.18ns
S06093-1	A2 (8)	44	130	53	227	1:2:1	5.49ns
S03635-1	A2 (8)	47	115	60	222	1:2:1	1.88ns
S02064-1	A2 (8)	47	100	61	208	1:2:1	2.19ns

1.RES: Resistente; 2. HET: Heterozigoto; 3.SUS: Suscetível.

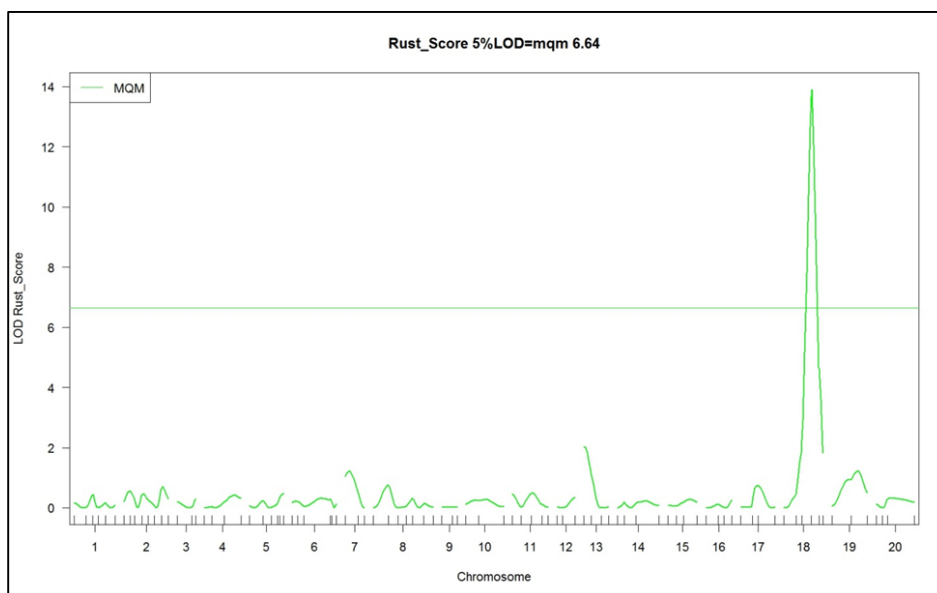
Tabela 7. Continuação...

MARCADOR	CROMOSSOMO	OBSERVADO				ESPERADO	$\chi^2_{0.05}$
		RES <sup>1</sup>	HET <sup>2</sup>	SUS <sup>3</sup>	TOTAL		
S04846-1	K (9)	54	135	40	229	1:2:1	8.71*
S00621-1	K (9)	60	125	41	226	1:2:1	5.92ns
S00402-1	K (9)	65	112	53	230	1:2:1	1.35ns
S04753-1	O (10)	48	122	55	225	1:2:1	1.88ns
S03206-1	O (10)	44	130	55	229	1:2:1	4.99ns
S00692-1	O (10)	55	89	60	204	1:2:1	3.56ns
S02348-1	B1 (11)	46	132	51	229	1:2:1	5.27ns
S02189-1	B1 (11)	56	122	43	221	1:2:1	3.73ns
S01433-1	B1 (11)	53	137	39	229	1:2:1	10.17*
S01675-1	B1 (11)	52	110	49	211	1:2:1	0.47ns
S06787-1	B1 (11)	58	126	40	224	1:2:1	6.39*
S01049-1	H (12)	52	128	42	222	1:2:1	6.39*
S01267-1	H (12)	58	117	48	223	1:2:1	1.44ns
S01840-1	H (12)	41	137	47	225	1:2:1	10.56*
S03385-1	F (13)	66	111	47	224	1:2:1	3.24ns
S13681-1	F (13)	56	123	47	226	1:2:1	2.66ns
S00308-1	F (13)	50	124	50	224	1:2:1	2.57ns
S00463-1	F (13)	56	117	54	227	1:2:1	0.25ns
S03188-1	B2 (14)	38	119	59	216	1:2:1	6.32*
S00757-1	B2 (14)	41	113	64	218	1:2:1	5.18ns
S01369-1	B2 (14)	44	126	57	227	1:2:1	4.23ns
S00185-1	B2 (14)	42	128	56	226	1:2:1	5.96ns
S01205-1	E (15)	62	116	45	223	1:2:1	2.95ns
S01417-1	E (15)	56	126	46	228	1:2:1	3.4ns
S13451-1	E (15)	53	111	62	226	1:2:1	0.75ns
S00350-1	E (15)	49	131	51	231	1:2:1	4.18ns
S04755-1	J (16)	54	122	50	226	1:2:1	1.73ns
S02272-1	J (16)	52	124	49	225	1:2:1	2.23ns
S04241-1	J (16)	56	114	55	225	1:2:1	0.03ns
S04893-1	J (16)	54	131	43	228	1:2:1	6.13*
S05604-1	D2 (17)	58	106	51	215	1:2:1	0.5ns
S10125-1	D2 (17)	1	0	228	229	1:2:1	683.02*
S00679-1	D2 (17)	59	114	55	228	1:2:1	0.14ns
S00289-1	D2 (17)	47	117	59	223	1:2:1	1.83ns
S06818-3	G(18)	39	115	56	210	1:2:1	4.82ns
S04671-1	G(18)	53	129	47	229	1:2:1	3.74ns
S02637-1	G(18)	59	0	54	113	1:2:1	115.46*
S06987-1	G(18)	52	129	49	230	1:2:1	3.72ns
S04925-1	G(18)	54	121	47	222	1:2:1	2.42ns
S01858-1	G(18)	59	111	52	222	1:2:1	0.45ns
S00011-1	G(18)	54	117	47	218	1:2:1	1.77ns
S02074-1	L (19)	58	110	56	224	1:2:1	0.11ns
S01363-1	L (19)	55	109	52	216	1:2:1	0.1ns
S04040-1	L (19)	48	126	55	229	1:2:1	2.54ns
S01243-1	I (20)	67	108	41	216	1:2:1	6.26*
S04342-1	I (20)	64	107	44	215	1:2:1	3.71ns
S00569-1	I (20)	50	119	53	222	1:2:1	1.38ns
S04183-1	I (20)	57	98	53	208	1:2:1	0.85ns

