

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

MAIARA CECILIA PANHO

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DE
GENÓTIPOS DE SOJA PORTADORES DE GENES PIRAMIDADOS DE
RESISTÊNCIA A *Phakopsora pachyrhizi***

PATO BRANCO

2022

MAIARA CECILIA PANHO

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DE
GENÓTIPOS DE SOJA PORTADORES DE GENES PIRAMIDADOS DE
RESISTÊNCIA A *Phakopsora pachyrhizi***

**Morphological characterization and biochemical composition of soybean
genotypes carrying pyramided genes of resistance to *Phakopsora pachyrhizi***

Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do título de Mestre em Fitotecnia da
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
(UTFPR).

Orientador: Giovani Benin.

PATO BRANCO

2022



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

Esta licença permite compartilhamento do trabalho, mesmo para fins comerciais, sem a possibilidade de alterá-lo, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



MAIARA CECILIA PANHO

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DE GENÓTIPOS DE SOJA
PORTADORES DE GENES PIRAMIDADOS DE RESISTÊNCIA A PHAKOPSORA PACHYRHIZI**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).
Área de concentração: Produção Vegetal.

Data de aprovação: 04 de Fevereiro de 2022

Prof Giovani Benin, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof Gaspar Malone, Doutorado - Gdm Genética do Brasil Ltda

Prof.a Neucimara Rodrigues Ribeiro, Doutorado - Gdm Genética do Brasil Ltda

Prof Salvador Lima Brito Junior, Doutorado - Gdm Genética do Brasil Ltda

PATO BRANCO

2022

A Leonardo Oracides Panho e Ivonete Peron Panho,
pela educação, apoio e incentivo, a vocês dedico
este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me proporcionar viver e alcançar meus maiores sonhos.

A minha família: meus pais (Leonardo e Ivonete), por me educarem, me incentivarem, por não deixar me faltar nada, pelo amor e por sonharem junto comigo. Vocês os dois avicultores, que tanto me orgulho são minha maior motivação, inspiração e exemplo. Aos meus irmãos Marcilene e Marcionei Panho e minha afilhada Julia Carolina, que sempre me incentivaram na busca por meus objetivos e sonhos. Ao meu namorado Alex Rosaneli, por sempre estar ao meu lado. Obrigado por tanto companheirismo e por acreditar em mim.

A minha grande amiga Laura Alexandra Madella, são sete anos de amizade, companheirismo, conselhos e parceria, saiba que sua amizade é muito importante para mim. Obrigada por me apoiar sempre, me auxiliar na execução desse e de outros trabalhos, por ser exatamente como és e por torcer por mim assim como torço muito por você.

Gostaria de agradecer também, ao meu orientador Giovani Benin, que me acompanha desde a graduação, por todo conhecimento adquirido neste tempo, pelo apoio na execução de trabalhos e por toda amizade construída.

A todo pessoal do Laboratório de genética e melhoramento de trigo e soja da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, em especial ao Rogê Afonso Tolentino Fernandes, Otávio Ramos Campagnoli, Ana Cláudia Rosa, Caroline Patrícia Menegazzi, Felipe Chade Quadra e Daniela Meira, por todo companheirismo e auxílio no decorrer deste trabalho.

Agradeço a empresa GDM do Brasil, pela disponibilização das linhagens para condução e avaliação e pela parceria deste e de outros trabalhos.

Agradeço a Capes pela concessão da bolsa durante o mestrado.

Enfim, a todos os que por algum motivo contribuíram para a realização desta pesquisa.

RESUMO

A ferrugem asiática (FAS, *Phakopsora pachyrhizi* Sydow e Sydow) é a principal doença da cultura, causando grandes quebras no rendimento da soja, afetando todo mercado do grão. Com a baixa eficiência dos fungicidas, o uso de cultivares resistentes apresenta-se como alternativa de controle, sendo econômica, segura, eficiente e sustentável. Porém, devido a grande variabilidade e agressividade da FAS, o uso de genes *Rpp* é limitado. Com isso, a piramidação de genes de resistência se mostra como uma alternativa na busca de cultivares com níveis mais elevados de resistência. Contudo, identificar a combinação mais adequada de genes que resultarão em genótipos com níveis elevados de resistência precisam ser estudados. Desta forma, entender quais mecanismos de resistência estão envolvidos na interação soja-*P. pachyrhizi*, pode auxiliar os programas de melhoramento no desenvolvimento de combinações com maiores níveis de resistência. O objetivo do presente estudo foi identificar variabilidade morfológica, fenotípica e bioquímica de genótipos (cultivares, linhagens e PI's – plant introduction) contendo diferentes combinações de genes piramidados (*Rpps*) de resistência a ASR, visando identificar os mecanismos de defesa associados aos genes de resistência. Linhagens irmãs contendo genes *Rpp* piramidados, introdução de plantas (PIs) e cultivares resistentes e suscetíveis foram avaliadas quanto a resistência a FAS, a nível de campo. Foram avaliadas as características fenotípicas (lesão de resistência: *Reddish brown*, suscetível e imune) e caracteres de resistência: número de urédia por lesão (NoU), frequência de lesão com urédia (%LU), nível de esporulação (NE), e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), características morfológicas: espessura epiderme superior (EES) e inferior (EEI) espessura parênquima paliçádico (EPP) e lacunoso (EPL) e espessura limbo foliar (ELF); e características bioquímicas (compostos fenólicos): daidzina, gliciteína, daidzeína, genisteína e genistina. Todas as linhagens com genes *Rpp* piramidados apresentaram elevados níveis de resistência, com reduções significativas nos NE, NoU e %LU comparativamente as fontes de resistência. Todos os genótipos das combinações *Rpp1-b + Rpp1-b*, *Rpp2 + Rpp1-b*, *Rpp4 + Rpp1-b*, além do gene *Rpp1-b* foram classificadas como "altamente resistentes" (AR). Além disso, a linhagem 52117-57 (*Rpp2 + Rpp1-b*) apresentou imunidade em condições de campo. Todos os genótipos classificados como AR apresentaram as menores AACPDs. Já os genótipos suscetíveis apresentaram as maiores AACPDs, evidenciando a importância da resistência genética em conter o avanço da doença. Os caracteres morfológicos e bioquímicos avaliados no presente estudo não apresentaram relação com os genes *Rpp* de resistência a FAS. Desta forma, mais estudos são necessários para investigar quais outros mecanismos estruturais e bioquímicos podem estar envolvidos no processo de resistência da soja a FAS.

Palavras-chave: resistência genética; piramidação; ferrugem asiática da soja; *Glycine max*.

ABSTRACT

Asian rust (ASR, *Phakopsora pachyrhizi* Sydow and Sydow) is the main disease of the crop, causing major drops in soybean yield, affecting the entire grain market. With the low efficiency of fungicides, the use of resistant cultivars is presented as an alternative control, being economical, safe, efficient and sustainable. However, due to the great variability and aggressiveness of ASR, the use of *Rpp* genes is limited. Thus, the pyramiding of resistance genes is shown as an alternative in the search for cultivars with higher levels of resistance. However, identifying the most suitable combination of genes that will result in genotypes with high levels of resistance needs to be studied. In this way, understanding which resistance mechanisms are involved in the soybean-*P. pachyrhizi*, can help breeding programs to develop combinations with higher levels of resistance. The objective of the present study was to identify morphological, phenotypic and biochemical variability of genotypes (cultivars, lines and PI's – plant introduction) containing different combinations of pyramided genes (*Rpps*) of resistance to ASR, aiming to identify the defense mechanisms associated with resistance genes. Sibling lines containing pyramided *Rpp* genes, plant introductions (PIs) and resistant and susceptible cultivars were evaluated for FAS resistance at field level. The phenotypic characteristics (resistance lesion: Reddish brown, susceptible and immune) and resistance characters: number of uredia per lesion (NoU), frequency of lesion with uredia (%LU), sporulation level (SL), and area under the disease progress curve (AUDPC), morphological characteristics: upper (UET) and lower (LET) epidermis thickness, palisade (PPT) and spongy (SPT) parenchyma thickness and leaf limb thickness (LLT); and biochemical characteristics (phenolic compounds): daidzin, glycitein, daidzein, genistein and genistin. All strains with pyramided *Rpp* genes showed high levels of resistance, with significant reductions in SL, NoU and %LU compared to sources of resistance. All genotypes of combinations *Rpp1-b* + *Rpp1-b*, *Rpp2* + *Rpp1-b*, *Rpp4* + *Rpp1-b*, in addition to the *Rpp1-b* gene were classified as “high resistant” (HR). In addition, strain 52117-57 (*Rpp2* + *Rpp1-b*) showed immunity under field conditions. All genotypes classified as HR had the lowest AUDPCs. The susceptible genotypes had the highest AUDPCs, highlighting the importance of genetic resistance in containing the disease progression. The morphological and biochemical characters evaluated in the present study were not related to the ASR resistance *Rpp* genes. Thus, further studies are needed to investigate which other structural and biochemical mechanisms may be involved in the process of soybean resistance to ASR.

Keywords: genetic resistance; pyramidation; Asian soybean rust; *Glycine max*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Escala diagramática para avaliação da severidade de ferrugem asiática da soja proposta por Franceschi <i>et al.</i> (2020)	27
Figura 2 - Esporulação de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> em linhagens irmãs com genes <i>Rpp</i> piramidados, parentais e fontes de resistência (PI's) e cultivares suscetíveis e resistentes. Fotografias do lado abaxial da folha em microscópio estereoscópio com aumento de 14x.....	33
Figura 3 - Número de genótipos por <i>Rpp</i> -genes piramidados e por classificação quanto a resistência a <i>Phakopsora pachyrhizi</i> . Classificação baseada em estudos de Yamanaka <i>et al.</i> (2013).....	37
Figura 4 - Severidade (%) ao longo do tempo (dias) de linhagens contendo genes <i>Rpp</i> -piramidados (A), fontes de resistência (PI's, B), cultivares resistentes (C) e cultivares suscetíveis (D) de soja quanto a <i>Phakopsora pachyrhizi</i>	38
Figura 5 – Barplots com teste de agrupamento de médias de ScottKnott (P <0,05), para área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) de linhagens, fontes de resistência (PI's), cultivares resistentes e suscetíveis.....	40
Figura 6 - Barplots com teste de agrupamento de médias (Skott Knott, P<0,05) de linhagens com genes <i>Rpp</i> -piramidados, fontes de resistência (PI's) e testemunhas resistentes e suscetíveis de soja para os caracteres morfológicos: espessura da epiderme superior (EES, um), espessura da epiderme inferior (EEI, um), espessura do parênquima paliçádico (EPP, um), espessura do parênquima lacunoso (EPL, um) e espessura do limbo foliar (ELF, um) mensurados em microscópio eletrônico de varredura (MEV)	43
Figura 7 – Cromatograma do extrato foliar de uma amostra da cultivar BMX Raio IPRO.....	45
Figura 8 – Barplot com teste de agrupamento de médias (Skott Knott) para os compostos fenólicos Genistina, Gliciteína, Daidzeína, Daidzina, Genisteína e somatório de compostos (u gL ⁻¹) para seis linhagens, oito fontes de resistência e duas cultivares suscetíveis de soja.....	47
Figura 9 – Correlação de Pearson entre os caracteres morfológicos: espessura de limbo foliar (ELF), espessura da epiderme superior (EES) e inferior (EEI), espessura do parênquima paliçádico (EPP) e lacunoso (EPL); bioquímicos: Daizina (DAI), Genistina (GEI), Daidzeína (DAD), Gliciteína (GLY), Genisteína (GEA) e somatório (CFT); caracteres de resistência: nível de esporulação (NE), número de lesão (NL), frequência de urédia por lesão (LU), número de lesão com urédia (NoU), área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), reação de resistência (RR) e classificação (CLASS).....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição das linhagens com <i>Rpp</i> -genes piramidados, cultivares resistentes e suscetíveis e introdução de plantas (PI's) utilizadas no presente estudo	25
Tabela 2 - Critério de classificação para caracterização fenotípica de genótipos suscetíveis ou resistentes para três caracteres de resistência: frequência de lesão com urédia (%LU), número de lesão com urédia (NoU) e nível de esporulação (NE) em 1cm ² de folha. Adaptado de Yamanaka <i>et al.</i> (2013).....	28
Tabela 3 - Critério de classificação de genótipos quanto a resistência a <i>Phakopsora pachyrhizi</i> . Adaptado de Yamanaka <i>et al.</i> (2013)	28
Tabela 4 - Análise de componentes de variância de 33 genótipos estudados para os caracteres de resistência número de lesão (NL), frequência de lesão com urédia (%LU), número de urédia por lesão (NoU) e nível de esporulação (NE).....	31
Tabela 5 - Classificação fenotípica baseada nos caracteres de resistência a <i>Phakopsora pachyrhizi</i> : frequência de lesão com urédia (%LU), número de urédia por lesão (NoU) e nível de esporulação (NE) em 14 linhagens com <i>Rpp</i> -genes piramidados, cultivares suscetíveis e resistentes e fontes de resistência (PI's) de soja	36
Tabela 6 - Análise de componentes de variância de linhagens com genes <i>Rpp</i> -piramidados, fontes de resistência (PI's) e testemunhas suscetíveis e resistentes para os caracteres espessura de limbo foliar (ELF), espessura do parênquima paliçádico (EPP) e lacunoso (EPL), espessura da epiderme inferior (EEI) e superior (EES) e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD)	41
Tabela 7 - Análise de componentes de variância de linhagens com genes <i>Rpp</i> -piramidados, fontes de resistência (PI's) e testemunhas suscetíveis e resistentes para os caracteres Daizina (DAI), Genistina (GEI), Daidzeína (DAD), Gliciteína (GLY), Genisteína (GEA) e somatório de compostos (CFT)	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%LU	Frequência de lesão com urédia
AACPD	Área abaixo da curva de progresso da doença
ANOVA	Análise de variância
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CONAB	Companhia nacional de abastecimento
DAD	Daidzeína
DAI	Daizina
DAS	Dias após a semeadura
E EI	Espessura da epiderme inferior
EES	Espessura da epiderme superior
ELF	Espessura do limbo foliar
EPL	Espessura do parênquima lacunoso
EPP	Espessura do parênquima paliçádico
ETI	<i>Effector Triggered Immunity</i>
FAS	Ferrugem asiática da soja
GEA	Genistina
GEI	Genisteína
GLY	Gliciteína
IM	Imune
MAMPs	<i>Microbe associated molecular pattern</i>
MEV	Microscópio eletrônico de varredura
NE	Nível de esporulação
NL	Número de lesão
NoU	Número de urédia por lesão
PAMPs	<i>Pathogen associated molecular pattern</i>
PI	Plant Introduction
PTI	<i>Pattern Triggered Immunity</i>
QTL	Quantitative trait loci
RB	Reddish brown
RH	Reação de hipersensibilidade
RNH	Resistencia não hospedeira
ROS	Espécies reativas de hidrogênio
Rpp's	<i>Pattern recognition receptors</i>
TAN	Suscetível
USDA	United States Department of agriculture
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus celsius
µg L ⁻¹	Micrograma por litro
µm	Micrômetro
Kg	Kilograma
ha	Hectare
%	Percentagem
m ²	Metro quadrado
mL	Mililitros
cm ²	Centímetro quadrado
g	Gramma
Mm	Milímetros
nm	Nanômetros
L	Litro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	Histórico e importância da cultura da soja	15
2.2	Ferrugem asiática da soja	16
2.3	Resistência de plantas a patógenos	17
2.3.1	Como as plantas se defendem dos patógenos?	18
2.3.2	Mecanismos estruturais	19
2.3.3	Mecanismos bioquímicos	21
2.4	Resistência genética de plantas a patógenos	22
2.5	Resistência genética a ferrugem asiática da soja	23
3	MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1	Materia vegetal	25
3.2	Avaliação de resistência	28
3.3	Caracterização de lesões	26
3.4	Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD)	27
3.5	Análises anatômicas em microscópio eletrônico de varredura (MEV)	28
3.6	Análise de compostos fenólicos em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	29
3.7	Análise de dados	30
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1	Caracterização de genótipos quanto a resistência a ferrugem asiática da soja	31
4.2	Severidade e Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD)	38
4.3	Caracterização morfológica foliar	41
4.4	Análise de compostos fenólicos em CLAE	44
4.5	Correlação entre caracteres	48
5	CONCLUSÃO	50
	REFERÊNCIAS	51
	APÊNDICE A - Fotografias da morfologia foliar	58

1 INTRODUÇÃO

Ano após ano, produtores de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) enfrentam inúmeras adversidades, causadas por fatores bióticos e abióticos, com potencial de causar sérios prejuízos a cultura. As doenças de plantas são as principais responsáveis por perdas de safras, sendo uma ameaça para segurança alimentar global e para sustentabilidade agrícola.

A Ferrugem Asiática da Soja (FAS) é uma das doenças de maior importância econômica da cultura, principalmente em países tropicais e subtropicais, onde as reduções no rendimento de grãos podem atingir até 80% (GODOY *et al.*, 2016). Além disso, a FAS impacta diretamente o mercado da soja, por acarretar em quebra de produtividade (grão) e conseqüentemente de seus derivados (óleo, farelo, etc) (ISHIWATA; FURUYA, 2020).

A FAS é causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* (Sydow e Sydow), basidiomiceto, biotrófico obrigatório, que possui múltiplos ciclos de infecção em uma mesma safra, com elevada capacidade de produzir uredósporos e fácil disseminação (CHANDER *et al.*, 2019). Além disso, apresenta alta variabilidade intraespecífica de isolados, ampla distribuição geográfica, é extremamente severa e de difícil controle (DARBEN *et al.*, 2020). Atualmente, o uso de fungicidas é o método mais empregado para manejo da FAS (MURITHI *et al.*, 2021). Contudo, os custos com fungicidas são extremamente elevados (2,2 bilhões de dólares por safra), e a ineficácia dos produtos tem aumentado com a insensibilidade do fungo, safra após safra (GODOY *et al.*, 2016). Nesse sentido, a adoção de cultivares resistentes apresenta-se como uma estratégia promissora, sendo mais econômica, segura e eficiente e sustentável (GODOY *et al.*, 2016; ISHIWATA; FURUYA, 2020; MURITHI *et al.*, 2021).

A resistência de plantas a patógenos é definida fisiologicamente como a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e estabelecimento do patógeno em seus tecidos (ZAIDI; MUKHTAR; MANSOOR, 2018). Segundo Pascholati e Dalio (2018) as plantas possuem mecanismos de defesa, que podem ser de natureza estrutural e/ou bioquímica preexistente na planta (pré-formado) ou acionados a partir de um estímulo (pós-formados).

Alguns estudos relatam mudanças estruturais e bioquímicas desencadeado por interações patógeno-hospedeiro. Mussury *et al.* (2007) observaram aumento na pilosidade do limbo foliar e espessamento de cutícula em plantas de soja quando

infectadas pelo fungo *P. pachyrhizi*. Mussury *et al.* (2012) relatam espessamento de vários componentes da parede celular em folhas infectadas pela ferrugem asiática. Oliveira *et al.* (2018) relataram aumentos no conteúdo de compostos fenólicos de soja quando infectados por *P. pachyrhizi*. Madoxx, Laur e Tian (2010), avaliando a interação citrus x *Xylella fastidiosa*, observaram que compostos do grupo dos flavonóides possuíam atividade antibacteriana mais pronunciada.

