

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA**

**BERNARDO DO VALE ARAÚJO MELO**

**DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES BASEADOS EM SNPs PARA  
MAPEAMENTO DE GENES DE RESISTÊNCIA EM *Lablab purpureus***

**VIÇOSA – MINAS GERAIS**

**2016**

**BERNARDO DO VALE ARAÚJO MELO**

**DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES BASEADOS EM SNPs PARA  
MAPEAMENTO DE GENES DE RESISTÊNCIA EM *Lablab purpureus***

**Trabalho de conclusão de curso apresentado à  
Universidade Federal de Viçosa como parte das  
exigências para a obtenção do título de Engenheiro  
Agrônomo. Modalidade: trabalho científico.**

**Orientador: Sérgio Hermínio Brommonschenkel**

**Coorientadores: Flávio Santos Lopes**

**Thiago Andrade Maia**

**VIÇOSA – MINAS GERAIS**

**2016**

**BERNARDO DO VALE ARAÚJO MELO**

**DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES BASEADOS EM SNPs PARA  
MAPEAMENTO DE GENES DE RESISTÊNCIA EM *Lablab purpureus***

**Trabalho de conclusão de curso apresentado à  
Universidade Federal de Viçosa como parte das  
exigências para a obtenção do título de Engenheiro  
Agrônomo. Modalidade: trabalho científico.**

APROVADO: 30 de Novembro de 2016.

---

Prof. Sérgio Hermínio Brommonschenkel  
(orientador)  
(UFV)

## RESUMO

A ferrugem asiática da soja (FAS), causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, é considerada a doença mais importante da cultura no Brasil. Atualmente, a principal forma de manejo da doença é dependente de controle químico com mistura de fungicidas dos grupos químicos das estrobilurinas e triazóis que a cada ano tornam se menos efetivos. Ainda não existem variedades comerciais de soja com resistência durável, e apesar de oito loci terem sido mapeados em soja, nenhum foi clonado. Entretanto, trabalhos recentes relataram a possibilidade de identificação e clonagem de genes de resistência de *Cajanus cajan* (Fabaceae) e sua transferência para plantas de soja nas quais conferiu resistência completa ao patógeno responsável pela FAS. No mesmo trabalho foi relatada a possibilidade de espécies da família Fabaceae apresentarem diferentes genes de resistência que possam conferir resistência à *P. pachyrhizi*. Assim como o Guandu (*Cajanus cajan*), o Lablab (*Lablab purpureus*) é uma espécie da família Fabaceae de grande distribuição em regiões tropicais e também hospedeira do agente causal da FAS. Dentro dessa espécie, observa-se acessos com resistência e susceptibilidade a doença o que levanta a possibilidade de fazer seleção assistida por marcadores permitindo a seleção de indivíduos com genótipo desejado em populações segregantes. Este trabalho teve por objetivo identificar marcadores baseados em SNPs para mapear genes de resistência à ferrugem asiática da soja em Lablab. Foi obtida uma população segregante F2 a partir do cruzamento entre os genótipos LB005 e LB010 de Lablab, considerados resistente e susceptível, respectivamente. As três subpopulações CXLB010-S1, CXLB010-S2 e CXLB010-S4, constituídas por 268, 170 e 255 plantas, respectivamente, foram inoculadas com o isolado monopostular de *P. pachyrhizi* (PPUFV02) e avaliadas aos quinze dias. O genoma dos acessos LB005 e LB010 foram sequenciados utilizando a técnica de sequenciamento Illumina visando leitura dos dois terminais de fragmentos de DNA (Pair-Ends), e cobertura mínima de 10X. As leituras obtidas foram montadas utilizando como referência o genoma de *Phaseolus vulgaris* utilizando o algoritmo BWA e os SNPs visualizados a partir do programa IGV. A partir deste programa foram retiradas sequências que permitiram o desenvolvimento do par de oligonucleotídeos usados no trabalho. A partir das técnicas CAPS e dCAPS foi possível avaliar os parentais e as subpopulações segregantes para verificar a ligação dos marcadores SNPs ao gene de resistência estudado, denominado *LpRpp01*, capaz de conferir resistência ao isolado PPUFV02. A ligação dos marcadores com o gene *LpRpp01* foi confirmada pela cosegregação com o fenótipo de resistência em três

populações segregantes utilizadas no estudo da herança da resistência. Esses marcadores estão sendo utilizados no mapeamento de alta resolução do gene *LpRpp01* visando a sua clonagem por meio da técnica de clonagem posicional.

Palavras-chave: *Phakopsora pachyrhizi*, *Glycine max*, resistência, sequenciamento, CAPS

## ABSTRACT

Asian soybean rust (ASR), caused by *Phakopsora pachyrhizi* is the major soybean disease in Brazil. Nowadays, the disease management is mainly dependent on chemical control with the mixture of strobilurins and triazoles fungicides that become less effective every year. Until today, there are no commercial varieties of soybean with durable rust resistance, and although soybean resistance loci have been mapped, no resistance genes have been cloned. Recent studies have reported the possibility of identification and cloning of *Cajanus cajan* (Fabaceae) resistance genes, a legume host of *P. pachyrhizi*. The gene was transferred to soybean plants and conferred complete resistance to the pathogen responsible for ASR. In the same work it was reported the possibility of different resistance genes, in other Fabaceae family species, that could confer resistance to *P. pachyrhizi*. Like the Guandu (*Cajanus cajan*), Lablab (*Lablab purpureus*) is also a Fabaceae with a great distribution in tropical regions and also host of the causal agent of ASR. Within this species, accesses with resistance and susceptibility to disease is observed, which raises the possibility of making selection assisted by markers allowing the selection of individuals with a desired genotype in segregating populations. This work aimed to identify SNP-based markers for mapping resistance genes for asian soybean rust in Lablab. A F2 segregating population was obtained in a cross between Lablab LB005 and LB010 genotypes considered resistant and susceptible, respectively. The three subpopulations CXLB010-S1, CXLB010-S2 and CXLB010-S4, consisting of 268, 170 and 255 plants, respectively, were inoculated with PPUFV02 monopostulate isolate of *P. pachyrhizi* and evaluated after 15 days. The genome of the LB005 and LB010 accessions were sequenced using Illumina aiming at reading both ends of DNA fragments (Pair-Ends), and minimum coverage of 10X. The readings obtained were assembled using the genome of *Phaseolus vulgaris* as reference and the BWA algorithm and the SNPs visualized from the IGV program. Sequences were taken that allowed the development of the pair of oligonucleotides used in the work. From the CAPS and dCAPS techniques it was possible to evaluate the segregant parental and subpopulations to verify the binding of the SNPs markers to the resistance gene studied, called *LpRpp01*, capable of conferring resistance to the isolate PPUFV02. The binding of the markers to the *LpRpp01* gene was confirmed by cosegregation with the resistance phenotype in three segregant populations used in the study of resistance inheritance. These markers are being used in the

high resolution mapping of the *LpRpp01* gene for cloning using the positional cloning technique.

Keywords: *Phakopsora pachyrhizi*, *Glycine max*, resistance, sequencing, CAPS

## SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO GERAL.....	9
2 – REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 – A cultura da Soja.....	13
2.1.1 – Origem e domesticação.....	13
2.1.2 – Importância .....	14
2.1.3 – Doenças na cultura da soja.....	15
2.2 – Ferrugem Asiático da Soja .....	16
2.2.1 – Histórico da Ferrugem.....	16
2.2.2 – Ciclo de vida e Epidemiologia.....	16
2.2.3 – Sintomatologia .....	17
2.2.4 – Medidas de Controle .....	18
2.2.5 – Controle Genético .....	19
2.3 – Marcadores Moleculares.....	20
2.3.1 – Marcadores SNPs.....	21
3 – MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 – Segregação da resistência das populações de <i>Lablab purpureus</i> ao isolado PPUFV02 .....	23
3.2 – Mapeamento Genético a partir de SNPs.....	24
3.2.1 – Extração do DNA.....	24
3.2.2 – Identificação dos SNPs .....	24
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	27
5 – CONCLUSÃO .....	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	32

## 1 –INTRODUÇÃO GERAL

A soja (*Glycine max* L. Merrill) é originária do continente asiático, mais especificamente do leste da China, onde é cultivada a centena de anos. A soja cultivada atualmente surgiu do cruzamento natural de espécies de soja selvagem que foram domesticadas e melhoradas. O cultivo de soja ficou restrito à China até o século XV quando viajantes ingleses e imigrantes asiáticos levaram a planta para jardins botânicos no continente europeu (EMBRAPA, 2016).