1.RES: Resistente; 2. HET: Heterozigoto; 3.SUS: Suscetível.

### Identificação de marcadores moleculares associados ao gene *Rpp4*

Utilizando os dados fenotípicos (tipo de lesão) e genotípicos obtidos, foi realizada a análise da associação entre as variâncias dos dados através do procedimento de mapeamento múltiplo no programa R/qtl. O resultado da análise estatística mostrou valor significativo de LOD score no grupo de ligação G (18), mostrando evidência da presença de um QTL associado à resistência a ferrugem asiática da soja naquele cromossomo (Figura 7). O termo LOD score é a representação do logaritmo na base 10 da razão de verossimilhança, utilizado para estimar a frequência de recombinação entre dois locos (BATISTA, 2008).



**Figura 6.** Índice de associação entre a variância fenotípica e a variância genotípica (LOD score) no estudo de identificação de marcadores SNPs associados a resistência a ferrugem asiática da soja.

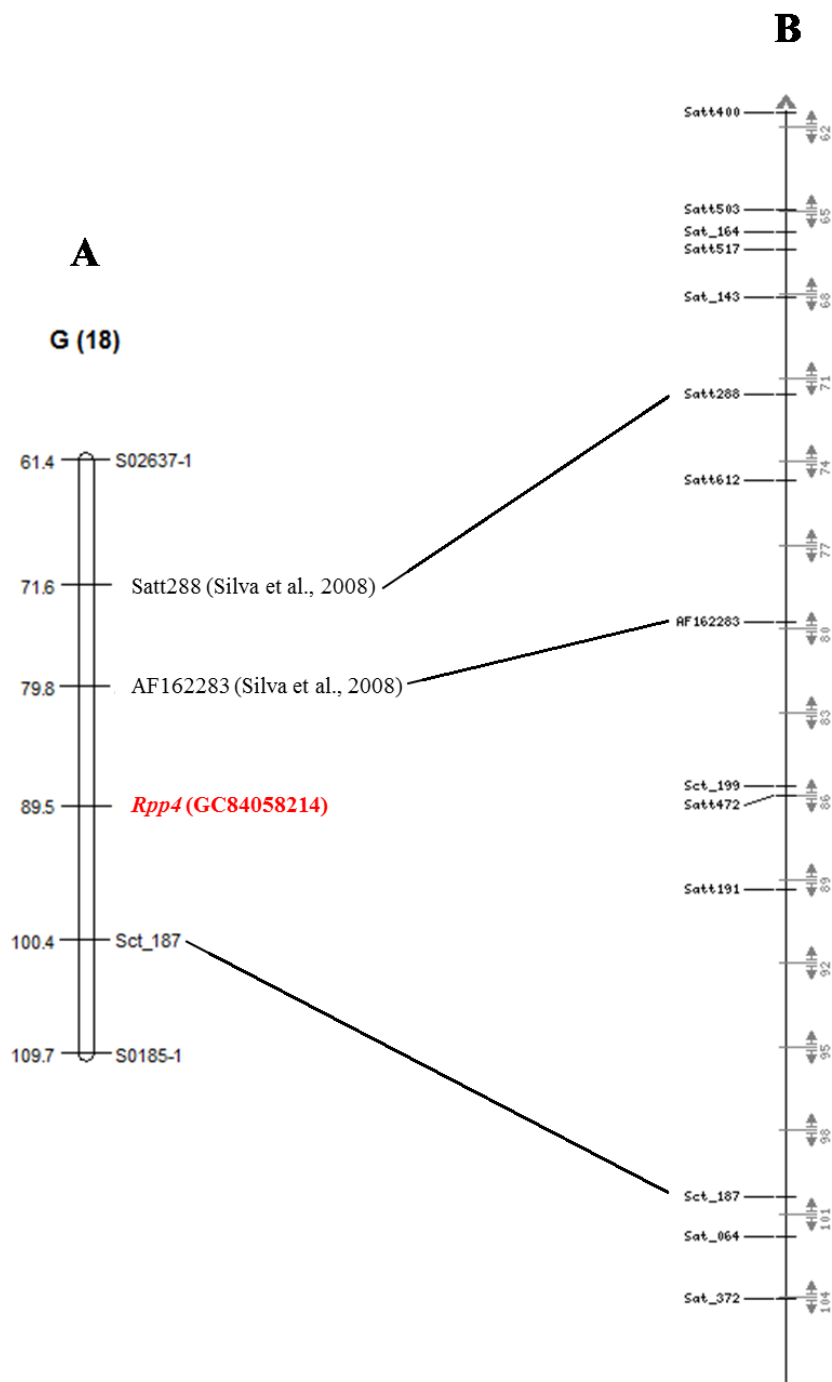
O marcador molecular identificado foi responsável por explicar aproximadamente 30% da variação fenotípica da característica estudada, e sua posição no grupo de ligação G (18) foi a 89.5 cM (Tabela 8).

**Tabela 8.** Resultado da análise estatística com o programa R/qtl para identificação de marcador molecular associado a gene de resistência a ferrugem asiática da soja.

POPULAÇÃO	LOD	VARIÂNCIA (R <sup>2</sup> )	CROMOSSOMO	POSIÇÃO (cM)
GC84058214/BG4184	16.64	30.108	G (18)	89.5

O resultado deste trabalho concorda com o resultado obtido por Silva et al. (2008), que mapearam o gene *Rpp4* no grupo de ligação G (18) a 1.9 cM do marcador Satt288 e a 12.8 cM do marcador AF162283 (Figura 8).