Para soja, sete loci de resistência a ferrugem asiática foram identificados e mapeados nomeados do *Rpp1* ao *Rpp7* (MCLEAN; BYTH 1980; HARTWIG; BROMFIELD, 1983; HARTWIG, 1986; HYTEN *et al.*, 2007; GARCIA *et al.*, 2008; PIEROZZI *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2008; CHAKRABORTY *et al.*, 2009; HYTEN *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2012; YAMANAKA *et al.*, 2015; YU *et al.*, 2015; CHILDS *et al.*, 2018). Estes genes são efetivos apenas contra raças específicas de *P. pachyrhizi* (YAMANAKA; HOSSAIN, 2019). Contudo, uma resistência mais ampla, duradoura e efetiva pode ser desenvolvida através da piramidação de genes (YAMANAKA *et al.*, 2015).

Segundo Mundt (2018), a piramidação de genes consiste em alocar em um mesmo genótipo dois ou mais genes de resistência, conferindo assim uma resistência mais ampla a um número maior de raças. Inúmeros estudos têm demonstrado sucesso com a piramidação de genes de resistência para controle de FAS, com resultados satisfatórios a uma ampla gama de isolados, incluindo isolados brasileiros considerados altamente agressivos (LEMOS *et al.*, 2011; YAMANAKA *et al.*, 2013; YAMANAKA *et al.*, 2015; YAMANAKA; HOSSAIN, 2019; PARHE *et al.*, 2017; VIGANO *et al.*, 2018; KATO; SOARES; YAMANAKA, 2017; KATO; SOARES, 2021).

Contudo, identificar a combinação adequada de genes que irão resultar em genótipos com níveis elevados de resistência ainda precisam ser estudados. Entender os mecanismos de resistência envolvidos na interação soja-*P. pachyrhizi*, pode auxiliar os programas de melhoramento no desenvolvimento de combinações de *Rpp*-genes mais adequadas, na busca de cultivares com níveis mais elevados de resistência a FAS. O objetivo do presente trabalho foi identificar a variabilidade morfológica, fenotípica e bioquímica de linhagens com *Rpp*-genes piramidados, cultivares suscetíveis e resistentes e fontes de resistência (PI's) contendo *Rpp*-genes visando elucidar quais mecanismos de defesa estão associados aos genes de resistência a *Phakopsora pachyrhizi*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico e importância da cultura da soja

Os teores de óleo (20%) e proteína (40%) presentes no grão de soja (*Glycine max* (L) Merrill), servem como matéria prima de diversos produtos presentes na alimentação animal (rações), humana (óleos, proteína de soja, molhos), no seguimento de biocombustível, entre outras finalidades.

É considerada a *commodity* de maior importância no mundo, movimentando vários seguimentos do agronegócio como empresas de pesquisa e desenvolvimento, fornecedores de insumos, indústrias de máquinas e equipamento, produtores rurais, cooperativas agropecuárias, cooperativas agroindustriais, processadoras, produtores de óleo, fabricantes de ração e usinas de biodiesel, dentre outras (HIRAKURI; LAZZAROTTO, 2014). Além de ser fonte de diversos produtos, o complexo soja (óleo, grão e farelo) é responsável por mais de 44% das exportações, sendo considerado o principal setor dentro do agronegócio brasileiro. Em 2021, o Brasil faturou aproximadamente 41 bilhões de dólares com a exportação de grão, farelo e óleo de soja (AGROSTAT, 2021)

A produção mundial de soja na safra 2019/20 foi de aproximadamente 363,6 milhões de toneladas distribuídos, entre diversos países produtores. Dentre eles destacam-se o Brasil como maior produtor mundial do grão, seguido dos Estados Unidos e da Argentina com produções de 137,0, 112,5 e 46,5 milhões toneladas, respectivamente (USDA, 2021).

No Brasil a área total destinada ao cultivo do grão chegou a 38 milhões de hectares na safra 2020/21, 4,4% maior que na safra anterior (2019/20) (USDA, 2021). Os estados brasileiros com maiores áreas destinadas ao cultivo do grão são Mato Grosso, Rio Grande do Sul e Paraná com aproximadamente 10,0, 6,0 e 5,6 mil hectares, respectivamente. Já os estados com maiores produções são o Mato Grosso (35,7 mil toneladas), Paraná (20,2 mil toneladas) e Rio Grande do Sul (20,0 mil toneladas). Juntos estes estados correspondem a 58% da produção total de soja do país.

Inúmeros fatores afetam a produção de soja, e causam grandes prejuízos ao setor agrícola, diminuindo a oferta de produto. Dentre os fatores bióticos e abióticos, as doenças de plantas, são as principais responsáveis por perdas substanciais de

safra, e ameaçam constantemente a segurança alimentar e a sustentabilidade agrícola (NELSON *et al.*, 2018).

Em soja, as principais dificuldades encontradas por produtores estão relacionadas a problemas fitossanitários como ferrugem asiática, percevejos e nematoides, que causam severas reduções no rendimento da cultura, e impactam diretamente todo mercado global de soja, diminuindo a oferta do produto (grão) e seus derivados (ISHIWATA; FURUYA, 2020).

2.2 Ferrugem asiática da soja

A ferrugem asiática da soja (FAS), causada pelo fungo biotrófico obrigatório *Phakopsora pachyrhizi* Sydow e Sydow, é uma das doenças de maior importância econômica na cultura da soja. Após ser descrita pela primeira vez no Japão em 1902 (HENNING, 1903), é relatada em diversos países, causando reduções no rendimento da cultura da soja. No Brasil e Paraguai a doença foi relatada pela primeira vez na safra 2001/02 (YORINORI; PAIVA, 2002), na África do Sul causa danos desde 1999 (PRETORIUS; KLOPPERS; FREDERICK, 2001), nos Estados Unidos desde meados de 2004 (SCHNEIDER *et al.*, 2007), entre outros.

O fungo naturalmente pode acometer diversas espécies de plantas, incluindo 41 espécies em 17 gêneros pertencentes a família Fabaceae (FIALLOS, 2011). Por seu grande número de hospedeiros, fácil disseminação e difícil controle, vários autores relatam reduções no rendimento da cultura da soja relacionados ao ataque de *P. pachyrhizi* variando entre 25 e 80% (GARCÍA-RODRIGUEZ *et al.*, 2017), 10 a 90% (SCHNEIDER *et al.*, 2005), 10 e 80% (BROMFIELD; HARTWIG 1983; PANDEY *et al.*, 2010). Essas reduções variam de acordo com a severidade da doença, genótipo, condições ambientais, manejo da cultura etc.

O processo de infecção de *P. pachyrhizi* em plantas inicia-se com a germinação dos uredósporos e formação do tubo germinativo que cresce sobre a superfície foliar (GOELLNER *et al.*, 2010). O patógeno necessita da presença de água livre na superfície foliar com molhamento mínimo 6 horas e temperaturas entre 16 °C e 26,5 °C, condições ideais para o desenvolvimento da doença (GODOY *et al.*, 2014). O crescimento do tubo germinativo cessa com a formação do apressório, que auxilia na fixação e penetração do patógeno no hospedeiro. O fungo penetra os tecidos de forma direta através da epiderme passando a colonizar as células do hospedeiro com intensa formação de hifas. Essas crescem pela epiderme atingindo os espaços

intercelulares com formação de haustórios, responsáveis pela absorção de nutrientes. A reprodução assexuada é concluída com a agregação de hifas formando os primórdios urediais (BROMFIELD; HARTWIG 1983; MAGNANI; ALVES; ARAÚJO, 2007; GOELLNER *et al.*, 2010; NERSALLA, 2018). A FAS é uma doença policíclica com infecções repetidas através de uredósporos, durante o crescimento e desenvolvimento da cultura da soja (CHILDS; BUCK; LI, 2018).

Os sintomas da doença podem aparecer em qualquer estágio de desenvolvimento da cultura (GODOY *et al.*, 2014), sendo que os sintomas iniciais da FAS podem ser facilmente confundidos com outras doenças (FIALLOS, 2011), pela ausência ou pouca frutificação característica do patógeno. Inicialmente são observadas pequenas lesões bronzeadas restritas as nervuras da folha. Com a evolução da doença as pústulas (urédia) passam a ser visíveis adquirindo coloração castanha-clara a castanha-escura com maior presença na face abaxial da folha. Quando a urédia se rompe os uredósporos são liberados (GOELLNER *et al.*, 2010; GODOY *et al.*, 2014), ocorrendo a dispersão do fungo para outras áreas. Com o aumento da severidade da doença, as folhas começam a ficar amareladas e caem prematuramente (GOELLNER *et al.*, 2010; GODOY *et al.*, 2014) causando redução na área fotossintética acarretando problemas na formação, enchimento e peso final dos grãos (GODOY *et al.*, 2018).

Algumas estratégias de controle da FAS englobam a adoção do vazio sanitário, visando redução no inóculo da doença, semeadura no início da safra recomendada evitando períodos de maior pressão de inóculo, controle químico e uso de cultivares tolerantes (GODOY *et al.*, 2018). Atualmente, o controle químico é o mais utilizado, contudo, apenas um número limitado de princípios ativos tem controle efetivo (YAMANAKA; HOSSAIN 2019). Esta limitação pode resultar em pressão de seleção para resistência a fungicidas. Com isso, a resistência genética demonstra-se como uma alternativa, que envolvendo a implantação de fontes naturalmente resistentes, auxiliando na redução custos com aplicações e minimizando a pressão de seleção sobre os fungicidas (GODOY *et al.*, 2016).

2.3 Resistência de plantas a patógenos

A resistência de plantas a patógenos é definida fisiologicamente como a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e estabelecimento do patógeno em seus tecidos, atuando de forma coordenada, no momento e local adequado, e na

magnitude apropriada (AGRIOS, 2004). Necessita atuar como um sistema multicomponente onde o nível de resistência é resultado do somatório das contribuições individuais dos diferentes mecanismos de resistência (PASCHOLATI; DALIO, 2018).

Apesar de na natureza as plantas serem expostas a milhares de microrganismos com potencial fitopatogênico, a resistência mostra-se como regra sendo a suscetibilidade a exceção (AGRIOS, 2004). Para tanto, as plantas possuem mecanismos basais de defesa denominados mecanismos de resistência-não-hospedeira (RNH), que são efetivos contra a maioria dos microrganismos e conservados do ponto de vista evolutivo. Os mecanismos de RNH incluem mecanismos estruturais e bioquímicos (CAMARGO, 2018).

Contudo, alguns microrganismos desenvolveram a habilidade de superar a RNH, e conseqüentemente causar lesões (doença) na planta (CAMARGO, 2018). A interação patógeno-hospedeiro pode ser vista como uma luta entre dois organismos pela sobrevivência. De um lado o patógeno utiliza armas químicas para atacar o hospedeiro, enquanto este através de mecanismos estruturais e bioquímicos, procura se defender do patógeno (PASCHOLATI; DALIO, 2018). A interação patógeno-hospedeiro leva a planta a sofrer várias alterações desencadeando uma série de respostas genético-moleculares, fisiológicas e morfológicas (CAVATTE; CASTRO; MACHADO, 2018) denominados mecanismos de resistência.

2.3.1 Como as plantas se defendem dos patógenos?

As plantas podem se defender dos patógenos de duas formas: ativa e passivamente. Os mecanismos de resistência são subdivididos em duas categorias: pré-formados (passivos, constitutivos) e pós-formados (ativos, induzidos). Ambos podem ser subdivididos de acordo com sua origem: estruturais e bioquímicos (PASCHOLATI; DALIO, 2018).

Os mecanismos pré-formados são estruturas ou compostos preexistentes na planta mesmo antes do contato com um possível fitopatógeno (ROBAYO; GUTIÉRREZ, 2014). Já os mecanismos pós-formados encontram-se ausentes ou presentes em baixos níveis em condições naturais, porém, são ativados quando a planta está sob ataque do fitopatógeno. A ativação dos mecanismos pós-formados é realizada pela detecção do patógeno pela planta através de sinais específicos a partir de um precursor remoto (BARROS *et al.*, 2010).

O processo de ativação dos mecanismos de defesa inicia-se com o reconhecimento pela planta, de sinais exógenos conhecidos como padrões moleculares associados ao patógeno PAMPs (“*pathogen associated molecular pattern*”) ou MAMPs (“*microbe associated molecular pattern*”). Os MAMPs geralmente são moléculas com alguma função estrutural em algum componente celular no microrganismo (DALLAGNOL; ARAÚJO FILHO, 2018). Esses padrões são reconhecidos por receptores de reconhecimento padrão RPPs (“*pattern recognition receptors*”) na planta hospedeira. O reconhecimento desencadeia uma cascata de sinais que levam a ativar o sistema de defesa basal (FIGUEROA, 2020), também denominada imunidade desencadeada por padrão (PTI - *Pattern Triggered Immunity*) (CAVATTE; CASTRO; MACHADO, 2018). A resistência desencadeada por reconhecimento de MAMPs, pode ser fenotipicamente caracterizada pela ausência de sintomas ou morte localizada no local de infecção (resposta de hipersensibilidade) (DALLAGNOL; ARAÚJO FILHO, 2018).

Contudo, alguns patógenos são capazes de produzir moléculas efetoras que interferem no reconhecimento dos RPPs, provocando assim, a doença. Todavia, algumas plantas desenvolveram a capacidade de reconhecer estes efetores, através da interação com proteínas de resistência da planta (R), denominada resistência desencadeada por efector (ETI – *Effector Triggered Immunity*), resultando em uma cascata de sinalizações que irão ativar genes de defesa ocasionando uma resposta de hipersensibilidade a fim de conter o avanço da doença (CAVATTE; CASTRO; MACHADO, 2018; FIGUEROA, 2020). O reconhecimento realizado por ambos os mecanismos de resistência (PTI e ETI) geram a ativação de mecanismos de transdução de sinais, que resultam na reprogramação do metabolismo da célula vegetal envolvendo alterações gênicas, morfológicas e fisiológicas que culminam no processo de defesa (PASCHOLATI; DALIO, 2018).

2.3.2 Mecanismos estruturais

Os mecanismos estruturais apresentam importante papel na resistência de plantas a patógenos. Atuam como barreiras físicas, sendo esta a primeira linha de defesa contra a invasão de microrganismos (DALLAGNOL; ARAÚJO FILHO, 2018). Os pré-formados são constituintes naturais da planta produzidos de forma independente da ação de patógenos. Os pós-formados são desencadeados após a tentativa de invasão (STANGARLIN *et al.*, 2011).

Existem várias estruturas do sistema basal das plantas que contribuem dificultando e até mesmo evitando a entrada do patógeno em seus tecidos. Os tricomas, além de apresentar funções basais relacionadas a redução de perda de água, também auxiliam na proteção contra fitopatógenos. Mussury *et al.* (2007) observaram intensa pilosidade do limbo foliar em plantas de soja quando infectadas pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, sendo importante barreira contra a penetração contra o patógeno evitando a formação de filme d'água sobre a superfície foliar, requerida para germinação de esporos.

A parede celular é composta por celulose, hemicelulose, pectina e lignina. Estes constituintes básicos requerem por parte do fungo a secreção de enzimas para degradá-la, variando conforme a complexidade de cada constituinte, idade dos tecidos, concentração em relação ao órgão da planta, afetando diretamente a suscetibilidade do hospedeiro ao patógeno (DALLAGNOL; ARAÚJO FILHO, 2018). Além disso, o espessamento da parede celular pode contribuir para a restrição da colonização de fitopatógenos nos tecidos das plantas (PASCHOLATI; DALIO, 2018). Nos estudos de Mussury *et al.* (2012) os autores relatam espessamento de vários componentes da parede celular como parênquimas e epiderme em folhas de soja tratadas com extratos vegetais e submetidas a ferrugem asiática. Navarro *et al.* (2019) analisando a Histopatologia de *Phakopsora euvitis* em videira observou espessamento da parede celular em genótipos resistentes ao fungo, restringindo o crescimento do patógeno.

Os mecanismos estruturais pós-formados atuam no reforço da parede celular, dificultando e até mesmo impedindo a entrada de patógenos nos tecidos vegetais. A formação de papilas, por exemplo, auxilia no reforço da parede celular através da deposição de calose, derivados de fenólicos e lignina no local de infecção do patógeno. A camada de cortiça atua limitando o crescimento do patógeno, através da alteração metabólica que ocasiona morte celular em torno da lesão com intuito de limitar o avanço do patógeno (BARROS *et al.*, 2010; STANGARLIN *et al.*, 2011). A camada de abscisão também atua impedindo avanço da infecção e colonização do patógeno para outros tecidos da planta. Isso ocorre através da ação de enzimas celulolíticas e pectonolíticas, que ocasionam a dissolução, separação, afrouxamento e abscisão de tecidos vegetais da planta hospedeira (PASCHOLATI; DALIO, 2018).

2.3.3 Mecanismos bioquímicos

Os mecanismos bioquímicos são compostos de diversas naturezas presentes na planta. São produzidos a partir de vários metabólitos primários ou seus intermediários biossintéticos, produzidos de forma natural ou como resposta a diferentes estímulos ambientais (PIASCEKA; JEDRZEJCZAK-REY; BEDNAREK 2015).

As fitoantecipinas são compostos que exibem atividade antimicrobiana presentes em altas concentrações mesmo antes do contato com o patógeno. Em alguns casos como resultado da infecção, podem ser convertidas em substâncias altamente tóxicas. O principal grupo de fitoantecipinas são os compostos fenólicos, conhecidos por atuar como substância fungitóxica, antibacteriana e antivirótica. Possuem efeito inibitório no crescimento micelial, germinação de esporos e produção de enzimas, podendo variar conforme o grupo de fenóis presentes (STANGARLIN *et al.*, 2011). Dentre os compostos fenólicos os ácidos ferrúlico, cafeico, gálico, clorogênico, catecol são os mais conhecidos por atuar na defesa das plantas contra fitopatógenos. Além dos compostos fenólicos outras substâncias podem ser citadas como mecanismos de defesa bioquímica pré-formada: saponinas (STANGARLIN *et al.*, 2011; PIASCEKA; JEDRZEJCZAK-REY; BEDNAREK, 2015), glucosinolatos, glicosídeos cianogênicos (PIASCEKA; JEDRZEJCZAK-REY; BEDNAREK, 2015), ácidos hidroxicarboxílicos (STANGARLIN *et al.*, 2011), lizosinas, defensinas, fototoxinas (PASCHOLATI; DALIO, 2018), etc.

As fitoalexinas são um exemplo clássico de compostos bioquímicos pós-formados. São caracterizadas como um grande grupo de metabólitos secundários de baixo peso molecular produzidas de novo a partir de um precursor remoto quando as plantas estão sobre alguma forma de estresse (DALLAGNOL; ARAÚJO FILHO, 2018). Estes compostos são considerados biocidas tendo efeitos sobre bactérias, fungos, vírus, animais e plantas. Em fungos causam desorganização do conteúdo celular, ruptura da membrana plasmática e inibição de enzimas fúngicas (STANGARLIN *et al.*, 2011). Pascholati e Dalio (2018) apontam algumas classes químicas de fitoalexinas importantes na resposta de defesa das plantas: fenóis do tipo flavonóide, poliacetilenos e isoprenos, terpenoides e esteroides, entre outras. Maddox, Laur e Tian (2010) avaliando desempenho de cultivares de citrus contra a bactéria *Xylella fastidiosa*, observaram que compostos do grupo dos flavonóides possuíam atividade

antibacteriana mais pronunciada. Analisando o comportamento em relação a ferrugem asiática em genótipos de soja Oliveira *et al.* (2018) relataram aumentos no conteúdo de compostos fenólicos das plantas inoculadas com o fungo.