Os primeiros genótipos de soja plantados no Brasil, em 1882, vieram dos Estados Unidos e foram introduzidos para experimentos na Bahia, pelo professor Gustavo Dutra, que não obteve sucesso devido a grande diferença de clima entre a região de origem no país norte americano e a o estado da Bahia. Em 1901, o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) iniciou o cultivo de soja e distribuição de sementes a produtores paulistas, sendo considerado o marco principal da introdução da cultura no país. A soja foi introduzida no Rio Grande do Sul em 1914 e começou a ser cultivada como uma cultura de sucessão ao trigo (APROSOJA, 2016).

O aumento na demanda pelo grão de soja para produção de ração animal na década de 60 e o alto preço no mercado mundial na década de 70 tornaram a cultura mais atrativa aos produtores e ao governo brasileiro. Nestes anos, houve grande investimento para produção e melhoramento de soja com foco à adaptação de cultivares as condições climáticas do país. O desenvolvimento de cultivares adaptadas ao clima de baixas latitudes e o uso de tecnologias de correção de acidez e fertilidade de solos da região de cerrado permitiu a expansão do cultivo de soja para regiões de menor latitude, como o triângulo mineiro e os estados do centro-oeste, norte e nordeste do Brasil (EMBRAPA, 2016).

A soja é uma das culturas mais importantes do mundo devido aos seus diversos usos. O óleo extraído do grão pode ser utilizado em muitos produtos, como na alimentação humana, biodiesel, lubrificantes e desinfetantes. Do farelo pode se gerar outros vários produtos, sendo o seu principal emprego na alimentação humana e de animais. Devido ao baixo custo de produção e alto teor de proteína, este grão é uma importante fonte proteica para complementação da dieta em vários países (BEZERRA et al., 2015).

A área plantada com soja no Brasil ultrapassa 30 milhões de hectares, e a importância da cultura não se restringe aos seus diversos usos. A Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais (ABIOVE, 2016) estipula que a sojicultura gera 1,5 milhão de empregos em dezessete estados do país e leva a uma melhoria na qualidade de vida das pessoas nas principais cidades produtoras, como comprovado pela melhoria do IDH destas cidades após a chegada da sojicultura. A produção deste grão também é importante economicamente, dado que representa cerca de 32,5% das exportações brasileiras, valores que comprovam a importância da produção deste grão para a balança comercial do país (EMBRAPA, 2016).

A soja é afetada por grande número de doenças, entre fungos, bactérias, vírus e nematoides. Estima-se que na cultura da soja ocorra perda de 15 a 20% da produção devido ao ataque de patógenos. Entretanto, algumas doenças, como a Ferrugem Asiática da Soja (FAS) pode causar danos mais severos e se não manejadas corretamente podem inviabilizar o cultivo (EMBRAPA, 2011).

Considerada a doença de maior impacto na soja no país, a Ferrugem Asiática da Soja causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, quando não manejada, pode levar a uma perda de 90% da produção. O Consórcio Antiferrugem (2016) estimou o custo que a doença trouxe desde sua chegada em 2001, levando em consideração o custo médio dos produtos para combate do patógeno e das operações de aplicação, somados à perdas em produção de grãos e arrecadação. O somatório do custo devido a FAS desde a safra 2001/02 até a safra de 2013/2014 ultrapassam 23 bilhões de dólares.

O manejo da FAS é feito principalmente com medidas legislativas (vazio sanitário) e químicas, sendo que o uso de fungicidas é o mais comum. No entanto, Freire (2007) alerta sobre a importância do uso racional de fungicidas já que o uso irracional além de tornar o cultivo de soja inviável economicamente, causa impactos ambientais negativos e leva a seleção de populações do patógeno resistente aos fungicidas. A perda de eficiência já foi constatada no grupo químico Triazol desde a safra de 2007 levando a necessidade de mistura destes fungicidas com fungicidas do grupo das estrobilurinas (CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM, 2016).

O controle genético, a partir de cultivares resistentes constitui a melhor medida de controle de doenças devido ao fácil manejo, baixo custo de produção e redução de impactos ambientais decorrentes da aplicação de pesticidas (ZAMBOLIM, 2006). Diversos genes de

resistência foram mapeados em soja (*Rpp1a*, *Rpp6*, *Rpp1b* e *Rpp?* (*Hyuuga*)), mas nenhum ainda foi clonado e apenas *Rpp4* foi parcialmente caracterizado (HYTEN, 2007; MEYER, 2009). Muitos genes destes loci quando introgridos em variedades comerciais são capazes de proporcionar resistência a isolados específicos, entretanto, não são efetivos contra todos os diferentes isolados do patógeno encontrados em campo (AKAMATSU, 2013; PAUL, 2013).

Com o avanço de pesquisas e técnicas de biologia molecular que permitem a manipulação do DNA, foram desenvolvidos vários marcadores moleculares que podem ser utilizados para o mapeamento de genes. Ferreira e Grattapaglia (1998) definem marcadores moleculares como segmentos de DNA fisicamente ligados a loci que determinam uma característica e que são capazes de diferenciar dois indivíduos. Estes marcadores podem ser encontrados em regiões expressas ou não do genoma.

Marcadores moleculares ligados a genes de resistência além de serem úteis para fazer seleção assistida por marcadores permitindo a seleção de indivíduos com genótipo desejado em populações segregantes (ALZATE-MARIN et al., 2005) podem ser usados como ponto de partida para a clonagem desses genes por meio da técnica de clonagem baseada em mapeamento genético ou clonagem posicional.

O uso de marcadores SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) tem sido freqüente em estudos de mapeamento genético em função de sua abundância e ampla distribuição no genoma. A descoberta dos SNPs é efetuada por meio do seqüenciamento, enquanto a sua análise em populações segregantes é efetuada por diferentes técnicas.

Para a avaliação de um número restrito de SNPs normalmente são utilizadas técnicas baseadas em PCR como CAPS (*Cleavable Amplified Polymorphic Sites*) e dCAPS (*Derived Cleavable Amplified Polymorphic Sites*) nas quais há amplificação da região contendo o SNP por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando pares de oligonucleotídeos específicos. O uso de enzimas de restrição no produto de PCR permitem a diferenciação dos indivíduos na região do SNP (KONIECZNY e AUSUBEL, 1993).

Kawashima et al. (2016) relatou o mapeamento e clonagem do gene *CcRpp1* de guandu (*Cajanus cajan*) que ao ser transferido pra soja conferiu resistência a múltiplos isolados de *Phakopsora pachyrhizi*. Este trabalho demonstrou a possibilidade de uso de outras leguminosas infectadas pelo fungo podem ser fontes de genes de resistência contra o patógeno causador da FAS.

O *Lablab purpureus* (L.) é uma leguminosa herbácea de ciclo anual, bianual ou perene. É encontrada em regiões tropicais, principalmente no continente africano onde é utilizada na alimentação. Apesar de ser uma planta rústica, com tolerância a várias pragas e doenças, o Lablab é um hospedeiro do fungo *P. pachyrhizi* sendo observadas, dentro da espécie, variedades resistentes e susceptíveis (VAKILI, 1979). Acredita-se que, assim como Kawashima et al. (2016) reportou um gene de Guandu que conferiu resistência à FAS, esta espécie possa ser fonte de outros genes que confirmam resistência à FAS.

Dada a possibilidade de leguminosas hospedeiras de *P. pachyrhizi* apresentarem diferentes genes de resistência ao fungo, este trabalho teve por objetivo identificar marcadores baseados em SNPs para mapear genes de resistência em Lablab.