O mapeamento de QTLs, e seu uso em programas de melhoramento, permite direcionar as hibridações, identificar precocemente os melhores indivíduos e ainda realizar a clonagem desses QTLs. No entanto, para que a seleção assistida por marcadores moleculares melhore a eficiência dos métodos de seleção convencionais, é necessário que esses marcadores estejam fortemente ligados aos genes de interesse e sejam estáveis nos ambientes e épocas de cultivo.



**Figura 7.** Representação gráfica do mapa de ligação G da soja produzido neste trabalho (A) e o mapa consenso da soja (B), indicando o posicionamento do gene *Rpp4* em relação aos marcadores referidos por Silva et al. (2008). O mapa consenso foi obtido na página do Soybase (<http://www.soybase.org>).

## CONCLUSÕES

- Os genótipos utilizados como fontes de resistência a ferrugem asiática não são homogêneos para esta característica. Existe variação entre as plantas na reação a *Phakopsora pachyrhizi*. Em vista dessa característica, recomenda-se que os genótipos sejam purificados antes da realização de hibridações visando a transferência dos genes de resistência para germoplasma adaptado.
- A resistência do genótipo GC84058214 a ferrugem asiática é conferida pelo gene *Rpp4*, localizado no grupo de ligação G (18).
- Foi identificado um marcador SNP associado ao gene de resistência *Rpp4* localizado a 89.5 cM no grupo de ligação G (18).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BATISTA, C.E.A. 2008. Mapeamento de genes associados à resistência da soja a ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*). Piracicaba, 2008. 56 p. Dissertação (Mestrado) – ESALQ.

BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. 2009. Marcadores Moleculares. Viçosa. 532p.

BROMFIELD, K.R.; HARTWIG, E.E. 1980. Resistance to soybean rust and mode of inheritance. *Crop Science* 20: 254-255.

BROMFIELD, K.R. 1984. Soybean Rust, Monograph No. 11. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.

CALVO, E.S.; KIIHL, R.A.S.; GARCIA, A.; HARADA, A.; HIROMOTO, D. 2008. Two major recessive soybean genes conferring soybean rust resistance. *Crop Science* 48:1350-1354.

CHAKRABORTY, N.; CURLEY, J.; FREDERICK, R.D.; HYTEN, D.L.; NELSON, R.L.; HARTMAN, G.L.; DIERS, B.W. 2009 Mapping and confirmation of a new allele at Rpp1 from soybean PI594538A conferring RB lesion-type resistance to soybean rust. *Crop Science* 49: 783-790.

DIAS, W.P.; SILVA, J.F.V.; CARNEIRO, G.E.S.; GARCIA, A.; ARIAS, C.A.A. 2009. Nematóide de cisto da soja: biologia e manejo pelo uso da resistência genética. *Nematologia Brasileira* 33: 1-16.

FALEIRO, F.G.; ANDRADE, S.R.M. 2011. Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. 730 p.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ªed. Brasília: Embrapa-Cenargen. 220 p.



FEHR, W.R.; CAVINESS, C.E. 1977. Stages of soybean development. Ames: Iowa State University of Science and Technology. 11 p. (Special Report, 80).

FUNGATI, R.; BENEVENTI, M.A.; SILVA, J.F.V.; ARIAS, C.A.A.; MARIN, S.R.R.; BINNECK, E.; NEPOMUCENO, A.L. 2004. Identificação de marcadores moleculares de microssatélites para seleção de genótipos de soja resistentes a *Meloidogyne javanica*. Nematologia Brasileira 28: 125-130.

GARCIA, A.; CALVO, E.S.; KIIHL, R.A.S.; HARADA, A.; HIROMOTO, D.M.; VIEIRA, L.G.E. 2008. Molecular mapping of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) resistance genes: discovery of a novel locus and alleles. Theor. Appl. Genet. 117: 545-553.

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

GODOY, C.V.; SILVA, L.H.C.P.; UTIAMADA, C.M.; SIQUERI, F.V.; LOPES, I.O.N.; ROESE, A.D.; MACHADO, A.Q.; FORCELINI, C.A.; PIMENTA, C.B.; NUNES, C.D.M.; CASSETARI NETO, D.; JACCOUD FILHO, D.S.; FORNAROLLI, D.A.; WRUCK, D.S.; RAMOS JUNIRO, E.U.; BORGES, E.P.; JULIATTI, F.C.; FEKSA, H.R.; CAMPOS, H.D.; NUNES JUNIOR, J.; SILVA, J.R.C.; COSTAMILAN, L.M.; CARNEIRO, L.C.; SATO, L.N.; CANTERI, M.G.; ITO, M.A.; IAMAMOTO, M.M.; ITO, M.F.; MEYER, M.C.; COSTA, M.J.N.; DIAS, M.D.; MARTINS, M.C.; LOPES, P.V.; SOUZA, P.I.M.; BARROS, R.; BALARDIN, R.S.; IGARADHI, S.; SILVA, S.A.; FURLAN, S.H.; CARLIN, V.J. 2009. Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2009/10: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Londrina, Brasil: Embrapa Soja publication n. 69.

HARTMAN, G.L.; SINCLAIR, J.; RUPE, J. 1999. Compendium of soybean diseases. APS Press.