As espécies reativas de hidrogênio (ROS) também são exemplos de compostos bioquímicos pós-formados, sendo substâncias que podem atuar diretamente sobre o patógeno inibindo seu crescimento ou através do reforçamento da parede celular (STANGARLIN *et al.*, 2011). Outro grupo de proteínas consideradas compostos bioquímicos pós-formados são as proteínas relacionadas a patogênese (RP) que possuem ação direta e indireta sobre o patógeno. A direta ocorre através da inibição do crescimento do patógeno ou da germinação de esporos. A indireta atua no processo de indução de resistência através da oxidação de componentes da parede celular por meio de peroxidases. Também possuem envolvimento na transdução de sinais durante a interação patógeno-hospedeiro (STANGARLIN *et al.*, 2011). As proteínas RP mais conhecidas são a B1-3-glucanase e a quitinase (PASCHOLATI; DALIO, 2018).

2.4 Resistência genética de plantas a patógenos

Independentemente do tipo de defesa ou resistência que a planta utiliza contra estresses bióticos e/ou abióticos, esta é controlada direta ou indiretamente pelos seus genes. A resistência de plantas a patógenos pode ser governada por um/poucos gene (monogênica e/ou qualitativa) ou por vários genes (poligênica e/ou quantitativa) (ZAIDI; MUKHTAR; MANSOOR, 2018).

A resistência vertical ou qualitativa ocorre quando variedades de plantas interagem especificamente com raças do patógeno (FIGUEROA, 2020). Este tipo de resistência está intimamente relacionado com a teoria gene-a-gene proposta por Henry Flor em 1942. Esta teoria aponta que para cada gene de resistência (R) do hospedeiro há um gene correspondente (Avr) no patógeno que condiciona a avirulência. Ou seja, o alelo Avr codifica uma molécula elicitora que é reconhecido por um receptor específico (gene R). O reconhecimento ativa a transdução de sinais que resultaram em uma resposta de hipersensibilidade (RH). Contudo, se o patógeno não possui gene Avr, o hospedeiro não irá reconhecê-lo, resultando em suscetibilidade (BESPALHOK; GUERRA; OLIVEIRA, 2016). Dessa forma, apenas uma mudança de raça do patógeno seria necessário para superar este tipo de resistência (FIGUEROA, 2020).

Já a resistência horizontal ou quantitativa ocorre quando a interação entre variedades de plantas e raças do patógeno não é específica (FIGUEROA, 2020). Este tipo de resistência é governado por vários genes de efeito menor e estão associadas a regiões genômicas ou QTLs (Quantitative Trait Loci). Cada QTL contribui com um efeito variável para o fenótipo, conferindo um nível parcial de resistência, pois, não bloqueia completamente o patógeno, mas reduz a multiplicação, colonização e/ou gravidade dos sintomas (PILET-NAYEL *et al.*, 2017). Por apresentar maior número de genes envolvidos nas respostas de defesa da planta, as chances de superar este tipo de resistência é quase nula (DALLAGNOL; ARAÚJO FILHO, 2018), pois, requer várias e sucessivas mutações por parte do microrganismo para superá-la (CAMARGO, 2018).

2.5 Resistência genética a ferrugem asiática da soja

Em soja, sete loci independentes de resistência a ferrugem asiática foram identificados e mapeados até o momento: *Rpp1/Rpp1-b* localizados no cromossomo (Chr) 18 (MCLEAN; BYTH 1980; HYTEN *et al.*, 2007; CHAKRABORTY *et al.*, 2009), *Rpp2/rpp2* mapeados no Chr 16 (HARTWIG; BROMFIELD, 1983; SILVA *et al.*, 2008; GARCIA *et al.*, 2008; YU *et al.*, 2015; YAMANAKA *et al.*, 2015), *Rpp3/rpp-?* encontrados no Chr 6 (HARTWIG; BROMFIELD, 1983; HYTEN *et al.*, 2009), *Rpp4/Rpp4-b* também localizado no Chr 18, com aproximadamente 26cM do gene *Rpp1* (HARTWIG, 1986; GARCIA *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2008), *Rpp5/rpp5* identificados no Chr 3 (GARCIA *et al.*, 2008; PIEROZZI *et al.*, 2008), *Rpp6* localizado no Chr 18 a 40cM do gene *Rpp4* (LI *et al.*, 2012) e *Rpp7* mapeado no Chr 19 (CHILDS *et al.*, 2018). A ação dos genes *Rpp* é geralmente dominante, porém, já foram observadas dominância incompleta e ação genética recessiva (CHILDS; BUCK; LI, 2018). Contudo, estes genes são efetivos apenas contra raças específicas de *P. pachyrhizi* (YAMANAKA; HOSSAIN, 2019), tornando seu uso limitado a áreas onde o patógeno não apresenta alta virulência.

A resistência da soja ao *P. pachyrhizi*, é caracterizada por reações fenotípicas marrom avermelhadas (*reddish brown* - RB) ou uma resposta imune (IM). A resposta IM é resultado da interação incompatível sem sintomas visíveis da doença nas folhas do hospedeiro. As lesões RB são consideradas como resistência incompleta, pois, em alguns casos, o patógeno poder crescer e se reproduzir de maneira limitada. Quando há interação compatível entre *P. pachyrhizi*-soja, as lesões características são de

suscetibilidade (TAN), que possuem coloração bronzeada com urédias esporulantes (MILES *et al.*, 2011; GODOY *et al.*, 2016).

Apesar de alguns genótipos de soja possuírem genes de resistência conhecido, *P. pachyrhizi* apresenta alta variabilidade e capacidade em desenvolver mutações genéticas (OLIVEIRA, 2017; SEIXAS *et al.*, 2018). Com isso, os programas de melhoramento genético vêm apresentando dificuldades em manter resistência durável a ferrugem asiática da soja. Todavia, alternativas como piramidação de genes vem sendo empregadas para aumentar durabilidade e o nível de resistência a FAS. Segundo Mundt (2018), a piramidação de genes consiste em alocar em um mesmo genótipo dois ou mais genes de resistência, conferindo uma resistência mais ampla a um número maior de raças.

Vários estudos utilizando diferentes combinações de genes piramidados de resistência a *P. pachyrhizi* relatam resultados positivos quanto a piramidação de genes. Yamanaka *et al.* (2013) avaliando uma linhagem de soja portadora de três genes de resistência piramidados (*Rpp2* + *Rpp4* + *Rpp5*) indicaram alto nível de resistência contra vários isolados de FAS, devido a sua baixa esporulação e pouco número de urédia por lesão. Nos estudos de Yamanaka *et al.* (2015) os autores encontraram resistência significativamente mais alta, com níveis mais baixos de número de urédias por lesão e baixa esporulação nas linhas piramidadas, No6-12-B (*Rpp4* + *Rpp5*), Oy49-4 (*Rpp2* + *Rpp3* + *Rpp4*) e No6-12-1 (*Rpp2* + *Rpp4* + *Rpp5*) em comparação com as fontes de resistência, PI 230970 (*Rpp2*), Hyuuga (*Rpp3*), PI 459025 (*Rpp4*) e Kinoshita (*Rpp5*) que possuem apenas um gene de resistência. Yamanaka e Hossain (2019) observaram que entre várias linhagens contendo genes piramidados de resistência desenvolvidas em seus estudos, as portadoras dos genes piramidados *Rpp3* + *Rpp4* e *Rpp3* + *Rpp4* + *Rpp5* apresentaram maiores níveis de resistência à FAS, com pouca ou nenhuma esporulação. Portanto, a piramidação de genes é uma alternativa para os programas de melhoramento no desenvolvimento de cultivares com maiores níveis de resistência com durabilidade e eficiência.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Quatorze linhagens irmãs de seis populações, contendo dois genes *Rpp* piramidados, oito fontes de resistência (Plant Introduction - PI), cinco cultivares comerciais resistentes e seis cultivares comerciais suscetíveis foram avaliadas no presente estudo (Tabela 1).

Tabela 1 - Descrição das linhagens com *Rpp*-genes piramidados, cultivares resistentes e suscetíveis e introdução de plantas (PI's) utilizadas no presente estudo

Genótipo	Gene	Fenótipo	Genealogia
¹ 52116-54	<i>Rpp2 + Rpp1-b</i>	SI	[(PI230970 x 55i57RSF) x (PI594723 x 63i64RSF)]
¹ 52116-74	<i>Rpp2 + Rpp1-b</i>	SI	[(PI230970 x 55i57RSF) x (PI594723 x 63i64RSF)]
¹ 52117-21	<i>Rpp2 + Rpp1-b</i>	SI	[(PI230970 x 55i57RSF) x (PI594538A x 63i64RSF)]
¹ 52117-57	<i>Rpp2 + Rpp1-b</i>	SI	[(PI230970 x 55i57RSF) x (PI594538A x 63i64RSF)]
¹ 52117-59	<i>Rpp2 + Rpp1-b</i>	SI	[(PI230970 x 55i57RSF) x (PI594538A x 63i64RSF)]
¹ 52117-60	<i>Rpp2 + Rpp4</i>	SI	[(PI230970 x 55i57RSF) x (PI459025A x 63i64RSF)]
¹ 52117-63	<i>Rpp2 + Rpp4</i>	SI	[(PI230970 x 55i57RSF) x (PI459025A x 63i64RSF)]
¹ 52118-56	<i>Rpp1-b + Rpp1-b</i>	SI	[(PI594723 x 55i57RSF) x (PI594538A x 63i64RSF)]
¹ 52118-81	<i>Rpp1-b + Rpp1-b</i>	SI	[(PI594723 x 55i57RSF) x (PI594538A x 63i64RSF)]
¹ 52118-88	<i>Rpp1-b + Rpp1-b</i>	SI	[(PI594723 x 55i57RSF) x (PI587880A x 63i64RSF)]
¹ 52118-93	<i>Rpp1-b + Rpp1-b</i>	SI	[(PI594723 x 55i57RSF) x (PI594538A x 63i64RSF)]
¹ 52119-43	<i>Rpp1-b + Rpp1-b</i>	SI	[(PI594723 x 55i57RSF) x (PI594538A x 63i64RSF)]
¹ 52119-69	<i>Rpp1-b + Rpp1-b</i>	SI	[(PI594538A x 55i57RSF) x (PI594538A x 63i64RSF)]
¹ 52120-38	<i>Rpp1-b + Rpp1-b</i>	SI	[(PI594538A x 55i57RSF) x (PI594538A x 63i64RSF)]
² 95R51	Não possui	Suscetível	-
² 95Y72	Não possui	Suscetível	-
¹ BMX Raio	Não possui	Suscetível	-
¹ BMX Zeus	Não possui	Suscetível	-
³ BRS 511	<i>Rpp5</i>	Resistente	-
³ BRS 531	<i>Rpp1-b</i>	Resistente	-
³ BRS 539	<i>Rpp1-b + Rpp4</i>	Resistente	SI
⁴ NK 6201	Não possui	Suscetível	-
⁴ NS 6700	Não possui	Suscetível	-
⁵ PI200487	<i>Rpp5</i>	Resistente	-
⁵ PI200492	<i>Rpp1</i>	Resistente	-
⁵ PI230970	<i>Rpp2</i>	Resistente	-
⁵ PI459025A	<i>Rpp4</i>	Resistente	-
⁵ PI506764	<i>Rpp3 + Rpp5</i>	Resistente	-
⁵ PI587880A	<i>Rpp1-b</i>	Resistente	-
⁵ PI594538A	<i>Rpp1-b</i>	Resistente	-
⁵ PI594723	<i>Rpp1-b</i>	Resistente	-
⁶ TMG 7058	SI	Resistente	-
⁶ TMG 7062	SI	Resistente	-

Nota: ¹GDM genética do Brasil; ²Pioneer seeds; ³BRS: Embrapa – Empresa brasileira de pesquisa agropecuária; ⁴Nidera/Syngenta seeds; ⁵US National Plant Germoplasm System; ⁶TMG – Tropical melhoramento e Genética; SI – Sem informação.

Fonte: Autoria própria (2021)

As linhagens irmãs foram desenvolvidas em estudos anteriores conduzidos por Meira *et al.* (2021), onde a partir de cruzamento duplo entre F1s, obtido entre cultivares comerciais suscetíveis (63i64RSF IPRO e 55i57RSF IPRO) e cinco fontes

de resistência (PI) (PI 594723 - *Rpp1-b*, PI 594538A - *Rpp1-b*, PI 587880A - *Rpp1-b*, PI 230970 - *Rpp2* e PI 459025 - *Rpp4*) (Tabela 1). As linhagens foram selecionadas através de seleção assistida por marcadores moleculares nas gerações F2 e F3, confirmando a presença dos dois genes de resistência. Apenas linhagens contendo os genes de resistência piramidados e com lesões RB características foram selecionadas para avanço de geração. As linhagens avaliadas a campo encontram-se em geração F4 e pertencem ao programa de melhoramento genético da empresa GDM Genética do Brasil S.A.

3.2 Condução experimental

As linhagens irmãs com genes *Rpp* piramidados, oito fontes de resistência (PI's), cultivares comerciais resistentes e suscetíveis (Tabela 1) foram conduzidas à campo na área experimental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), *Campus* Pato Branco (26°13'43"S; 52°40'14"O; 760 m de altitude) O clima da região é Cfa (clima temperado, sem estação seca e verão quente) segundo classificação de Koppen (ALVARES *et al.*, 2013). A semeadura foi realizada em época não preferencial de cultivo da soja (01/12/2020), escolhida a fim de coincidir o período de maior incidência de *Phakopsora pachyrhizi*, aos períodos mais receptivos da cultura. O experimento foi conduzido em blocos ao acaso, com três repetições. Cada unidade experimental foi composta por 2 linhas de 3 metros de comprimento, espaçadas a 0,5 m entre si (3 m²). A densidade de semeadura foi de 14 sementes por metro linear.

Antes da implantação do experimento foi realizada a semeadura de bordadura em torno da área, com quatro semanas de antecedência, com cultivar comercial suscetível a ferrugem asiática, a fim de proporcionar presença de inóculo na área. Não foram realizadas aplicações de fungicida na área do experimento. A adubação e o controle de pragas foram realizados conforme recomendações técnicas para a cultura da soja e o controle de plantas daninhas foi realizado manualmente.

3.3 Avaliações de campo

3.3.1 Caracterização de lesões

No campo, foram analisadas dez folhas do terço médio de plantas de soja no estágio R5 (FEHR; CAVINESS, 1977) de cada unidade experimental. A classificação

das lesões foi de acordo com as reações de resistência: *reddish brown* (RB), suscetível (TAN) e imune (IM). Sendo: IM sem lesões visíveis; TAN com lesões abundantemente esporuladas; e RB de acordo com o nível de esporulação: RB1 pouca ou nenhuma lesão esporulada; RB2 pouca esporulação; RB3 esporulação moderada (Adaptado de YAMANAKA *et al.*, 2011; MILES *et al.*, 2011).

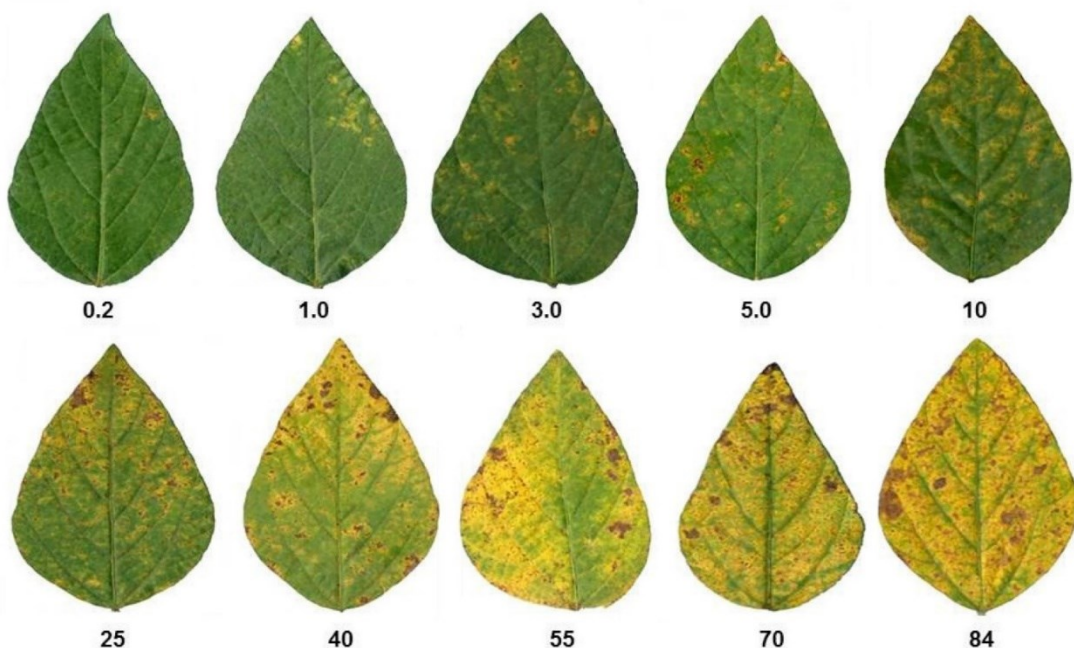
3.3.2 Severidade e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD)

Para determinação da AACPD, foram realizadas cinco avaliações de severidade com intervalo de sete dias, em todos os genótipos descritos na Tabela 1. A primeira avaliação ocorreu 81 dias após a semeadura (DAS). A severidade foi mensurada com auxílio de escala diagramática para ferrugem asiática da soja proposta por Franceschi *et al.* (2020) (Figura 1). A partir dos dados de severidade foram calculadas a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) através da equação proposta por Bettiol, Tratch e Galvão (1998):

$$\left(\frac{y_1+y_2}{2}\right)*(t_2-t_1)+\left(\frac{y_2+y_3}{2}\right)*(t_3-t_2)+\left(\frac{y_3+y_4}{2}\right)*(t_4-t_3)+\left(\frac{y_4+y_5}{2}\right)*(t_5-t_4) \quad (1)$$

onde y_1 , y_2 , y_3 , y_4 e y_5 refere-se a cinco avaliações de severidade da doença realizadas nos tempos t_1 , t_2 , t_3 , t_4 e t_5 , respectivamente.

Figura 1 - Escala diagramática para avaliação da severidade de ferrugem asiática da soja proposta por Franceschi *et al.* (2020)



Fonte: Franceschi *et al.* (2020)

3.4 Análises de laboratório

3.4.1 Avaliação de resistência

Foram coletadas dez folhas aleatórias do terço-médio de cada parcela no estádio fenológico R5 da soja (FERH; CAVINESS, 1977). Foram avaliados os caracteres nível de esporulação (NE), frequência de lesão com urédia (%LU) e número de urédia com lesão (NoU) em 1 cm² de folha. As características foram avaliadas em microscópio estereoscópio binocular óptico com aumento de 14x. Diferenças significativas entre os genótipos para os três caracteres foi comprovada pela ANOVA. A classificação de genótipos quanto a resistência foi realizada de acordo com Yamanaka *et al.* (2013), e estão dispostos na tabela 1 e 2.