## **2 – REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 – A cultura da Soja**

#### **2.1.1 – Origem e domesticação**

A soja pertence à família Fabaceae, gênero *Glycine* e espécie *Glycine max* Merrill. Acredita-se que é originária do continente asiático, mais especificamente na China, onde é cultivada a centenas de anos (JUDD et al., 2009). Qiu e Chang (2010) argumentam que a espécie de soja selvagem *Glycine soja*, que deu origem à espécie cultivada atualmente, é encontrada apenas na China, Japão, Coreia e Rússia restringindo a região de origem da planta a algum destes países.

Não há consenso sobre qual região da China seria o centro de origem da soja. Existem teorias quanto ao surgimento nas regiões de Huanghuai, nordeste e sul da China, assim como de múltiplas regiões de origem. No entanto, sabe-se que a soja cultivada atualmente foi domesticada e melhorada por cientistas chineses. Livros, artefatos e partes de sementes escavadas comprovam o uso do grão pelos chineses há mais de cinco mil anos. (QIU e CHANG, 2010).

A soja ficou restrita ao oriente por pelo menos dois milênios, sendo plantada na Europa pela primeira vez em 1739 no jardim botânico de Paris onde tinha a finalidade de ornamentação (SEDIYAMA et al., 1985). Segundo Hartman et al. (2011), o primeiro registro de cultivo de soja no continente americano foi em 1765 nos Estados Unidos. No século XIX a cultura já era conhecida na Argentina, Egito, Cuba, Filipinas e Canadá onde era cultivada como forrageira (SEDIYAMA et al., 1985).

O primeiro relato de plantio de soja no Brasil foi feito por D'Utra em 1882, na Bahia. A variedade cultivada era oriunda dos Estados Unidos e não estava adaptada a região de baixa latitude, como no estado da Bahia, o que levou ao insucesso do plantio (SEDIYAMA et al., 2009). Em 1908, a soja foi levada ao Instituto agrônomo de Campinas (IAC) onde apresentou melhor desenvolvimento do que na Bahia. A partir do IAC, as sementes de soja começaram a ser multiplicadas e distribuídas a produtores paulistas (SEDIYAMA, 1985).

Em 1914 a soja chegou ao estado do Rio Grande do Sul. O professor da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, E. C. Craig foi quem levou a cultura para o estado onde a

planta apresentou o melhor desenvolvimento quando comparado a plantios anteriores devido à semelhança das condições climáticas do estado com o clima da região dos Estados Unidos de onde vieram as sementes da cultivar plantada (SANTOS, 1988).

Segundo Sedyama (2009) foi em 1935 que a soja começou a ser plantada em escala comercial, chegando à marca de 702 hectares plantados no ano de 1941. A partir de 1950, o cultivo da leguminosa expandiu para o sudeste, norte e nordeste do Brasil. Ainda nesta década, foi instalada no país a primeira indústria de extração de óleo de soja que tornou se mais um atrativo para produtores de soja.

O progresso e consolidação da soja como uma cultura de larga escala e grande importância econômica no país se deve ao desenvolvimento de cultivares adaptadas às baixas latitudes (MEDINA et al., 1982). Entretanto, uma série de outros fatores tornou a atividade produtiva e viável economicamente, como a valorização da soja no mercado mundial e interno na década de setenta, novas técnicas e tecnologias de insumos, corretivos, fertilizantes e máquinas para produção e para processamento da soja, topografia plana e apta a mecanização, investimentos em pesquisas para melhoramento e políticas públicas para expansão da produção agrícola (TECNOLOGIAS DE PRODUÇÃO DE SOJA, 2005).

Com a expansão do cultivo de soja para áreas de cerrado, o Brasil aumentou consideravelmente a produção de soja passando a ser o segundo maior produtor mundial do grão, atrás apenas dos Estados Unidos (EMBRAPA, 2016).

### **2.1.2 – Importância**

Com aproximadamente 106 milhões de toneladas de soja, os Estados Unidos lideram o ranking de maior produtor mundial de soja, seguido pelo Brasil que produz aproximadamente 95 milhões de toneladas anuais e pela Argentina com cerca de 55 milhões de toneladas. Juntos, estes três países representam mais de oitenta por cento da produção mundial de soja (USDA, 2016).

Em 2014, a soja representou 32,5% das exportações brasileiras, valores que comprovam a importância da produção deste grão para a balança comercial do país (EMBRAPA, 2016). Segundo dados do Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços

(MDIC, 2016), no período de Janeiro a Setembro de 2016 as exportações brasileiras do complexo da soja atingiram um valor de US\$ 23,455 bilhões.

Segundo a Embrapa (2016), a área brasileira cultivada com soja é de 31,5 milhões de hectares, sendo que no estado do Mato Grosso é responsável por 8,8 milhões de hectares. A Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais (ABIOVE, 2016) estipula que a sojicultura gera 1,5 milhão de empregos em dezessete estados do país e leva a uma melhoria na qualidade de vida das pessoas nas principais cidades produtoras, como comprovado pela melhoria do IDH destas cidades após a chegada da sojicultura.

A soja, apesar de ser considerado um alimento secundário, tem grande importância devido ao seu grande uso na alimentação humana e animal. O grão possui alto teor de proteínas e lipídios que aliado ao seu baixo custo de produção tornam o grão uma fonte proteica para complementação de dieta (BEZERRA et al., 2015).

A soja é também utilizada para produção de biodiesel, extração de compostos para indústria farmacêutica e cosmética (ácidos graxos, glicerol, esteróis e lecitina), agentes aerantes, emulsificantes antiespumantes, antiderrapantes, dispersantes, estabilizantes e umidificantes (EMBRAPA, 2016).

### **2.1.3 – Doenças na cultura da soja**

Segundo Henning et al. (2014) quarenta e seis patógenos (entre fungos, bactérias, vírus e nematoides) acometem a cultura da soja no Brasil. A quantidade de doenças cresce a cada ano devido à abertura de novas áreas e ao cultivo em larga escala.

Estima-se que na cultura da soja ocorra perda de 15 a 20% devido ao ataque de patógenos. Entretanto, algumas doenças possuem danos mais severos e se não manejadas corretamente, podem levar a uma perda total da produção, como ocorre em epidemias da Ferrugem Asiática da Soja (EMBRAPA, 2011).

## 2.2 – Ferrugem Asiático da Soja

### 2.2.1 – Histórico da Ferrugem

A soja é infectada por duas espécies do gênero *Phakopsora*. A *Phakopsora meibomia* Arthur (Arthur) causa a ferrugem americana que teve seu primeiro relato no Brasil em 1979. Entretanto, essa espécie é pouca agressiva, dependendo de temperaturas amenas para se desenvolver e geralmente a doença ocorre no final do ciclo, sendo então, pouco relatado como uma doença de impacto econômico relevante aos produtores (HENNING; GODOY, 2006).

A Ferrugem Asiática da Soja (FAS) é causada pela espécie *Phakopsora pachyrhizi* que foi relatada pela primeira vez no Japão em 1903, de onde se espalhou por toda Ásia. A doença ficou restrita ao continente asiático até 1990, quando chegou ao continente Africano. Em 2001, a doença foi relatada pela primeira vez na América do Sul e três anos depois chegou aos Estados Unidos da América (CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM, 2016).

Após ser detectado no Paraguai e no Brasil em 2001, o patógeno disseminou se rapidamente por todo o continente, sendo relatado na Argentina em 2002 e na Bolívia em 2003 (HENNING; GODOY, 2006).

Devido a grande produção e fácil disseminação de esporos de *P. pachyrhizi* pelo vento e também pelo homem, o patógeno que em 2001 encontrava-se limitado ao estado do Paraná, na safra 2002/03 foi detectado em todas as regiões produtoras, com exceção do Pará e Roraima (CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM, 2016).

O Consórcio Antiferrugem (2016) estimou o custo devido a FAS desde a safra 2001/02 até a safra de 2013/2014 em mais de 23 bilhões de dólares. Essa estimativa leva em consideração o custo médio dos fungicidas utilizados no controle do patógeno e das operações de aplicação, somada às perdas em produção de grãos e arrecadação de impostos.