- HARTMAN, G.L.; MILES, M.R.; FREDERICK, R.D. 2005. Breeding for resistance to soybean rust. *Plant Dis.* 89:664-666.
- HARTWIG, E.E.; BROMFIELD, K.R. 1983. Relationships among three genes conferring specific resistance to rust in soybeans. *Crop Science* 23: 237-239.
- HARTWIG, E.E. 1986. Identification of a fourth major genes conferring to rust in soybeans. *Crop Science* 26: 1135-1136.
- HOSSAIN, M.M.; AKAMATSU, H.; MORISHITA, M.; MORI, T.; YAMAOKA, Y.; SUENAGA, K.; SOARES, R.M.; BOGADO, A.N.; IVANCOVICH, A.J.G.; YAMANAKA, N. 2014. Molecular mapping of Asian soybean rust resistance in soybean landraces PI 594767A, PI 587905 and PI 416764. *Plant Pathology* 64(1): 147-156.
- LI, S.; SMITH, J.R.; RAY, J.D.; FREDERICK, R.D. 2012. Identification of a new soybean rust resistance gene in PI567102B. *Theor Appl Genet* 125: 133-142.
- MAPHOSA, M.; TALWANA, H.; TUKAMUHABWA, P. 2012. Enhancing soybean rust resistance through *Rpp2*, *Rpp3* and *Rpp4* pair wise gene pyramiding. *Afr J Agric Res* 7:4271-4277.
- McLEAN, R.J.; BYTH, D.E. 1980. Inheritance of resistance to rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in soybeans. *Australian Journal Agriculture Research* 31: 951-956.
- MILACH, S.C.K.; CRUZ, R.P. 1997. Piramidização de genes de resistência as ferrugens em cereais. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.27, n.4, p.685-689.
- MILES, M.R.; BONDE, M.R.; NESTER, S.E.; BERNER, D.K.; FREDERICK, R.D.; HARTMAN, G.L. 2011. Characterizing resistance to *Phakopsora pachyrhizi* in soybean. *Plant Dis.* 95:577-581.

MORCELI, T.G.S.; TREVISOLI, S.H.U.; MORCELI JUNIOR, A.A.; KIIHL, R.A.S.; CALVO, E.S.; DiMAURO, A.O.; GARCIA, A. 2008. Identificação e validação de marcadores microssatélites ligados ao gene Rpp5 de resistência a ferrugem asiática da soja. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 43: 1525-1531.

PINHEIRO, T.M.; ARAUJO, L.G.; SILVA-LOBO, V.L.; PRABHU, A.S.; FILIPPI, M.C. 2012. Tagging microsatellite marker to a blast resistance gene in the irrigated rice. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 12: 164-170.

RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B.; PINTO, C.A.B.P. 2004. *Genética na agropecuária*. 3.ed.rev. – Lavras: UFLA. 472 p.

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

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

TEIXEIRA, F.F.; COSTA, F.M.; SABATO, E.O. LEITA, C.E.P.; MEIRELESS, W.F.; GUIMARÃES, C.T.; BELICUAS, N.J. 2013. Pre-melhoramento de milho quanto a resistência a enfezamentos. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 48: 51-58.

TRUETT, G.E.; HEEGER, P.; MYNATT, R.L.; TRUETT, A.A.; WALKER, J.A.; WARMAN, M.L. 2000. Preparation of PCR-Quality Mouse Genomic DNA with Hot Sodium Hydroxide and Tris (HotSHOT). *Bio Techniques* 29: 52-54.

TWIZEYIMANA, M.; OJIAMBO, P.S.; IKOTUN, T.; HARTMAN, G.L.; BANDYOPADHYAY, R. 2007. Comparison of field, greenhouse, and detached-leaf evaluations of soybean germplasm for resistance to *Phakopsora pachyrhizi*. *Plant Disease*, 91: 1116-1169.

USDA, ARS, National Genetic Resources Program. Germplasm Resources Information Network - (GRIN). [Online Database] National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. Available: <http://www.ars-grin.gov/4/cgi-bin/npgs/html/coop.pl?71343> (18 November 2015).

VOORRIPS, R.E. 2002. MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *The Journal of Heredity*, 93(1): 77-78.

YAMAOKA, Y.; FUJIWARA, Y.; KAKISHIMA, M.; KATSUYA, K.; YAMADA, K.; HAGIWARA, H. 2002. Pathogenic races of *Phakopsora pachyrhizi* on soybean and wild host plants collected in Japan. *Journal of Genetic Plant Pathology*, v.68, p.52-56.

YAMANAKA, N.; YAMAOKA, Y.; KATO, M.; LEMOS, N.G.; PASSIANOTTO, A.L.L.; dos SANTOS, J.V.M.; BENITEZ, E.R.; ABDELNOOR, R.V.; SOARES, R.M.; SUENAGA, K. 2011. Development of classification criteria for resistance to soybean rust and differences in virulence among Japanese and Brazilian rust population. *Trop Plant Pathol* 35:153-162.

YORINORI, J.T. 2008. Soybean germplasm with resistance and tolerance to Asian rust and screening methods. In: Kudo, H.; Suenaga, K.; Soares, R.M.; Toledo, A. (eds) *Facing the challenge of soybean rust in South America*, JIRCAS Working Report No. 58. JIRCAS, Tsukuba, pp 70-87.