Tabela 2 - Critério de classificação para caracterização fenotípica de genótipos suscetíveis ou resistentes para três caracteres de resistência: frequência de lesão com urédia (%LU), número de lesão com urédia (NoU) e nível de esporulação (NE) em 1cm² de folha

Caractere de resistência	Resistente	Suscetível
%LU	$0,0 \leq x < 70,0$	$70,0 \leq x \leq 100,0$
NoU	$0,0 \leq x < 2,0$	$2,0 \leq x$
NE	$0,0 \leq x < 2,0$	$2,0 \leq x \leq 3,0$

Nota: %LU: frequência de lesão com urédia; NoU: número de urédia por lesão; NE: nível de esporulação.

Fonte: Yamanaka *et al.* (2013)

Tabela 3 - Critério de classificação de genótipos quanto a resistência a *Phakopsora pachyrhizi*

Categoria	Critério
Imune (IM)	Sem lesões
Altamente resistente (AR)	Com lesões, mas com os 3 caracteres apresentando resistência
Resistente (R)	Com lesões, mas apenas 1 caractere apresentando suscetibilidade
Pouco resistente (PR)	Com lesões, e apenas 1 caractere apresentando resistência
Suscetível (S)	Com lesões, e os 3 caracteres apresentando suscetibilidade

Fonte: Yamanaka *et al.* (2013)

3.4.2 Análises anatômicas em microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As avaliações em MEV foram realizadas no Laboratório Central de análises da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, *Campus Pato Branco*. Foram coletados dez folíolos do terço médio de todos os genótipos (Tabela 1) de cada parcela no estádio de início de desenvolvimento do grão (R5) da cultura da soja (FEHR; CAVINESS, 1977). As amostras foram alocadas em estufa a 60 °C, a fim de remover a umidade para não danificar as amostras e o equipamento. Foram retirados pequenos pedaços do centro de cada folíolo (aproximadamente 1 cm²) e acoplado ao suporte do equipamento com auxílio de fita de carbono e cobre. Posteriormente, as amostras foram avaliadas em microscópio eletrônico de varredura modelo TM3000,

Hitachi, com aumento de 1000x. Foram mensuradas as variáveis: espessura da epiderme inferior (abaxial; EEI), espessura da epiderme superior (adaxial; EES), espessura de parênquima paliçádico (EPP), espessura de parênquima lacunoso (EPL) e espessura do limbo foliar (ELF).

3.4.3 Análise de compostos fenólicos em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A extração e quantificação de compostos fenólicos foi realizada no laboratório de Central de análises da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, *Campus* Pato Branco. Foram selecionados para quantificação dos compostos fenólicos 16 genótipos sendo duas cultivares suscetíveis (BMX Zeus IPRO e BMX Raio IPRO); as fontes de resistência PI200487 (*Rpp5*), PI200492 (*Rpp1*), PI230970 (*Rpp2*), PI459025A (*Rpp4*), PI506764 (*Rpp5*, 3), PI587880A (*Rpp1-b*), PI594538A (*Rpp1-b*), PI594723 (*Rpp1-b*) e as linhagens: 52116-74 (*Rpp2* + *Rpp1-b*), 52117-57 (*Rpp2* + *Rpp1-b*), 52117-60 (*Rpp2* + *Rpp4*), 52118-81 (*Rpp1-b* + *Rpp1-b*), 52119-43 (*Rpp1-b* + *Rpp1-b*) e 52119-69 (*Rpp1-b* + *Rpp1-b*).

A metodologia de extração seguiu como descrito por Oliveira *et al.* (2018) com algumas modificações: foram coletadas cinco folhas do terço médio de cada parcela no estágio R5 de desenvolvimento da cultura (FEHR; CAVINESS, 1977). As amostras foram armazenadas individualmente em embalagens de papel alumínio, em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas em ultrafreezer até o momento da extração e análise. No momento da extração, o tecido foliar foi macerado em almofariz utilizando nitrogênio líquido e colocadas em tubo falon (15 mL). Foram pesadas 1 g de tecido foliar de cada amostra em balança analítica de precisão e misturadas com 10 mL de metanol PA (90%). As amostras foram condicionadas em banho ultrassônico por 20 minutos e centrifugadas por 20 minutos a 7000 rpm a 4 °C, rotaevaporadas, secas sob vácuo e ressolubilizadas com 3 mL de metanol grau HPLC (80%), e homogeneizadas manualmente. Em seguida, o extrato foliar foi filtrado em membrana Milipore® 0,45 µm. Foram quantificadas as isoflavonas: daidzina, gliciteína, daidzeína e genisteína. A quantificação das isoflavonas foi realizada utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), modelo LC920, Varian, previamente testado com padrões de pureza e concentração conhecida a fim de obter um fator de correção para cada composto. A injeção dos extratos fenólicos no equipamento seguiu conforme descrito por Oliveira *et al.* (2018).

Diferentes concentrações dos padrões (3,12; 6,24; 12,48; 24,96; 50,00; 100,00 $\mu\text{g L}^{-1}$) foram injetadas no CLAE, a fim de obter uma curva padrão. A identificação dos compostos foi realizada por meio de comparação de espectros e tempo de retenção dos padrões com o espectro e tempo de retenção de cada amostra analisada. A quantificação dos compostos, foi realizada levando em consideração a área do pico de cada substância identificada.

3.5 Análise de dados

Os dados foram previamente analisados pelo teste de normalidade dos resíduos de Shapiro-Wilk, e teste de homogeneidade das variâncias (Bartlett), atendendo assim os pressupostos da análise de variância (ANOVA). Os dados foram submetidos a ANOVA pelo teste F a 5% de probabilidade de erro. Quando verificado significância, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. Foi realizada análise de correlação, a fim de observar quais caracteres morfológicos e bioquímicos estão relacionados com os caracteres de resistência. As análises e gráficos foram realizados no software R (R CORE DEVELOPMENT TEAM, 2020) utilizando os pacotes: Metan e ExpDes.pt (OLIVOTO; LÚCIO, 2020; FERREIRA; CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2021).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização de genótipos quanto a resistência a ferrugem asiática da soja

A análise de variância (Tabela 4) apresentou significância ($P < 0,01$) para todos os caracteres avaliados. A herdabilidade dos caracteres de resistência número de lesão (NL), frequência de lesão com urédia (%LU), número de urédia por lesão (NoU) e nível de esporulação (NE) foi elevada variando de 0,94 a 0,96. A maior participação foi de efeitos genéticos, apresentando possibilidade de resposta a seleção.

Tabela 4 - Análise de componentes de variância de 33 genótipos estudados para os caracteres de resistência número de lesão (NL), frequência de lesão com urédia (%LU), número de urédia por lesão (NoU) e nível de esporulação (NE)

Fator de variação	NL	%LU	NoU	NE
Herdabilidade	0,96	0,94	0,96	0,96
Variância Genotípica	436,77**	0,20**	2,13**	1,41**
Variância Residual	50,38	0,04	0,26	0,16
Média	20,88	0,52	1,36	1,24
CV	34,00	38,86	37,16	31,72

Nota: CV: coeficiente de variação; **: significativo a 5% de probabilidade de erro.

Fonte: Autoria própria (2021)

A bordadura semeada antecipadamente, contribuiu para presença de inóculo na área, sendo que a presença de ferrugem no campo experimental foi confirmada pela observação de lesões características de suscetibilidade (TAN) à *Phakopsora pachyrhizi* nas testemunhas suscetíveis (NK6201, NS6700, 95R51, 95Y72, BMX Zeus IPRO e BMX Raio IPRO) (Tabela 5; Figura 2).

As linhagens 52116-74 [(PI230970 x 55i57RSF) x (PI594723 x 63i64RSF)], 52117-21, 52117-57 [(PI230970 x 55i57RSF) x (PI594538A x 63i64RSF)], que contém os genes *Rpp2* + *Rpp1-b* piramidados, apresentaram NE nulo (NE = 0). Além disso, estas linhagens não diferiram estatisticamente de seus parentais portadores do gene *Rpp1-b* (PI594723 e PI594538A) (Tabela 5; Figura 2).

As linhagens 52119-69 e 52120-38 [(PI594538A x 55i57RSF) x (PI587880A x 63i64RSF)], portadores dos genes *Rpp* piramidados *Rpp1-b* + *Rpp1-b*, também apresentaram ausência de esporulação (NE = 0), não diferindo do parental resistente PI594538A, mas com desempenho superior ao parental PI587880A, que apresentou NE = 1. A linhagem 52118-81, resultante do cruzamento (PI594723 x 55i57RSF) x (PI594538A x 63i64RSF), apresentaram NE significativamente igual aos parentais (NE = 0), que carregam o gene *Rpp1-b* (PI594723 e PI594538A) (Tabela 5; Figura 2). Resultado semelhante obtido pela linhagem, 52117-60 portadora dos genes *Rpp2* +

Rpp4. As linhagens 52118-56 e 52118-88 descendentes do cruzamento entre (PI594723 x 55i57RSF) x (PI587880A x 63i64RSF) apresentaram NE baixos (NE=0,33), não diferindo do parental resistente, PI594723 (*Rpp1-b*, NE=0) e superiores ao parental, PI587880A (*Rpp1-b*, NE=1). Dentre as linhagens avaliadas, a 52117-63 (*Rpp2* + *Rpp4*, NE = 2), seguido pela 52116-54 (*Rpp2* + *Rpp1-b*, NE=1), apresentaram as maiores esporulações.

Os maiores níveis de esporulação foram observados nas testemunhas suscetíveis 95R51, 95Y72, BMX Raio IPRO, BMX Zeus IPRO, NK6201 e NS6700 (Tabela 4; Figura 2). Além disso, a cultivar comercial resistente TMG7062 e a PI, portadora do gene *Rpp4* (PI459025A), também apresentaram níveis elevados de esporulação (NE = 3). As cultivares comerciais BRS531 (*Rpp1-b*) e BRS539 (*Rpp1-b* + *Rpp4*), que também contém o gene *Rpp1-b*, apresentaram ausência de esporulação.

As linhagens 52117-21 e 52117-57, descendentes do cruzamento [(PI230970 x 55i57RSF) x (PI594538A x 63i64RSF)] (*Rpp2* + *Rpp1-b*), a 52117-60 [(PI230970 x 55i57RSF) x (PI459025A x 63i64RSF)] e a 52119-69 e 52120-38, oriundas do cruzamento [(PI594538A x 55i57RSF) x (PI587880A x 63i64RSF)] (*Rpp1-b* + *Rpp1-b*), apresentaram %LU e NoU nulos (Tabela 5; Figura 2). Valores inferiores, comparado aos parentais, portadores de genes de resistência PI230970 (*Rpp2*, NoU=1,01; %LU=76,67), PI459025 (*Rpp4*, NoU= 2,88; %LU=100), PI587880A (*Rpp1-b*, NoU=1,14; %LU=63,14).

Já as linhagens, 52117-74 [*Rpp2* + *Rpp1-b* (PI230970 x 55i57RSF) x (PI594723 x 63i64RSF)] e 52118-81 (*Rpp1* + *Rpp1-b*), [(PI594723 x 55i57RSF) x (PI594538A x 63i64RSF)], apresentaram valores de NoU e %LU semelhantes a seu parental, PI594723 (*Rpp1-b*, NoU=0; %LU=0) e PI594538A (*Rpp1-b*, NoU=0,33; %LU=33) (Tabela 5). As linhagens 52116-54 [*Rpp2* + *Rpp1-b*, (PI230970 x 55i57RSF) x (PI594723 x 63i64RSF)], 52118-56 [*Rpp1-b* + *Rpp1-b* (PI594723 x 55i57RSF) x (PI594538A)], 52118-88, 52118-93 e 52118-43 [*Rpp1-b* + *Rpp1-b*, (PI594723 x 55i57RSF) x (PI587880A x 63i64RSF)] apresentaram valores baixos de %LU e NoU, variando entre 6,06% a 18,79% e 0,13 a 0,33, respectivamente.

Esses valores são significativamente menores quando comparado a fontes de resistência simples PI200487 (*Rpp5*, %LU=94,87; NoU=1,33), PI200492 (*Rpp1*, %LU=100,00; NoU=2,36), PI230970 (*Rpp2*, %LU=76,67; NoU=1,01), PI459025A (*Rpp4*, %LU=100,00; NoU=2,88), PI506764 (*Rpp3*, %LU=100,00; NoU=2,31) e PI587880A (*Rpp1-b*, %LU=63,14; NoU=1,14).

Figura 2 - Esporulação de *Phakopsora pachyrhizi* em linhagens irmãs com genes *Rpp* piramidados, parentais e fontes de resistência (PI's) e cultivares suscetíveis e resistentes. Fotografias do lado abaxial da folha em microscópio estereoscópio com aumento de 14x

	Linha.	Pai 1 (R)	Pai 2 (S)	Pai 1 (R)	Pai 2 (S)		Testemunhas
<i>Rpp2 + Rpp1-b</i>	52116-54	PI230970	55i57RSF	PI594723	63i64RSF	<i>Rpp1</i>	PI200492
<i>Rpp2 + Rpp1-b</i>	52116-74	PI230970	55i57RSF	PI594723	63i64RSF	<i>Rpp3 + Rpp5</i>	PI506764
<i>Rpp2 + Rpp1-b</i>	52117-21	PI230970	55i57RSF	PI594538A	63i64RSF	<i>Rpp5</i>	PI200487
<i>Rpp2 + Rpp1-b</i>	52117-57	PI230970	55i57RSF	PI594538A	63i64RSF	<i>Rpp5</i>	BRS511
<i>Rpp2 + Rpp1-b</i>	52117-59	PI230970	55i57RSF	PI594538A	63i64RSF	<i>Rpp1-b</i>	BRS531
<i>Rpp2 + Rpp4</i>	52117-60	PI230970	55i57RSF	PI459025A	63i64RSF	<i>Rpp1-b + Rpp4</i>	BRS539
<i>Rpp2 + Rpp4</i>	52117-63	PI230970	55i57RSF	PI459025A	63i64RSF	SI	TMG7058
<i>Rpp1-b + Rpp1-b</i>	52118-56	PI594723	55i57RSF	PI594538A	63i64RSF	SI	TMG7062
<i>Rpp1-b + Rpp1-b</i>	52118-81	PI594723	55i57RSF	PI594538A	63i64RSF	Suscetível	NK6201
<i>Rpp1-b + Rpp1-b</i>	52118-88	PI594723	55i57RSF	PI587880A	63i64RSF	Suscetível	NS6700
<i>Rpp1-b + Rpp1-b</i>	52118-93	PI594723	55i57RSF	PI587880A	63i64RSF	Suscetível	95R51
<i>Rpp1-b + Rpp1-b</i>	52119-43	PI594723	55i57RSF	PI587880A	63i64RSF	Suscetível	95Y72
<i>Rpp1-b + Rpp1-b</i>	52119-69	PI594538A	55i57RSF	PI587880A	63i64RSF		
<i>Rpp1-b + Rpp1-b</i>	52120-38	PI594538A	55i57RSF	PI587880A	63i64RSF		

**Nota: S: suscetível; R: Resistente; SI: Sem informação.
Fonte: Autoria própria (2021)**

Os maiores valores de %LU, foram observados nas cultivares comerciais 95R51, 95Y72, BMX Raio IPRO, BMZ Zeus IPRO, BRS511, NK6201, NS6700,

TMG7058 e TMG7062 e para as fontes de resistência PI200492, PI459025A e PI506764 que apresentaram valores de LU de 100,00%. Os genótipos BRS539 (66,67%), PI200487 (94,87%), PI230970 (76,67%) e PI587880A (63,14%) e a linhagem 52117-63 (100,00%) também apresentaram valores altos de LU, não diferindo das cultivares suscetíveis. Já para NoU, valores elevados foram observados para as testemunhas suscetíveis 95R51, 95Y72, BMX Raio IPRO, BMZ Zeus IPRO, BRS511, NK6201, NS6700 não diferindo da cultivar resistente TMG7062, apresentando valores de NoU > 3,00.

De modo geral, todas as linhagens contendo genes *Rpp* piramidados apresentaram níveis superiores de resistência quando comparados as fontes de resistência com apenas um gene *Rpp*: PI200487 (*Rpp5*), PI200492 (*Rpp1*), PI230970 (*Rpp2*), PI459025A (*Rpp4*) e PI506764 (*Rpp3*, *Rpp5*). Resultado semelhante ao encontrado por Yamanaka *et al.* (2015), que observaram resistência significativamente maior nas linhas piramidadas, N°6-12-B (*Rpp4* + *Rpp5*), Oy49-4 (*Rpp2* + *Rpp3* + *Rpp4*) e N°6-12-1 (*Rpp2* + *Rpp4* + *Rpp5*), em comparação com as fontes de resistência, PI230970 (*Rpp2*), PI506764 (*Rpp3*, *Rpp5*), PI459025 (*Rpp4*) e PI200487 (*Rpp5*). Lemos *et al.* (2011), também relataram sucesso na piramidação de genes, onde a linha piramidada portadora dos genes *Rpp2* + *Rpp4* + *Rpp5* identificada com o maior nível de resistência, quando comparada a seus parentais portadores de genes simples (PI230970, PI459025 e PI200487).

O número de urédia por lesão (NoU) e a frequência de lesão com urédia (%LU) são parâmetros confiáveis na determinação de genótipos resistentes ou suscetíveis (KASHIWA; MURAKI; YAMANAKA, 2020). Em nossos estudos, as linhas com genes *Rpp*-piramidados apresentaram menor frequência de lesão com urédia (%LU), e menor número de urédia por lesão (NoU), comparativamente a seus parentais e as fontes de resistência (PI). Resultados semelhantes foram relatados em outros estudos, com diferentes combinações de genes piramidados (LEMOS *et al.*, 2011; YAMANAKA *et al.*, 2013; YAMANAKA *et al.*, 2015; YAMANAKA; HOSSAIN, 2019). Além disso, as linhagens 52117-21, 52117-57, 52117-60, 52119-69 e 52120-38 não apresentaram esporulação, além de ausência na formação de urédias (Tabela 5). Tais resultados corroboram com Yamanaka *et al.* (2013) e Yamanaka e Hossain (2019), que avaliando linhas com genes *Rpp* piramidados, observaram ausência na formação de urédias e esporulação.

A piramidação de genes afetou diretamente a formação de estruturas reprodutivas do patógeno, impedindo e/ou reduzindo a formação de urédias e a esporulação. As urédias são responsáveis pela liberação dos esporos, as quais disseminam o fungo (KASHIWA; MURAKI; YAMANAKA, 2020). Com a redução dessas estruturas, os danos causados na área foliar são minimizados, mantendo maior área fotossinteticamente ativa, e melhorando a interceptação luminosa, gerando maior acúmulo de fotoassimilados, resultando em maior rendimento (GODOY *et al.*, 2018).

Todas as cultivares testemunhas apresentaram reação típica suscetível, caracterizada como lesão tipo TAN (Tabela 5). Reações de imunidade (IM), associada a mínimas lesões tipo *redish brown* sem esporulação (RB1) foram observadas nas linhagens com genes *Rpp* piramidados: 52117-21, 52117-57, 52117-59, 52117-60 e 52119-69, e para a cultivar comercial BRS531. Além disso, lesões RB1 foram observadas nas linhagens 52116-54, 52116-74, 52118-56, 52118-81, 52118-88, 52118-93, 52119-43 e 52120-43, e na PI594538A e PI594723, e para a cultivar comercial BRS539.