### 2.2.2 – Ciclo de vida e Epidemiologia

A espécie *P. pachyrhizi* é um parasita de hábito biotrófico e por isso depende do tecido vivo do hospedeiro para se desenvolver, não sendo cultivada em meio de cultura. O ciclo do fungo começa com a produção de uredósporos produzidos em estruturas denominadas urédias

em plantas hospedeiras. A presença de hospedeiros durante todo o ano, denominado ponte verde, é essencial para a continuidade do ciclo do patógeno que se multiplica e não sobreviveria na ausência de hospedeiros (ZAMBOLIM, 2006).

Os uredósporos, após a abertura da urédia, são facilmente dispersos pelo vento e quando encontram condições de temperatura entre 18 e 26°C e lâmina de água sobre o tecido do hospedeiro, por pelo menos seis horas, germinam formando o tubo germinativo que formará em sua extremidade um apressório globoso (GOELLNER et al., 2010).

Segundo Bromfield (1984), a penetração no tecido do hospedeiro ocorre diretamente no tecido, não necessitando da abertura de estômatos para a penetração. A hifa de penetração do fungo passa pela epiderme causando a necrose da célula vegetal penetrada. Ao atingir o espaço intercelular a hifa de penetração dá origem a uma hifa primária. A partir das hifas primárias são formadas as hifas secundárias que por vez formam haustórios em regiões de contato com células do mesófilo (GOELLNER, et al., 2010; KOCH et al., 1983).

Segundo Zambolim (2006), em condições favoráveis ao patógeno, a infecção e colonização do tecido vegetal pelo fungo ocorrem entre cinco e sete dias e a produção de uredósporos ocorre entre nove e doze dias. Caso estes esporos cheguem a atingir um tecido passível de infecção da mesma planta ou de algum outro hospedeiro e encontre condições adequadas este irá infectar e recomeçará um novo ciclo. Devido à realização de mais de um ciclo do patógeno no mesmo ciclo da soja, a ferrugem é considerada uma doença policíclica.

Sabe se que a *P. pachyrhizi* é capaz de produzir teliósporos em laboratórios em condições controladas de temperatura e umidade (SAKAIRIRAT e HOPPE, 1991), no entanto sua germinação nunca foi constatada na natureza (BROMFIELD, 1984).

### **2.2.3 – Sintomatologia**

Os sintomas causados pelo fungo são observados inicialmente nas folhas inferiores da planta, onde se observa pontos com 1 a 2 mm de diâmetro que, por estarem necrosados, possuem coloração mais escura do que o tecido sadio da folha. Na parte abaxial da folha observam-se as urédias que são os sinais do patógeno causador da ferrugem. Com o desenvolvimento do fungo dentro do tecido da planta, as lesões podem atingir 2 a 5 mm de

diâmetro, podendo aparecer nos pecíolos, vagens e caules (CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM, 2016).

Em situações de alta severidade ocorre a desfolha precoce causando redução da área foliar e, conseqüentemente, redução do processo fotossintético da planta, levando a menor quantidade, peso e qualidade dos grãos. A doença pode atingir a soja em qualquer época do ciclo e pode causar perdas de 10 a 90% (CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM, 2016).

Dependendo da susceptibilidade ou não do hospedeiro, podem-se notar diferentes tipos de reações ao patógeno. Em plantas consideradas resistentes, observa-se o fenótipo de imunidade (ausência de lesões) ou lesões castanho-avermelhadas (RB – Reddish-Brown) nas quais observa-se pouca ou nenhuma esporulação. Em plantas susceptíveis são produzidas lesões de coloração bronzeadas ou castanho clara com abundante esporulação, conhecidas como lesões TAN (GOELLNER et al., 2010; MILES et al., 2011).

#### **2.2.4 – Medidas de Controle**

O controle da doença se inicia antes mesmo do plantio da soja. Como o patógeno é dependente do hospedeiro vivo para sobreviver, deve-se eliminar plantas voluntárias de soja durante a entressafra. Essa medida de controle legislativo é conhecida como “vazio sanitário”, e foi adotada para reduzir a severidade da doença. O vazio sanitário tem o objetivo de, em um período de tempo determinado por cada estado da federação, reduzir a quantidade de esporos no ambiente na época em que a soja for plantada (DEL PONTE, 2009).

O uso de variedades de ciclo precoce consiste em uma alternativa para se reduzir o impacto da doença sobre a produção. O patógeno passa por uma quantidade de ciclos menor durante o período de cultivo e com isso as plantas recebem menor quantidade de esporos fúngicos reduzindo a severidade dos danos da doença durante o período de safra (YORINORI e LAZZAROTTO, 2004; ZAMBOLIM, 2006).

A lavoura também deve ser monitorada rotineiramente, já que o patógeno tem um ciclo de reprodução rápido e dissemina-se pelo cultivo em pouco tempo. O controle químico com fungicidas deve ser iniciado logo após os primeiros sintomas ou preventivamente. É comum a aplicação preventiva quando as condições climáticas são favoráveis ao fungo e

quando se detecta a ocorrência da doença em cultivos marginais. Atualmente, é comum a utilização de misturas comerciais de fungicidas do grupo dos triazóis com os das estrobilurinas para o controle da ferrugem, dado a redução da eficiência dos triazóis desde 2008 (CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM, 2016).

Freire (2007) alerta sobre a importância do uso racional de fungicidas já que o uso irracional além de tornar o cultivo da soja inviável economicamente, causa impactos ambientais negativos e leva à seleção de populações do patógeno resistentes aos fungicidas. Del Ponte (2009) relata que no cultivo de soja da safra 2007/2008, o custo do controle químico representou mais de 80% do custo total da FAS naquele ano.

Cultivares resistentes constituem a melhor medida de controle de doenças devido ao fácil manejo, baixo custo de produção e redução de impactos ambientais decorrentes da aplicação de pesticidas (ZAMBOLIM, 2006).

No Brasil, algumas variedades foram desenvolvidas e lançadas como capazes de prover resistência a alguns isolados da FAS, no entanto não se observa em campo uma variedade com resistência completa aos isolados presentes em campo (KAWASHIMA, 2016).

### **2.2.5 – Controle Genético**

Atualmente, oito loci de resistência foram mapeados em soja (*Rpp1a*, *Rpp6*, *Rpp1b* e *Rpp?* (*Hyuuga*)), mas nenhum ainda foi clonado e apenas *Rpp4* foi parcialmente caracterizado (HYTEN, 2007; MEYER, 2009). Muitos genes destes loci quando introgridido sem variedades comerciais são capazes de proporcionar resistência a determinados isolados. Todavia, não são efetivos contra os diferentes isolados do patógeno observados em campo (AKAMATSU, 2013; PAUL, 2013).

Yamanaka et al. (2010) ao avaliar inoculação de diferentes genótipos de soja com três isolados de *P. pachyrhizi* verificou que esses isolados eram capazes de suplantar a resistência conferida por genes de efeito principal quando presente isoladamente em um cultivar, como o gene *Rpp2* dos acessos PI230970 e PI417125.

Devido à alta capacidade do fungo de suplantar a resistência monogênica, uma boa estratégia para o manejo da doença seria a piramidação de genes de resistência associada a

outras métodos de controle que reduzam a população do patógeno, como o controle químico e o vazio sanitário, aumentando a longevidade das variedades resistentes (UNFRIED et al., 2010).

O fungo *P. pachyrhizi* é capaz de infectar várias plantas em campo. Slaminko (2008) relata que o patógeno tem ao menos 31 espécies hospedeiras em 17 gêneros distintos em experimento realizado em casa de vegetação. No entanto, há relatos de 152 leguminosas em 56 gêneros que são descritas como potenciais hospedeiros do fungo (SLAMINKO, 2008; ONO, 1992).

Segundo Kawashima et al. (2016) as diversas espécies de leguminosas que são infectadas pelo fungo causador da FAS podem ser fontes de genes de resistência para a soja. Os autores comprovaram essa possibilidade por meio da clonagem do gene *CcRpp1* de *Cajanus cajan*, e sua transferência para a soja por meio da transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. As plantas de soja transgênicas apresentaram resistência aos isolados coletados em diferentes regiões produtoras de soja no Brasil, a dois isolados coletados nos Estados Unidos e um isolado japonês. O gene *CcRpp1* foi clonado pela estratégia de clonagem baseada em mapeamento genético ou clonagem posicional que emprega marcadores moleculares localizados próximo do gene para isolar a região do genoma que contém o gene de resistência.