Os valores de NoU e %LU de cada genótipo possibilitaram classificá-los quanto a resistência a *P. pachyrhizi* (Tabela 5). Apenas o genótipo 52117-57, resultante do cruzamento entre (PI230970 x 55i57RSF) x (PI594538A x 63i64RSF) e portador dos genes de resistência *Rpp2* + *Rpp1-b*, foi classificado como imune (IM), por apresentar ausência de lesões e conseqüentemente, ausência de urédias e esporulação (NL, NE, NoU e %LU = 0). As demais linhagens, exceto a linhagem 52117-63, foram classificadas como altamente resistentes (AR). Genótipos com NE e NoU $\leq 2,0$ e LU $\leq 70,0\%$ (Tabela 2) caracterizam fenótipos AR (Tabela 3). As cultivares BRS531 e BRS539 e as PI's PI587880A, PI594538A e PI594723 também apresentaram fenótipo AR.

A linhagem 52117-63, a cultivar BRS511 e as PI's PI200487 e PI230970 foram classificadas como resistentes (R) (Tabela 5), pois apresentaram NoU e NE $\leq 2,0$ e LU $> 70,0\%$ (Tabela 2; Tabela 3). Por outro lado, genótipos que apresentam NoU e NE $> 2,0$ e LU $> 70,0\%$, caracterizam fenótipos suscetíveis (S). Todas as cultivares testemunhas (95R51, 95Y72, BMX Raio IPRO, BMZ Zeus IPRO, BRS511, NK6201, NS6700) apresentaram valores elevados para NE, %LU e NoU. Além disso, a cultivar comercial resistente TMG7062 apresentou fenótipo S, juntamente com a PI459025 (Tabela 5).

Tabela 5 - Classificação fenotípica baseada nos caracteres de resistência a *Phakopsora pachyrhizi*: frequência de lesão com urédia (%LU), número de urédia por lesão (NoU) e nível de esporulação (NE) em 14 linhagens com *Rpp*-genes piramidados, cultivares suscetíveis e resistentes e fontes de resistência (PI's) de soja

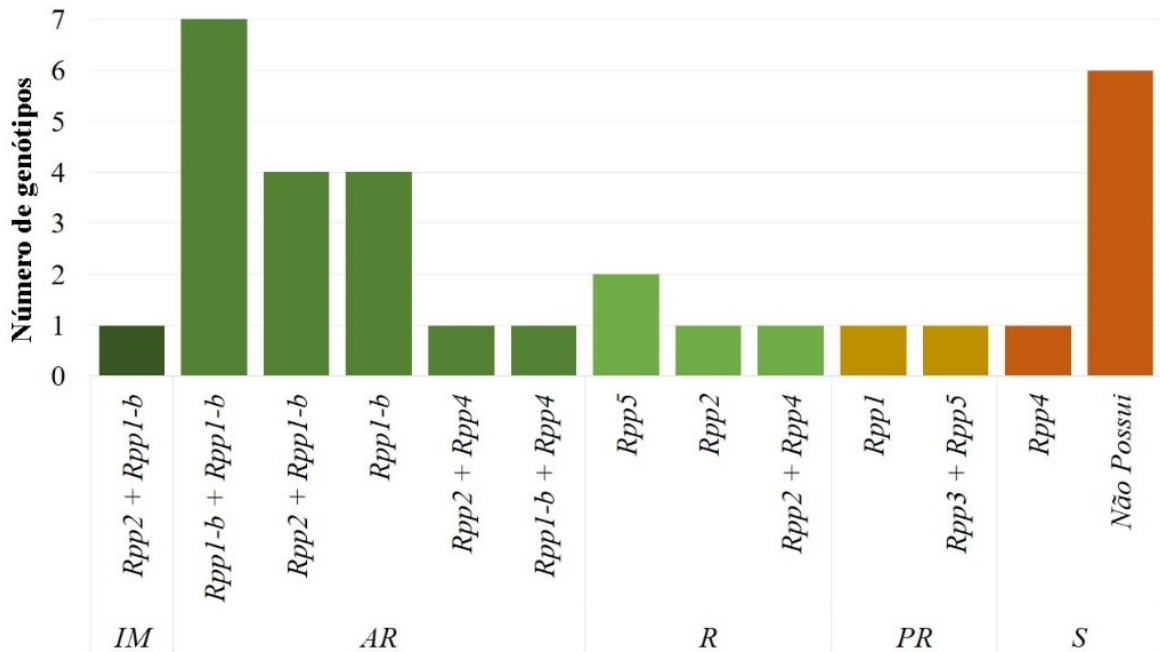
Genótipo	Genealogia	Gene	NE	%LU	NoU	NL	Class ¹	RR
52116-54	[(PI230970 x 55i57RSF) x (PI594723 x 63i64RSF)]	<i>Rpp2 + Rpp1-b</i>	² 1,00c	18,79%b	0,33d	14d	AR	RB1
52116-74	[(PI230970 x 55i57RSF) x (PI594723 x 63i64RSF)]	<i>Rpp2 + Rpp1-b</i>	0,00d	0,00%b	0,00d	5e	AR	RB1
52117-21	[(PI230970 x 55i57RSF) x (PI594538A x 63i64RSF)]	<i>Rpp2 + Rpp1-b</i>	0,00d	0,00%b	0,00d	1e	AR	IM/RB1
52117-57	[(PI230970 x 55i57RSF) x (PI594538A x 63i64RSF)]	<i>Rpp2 + Rpp1-b</i>	0,00d	0,00%b	0,00d	0e	IM	IM/RB1
52117-59	[(PI230970 x 55i57RSF) x (PI594538A x 63i64RSF)]	<i>Rpp2 + Rpp1-b</i>	0,67c	33,33%b	0,86c	7e	AR	IM/RB1
52117-60	[(PI230970 x 55i57RSF) x (PI459025A x 63i64RSF)]	<i>Rpp2 + Rpp4</i>	0,00d	0,00%b	0,00d	1e	AR	IM/RB1
52117-63	[(PI230970 x 55i57RSF) x (PI459025A x 63i64RSF)]	<i>Rpp2 + Rpp4</i>	2,00b	100,00%a	1,65c	27d	R	RB3
52118-56	[(PI594723 x 55i57RSF) x (PI594538A x 63i64RSF)]	<i>Rpp1-b + Rpp1-b</i>	0,33d	6,06%b	0,15d	10e	AR	RB1
52118-81	[(PI594723 x 55i57RSF) x (PI594538A x 63i64RSF)]	<i>Rpp1-b + Rpp1-b</i>	0,00d	0,00%b	0,00d	6e	AR	RB1
52118-88	[(PI594723 x 55i57RSF) x (PI587880A x 63i64RSF)]	<i>Rpp1-b + Rpp1-b</i>	0,33d	6,67%b	0,13d	4e	AR	RB1
52118-93	[(PI594723 x 55i57RSF) x (PI594538A x 63i64RSF)]	<i>Rpp1-b + Rpp1-b</i>	0,67c	6,41%b	0,13d	11e	AR	RB1
52119-43	[(PI594723 x 55i57RSF) x (PI594538A x 63i64RSF)]	<i>Rpp1-b + Rpp1-b</i>	0,67c	9,23%b	0,18d	7e	AR	RB1
52119-69	[(PI594538A x 55i57RSF) x (PI594538A x 63i64RSF)]	<i>Rpp1-b + Rpp1-b</i>	0,00d	0,00%b	0,00d	1e	AR	IM/RB1
52120-38	[(PI594538A x 55i57RSF) x (PI594538A x 63i64RSF)]	<i>Rpp1-b + Rpp1-b</i>	0,00d	0,00%b	0,00d	5e	AR	RB1
95R51	-	Não Possui	3,00a	100,00%a	3,75a	45c	S	TAN
95Y72	-	Não Possui	3,00a	100,00%a	3,90a	58b	S	TAN
BMX Raio IPRO	-	Não Possui	3,00a	100,00%a	3,24a	25d	S	TAN
BMX Zeus IPRO	-	Não Possui	3,00a	100,00%a	3,21a	80a	S	TAN
BRS511	-	<i>Rpp5</i>	1,67b	100,00%a	1,61c	23d	R	RB2
BRS531	-	<i>Rpp1-b</i>	0,00d	0,00%b	0,00d	1e	AR	IM/RB1
BRS539	-	<i>Rpp1-b + Rpp4</i>	0,00d	66,67%a	0,67c	1e	AR	RB1
NK6201	-	Não Possui	3,00a	100,00%a	3,51a	51c	S	TAN
NS6700	-	Não Possui	3,00a	100,00%a	3,41a	62b	S	TAN
PI200487	-	<i>Rpp5</i>	1,67b	94,87%a	1,33c	22d	PR	RB2
PI200492	-	<i>Rpp1</i>	2,00b	100,00%a	2,36b	39c	R	RB3
PI230970	-	<i>Rpp2</i>	1,33c	76,67%a	1,01c	23d	R	RB3
PI459025A	-	<i>Rpp4</i>	3,00a	100,00%a	2,88b	57b	S	RB3
PI506764	-	<i>Rpp3 + Rpp5</i>	2,00b	100,00%a	2,31b	16d	PR	RB2
PI587880A	-	<i>Rpp1-b</i>	1,00c	63,14%a	1,14c	14d	AR	RB2
PI594538A	-	<i>Rpp1-b</i>	0,00d	33,33%b	0,33d	3e	AR	RB1
PI594723	-	<i>Rpp1-b</i>	0,00d	0,00%b	0,00d	11e	AR	RB1
TMG7058	-	SI	1,67b	100,00%a	2,13b	21d	PR	RB2
TMG7062	-	SI	3,00a	100,00%a	3,26a	39c	S	RB3

Nota:¹ Classificação de resistência de genótipos de acordo com Yamanaka *et al.* (2013). Para mais informações, consultar tabela 2 e 3. ²Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Skott Knott a 5% de probabilidade de erro.

Fonte: Autoria própria (2021)

A combinação de genes *Rpp* piramidados que resultou em genótipo (52117-57), imune (IM) foi *Rpp2 + Rpp1-b*, oriundo do cruzamento entre (PI230970 x 55i57RSF) x (PI594538A x 63i64RSF). Foram classificados em altamente resistentes (AR), todos os genótipos com os genes piramidados *Rpp1-b + Rpp1-b*, *Rpp1-b + Rpp4* e *Rpp2 + Rpp4*, além de quatro genótipos da piramidação, *Rpp2 + Rpp1-b* (Tabela 5; Figura 3). O nível de resistência é influenciado não só pela quantidade, mas também, pela combinação de genes da planta (NELSON *et al.*, 2018). Dentro de uma mesma combinação, com mesma base genética, foi possível observar diferenças entre os níveis de resistência das linhagens irmãs. Pequenas diferenças alélicas nos genes de resistência, bem como diferentes interações entre genes *Rpp* piramidados, fatores genéticos desconhecidos (além dos genes *Rpp*), e a base genética da planta, também podem influenciar no nível de resistência (YAMANAKA *et al.*, 2015; NELSON *et al.*, 2018; KASHIWA; MURAKI; YAMANAKA, 2020). Portanto, dentro de uma mesma combinação de piramidação, utilizando os mesmos parentais, é possível observar diferenças no fenótipo, quanto a resistência a FAS.

Figura 3 - Número de genótipos por *Rpp*-genes piramidados e por classificação quanto a resistência a *Phakopsora pachyrhizi*



Nota: Classificação baseada em estudos de Yamanaka *et al.* (2013); Descrição completa das linhagens, fontes de resistência (PI), cultivares resistentes e suscetíveis avaliadas, ver Tabela 1. IM: imune; AR: altamente resistente; R: resistente; PR: pouco resistente; S: suscetível.
Fonte: Autoria própria (2021)

Dentre as fontes de resistência utilizadas no presente estudo, as portadoras do gene *Rpp1-b* (PI587880A, PI594538A e PI594723), e a cultivar comercial BRS531 (*Rpp1-b*), apresentaram maiores níveis de resistência, quando comparado as demais fontes de resistência (Tabela 5). Além disso, todos os genótipos portadores do gene *Rpp1-b* apresentaram classificação AR, sendo o único gene simples com reação “altamente resistente” (Figura 3). Genótipos portadores do gene *Rpp1-b* já foram relatadas apresentando elevados níveis de resistência, principalmente as populações de *P. pachyrhizi* da América do Sul (AKAMATSU *et al.*, 2013; HOSSAIN *et al.*, 2015; YAMANAKA *et al.*, 2016) e da África (MURITHI *et al.*, 2021), corroborando com os resultados obtidos no presente estudo. O gene *Rpp1-b*, é uma fonte de resistência promissora para os programas de melhoramento, visando maiores níveis de resistência, principalmente contra isolados altamente agressivos de FAS da América do Sul (HOSSAIN *et al.*, 2015).

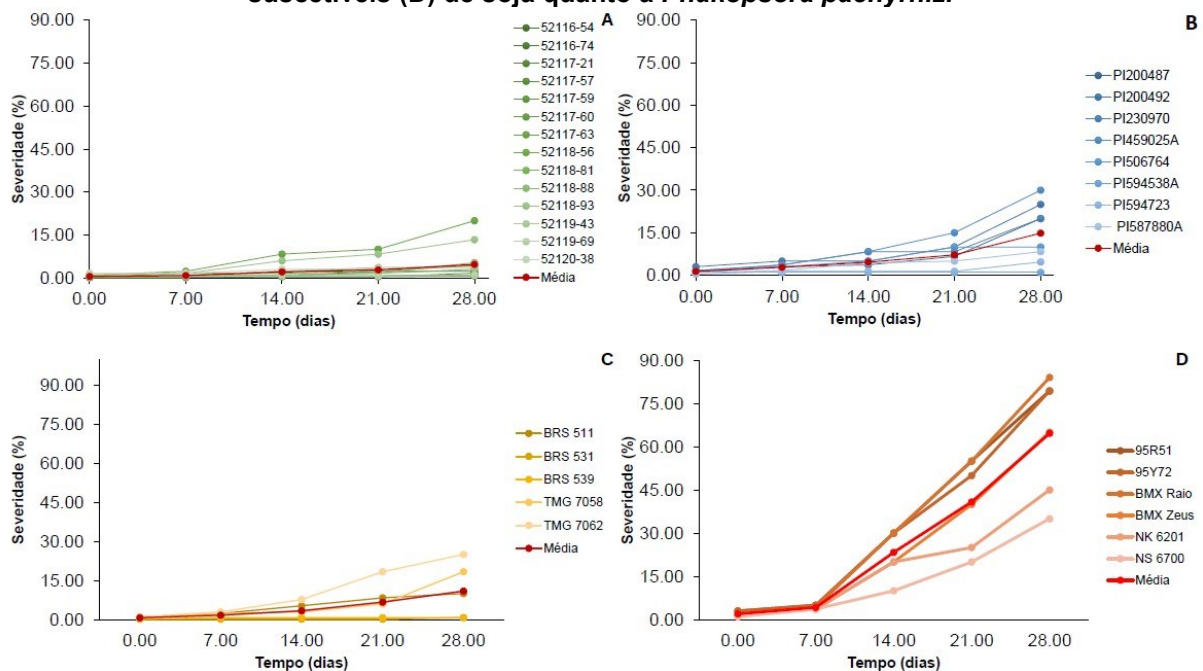
Todos os genótipos contendo genes simples *Rpp2*, *Rpp5*, *Rpp1* e *Rpp3*, bem como um genótipo da piramidação *Rpp2* + *Rpp4*, apresentaram classificação resistente (R) a pouco resistente (PR). Os genótipos sem genes de resistência, e o *Rpp4* (PI459025A) foram classificados como suscetíveis (S), frente aos isolados de campo (Figura 3).

4.2 Severidade e Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD)

A medida de severidade, consiste na proporção de área foliar infectada pelo fungo em relação a área foliar sadia. Esta é utilizada para comparar a eficiência de genótipos e/ou tratamentos em suprimir a doença (DALLA LANA *et al.*, 2015; FRANCESCHI *et al.*, 2020).

Todas as linhagens piramidadas (Figura 4A) apresentaram severidades inferiores a 6%, exceto as linhas 52117-63 (*Rpp2* + *Rpp4*) e 52118-93 (*Rpp1-b* + *Rpp1-b*) que apresentaram severidades de 20% e 13%, respectivamente.

Figura 4 - Severidade (%) ao longo do tempo (dias) de linhagens contendo genes *Rpp*-piramidados (A), fontes de resistência (PI's, B), cultivares resistentes (C) e cultivares suscetíveis (D) de soja quanto a *Phakopsora pachyrhizi*



Nota: Linhas vermelhas representam a média para Linhagens (A), fontes de resistência (B), cultivares resistentes (C) e cultivares suscetíveis (D).

Fonte: Autoria própria (2021)

As fontes de resistência (Figura 4B) apresentaram baixas severidades, não ultrapassando 30% (PI459025A, *Rpp4*) da área foliar infectada. As cultivares resistentes (Figura 4C), apresentaram severidades variando de 0,73% (BRS531, *Rpp1-b* e BRS539, *Rpp1-b* + *Rpp4*) ao máximo de 25% (TMG7062, SI) da área foliar infectada. Já as cultivares suscetíveis, apresentaram as maiores severidades (Figura 4D), atingindo 84% (BMX Raio IPRO) de área foliar infectada. Esses resultados corroboram com Kato e Soares (2021), que relataram menores severidades nas

linhagens com genes *Rpp* piramidados quando comparados as fontes de resistência e a cultivares suscetíveis a *P. pachyrhizi*, na ausência de aplicação de fungicida.

A contenção do avanço da doença proporcionado pela resistência genética é de suma importância para controle de *P. pachyrhizi*. Genótipos com baixas severidades apresentam poucas lesões e boa sanidade foliar, acarretando em menores perdas de área fotossintética, resultando em menores perdas no rendimento de grãos (DALLA LANA *et al.*, 2015; FRANCESCHI *et al.*, 2020).

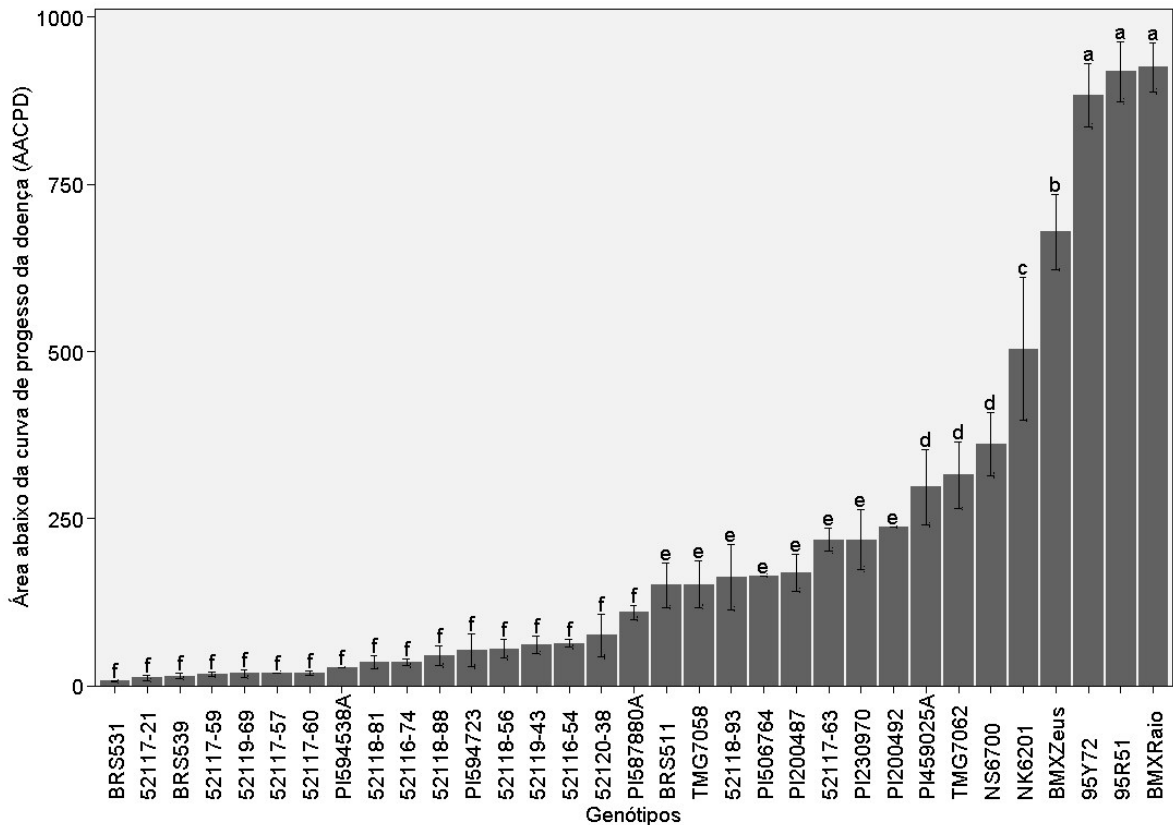
A área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) é calculada com base na severidade da doença ao longo do tempo. A AACPD, tem a capacidade de representar a evolução da doença, além de considerar o estresse sofrido pela cultura nas distintas fases de desenvolvimento (YNAIATY; YUSNAUAM, 2016). Desta forma, quanto maior for o valor da AACPD, maior é o dano causado pela doença na cultura.

As maiores AACPD's foram obtidas pelas cultivares BMX Raio IPRO, 95R51 e 95Y72 com valores médios de 925,16, 918,17 e 883,17 respectivamente (Figura 5). AACPD's elevadas indicam aumentos na gravidade da doença no decorrer do tempo. *P. pachyrhizi*, provoca redução na área fotossinteticamente ativa, além de causar queda prematura de folhas, prejudicando o acúmulo de fotoassimilados e consequentemente refletindo negativamente no rendimento de grãos (GODOY *et al.*, 2016). Vários trabalhos apontam redução no rendimento de grãos perante elevados AACPD's ocasionados por *P. pachyrhizi* (SILVA *et al.*, 2015; VIEGAS NETO *et al.*, 2021).

As linhagens com genes *Rpp* piramidados com as menores AACPD's foram 52117-21 (*Rpp2* + *Rpp1-b*, 12,13), 52117-59 (*Rpp2* + *Rpp1-b*, 17,73), 52119-69 (*Rpp1-b* + *Rpp1-b*, 18,67), 52117-57 (*Rpp2* + *Rpp1-b*, 19,60), 52117-60 (*Rpp2* + *Rpp4*, 19,60), 52118-81 (*Rpp1-b* + *Rpp1-b*, 35,00), 52116-74 (*Rpp2* + *Rpp1-b*, 35,93), 52118-88 (*Rpp1-b* + *Rpp1-b*, 45,03), 52118-56 (*Rpp1-b* + *Rpp1-b*, 55,53), 52119-43 (*Rpp1-b* + *Rpp1-b*, 61,60), 52116-54 (*Rpp2* + *Rpp1-b*, 63,93) e 52120-38 (*Rpp1-b* + *Rpp1-b*, 75,83). Avaliando uma linhagem com três genes *Rpp* piramidados, Kato, Soares e Yamanaka (2017), observaram que a área abaixo da curva de progresso para *P. pachyrhizi*, foi significativamente menor na linhagem quando comparado a cultivar suscetível BRS184 e as fontes de resistência PI230970 (*Rpp2*), PI459025 (*Rpp4*) e PI200526 (*Rpp5*). Kato e Soares (2021) também observaram menor AACPD na linhagem piramidada N°6-12-4 (*Rpp2* + *Rpp4* + *Rpp5*) comparativamente as fontes de resistência PI230970 (*Rpp2*), PI459025 (*Rpp4*) e Shiranui (*Rpp5*) e a cultivar

suscetível BRS184 quando submetidos a *P. pachyrhizi*. Estes resultados sugerem que a piramidação de genes diminui significativamente o progresso da doença a campo, reduzindo assim os danos causados por *P. pachyrhizi*.

Figura 5 – Barplots com teste de agrupamento de médias de ScottKnott ($P < 0,05$), para área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) de linhagens, fontes de resistência (PI's), cultivares resistentes e suscetíveis



Nota: Médias seguidas de mesma letra na barra não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade de erro pelo teste de Skott Knott.

Fonte: Autoria própria (2021)

As cultivares comerciais resistentes BRS531 (*Rpp1-b*, 7,46), BRS539 (*Rpp1-b* + *Rpp4*, 14,93) e as fontes de resistência PI594538A (*Rpp1-b*, 28,00), PI594723 (*Rpp1-b*, 53,43), PI587880A (*Rpp1-b*, 109,67), também apresentaram valores inferiores de AACPD, não diferindo das linhagens com genes *Rpp* piramidados. Fontes de resistência e genótipos portadores do gene *Rpp1-b*, tem apresentado baixos valores de AACPD em vários estudos (PHAM *et al.*, 2010; MILES *et al.*, 2011; KATO; SOARES; YAMANAKA, 2017), sendo fontes potenciais para resistência genética contra *P. pachyrhizi*. As demais fontes de resistência PI506764 (*Rpp5*, *Rpp3*), PI200487 (*Rpp5*), PI230970 (*Rpp2*), PI200492 (*Rpp1*) e PI459025A (*Rpp4*) apresentaram valores médios de AACPD de 164,5, 169,2, 218,2, 238,0 e 297,5, respectivamente. Miles *et al.* (2011) avaliando 34 acessos de soja quanto a resistência

a ferrugem asiática, observaram que as introduções de plantas PI230970 (*Rpp2*), PI459025A (*Rpp4*) e PI594538A (*Rpp1-b*) apresentaram as menores áreas abaixo da curva de progresso de ferrugem comparativamente a variedade suscetível “Willians”.

De modo geral, as linhagens portadoras de genes *Rpp* piramidados bem como as fontes de resistência (PI's), apresentaram AACPD's menores quando comparados as cultivares suscetíveis, as quais não possuem genes de resistência. Resultados semelhantes relatados nos trabalhos de Kato, Soares e Yamanaka (2017) e Kato e Soares (2021) que avaliaram efeito da piramidação de genes sobre o progresso da doença em condições de campo, e concluíram que linhagens com genes piramidados e as fontes de resistência (PI's) apresentam AACPD's menores quando comparadas a cultivares suscetíveis.

4.3 Caracterização morfológica foliar

A análise de variância (ANOVA) para os caracteres morfológicos espessura de limbo foliar (ELF), espessura da epiderme superior (EES), espessura da epiderme inferior (EEI), espessura do parênquima paliçádico (EPP) espessura do parênquima lacunoso (EPL) são apresentados na Tabela 6. A herdabilidade foi elevada para todos os caracteres morfológicos variando de 0,96 a 0,99. A maior proporção da variação foi devido a efeitos genotípicos.

Tabela 6 - Análise de componentes de variância de linhagens com genes *Rpp*-piramidados, fontes de resistência (PI's) e testemunhas suscetíveis e resistentes para os caracteres espessura de limbo foliar (ELF), espessura do parênquima paliçádico (EPP) e lacunoso (EPL), espessura da epiderme inferior (EEI) e superior (EES) e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD)

Estatística	AACPD	ELF	EES	EPP	EPL	EEI
Herdabilidade	0.98	0.99	0.96	0.98	0.99	0.96
Variância Genotípica	71713.25**	152.31**	0.40**	63.23**	65.54**	0.45**
Variância Residual	3592.34	6.92	0.04	4.27	2.90	0.06
Média	213.03	62.74	1.49	31.82	27.33	1.49
CV (%)	28.13	4.19	14.14	6.49	6.23	15.90

Nota: ** significativo a 5 de probabilidade de erro; CV: coeficiente de variação.

Fonte: Autoria própria (2021)

As fotografias das estruturas morfológicas internas da folha das linhagens com genes *Rpp* piramidados, PI's e cultivares suscetíveis e resistentes foram obtidas através de microscópio eletrônico de varredura (MEV) (Apêndice A). É possível observar grande variabilidade das estruturas morfológicas entre as linhagens, PI's e cultivares (Apêndice A). Alguns genótipos apresentam espaços intercelulares maiores

entre as estruturas morfológicas, como é o caso das linhagens 52118-56 (*Rpp1-b + Rpp1-b*) e 52118-81 (*Rpp1-b + Rpp1-b*) e da cultivar BRS539 (*Rpp1-b + Rpp4*).

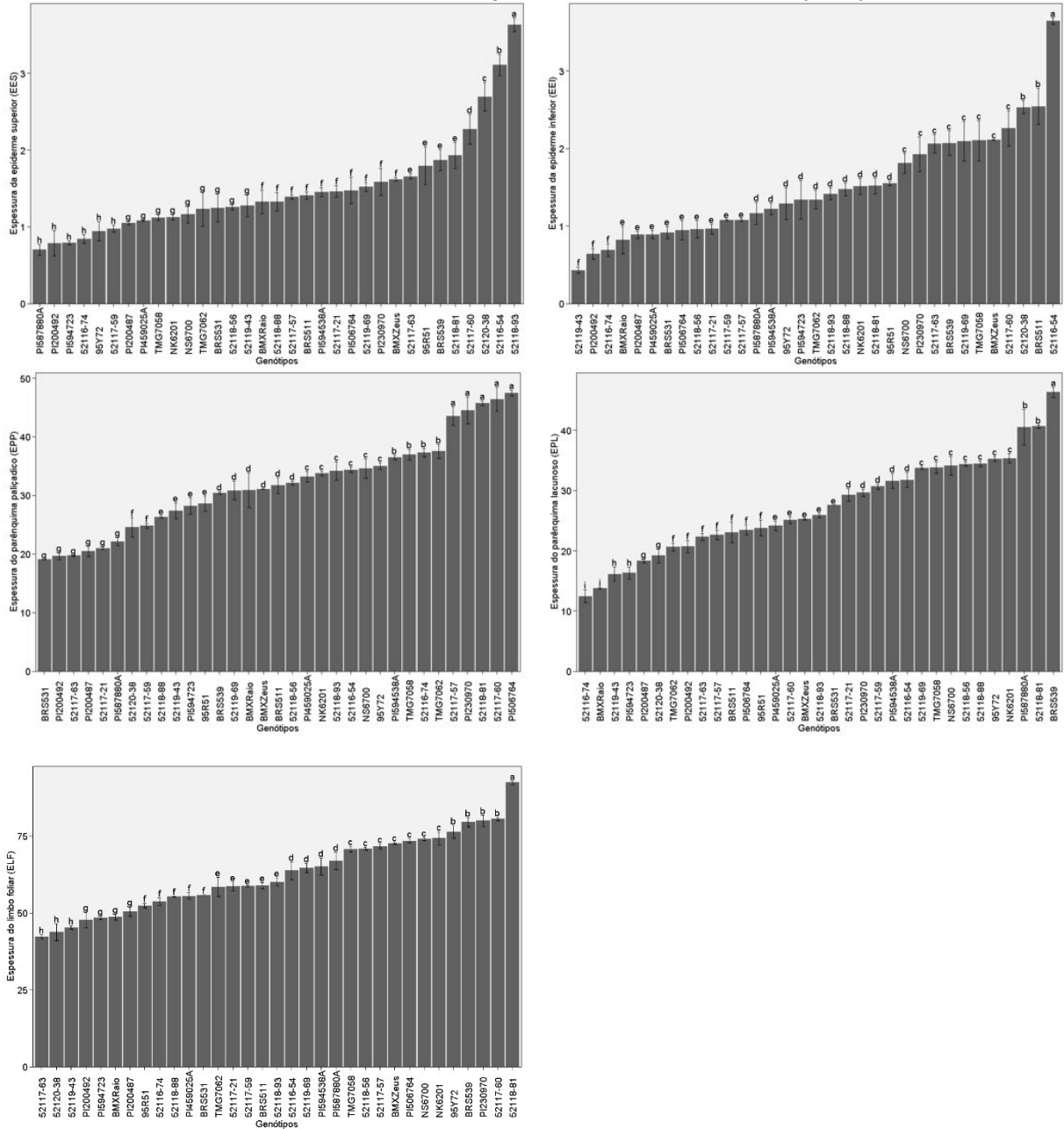
O sucesso da resistência de plantas a patógenos está relacionada a uma rede complexa de barreiras físicas (MIEDES *et al.*, 2014). Estruturas morfológicas como cutícula, epiderme e parede celular são as primeiras barreiras que os patógenos encontram ao tentar invadir os tecidos do hospedeiro (MUSSURY *et al.*, 2012). Estas estruturas são extremamente importantes, principalmente contra patógenos que penetram diretamente pela epiderme, como é o caso de *P. pachyrhizi* (SAITO *et al.*, 2021).

Para espessura de epiderme superior (EES, Figura 6) a linhagem 52118-93 (*Rpp1-b + Rpp1-b*, AR) obteve a maior espessura. As menores espessuras foram obtidas pelos genótipos PI587880A (*Rpp1-b*, AR), PI200492 (*Rpp1*, PR), PI594723 (*Rpp1-b*, AR), 52116-74 (*Rpp2 + Rpp1-b*, AR), 95Y72 (S) e 52117-59 (*Rpp2 + Rpp1-b*, AR). Já para epiderme inferior (EEI), a maior espessura foi obtida pela linhagem 52116-54 (*Rpp2 + Rpp1-b*, AR) que diferiu estatisticamente das demais (Figura 6). Esta foi seguida pela cultivar BRS511 (*Rpp5*, R) e pela linhagem 52120-38 (*Rpp1-b + Rpp1-b*, AR). As menores EEI foram obtidas pelos genótipos 52119-43 (*Rpp1-b + Rpp1-b*, AR), PI200492 (*Rpp1*, PR) e 52116-74 (*Rpp2 + Rpp1-b*, AR).

Segundo Mussury *et al.* (2012), o processo de infecção de *P. pachyrhizi* inicia-se pela epiderme, e desta forma, epidermes mais espessas poderiam apresentar alguma interferência na penetração do fungo nos tecidos foliares. Contudo, os resultados obtidos no presente estudo não apresentaram um “padrão”, sendo que linhagens classificadas como AR apresentaram as menores espessuras, juntamente com genótipos classificados em PR e S. Portanto, os resultados encontrados neste estudo apontam ausência de relação destas características com a resistência a *P. pachyrhizi* (ver Figura 8). Estudos em interações planta-patógeno relatam que as células epidérmicas não estão envolvidas no processo de defesa, como é o caso da interação *P. euvtis-videira* (RASEIRA *et al.*, 2019), *P. pachyrhizi*-soja (EDWARDS; BONDE, 2011).

Os parênquimas paliçádico e lacunoso são estruturas morfológicas onde usualmente os fungos causadores de ferrugem se desenvolvem, especialmente em seus espaços intercelulares (NAVARRO *et al.*, 2019). Desta forma, o aumento da espessura e/ou número de camadas parenquimáticas, pode interferir na colonização do fungo nos tecidos, limitando seu desenvolvimento (MUSSURY *et al.*, 2012).

Figura 6 - Barplots com teste de agrupamento de médias (Skott Knott, $P < 0,05$) de linhagens com genes *Rpp*-piramidados, fontes de resistência (*PI*'s) e testemunhas resistentes e suscetíveis de soja para os caracteres morfológicos: espessura da epiderme superior (EES, μm), espessura da epiderme inferior (EEL, μm), espessura do parênquima paliçádico (EPP, μm), espessura do parênquima lacunoso (EPL, μm) e espessura do limbo foliar (ELF, μm) mensurados em microscópio eletrônico de varredura (MEV)



Nota: Médias seguidas de mesma letra na barra não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade de erro pelo teste de Skott Knott.

Fonte: Autoria própria (2021)

No parênquima paliçádico (EPP) os genótipos que apresentaram as maiores espessuras foram PI506764 (*Rpp5*, 3, PR), 52117-60 (*Rpp2* + *Rpp4*, AR), 52118-81 (*Rpp1-b* + *Rpp1-b*, AR), PI230970 (*Rpp2*, R) e 52117-57 (*Rpp2* + *Rpp1-b*, AR). Já as menores espessuras foram observadas em BRS531 (*Rpp1-b*, AR), PI200492 (*Rpp1*,

PR), 52117-63 (*Rpp2 + Rpp4*, R), PI200487 (*Rpp5*, R) e PI587880A (*Rpp1-b*, AR). Já para o parênquima lacunoso (EPL), a maior espessura foi obtida pela cultivar BRS539 (*Rpp1-b + Rpp4*, AR), que diferiu estatisticamente dos demais genótipos. Já as menores espessuras foram observadas em 52116-74 (*Rpp2 + Rpp1-b*, AR) e BMX Raio IPRO (S). Para espessura do limbo foliar (ELF), a linhagem 52118-81 (*Rpp1-b + Rpp1-b*, AR) apresentou o maior ELF. Já as linhagens 52117-63 (*Rpp2 + Rpp4*, R), 52120-38 (*Rpp1-b + Rpp1-b*, AR) e 52119-43 (*Rpp1-b + Rpp1-b*, AR) apresentaram as menores ELF.

Vale destacar, que os resultados obtidos no presente estudo para as variáveis EPL, EPP e ELF, foram semelhantes aos obtidos por EES e EEI, não apresentando um “padrão”, sendo que, linhagens classificadas em AR apresentaram as maiores e menores estruturas morfológicas, juntamente com cultivares que apresentaram classificação S. Esses resultados sugerem que, as características morfológicas avaliadas não apresentam relação com a resistência de soja a *P. pachyrhizi*.

A linhagem 52116-57 (*Rpp2 + Rpp1-b*, IM) apresentou ausência de sintomas (NL = 0). A ausência de sintomas/lesões está atrelada a ausência de penetração e colonização do patógeno nos tecidos do hospedeiro. Estes resultados corroboram com Saito *et al.* (2021) que avaliando a influência da aplicação de nanofibras de celulose (CNF) em folhas de soja, observou redução significativa na infecção e na formação de estruturas (tubo germinativo e apressório) de *P. pachyrhizi* e consequentemente redução no número de lesões.

4.4 Análise de compostos fenólicos em CLAE

A análise dos componentes de variância para compostos fenólicos é apresentada na tabela 7. A herdabilidade dos compostos avaliados daidzina (DAI), genistina (GEI), daidzeína (DAD), gliciteína (GLY), genisteína (GEA) e somatório de compostos (CFT) foi elevada (0,99). Além disso, a maior parte da variação foi devido ao efeito genotípico.

Na figura 7, é apresentado um exemplo de cromatograma, obtido pela amostra da cultivar BMX Raio IPRO, que evidencia os compostos fenólicos presentes na amostra. Foram identificados os compostos fenólicos Genistina, Gliciteína, Daidzeína, Daidzina e Genisteína em todos os genótipos avaliados.