O *Lablab purpureus* (L.) é uma leguminosa herbácea de ciclo anual, bianual ou perene. É encontrada em regiões tropicais, principalmente no continente africano onde é utilizada na alimentação. Apresenta inflorescência de cor branca, rosa ou roxa em racemos e produz vagens com duas ou três sementes. No Brasil é utilizada para adubação verde, devido a grande produção de massa verde e a fixação biológica de nitrogênio, e como forrageira na dieta animal (FAO, 2016).

Apesar de ser uma planta rústica, com tolerância a várias pragas e doenças, o *Lablab* é um hospedeiro do fungo *P. pachyrhizi* sendo observado, dentro da espécie, variedades resistentes e susceptíveis (VAKILI, 1979). Acredita-se que esta espécie possa ser estudada para se identificar genes de resistência à FAS como realizado com o Guandu (*C. cajan*) por Kawashima et al. (2016).

### **2.3 – Marcadores Moleculares**

Os primeiros estudos genéticos foram realizados com o uso de marcadores morfológicos determinados por mutações simples que geram alterações fenotípicas de fácil identificação entre indivíduos. Entretanto, estes marcadores têm seu uso limitado já que poucos marcadores morfológicos ligados a características de interesse foram identificados (GUIMARÃES e MOREIRA, 1999).

Com o avanço de pesquisas e técnicas de biologia molecular que permitem a manipulação do DNA, surgiram vários tipos de marcadores moleculares que são empregados atualmente. Ferreira e Grattapaglia (1998) definem marcadores moleculares como segmentos de DNA fisicamente ligados a loci que determinam uma característica, sendo capazes de diferenciar dois indivíduos. Estes podem ser de regiões expressas ou não do genoma.

Ferreira e Grattapaglia (1998) citam vantagens que justificam o uso de marcadores moleculares no melhoramento e estudo genético de plantas, como a grande quantidade de polimorfismos distribuída aleatoriamente pelo genoma e a independência de efeitos ambientais e do estágio fisiológico da planta, o que permite a identificação do genótipo em indivíduos em estados iniciais de desenvolvimento.

Atualmente existem diferentes tipos de marcadores moleculares que diferenciam se entre si pela técnica, custo, capacidade de diferenciar indivíduos, reprodutibilidade e facilidade de uso. Caixeta et al. (2016) cita técnicas baseadas na hibridização de DNA, como a RFLP e minissatélites e outras baseadas na técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), como RAPD, AFLP, microssatélites, SCAR, STS e marcadores SNPs.

### **2.3.1 – Marcadores SNPs**

Os marcadores SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) se baseiam na detecção de polimorfismo resultante da alteração de um único nucleotídeo no genoma. Estas variações de base única podem representar até 90% do polimorfismo encontrado no genoma humano e em plantas a sua observação também é frequente (CAIXETA, et al, 2016).

Os SNPs surgem como importantes marcadores para criação de mapas genéticos de alta resolução devido a sua alta frequência e distribuição pelo genoma. Estes podem estar presentes em regiões expressas ou não expressas do genoma. Devido a redução crescente do

custo de sequenciamento de genomas o uso destes marcadores tem-se tornado cada vez mais comum (CAIXETA, et al, 2016).

Para a detecção de SNPs pode-se sequenciar fragmentos amplificados a partir de PCR utilizando vários indivíduos que representem as diferenças da população ou utilizar análise eletrônica de variação de ponto devido ao grande banco de dados de organismos sequenciados atualmente (CAIXETA, et al, 2016).

A detecção de SNPs também é realizada pela técnica de CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequences*) na qual polimorfismos são criados por enzimas de restrição que tem um sitio de clivagem, criado ou abolido, devido a SNPs. A clivagem de produtos de PCR amplificados com um par de oligonucleotídeos específicos permite a visualização de polimorfismo em gel de agarose (KONIECZNY e AUSUBEL, 1993).

Quando não há enzima de restrição que possibilite o uso da técnica CAPS, pode-se recorrer a técnica dCAPS (*Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences*) que induz ou destrói um sitio de reconhecimento da enzima de restrição pelo uso de um par de oligonucleotídeos, que apresentem bases extras. Na técnica dCAPS, quando a enzima de restrição é utilizada no produto de PCR amplificado, observa-se o polimorfismo em gel de agarose, assim como ocorre na técnica CAPS (NEFF et al. 1998).

### 3 – MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 – Segregação da resistência das populações de *Lablab purpureus* ao isolado PPUFV02

Os genótipos LB005 e LB010 foram utilizados como genitores resistentes e susceptíveis, respectivamente, em um cruzamento com o objetivo de obter uma população segregante para o estudo da herança da resistência ao isolado monopostular PPUFV02 de *Phakopsora pachyrhizi*.

As sementes oriundas do cruzamento foram semeadas em vasos de 4 litros contendo uma mistura de solo e substrato Tropstrato HTe esterco. As plantas foram confirmadas como híbridas a partir de marcadores SNP que foram polimórficos entre os parentais.

Dentre os híbridos foram selecionadas três plantas, CXLB010-S1, CXLB010-S2 e CXLB010-S4 que após a autofecundação deram origem a uma progênie de 268, 170 e 255 plantas, respectivamente, que foram plantados em vasos de 0,5 L com substrato de composição anteriormente descrita.

Ao apresentar o primeiro trifólio totalmente expandido, as folhas cotiledonares das plantas foram inoculadas com esporos de PPUFV02 em uma suspensão de  $1,0 \times 10^5$  uredósporos/mL em água destilada e Tween 20 (0,01%). Para inocular foi utilizado um atomizador de ar direto. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara de nevoeiro a 25°C, no escuro, por 24 horas. As plantas foram transferidas para casa de vegetação, junto com plantas LB005 e LB010 que funcionaram como plantas controle para a inoculação.

A avaliação da inoculação foi realizada com nove e quinze dias e as plantas foram classificadas de acordo com uma escala de avaliação visual. O resultado dessa avaliação fenotípica foi comparado com o resultado genotípico dos marcadores para confirmar a ligação dos marcadores moleculares com o gene de resistência, visando a seleção de indivíduos com eventos de recombinação informativos na região, visando o posicionamento do gene de resistência no menor intervalo genético possível.

## **3.2 – Mapeamento Genético a partir de SNPs**

### **3.2.1 – Extração do DNA**

A extração do DNA das plantas seguiu o protocolo de Doyle (1987) com modificações. O tecido foliar de cada planta (100mg) foi coletado separadamente em eppendorfs de 2,0mL e colocados no gelo. Em cada eppendorf foi adicionado três esferas de aço inoxidável e, com uso do equipamento TissueLyser, o material foi macerado. Ao tecido macerado foi adicionado 1,0mL de tampão de extração (2% (p v<sup>-1</sup>) CTAB, 100mM Tris-HCl (pH 8,0), 20mM EDTA (pH 8,0), 1,4 NaCl, 2% (p v<sup>-1</sup>) PVP 40) pré aquecido a 65°C e levado ao vortex antes de incubar a 65°C por dez minutos, invertendo a cada cinco minutos. Após deixar cinco minutos na temperatura ambiente foram adicionados 700µL de CIA (clorofórmio: álcool isoamílico, na proporção 24:1) gelado e inverteu se os eppendorfes várias vezes até formar uma emulsão. Após a formação da emulsão, as amostras foram centrifugadas por cinco minutos a 13.000 rpm e transferiu-se a fase aquosa para um novo eppendorf. Foram acrescentados 480µL de isopropanol gelado e 65 µL de CTAB 10% e os tubos foram invertidos algumas vezes antes de incubar a -20°C por trinta minutos. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por sete minutos. Descartou se o sobrenadante e os pellets foram lavados com Etanol 70%. Após a lavagem, os eppendorfs foram colocados, invertidos, sobre uma folha de papel toalha para secar e depois ressuspensos em 50µL de TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) com RNase (50µgmL<sup>-1</sup>) e incubados a 37°C por uma hora.