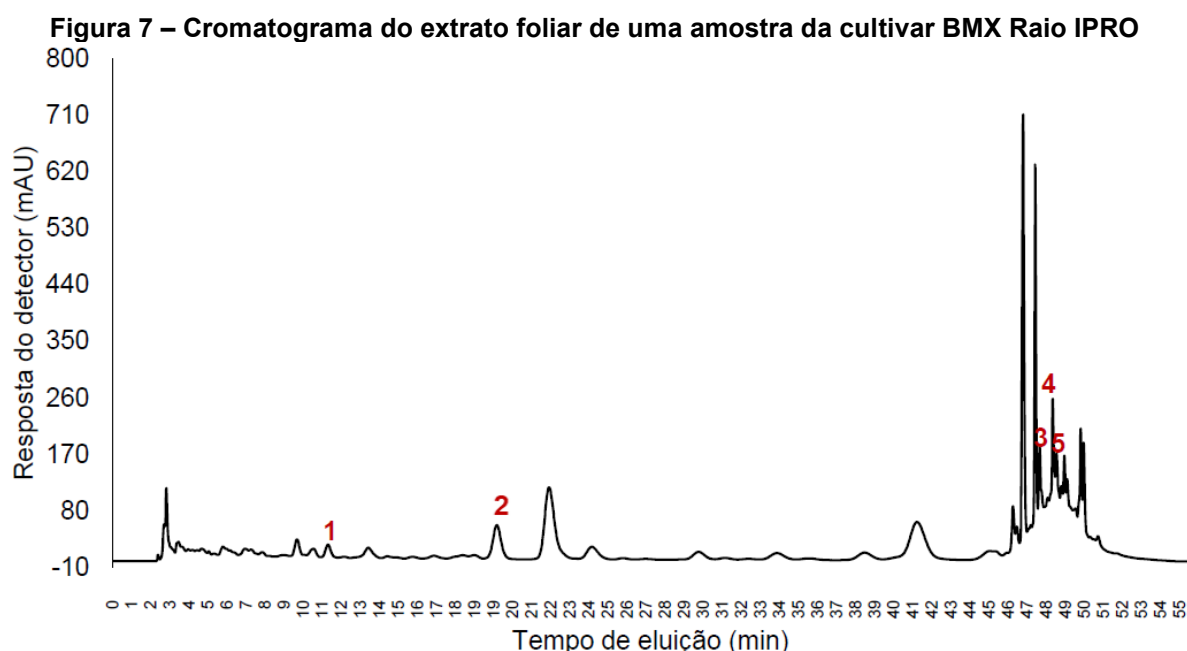
Tabela 7 - Análise de componentes de variância de linhagens com genes Rpp-piramidados, fontes de resistência (PI's) e testemunhas suscetíveis e resistentes para os caracteres Daizina (DAI), Genistina (GEI), Daidzeína (DAD), Gliciteína (GLY), Genisteína (GEA) e somatório de compostos (CFT)

Estatística	DAI	GEI	DAD	GLY	GEA	CFT
Herdabilidade	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
Variância genotípica	902,06**	401,33**	202,63**	179,08**	129,59**	3127,61**
Variância Residual	12,07	3,06	1,10	1,08	1,18	19,77
Média	38,35	42,39	16,77	15,50	11,45	124,49
CV (%)	9,06	4,13	6,25	6,72	9,50	3,57

Nota: CV: Coeficiente de variação; **, significativo a 5% de probabilidade de erro.

Fonte: Autoria própria (2021)

Este resultado corrobora ao relatado por Oliveira *et al.* (2018) que encontraram concentrações destes compostos fenólicos em plantas de soja quando submetidas a infecção por *P. pachyrhizi*, evidenciando que a infecção pelo fungo induz a síntese de compostos fenólicos em plantas de soja. Silva *et al.* (2021) também relatam em seus estudos uma ampla gama de compostos fenólicos, especialmente flavonóides e isoflavonóides produzidos em resposta a infecção por *P. pachyrhizi*. Flavonóides e isoflavonóides são conhecidos como fitoalexinas, compostos antimicrobianos de baixo peso molecular que são produzidos em resposta a infecção (SILVA *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2021).



Nota: (1) Daidzina, TR=11,03; (2) Genistina, TR=19,65; (3) Daidzeína, TR=47,73; (4) Gliciteína, TR=48,48; (5) Genisteína, TR=48,64.

Fonte: Autoria própria (2021)

Para Genistina (GEI), as maiores concentrações foram observadas nas fontes de resistência PI200492 (*Rpp1*, PR) e PI587880A (*Rpp1-b*, AR) (Figura 8). As

menores concentrações foram observadas nas PI's PI506764 (*Rpp5*, 3, PR) e PI200487 (*Rpp5*, R) e na linhagem 52118-81 (*Rpp1-b* + *Rpp1-b*, AR). Não foi identificado GEA na linhagem 52117-60 (*Rpp2* + *Rpp4*, AR).

Para Gliciteína (GLY) a maior concentração foi obtida pela cultivar BMX Raio IPRO (S) (Figura 8). As menores concentrações foram apresentadas pelas PI459025A (*Rpp4*, S) e 52116-74 (*Rpp2* + *Rpp1-b*, AR). As PI's PI594538A (*Rpp1-b*, AR) e PI594723 (*Rpp1-b*, AR), não apresentaram quantidades significativas para quantificação em CLAE, portanto, estas produzem GLY, porém em baixíssimas concentrações.

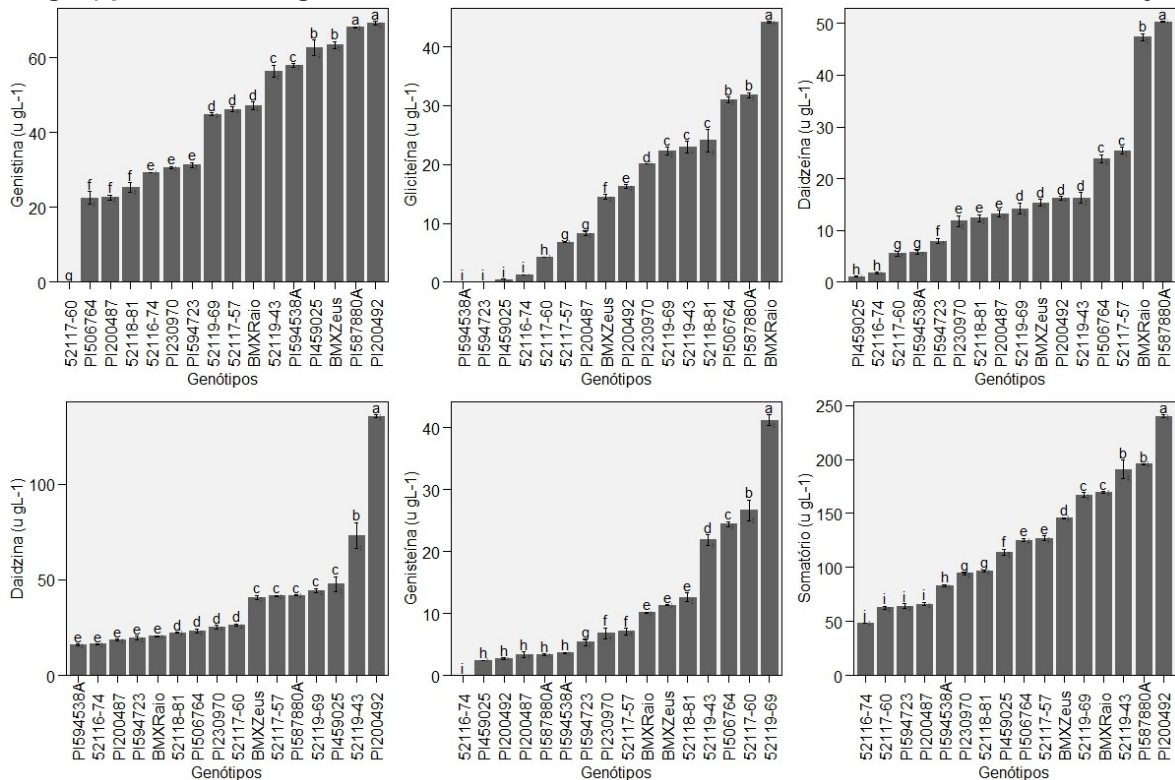
A PI587880A (*Rpp1-b*, AR) apresentou maior concentração de Daidzeína (DAI) dentre as cultivares avaliadas (Figura 8). Esta foi seguida pela cultivar BMX Raio IPRO (S). As menores concentrações deste composto foram obtidas pelas PI459025A (*Rpp4*, S) e 52116-74 (*Rpp2* + *Rpp1-b*, AR). Para Daidzina (DAD) a maior concentração foi encontrada na PI200492 (*Rpp1*, PR) (Figura 8). Já as menores foram observadas nas PI594538A (*Rpp1-b*, AR), 52116-74 (*Rpp2* + *Rpp1-b*, AR), PI200487 (*Rpp5*, R), PI594723 (*Rpp1-b*, AR) e BMX Raio IPRO (S). A linhagem 52119-69 (*Rpp1-b* + *Rpp1-b*, AR) apresentou maior concentração de Genisteína (GEA) dentre os genótipos avaliados. Não foi possível quantificar GEI na linhagem 52116-74 (*Rpp2* + *Rpp1-b*, AR), este foi apenas identificado, apontando que a planta produz o composto, porém em baixíssimas concentrações (Figura 8).

No somatório dos compostos estudados, as maiores concentrações de fenólicos foram obtidas pela PI200492 (*Rpp1*, PR). Já as linhagens 52116-74 (*Rpp2* + *Rpp1-b*, AR), 52117-60 (*Rpp2* + *Rpp4*) e as PI's PI594723 (*Rpp1-b*, AR), PI200487 (*Rpp5*, R) apresentam as menores concentrações do somatório de compostos fenólicos avaliados (Figura 8).

Apesar de serem relatadas na literatura como atuantes no processo de defesa da soja contra *P. pachyrhizi* (OLIVEIRA *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2021), os resultados encontrados no presente estudo sugerem que os compostos fenólicos avaliados não apresentam relação direta com a resistência dos genótipos de soja a *P. pachyrhizi*. Vale ressaltar, que a coleta para extração dos compostos fenólicos ocorreu quatro semanas após a primeira detecção do fungo na área, coincidindo com o estágio R5 da cultura da soja. Oliveira *et al.* (2018), avaliando a concentração de vários compostos em horas após a infecção, observou que o maior aumento é observado na última avaliação realizada pelos autores (6 dias após

inoculação). Nos trabalhos de Lygin *et al.* (2009), os autores observaram que as concentrações dos compostos genisteína, daidzeína e glicolína, foram maiores três semanas após a inoculação comparativamente a primeira semana após a inoculação tanto para genótipos resistentes quanto suscetíveis.

Figura 8 – Barplot com teste de agrupamento de médias (Skott Knott) para os compostos fenólicos Genistina, Gliciteína, Daidzeína, Daidzina, Genisteína e somatório de compostos (u GL⁻¹) para seis linhagens, oito fontes de resistência e duas cultivares suscetíveis de soja



Nota: Médias seguidas de mesma letra na barra não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade de erro pelo teste de Skott Knott.

Fonte: Autoria própria (2021)

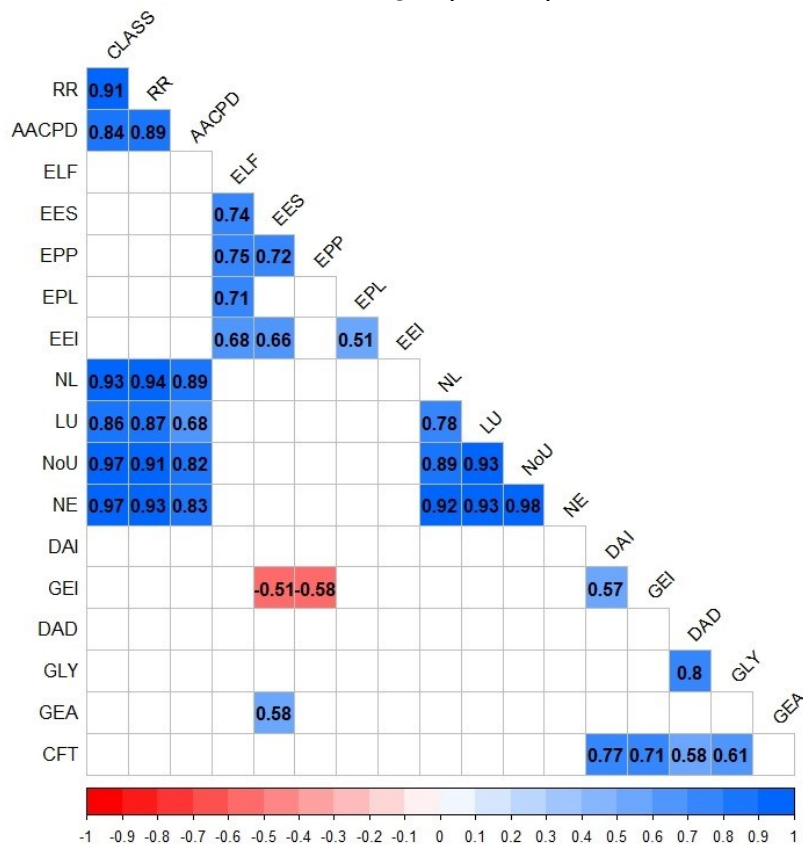
Portanto, para o momento em que foram avaliados (estádio R5), os genótipos suscetíveis (que não possuem genes *Rpp*), apresentaram produção de compostos na mesma proporção que genótipos portadores de genes simples ou piramidados de resistência avaliados no presente estudo. Alguns estudos também observaram este comportamento para alguns compostos fenólicos. Lygin *et al.* (2009) avaliando genótipos suscetíveis e resistentes quanto as concentrações de Daidzeína e Genisteína, relataram em seus estudos que ambos os genótipos (susceptível e resistente) apresentam concentrações semelhantes desses compostos. Contudo, os autores encontraram concentrações maiores de Glicolína nos genótipos resistentes, sugerindo que esta fitoalexina possa estar envolvida no processo de defesa da soja

contra *P. pachyrhizi*. Desta forma, os genes *Rpp*, provavelmente estão ligados a outros mecanismos bioquímicos de defesa.

4.5 Correlação entre caracteres

A análise de correlação, permite identificar o grau de associação entre características de interesse. Identificar características associadas aos caracteres resistência da soja a *P. pachyrhizi*, podem auxiliar a elucidar quais mecanismos estão atuando no processo de defesa. Foi observada associação positiva significativa entre todos os caracteres de resistência NL ($r = 0,93^{***}$), NE ($r = 0,97^{***}$), NoU ($r = 0,97^{***}$) LU ($r = 0,86^{***}$) e classificação dos genótipos (CLASS) (Figura 9).

Figura 9 – Correlação de Pearson entre os caracteres morfológicos: espessura de limbo foliar (ELF), espessura da epiderme superior (EES) e inferior (EEI), parênquima paliçádico (EPP) e lacunoso (EPL); bioquímicos: Daizina (DAI), Genistina (GEI), Daidzeína (DAD), Gliciteína (GLY), Genisteína (GEA) e somatório (CFT); caracteres de resistência: nível de esporulação (NE), número de lesão (NL), frequência de urédia por lesão (LU), número de lesão com urédia (NoU), área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), reação de resistência (RR) e classificação (CLASS)



Fonte: Autoria própria (2021)

Associações positivas de alta magnitude também foram observadas entre os caracteres de resistência e AACPD ($r = 0,87^{***}$; $0,68^{**}$; $0,82^{***}$; e $0,83^{***}$ para NL, LU,

NoU e NE x AACPD, respectivamente) (Figura 9). Estes resultados sugerem que todos os caracteres estudados estão envolvidos na progressão da doença a campo. Desta forma, a gravidade da doença está intimamente relacionada a aumentos no número de lesões (NL), na produção de urédias (NoU), e na produção de uredósporos (NE).

Os caracteres morfológicos e bioquímicos apresentaram ausência de correlação com os caracteres de resistência avaliados (Figura 9). Este resultado sugere que os caracteres morfológicos e bioquímicos avaliados no presente estudo, não apresentam relação com os genes *Rpp* simples e/ou piramidados, e não contribuem para resistência da soja a *P. pachyrhizi*. Neste sentido, mais estudos são necessários para elucidar se outros mecanismos estruturais e bioquímicos estão envolvidos no processo de defesa da soja a *P. pachyrhizi*.

5 CONCLUSÃO

Todas as linhagens com genes *Rpp* piramidados apresentaram níveis mais elevados de resistência, com redução significativa no nível de esporulação (NE), número de urédia por lesão (NoU) e na frequência de lesão com urédia (%LU), apresentando classificação “altamente resistente”. A linhagem 52117-57 (*Rpp2* + *Rpp1-b*) apresentou imunidade a *P. pachyrhizi* em condições de campo.

As linhagens portadoras de genes *Rpp* piramidados, as fontes de resistência (PI's) e as cultivares resistentes apresentaram menores curvas abaixo de progresso da doença (AACPD) comparativamente as cultivares suscetíveis, confirmando a eficiência dos genes de resistência em conter o avanço da doença.

As características morfológicas espessura da epiderme superior (EES) e inferior (EEI), espessura do parênquima paliçádico (EPP) e lacunoso (EPL) e espessura do limbo foliar (ELF) não apresentaram relação com a resistência da soja a *P. pachyrhizi*.

No período de tempo avaliado no presente estudo, os compostos fenólicos do grupo dos isoflavonóides daidzina, daidzeína, gliciteína, genistina e genisteína não apresentaram relação com a resistência da soja a *P. pachyrhizi*.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5. ed. Florida: Elsevier academic press, 2004.
- AGROSTAT. MAPA Indicadores - Estatísticas de comércio exterior do agronegócio brasileiro. 2021. **Ministério da agricultura pecuária e abastecimento**. Disponível em: <https://indicadores.agricultura.gov.br/agrostat/index.htm>. Acesso em: 7 jan. 2022.
- AKAMATSU, H.; *et al.* Pathogenic diversity of soybean rust in Argentina, Brazil, and Paraguay. **Journal of General Plant Pathology**, v. 79, n. 1, p. 28–40, 1 jan. 2013. <https://doi.org/10.1007/s10327-012-0421-7>.
- ALVARES, C. A.; *et al.* Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711–728, 1 dez. 2013. <https://doi.org/10.1127/0941-2948/2013/0507>.
- BARROS, F.; *et al.* Induction of resistance in plants against phytopathogens. **Bioscience Journal**, v. 26, p. 231–239, 1 mar. 2010.
- BETTIOL, W.; TRATCH, R.; GALVAO, J. a. H. Controle de doenças de plantas com biofertilizantes. 1998. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/13000>. Acesso em: 7 jan. 2022.
- FIGUEROA, Ó. B. Resistencia de plantas a patógenos: una revisión sobre los conceptos de resistencia vertical y horizontal. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 52, n. 3, p. 245–255, 1 jul. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2020.04.006>.
- CAMARGO, L. E. A. Controle genético. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 5. ed. Ouro Fino: Agronomica Ceres, 2018. v. 1, p. 229–238.
- CAVATTE, P. C.; CASTRO, L. H. S.; MACHADO, L. de S. Fisionômica e a Resistência de plantas a estresses bióticos. **Tópicos especiais em genética e melhoramento II**. 2. ed. Alegre: CAUFES, 2018. p. 64–90.
- CHAKRABORTY, N.; *et al.* Mapping and Confirmation of a New Allele at Rpp1 from Soybean PI 594538A Conferring RB Lesion–Type Resistance to Soybean Rust. **Crop Science**, v. 49, n. 3, p. 783–790, 2009. <https://doi.org/10.2135/cropsci2008.06.0335>.
- CHANDER, S.; *et al.* Prospects for Durable Resistance Against an Old Soybean Enemy: A Four-Decade Journey from Rpp1 (Resistance to *Phakopsora pachyrhizi*) to Rpp7. **Agronomy**, v. 9, n. 7, p. 348, jul. 2019. <https://doi.org/10.3390/agronomy9070348>.
- CHILDS, S. P.; BUCK, J. W.; LI, Z. Breeding soybeans with resistance to soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*). **Plant Breeding**, v. 137, n. 3, p. 250–261, 2018. <https://doi.org/10.1111/pbr.12595>.
- CHILDS, S. P.; *et al.* Discovery of a seventh Rpp soybean rust resistance locus in soybean accession PI 605823. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 131, n. 1, p. 27–41, 1 jan. 2018. <https://doi.org/10.1007/s00122-017-2983-4>.