A concentração, quantidade e qualidade do material extraído foi verificada com o uso do NanoDrop 1000 Spectrophotometer. O DNA foi diluído para a concentração de 25ng µL<sup>-1</sup> e armazenado em freezer a -20°C.

### **3.2.2 – Identificação dos SNPs**

O genoma dos acessos LB005 e LB010, que foram considerados, respectivamente, como resistentes e suscetíveis ao isolado PPUFV02 foram sequenciados utilizando a técnica de sequenciamento Illumina no BGI (Beijin Genomics Insitute), China, visando leitura dos dois terminais de fragmentos de DNA (Pair-Ends), e cobertura mínima de 10X. As leituras

obtidas foram montadas utilizando como referência o genoma de *Phaseolus vulgaris*, sequenciado e disponível (VLASOVA et al, 2016) utilizando o algoritmo BWA. Os SNPs foram visualizados utilizando o programa IGV (THORVALDSDÓTTIR et al., 2013). Utilizando-se o mesmo programa foram extraídas as sequências contendo o SNP (cerca de 200 bp de cada lado) que foram utilizadas para o desenvolvimento de marcadores CAPS e dCAPS. Para isso foram utilizados os programas dCAPS (helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html) e Primer 3.0 (<http://primer3.ut.ee>). Os oligonucleotídeos desenhados para cada ensaio foram sintetizados pela empresa IDT Technologies (<http://www.idtdna.com/site>).

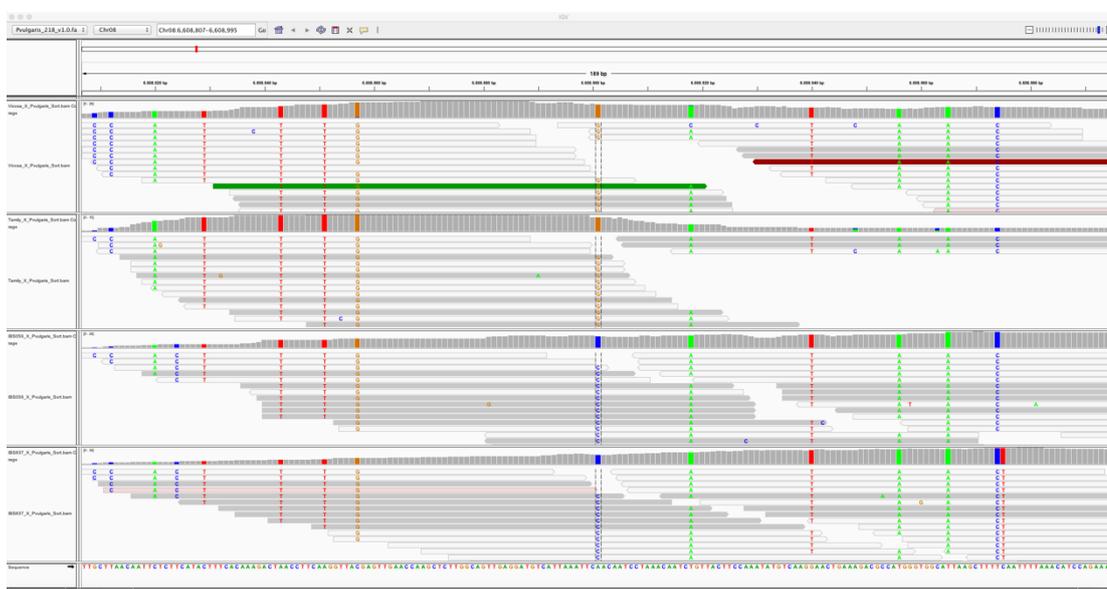


Figura 01 – Detalhe da montagem das sequências e visualização de regiões do genoma dos acessos LB005 e LB010 contendo polimorfismos de base única (SNPs) – Programa IGV

A amplificação das regiões contendo os marcadores foi feita através de PCR utilizando se termocicladores Veriti 96 poços nas seguintes condições de termociclagem: 95°C por 5 minutos, seguidos de 42 ciclos de 95°C por 30 segundos, 30 segundos na temperatura de anelamento do par de oligonucleotídeo, 72°C por 40 segundos e uma etapa final de 72°C por 5 minutos, sendo que na etapa de anelamento do primer a temperatura variou entre 54°C ou 56°C dependendo do par de oligonucleotídeos utilizados na reação.

Para as reações foi utilizado 4  $\mu\text{L}$  de DNA (100 ng), 1  $\mu\text{L}$  de Tampão de PCR (ThermoScientific 10X DreamTaq Buffer), 0,8  $\mu\text{L}$  de dNTP (2,5 $\mu\text{M}$ ), 0,6  $\mu\text{L}$  de primer (10,0 $\mu\text{M}$ ) e 0,1 $\mu\text{L}$  de Dream Taq (0,5 U) (ThermoScientific) e completou se o volume de reação para 10  $\mu\text{L}$ .

Todos os oligonucleotídeos foram inicialmente testados utilizando DNA dos parentais LB005 e LB010, para verificar a existência de polimorfismo na sequência amplificada. A seguir, analisou-se as três subpopulações segregantes de Lablab, CXLB010-S1, CXLB010-S2 e CXLB010-S4, para verificar a ligação com o ao gene de resistência à FAS.

A análise dos produtos de PCR foi feita usando o QIAxcel Advanced System. Os segmentos amplificados foram separados com base no tamanho do fragmento.

## 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram desenvolvidos ensaios dCAPS para os SNPs 6212685 e 7010864 e CAPS para o SNP 6746454. Esses SNPs, estão localizados na região genômica que contém o gene *LpRpp01*, que confere resistência ao isolado monopustular de *P. pachyrhizi* PPUFV02. Após o ajuste das condições ideais de termociclagem, e comprovação do polimorfismo detectado entre os parentais LB005 e LB010, os mesmos foram analisados nas populações segregantes CXLB010-S1, CXLB010-S2 e CXLB010-S4, constituídas por 268, 170, 155 plantas F2, respectivamente (Figura 02).

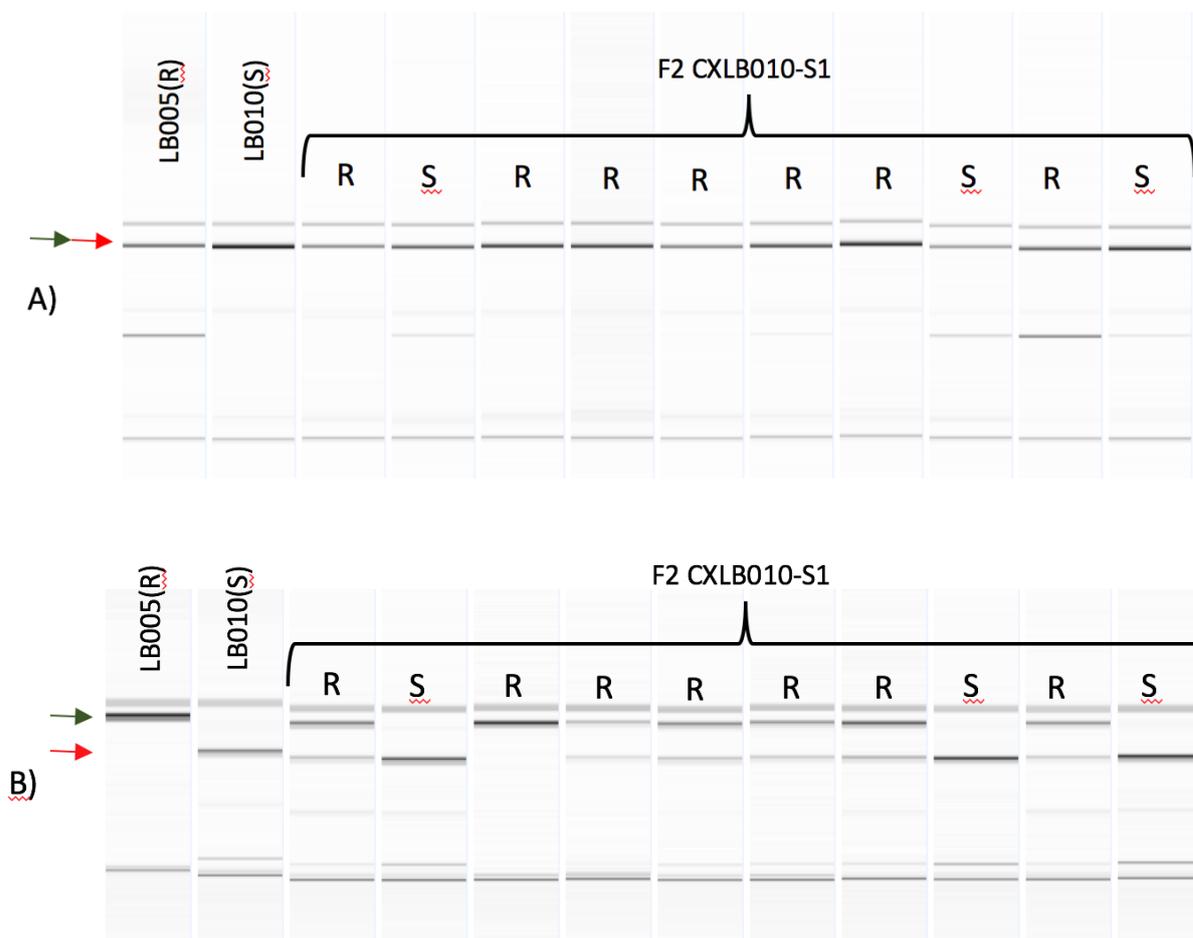


Figura 02 – Análise eletroforética do marcador dCAPS 7010864. A) Análise dos produtos de PCR dos parentais LB005 e LB010 e de 10 indivíduos da população F2 CXLB010-S1 antes da clivagem com a enzima de restrição *TaqI*. B) Análise dos produtos de PCR dos parentais LB005 e LB010 e de 10 indivíduos da população F2 CXLB010-S1 após a clivagem com a enzima de restrição *TaqI*. Pode-se notar a segregação dos diferentes alelos na população F2 CXLB010-S1. As setas verde-escuro e vermelha indicam a localização do fragmento

amplificado nos parentais e população segregante antes da digestão (A) e a segregação dos alelos derivados do acesso resistente LB005 e suscetível LB010, respectivamente, na população segregante.

A partir dos resultados de eletroforese dos ensaios CAPS e dCAPS realizados com os SNPs 6212685, 7010864 e 6746454 nas três subpopulações oriundas do cruzamento LB005 e LB010, foram criadas tabelas para avaliar a se a segregação do marcador estava ligada a segregação da resistência.

O padrão de segregação dos três marcadores nas populações analisadas foi submetido a um teste de aderência ao padrão de segregação 1:2:1, esperado para os marcadores co-dominantes CAPS e dCAPS, pelo método do qui-quadrado ( $\chi^2$ ) no qual apresentou ajuste (Tabela 1, 2 e 3).

Tabela 1: Análise do padrão de segregação dos marcadores SNPs na subpopulação F2 CXLB010-S1 derivada do cruzamento LB005 x LB010

Marcador	CXLB-010-S1			Hipótese	$\chi^2$ (Probabilidade)
	Genótipo	Observado	Esperado		
6212685	RR	55	67	1:2:1	3,0671* (21,58%)
	Rr	139	134	1:2:1	
	rr	74	67	1:2:1	
6746454	RR	57	67	1:2:1	2,1492* (34,14%)
	Rr	138	134	1:2:1	
	rr	73	67	1:2:1	
7010864	RR	56	67	1:2:1	2,4104* (29,96%)
	Rr	141	134	1:2:1	
	rr	71	67	1:2:1	

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

Tabela 2: Análise do padrão de segregação dos marcadores SNPs na subpopulação F2 CXLB010-S2 derivada do cruzamento LB005 x LB010

Marcador	CXLB-010-S2			Hipótese	$\chi^2$ (Probabilidade)
	Genótipo	Observado	Esperado		
6212685	RR	36	42,5	1:2:1	2,3294* (31,20%)
	Rr	84	85	1:2:1	
	rr	50	42,5	1:2:1	
6746454	RR	37	42,5	1:2:1	1,4235* (49,08%)
	Rr	85	85	1:2:1	
	rr	48	42,5	1:2:1	
7010864	RR	38	42,5	1:2:1	1,5176* (46,82%)
	Rr	83	85	1:2:1	
	rr	49	42,5	1:2:1	

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

Tabela 3: Análise do padrão de segregação dos marcadores SNPs na subpopulação F2 CXLB010-S4 derivada do cruzamento LB005 x LB010

Marcador	CXLB-010-S4			Hipótese	$\chi^2$ (Probabilidade)
	Genótipo	Observado	Esperado		
6212685	RR	57	63,75	1:2:1	1,1647* (55,86%)
	Rr	129	127,5	1:2:1	
	rr	69	63,75	1:2:1	
6746454	RR	58	63,75	1:2:1	0,8196* (66,38%)
	Rr	129	127,5	1:2:1	
	rr	68	63,75	1:2:1	
7010864	RR	61	63,75	1:2:1	0,1607* (92,28%)
	Rr	129	127,5	1:2:1	
	rr	65	63,75	1:2:1	

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

A partir do programa GENES, analisou-se os dados obtidos para criar o mapa de ligação entre os marcadores e o gene em estudo.

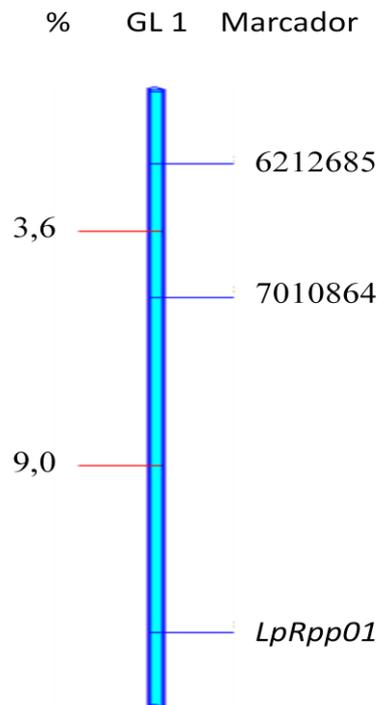


Figura 3: Mapa de ligação do gene *LpRpp01* aos marcadores SNPs. A distância é dada em frequência de recombinação

A ligação dos marcadores com o gene de resistência *LpRpp01* foi confirmada pela cosegregação com o fenótipo de resistência em três populações segregantes (CXLB010-S1, CXLB010-S2 e CXLB010-S4) utilizadas no estudo da herança da resistência. Esses marcadores estão sendo utilizados no mapeamento de alta resolução do gene *LpRpp01* visando a sua clonagem por meio da técnica de clonagem posicional.

## 5 – CONCLUSÃO

A resistência conferida pelo acesso LB005 se deve a um único gene dominante, denominado *LpRpp01*.

O estudo dos marcadores SNPs em *Lablab purpureus* confirmou a ligação dos SNPs ao gene de resistência *LpRpp01*. Sendo assim, estes podem ser utilizados para construção do mapa genético de alta resolução para posicionar o gene de resistência para clonagem.

Os marcadores estão posicionados em apenas um dos lados do gene em estudo, sendo assim, é necessário desenvolvimento de mais marcadores para identificar a posição exata do gene *LpRpp01*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIOVE - Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais. Disponível em: <<http://www.abiove.org.br/site/index.php?page=importancia-economica-e-social&area=NC0yLTI>> Acesso em: 11/10/2016

Akamatsu, H. et al. Pathogenic diversity of soybean rust in Argentina, Brazil, and Paraguay. *J. Gen. Plant Pathol.* 79, 28–40 (2013).

Alzate-Marin, A. L. et al. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatol. bras.** 30(4), jul-ago, 2005.

APROSOJA – Associação dos Produtores de Soja do Brasil. Disponível em: <<http://aprosojabrasil.com.br/2014/sobre-a-soja/a-historia-da-soja/>> Acesso em: 01/10/16

Bezerra, A. R. G. et al. Importância Econômica. In: **Soja: do plantio à colheita**. – [Editado por: Sedyama, T.; Silva, F.; Borém, A.] – Viçosa, MG : Ed. UFV, 2015. 333p. :il.