DALLA LANA, F.; *et al.* Meta-Analysis of the Relationship Between Crop Yield and Soybean Rust Severity. **Phytopathology**®, v. 105, n. 3, p. 307–315, 1 mar. 2015. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-14-0157-R>.

DALLAGNOL, L. J.; ARAÚJO FILHO, J. Capítulo 1: Uma visão geral da resistência genética da planta a microorganismos. **Resistência genética de plantas a patógenos**. Pelotas: UFPel, 2018. p. 13–47.

DARBEN, L. M.; *et al.* Characterization of genetic diversity and pathogenicity of *Phakopsora pachyrhizi* mono-uredinial isolates collected in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 156, n. 2, p. 355–372, 1 fev. 2020. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01872-2>.

EDWARDS, H. H.; BONDE, M. R. Penetration and Establishment of *Phakopsora pachyrhizi* in Soybean Leaves as Observed by Transmission Electron Microscopy. **Phytopathology**®, v. 101, n. 7, p. 894–900, jul. 2011. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-10-0248>.

FEHR, W.; CAVINESS, C. Stages of soybean development. **Iowa State University**, Special report. 1977. Disponível em: <https://dr.lib.iastate.edu/entities/publication/58c89bfe-844d-42b6-8b6c-2c6082595ba3>. Acesso em: 7 jan. 2022.

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A.; Package 'ExpDes. pt'. 2021.

FIALLOS, F. R. G. A ferrugem asiática da soja causada por *Phakopsora pachyrhizi* Sydow. **Revista Ciencia y Tecnología**, v. 4, n. 2, p. 45–60, 2011.

FRANCESCHI, V. T.; *et al.* A new standard area diagram set for assessment of severity of soybean rust improves accuracy of estimates and optimizes resource use. **Plant Pathology**, v. 69, n. 3, p. 495–505, 2020. <https://doi.org/10.1111/ppa.13148>.

GARCIA, A.; *et al.* Molecular mapping of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) resistance genes: discovery of a novel locus and alleles. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 117, n. 4, p. 545, 28 maio 2008. <https://doi.org/10.1007/s00122-008-0798-z>.

GARCÍA-RODRÍGUEZ, J. C.; *et al.* Pathogenic characteristics of the Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Mexico. **Revista mexicana de fitopatología**, v. 35, n. 2, p. 338–349, 2017. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1701-5>.

GODOY, C. V.; *et al.* Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2013/14: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. **Embrapa Soja-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2014.

GODOY, C. V.; *et al.* Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2017/2018: Resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. **Londrina, PR: Embrapa Soja. Retrieved on May**, v. 10, p. 2018, 2018.

GODOY, C. V.; *et al.* Asian soybean rust in Brazil: past, present, and future. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, p. 407–421, maio 2016. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2016000500002>.

GOELLNER, K.; *et al.* *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust. **Molecular plant pathology**, v. 11, n. 2, p. 169–177, 2010.

HARTWIG, E. E.; BROMFIELD, K. R. Relationships Among Three Genes Conferring Specific Resistance to Rust in Soybeans1. **Crop Science**, v. 23, n. 2, p. crops1983.0011183X002300020012x, 1983a. <https://doi.org/10.2135/cropsci1983.0011183X002300020012x>.

HARTWIG, E. E. Identification of a Fourth Major Gene Conferring Resistance to Soybean Rust1. **Crop Science**, v. 26, n. 6, p. crops1986.0011183X002600060010x, 1986. <https://doi.org/10.2135/cropsci1986.0011183X002600060010x>.

HENNINGS, P. Some new Japanese Uredinae, IV. **Hedwigia**, v. 42, n. Beiblatt, p. 107–108, 1903.

HIRAKURI, M. H.; LAZZAROTTO, J. J. O agronegócio da soja nos contextos mundial e brasileiro. p. 37, [s. d]. .

HOSSAIN, M. M.; *et al.* Molecular mapping of Asian soybean rust resistance in soybean landraces PI 594767A, PI 587905 and PI 416764. **Plant Pathology**, v. 64, n. 1, p. 147–156, 2015. <https://doi.org/10.1111/ppa.12226>.

HYTEN, D. L.; *et al.* Map Location of the Rpp1 Locus That Confers Resistance to Soybean Rust in Soybean. **Crop Science**, v. 47, n. 2, p. 837–838, 2007. <https://doi.org/10.2135/cropsci2006.07.0484>.

HYTEN, D. L.; *et al.* Bulk Segregant Analysis Using the GoldenGate Assay to Locate the Rpp3 Locus that Confers Resistance to Soybean Rust in Soybean. **Crop Science**, v. 49, n. 1, p. 265–271, 2009. <https://doi.org/10.2135/cropsci2008.08.0511>.

INAYATI, A.; YUSNAWAN, E. Characterization of soybean genotypes for Asian soybean rust reaction under screen house condition. **Biodiversitas Journal of Biological Diversity**, v. 17, n. 2, 26 jul. 2016. DOI [10.13057/biodiv/d170231](https://doi.org/10.13057/biodiv/d170231). Disponível em: <https://www.smujo.id/biodiv/article/view/334>. Acesso em: 10 jan. 2022.

ISHIWATA, Y. I.; FURUYA, J. Evaluating the Contribution of Soybean Rust-Resistant Cultivars to Soybean Production and the Soybean Market in Brazil: A Supply and Demand Model Analysis. **Sustainability**, v. 12, n. 4, p. 1422, jan. 2020. <https://doi.org/10.3390/su12041422>.

KASHIWA, T.; MURAKI, Y.; YAMANAKA, N. Near-isogenic soybean lines carrying Asian soybean rust resistance genes for practical pathogenicity validation. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 13270, 6 ago. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70188-7>.

KATO, M.; SOARES, R. M.; YAMANAKA, N. Synergetic effect of gene-pyramiding on disease progress and uredial production of asian soybean rust in the field. 2017. **50° congresso brasileiro de fitopatologia** [...]. Uberlândia: [s. n.], 2017.

KATO, M.; SOARES, R. M. Field trials of a Rpp-pyramided line confirm the synergistic effect of multiple gene resistance to Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*). **Tropical Plant Pathology**, 13 out. 2021. DOI [10.1007/s40858-021-](https://doi.org/10.1007/s40858-021-)

00471-z. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40858-021-00471-z>. Acesso em: 7 jan. 2022.

LEMOS, N. G.; *et al.* Characterization of genes *Rpp2*, *Rpp4*, and *Rpp5* for resistance to soybean rust. **Euphytica**, v. 182, n. 1, p. 53, 3 jun. 2011. <https://doi.org/10.1007/s10681-011-0465-3>.

LI, S.; *et al.* Identification of a new soybean rust resistance gene in PI 567102B. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 125, n. 1, p. 133–142, 1 jun. 2012. <https://doi.org/10.1007/s00122-012-1821-y>.

LYGIN, A. V.; *et al.* The Importance of Phenolic Metabolism to Limit the Growth of *Phakopsora pachyrhizi*. **Phytopathology**®, v. 99, n. 12, p. 1412–1420, dez. 2009. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-12-1412>.

MADDOX, C. E.; LAUR, L. M.; TIAN, L. Antibacterial Activity of Phenolic Compounds Against the Phytopathogen *Xylella fastidiosa*. **Current Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 53, 8 out. 2009. <https://doi.org/10.1007/s00284-009-9501-0>.

MAGNANI, E. B. Z.; ALVES, E.; ARAÚJO, D. V. Eventos dos processos de pré-penetração, penetração e colonização de *Phakopsora pachyrhizi* em folíolos de soja. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. 156–160, abr. 2007. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582007000200011>.

MCLEAN, R. J.; BYTH, D. E. (Orgs.). Inheritance of resistance to soybean rust. **SOYBEAN RUST NEWSLETTER**, 1980.

MEIRA, D.; *et al.* G. Gene pyramiding combinations confer resistance of Asian soybean rust. **Crop Science**, v. n/a, n. n/a, [s. d.]. DOI: 10.1002/csc2.20700 Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/csc2.20700>. Acesso em: 7 jan. 2022.

MIEDES, E.; *et al.* The role of the secondary cell wall in plant resistance to pathogens. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 358, 2014. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00358>.

MILES, M. R.; *et al.* Characterizing Resistance to *Phakopsora pachyrhizi* in Soybean. **Plant Disease**, v. 95, n. 5, p. 577–581, 1 maio 2011. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-10-0450>.

MUNDT, C. C. Pyramiding for Resistance Durability: Theory and Practice. **Phytopathology**®, v. 108, n. 7, p. 792–802, 1 jul. 2018. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-17-0426-RVW>.

MURITHI, H. M.; *et al.* Diversity and distribution of pathotypes of the soybean rust fungus *Phakopsora pachyrhizi* in East Africa. **Plant Pathology**, v. 70, n. 3, p. 655–666, 2021. <https://doi.org/10.1111/ppa.13324>.

MUSSURY, R. M.; *et al.* Anatomia foliar de soja infectada por *Phakopsora pachyrhizi* H. Sydow & Sydow e tratadas com extratos vegetais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, p. 18–25, 2012. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722012000100004>.

MUSSURY, R. M.; *et al.* Morfoanatomia de *Glycine max* (L.) Merrill infectadas por *Phakopsora pachyrhizi* H. Sydow & Sydow. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S1, p. 459–461, 2007.

NAVARRO, B. L.; *et al.* Histopathology of *Phakopsora euvitidis* on *Vitis vinifera*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 154, n. 4, p. 1185–1193, 1 ago. 2019. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01719-w>.

NELSON, R.; *et al.* Navigating complexity to breed disease-resistant crops. **Nature Reviews Genetics**, v. 19, n. 1, p. 21–33, jan. 2018. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.82>.

NESRALLA, L. R. Transformação genética de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] para expressão do gene relacionado à calose, para potencial tolerância à ferrugem asiática. 22 fev. 2018. Disponível em: <https://repositorio.unb.br/handle/10482/32304>. Acesso em: 7 jan. 2022.

OLIVEIRA, T. B. de; *et al.* The number of measurements needed to obtain high reliability for traits related to enzymatic activities and photosynthetic compounds in soybean plants infected with *Phakopsora pachyrhizi*. **PLOS ONE**, v. 13, n. 2, p. e0192189, 13 fev. 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192189>.

OLIVEIRA, M. M. Caracteres morfoagronômicos e resistência parcial à ferrugem asiática em genótipos precoces de soja. 30 maio 2017. DOI [10.14393/ufu.di.2017.5](https://doi.org/10.14393/ufu.di.2017.5). Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/21160>. Acesso em: 7 jan. 2022.

OLIVOTO, T.; LÚCIO, A. D. metan: An R package for multi-environment trial analysis. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 11, n. 6, p. 783–789, 2020. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13384>.

PANDEY, A. K.; *et al.* Functional Analysis of the Asian Soybean Rust Resistance Pathway Mediated by Rpp2. **Molecular Plant-Microbe Interactions®**, v. 24, n. 2, p. 194–206, 1 fev. 2011. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-10-0187>.

PARHE, S. D.; *et al.* Marker-assisted pyramiding of four QTL/genes for Asian rust (*Phakopsora pachyrhizi*) resistance in soybean. **Journal of Crop Improvement**, v. 31, n. 5, p. 689–711, 3 set. 2017. <https://doi.org/10.1080/15427528.2017.1347593>.

PASCHOLATTI, S. F.; DALIO, R. J. D. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. **Manual de fitopatologia: Princípios e conceitos**. 5. ed. Ouro Fino: Agronomica Ceres, 2018. v. 1, p. 424–450.

PHAM, T. A.; *et al.* Evaluation of soybean for resistance to soybean rust in Vietnam. **Field Crops Research**, v. 117, n. 1, p. 131–138, 8 maio 2010. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2010.02.011>.

PIASECKA, A.; JEDRZEJCZAK-REY, N.; BEDNAREK, P. Secondary metabolites in plant innate immunity: conserved function of divergent chemicals. **New Phytologist**, v. 206, n. 3, p. 948–964, 2015. <https://doi.org/10.1111/nph.13325>.

PIEROZZI, P. H. B.; *et al.* New soybean (*Glycine max* Fabales, Fabaceae) sources of qualitative genetic resistance to Asian soybean rust caused by *Phakopsora*

- pachyrhizi* (Uredinales, Phakopsoraceae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 2, p. 505–511, 2008. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572008000300018>.
- PILET-NAYEL, M.-L.; *et al.* Quantitative Resistance to Plant Pathogens in Pyramiding Strategies for Durable Crop Protection. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1838, 2017. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01838>.
- PRETORIUS, Z. A.; KLOPPERS, F. J.; FREDERICK, R. D. First Report of Soybean Rust in South Africa. **Plant Disease**, v. 85, n. 12, p. 1288–1288, 1 dez. 2001. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.12.1288C>.
- R CORE DEVELOPMENT TEAM. **R studio**. Boston: [s. n.], 2020. Disponível em: <https://www.rstudio.com/>.
- RASERA, J. B.; *et al.* Histopathological evidences of early grapevine leaf senescence caused by *Phakopsora euvtis* colonisation. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 108, p. 101434, 1 dez. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2019.101434>.
- ROBAYO, M. Y. D.; GUTIÉRREZ, M. C. Mecanismos de resistencia sistémica en plantas. **Acta Iguazu**, v. 3, n. 2, p. 1–19, 2014. <https://doi.org/10.48075/actaiguaz.v3i2.10277>.
- SAITO, H.; *et al.* Covering Soybean Leaves With Cellulose Nanofiber Changes Leaf Surface Hydrophobicity and Confers Resistance Against *Phakopsora pachyrhizi*. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 1827, 2021. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.726565>.
- SCHNEIDER, R. W.; *et al.* First Report of Soybean Rust Caused by *Phakopsora pachyrhizi* in the Continental United States. **Plant Disease**, v. 89, n. 7, p. 774–774, 1 jul. 2005. <https://doi.org/10.1094/PD-89-0774A>.
- SEIXAS, C. D. S.; *et al.* Monitoramento de *Phakopsora pachyrhizi* na safra 2017/2018 para tomada de decisão do controle da ferrugem-asiática da soja. p. 20, [s. d]. .
- SILVA, D. C. G.; *et al.* Molecular mapping of two loci that confer resistance to Asian rust in soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 117, n. 1, p. 57–63, jun. 2008. <https://doi.org/10.1007/s00122-008-0752-0>.
- SILVA, L. H. C. P. da; *et al.* Control of Asian soybean rust with mancozeb, a multi-site fungicide. **Summa Phytopathologica**, v. 41, p. 64–67, mar. 2015. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/1957>.
- SILVA, E.; *et al.* Unraveling Asian Soybean Rust metabolomics using mass spectrometry and Molecular Networking approach. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 138, 10 jan. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56782-4>.
- SILVA, E.; *et al.* Untargeted Metabolomics Analysis by UHPLC-MS/MS of Soybean Plant in a Compatible Response to *Phakopsora pachyrhizi* Infection. **Metabolites**, v. 11, n. 3, p. 179, mar. 2021. <https://doi.org/10.3390/metabo11030179>.
- STANGARLIN, J. R.; *et al.* A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 10, n. 1, p. 18–18, 2011. <https://doi.org/10.18188/sap.v10i1.5268>.

USDA. World agricultural production. 2021. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>. Acesso em: 25 set. 2021.

VIANA, R. G.; *et al.* Quantificação e composição química de cera epicuticular de folhas de eucalipto. **Planta Daninha**, v. 28, p. 753–758, dez. 2010. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582010000400007>.

VIEGAS NETO, A. L.; *et al.* Fungicide management in the Asian soybean rust. **Revista Agrogeoambiental**, v. 13, n. 1, 2021.

VIGANÓ, J.; *et al.* Microsatellite molecular marker-assisted gene pyramiding for resistance to Asian soybean rust (ASR). **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 40, 3 set. 2018. DOI [10.4025/actasciagron.v40i1.39619](https://doi.org/10.4025/actasciagron.v40i1.39619). Disponível em: <http://www.scielo.br/j/asagr/a/68bmdTv4hyzKMsl5xh85VdG/abstract/?lang=en>. Acesso em: 7 jan. 2022.

YAMANAKA, N.; HOSSAIN, Md. M. Pyramiding three rust-resistance genes confers a high level of resistance in soybean (*Glycine max*). **Plant Breeding**, v. 138, n. 6, p. 686–695, 2019. <https://doi.org/10.1111/pbr.12720>.

YAMANAKA, N.; *et al.* Soybean Breeding Materials Useful for Resistance to Soybean Rust in Brazil. **Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ**, v. 45, n. 4, p. 385–395, 2011. <https://doi.org/10.6090/jarq.45.385>.

YAMANAKA, N.; *et al.* Resistance to Asian soybean rust in soybean lines with the pyramided three Rpp genes. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 75–82, mar. 2013. <https://doi.org/10.1590/S1984-70332013000100009>.

YAMANAKA, N.; *et al.* Multiple Rpp-gene pyramiding confers resistance to Asian soybean rust isolates that are virulent on each of the pyramided genes. **Tropical Plant Pathology**, v. 40, n. 5, p. 283–290, 1 out. 2015. <https://doi.org/10.1007/s40858-015-0038-4>.

YAMANAKA, N.; *et al.* The locus for resistance to Asian soybean rust in PI 587855. **Plant Breeding**, v. 135, n. 5, p. 621–626, 2016. <https://doi.org/10.1111/pbr.12392>.

YORINORI, J. T.; PAIVA, W. M. Ferrugem da soja: *Phakopsora pachyrhizi* Sydow. **Embrapa Soja-Fôlder/Folheto/Cartilha (INFOTECA-E)**, 2002.

YU, N.; *et al.* Fine mapping of the Asian soybean rust resistance gene Rpp2 from soybean PI 230970. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 128, n. 3, p. 387–396, mar. 2015. <https://doi.org/10.1007/s00122-014-2438-0>.

ZAIDI, S. S.-A.; MUKHTAR, M. S.; MANSOOR, S. Genome Editing: Targeting Susceptibility Genes for Plant Disease Resistance. **Trends in Biotechnology**, v. 36, n. 9, p. 898–906, 1 set. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.04.005>.

APÊNDICE A - Fotografias da morfologia foliar

FOTOGRAFIAS DA MORFOLOGIA INTERNA DA FOLHA DE QUATORZE LINHAGENS DE SOJA COM GENES RPP-PIRAMIDADOS, OITO INTRODUÇÃO DE PLANTAS (PI'S), CINCO CULTIVARES RESISTENTES E SEIS SUSCETÍVEIS REALIZADAS EM MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA (MEV) COM AUMENTO DE 1000X.