Bromfield, K. R. *Soybean Rust*. (1984). 65 f. (Monograph) **American Phytopathological Society**, St. Paul, MN, 1984

Caixeta, E. T. et al. Tipos de Marcadores Moleculares In: Marcadores Moleculares – [Editado por: Borém, A.; Caixeta, E. T] – Viçosa, MG : Ed. UFV, 2016.

CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM – Disponível em: <http://www.consorcioantiferrugem.net/portal/> Acesso em: 11/10/16

Del Ponte E. M.; Spolti, P.; Godoy, C. V. Ferrugem asiática da soja: panorama e perspectivas para o manejo. **Revista Plantio Direto**. Out-nov 2009, p.16-19, 2009.

DOYLE, Jeff J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochem bull**, v. 19, p. 11-15, 1987.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Tecnologias de produção de soja** – Região Central do Brasil 2012 e 2013. Londrina, PR: Embrapa Soja, 2011. 264 p.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <https://www.embrapa.br/soja>. Acesso em: 01/10/2016

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Soja em números**. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/sojaemnumeros/> Acesso em: 10/10/16

Ferreira, M. E.; Grattapaglia, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas**. 3. ed. Brasília: Embrapa/Cenargen, 1998. 220 p.

Freire, M. C. M. **História evolutiva de *Phakopsora pachyrhizi* no Brasil com base em sequência de nucleotídeos de região espaçadora interna do DNA ribossomal nuclear**. Dissertação (mestrado em genética e melhoramento). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 64 p. 2007.

Doyle, J. J.; Doyle, J. L. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemistry Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nation. Disponível em: <http://www.fao.org/ag/agp/agpc/doc/gbase/data/pf000047.htm> Acesso em: 18/11/16

Goellner, K. et al. *Phakopsora Pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust. **Molecular plant Pathology**, v.11, n.2, p. 169-177, 2010.

GUIMARÃES, C. T.; MOREIRA, M. A. Genética molecular aplicada ao melhoramento de plantas. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. p. 715-740.

Hartman, G. L.; West, E. D.; Herman, D. K. Crops that feed the world 2. Soybean – worldwide production, use, and constraints caused by pathogens and pests. **Food Security**, v.3, p. 5-17, 2011.

Henning, A. A. et al. **Manual de identificação de doenças de soja**. 5. ed. Londrina. Embrapa Soja, 2014. 76 p.

Henning, A. A.; Godoy, C. V. Situação da ferrugem da soja no Brasil e no mundo. In: **Ferrugem asiática da soja**. [Editado por: Zambolin, L.] – Viçosa, MG: Suprema, 2006. 139p.

Hyten, D.L. et al. Map location of the Rpp1 locus that confers resistance to soybean rust in soybean. **CropSci.** 47, 837–838 (2007).

Judd, W. S.; Campbell, C. S.; Kellogg, E. A.; Donoghue, M. J. **Sistemática vegetal, um enfoque filogenético.** 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 632 p.

Kawashima, C. G. et al. A pigeonpea gene confers resistance to Asian soybean rust in soybean. **Nature biotechnology.** v. 34, n. 6, p.661-665. Junho, 2016.

Koch, E. et al. Light and electron-microscopic studies on the development of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.) in susceptible soybean leaves. **Phytopathologische Zeitschrift - Journal of phytopathology.** [S.I.] v. 106, n.4, p. 302-320, 1983.

Konieczny, A. ;Ausubel, F. M. A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. **Plant J.** 1993 Aug;4(2):403-10

Medina, J. C. et al. Introdução e evolução da soja no Brasil. In: **A soja no Brasil.** [Editado por: Miyasaka, S.; Medina, J. C.] 1. Ed. [S.1.]: Instituto de tecnologia de alimentos, 1982. 1062 p.

MDIC – Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços. Disponível em: <http://www.mdic.gov.br/> Acesso em: 10/10/16

Meyer, J. D. et al. Identification and analyses of candidate genes for rpp4-mediated resistance to Asian soybean rust in soybean. **Plant Physiol.** 150, 295–307, 2009.

Miles, M. R. et al. Characterizing resistance to *Phakopsora pachyrhizi* in soybean. **Plant disease,** v.95, p. 577-581, 2011.

Neff, M. M. et al. dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in *Arabidopsis thaliana* genetics. **Plant J.** 1998 May;14(3):387-92.

Ono, Y.; Buritica, U. P. e Hennen, J. F. Delimitation of *Phakopsora*, *Physopella* and *Cerotelium* and their species on Leguminosae. **Mycol. Res.** 96, p. 825–850, 1992.

Paul, C.; Hartman, G. L.; Marois, J. J.; Wright, D.L. e Walker, D. R. First report of *Phakopsora pachyrhizi* adapting to Soybean genotypes with Rpp1 or Rpp6 rust resistance genes in field plots in the United States. **Plant Dis.** 97, 1379 (2013).

Qiu, L. J.; Chang, R. Z. The origin and history of soybean. In: **The soybean: botany, production and uses**. – [Editado por: Guriqbal, S.] – Ludhiana, India : Ed. Punjab Agricultural University, 2010. 512 p.

Saksirirat, W.; Hoppe, H. H. Teliospore germination of soybean rust fungus (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.). **J. Phytopathol.** 132, p. 339-342. 1991.

Santos, O. S. **A cultura da soja**. – 1: Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná. Rio de Janeiro: Globo, 1988. 299 p.

Sediyama, T.; Pereira, M. G.; Sediyama, C. S.; Gomes, J. L. L. **Cultura da Soja – Parte I**. Viçosa, MG: UFV, Imp. Univ., 1985. 96 p.

Sediyama, T.; Teixeira, R. C.; Barros, H. B. Origem, evolução e importância econômica. In: **Tecnologia de produção e usos da soja**. – [Editado por: Sediyama, T.] – Londrina, PR: Mecenas, 2009. p. 1-5.

Slaminko, T. L.; Miles, M. R.; Frederick, R. D.; Bonde, M. R. e Hartman, G. L. New legume hosts of *Phakopsora pachyrhizi* based on greenhouse evaluations. **Plant Dis.** 92, p. 767–771, 2008.

TECNOLOGIAS DE PRODUÇÃO DE SOJA. **Região Central do Brasil 2005**. Londrina, PR: Embrapa Soja; Embrapa Cerrados; Embrapa Agropecuária Oeste, 2005. 239 p.

Thorvaldsdóttir, Helga; ROBINSON, James T.; MESIROV, Jill P. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. **Briefings in bioinformatics**, v. 14, n. 2, p. 178-192, 2013.

Unfried, J. R. et al. Genética e melhoramento para resistência à ferrugem asiática da soja. **Ata da XXXI Reunião de pesquisa de soja da região central do Brasil**. Londrina – PR: Embrapa soja, p. 130-140, 2010.

USDA – United States Department of Agriculture. Disponível em: [www.usda.gov](http://www.usda.gov) Acesso em: 10/10/16.

VAKILI, N. G. Field survey of endemic leguminous hosts of *Phakopsora pachyrhizi* in Puerto Rico. **Plant Disease Reporter**. v. 63, p. 931-935, 1979.

VLASOVA, A. et al. Genome and transcriptome analysis of the Mesoamerican common bean and the role of gene duplications in establishing tissue and temporal specialization of genes. **Genome biology**, v. 17, n. 1, p. 1, 2016.

Yamanaka, N. et al. Development of classification criteria for resistance to soybean rust and differences in virulence among Japanese and Brazilian rust population. **Tropical plantpathology**, v.35, p. 152-162, 2010.

Yorinori, J. T.; Lazzarotto, J. J. **Situação da ferrugem asiática da soja no Brasil e na América do Sul**. Documentos Embrapa 236. 30 p. Agosto, 2004.

Zambolim, L. Manejo integrado da ferrugem asiática da soja. In: **Ferrugem asiática da soja**. [Editado por: Zambolim, L.] – Viçosa, MG: Suprema Gráfica e Editora Ltda, 2006. p. 73-98.