Manual de laboratorio para estudios sobre la resistencia a roya de la soja

Versión 24

(Actualizada el 15 de Abril de 2018)

Japan International Research Center for Agricultural Sciences (JIRCAS)

© 2013-2019 Japan International Research Center for Agricultural Sciences (JIRCAS)

Los derechos de autor de este manual pertenecen al Centro Internacional de Japón para las Ciencias Agrícolas (JIRCAS).

Todos los derechos reservados. Este manual no puede ser modificado o copiado en forma completa o parcial sin el permiso de JIRCAS (sede 1-1, Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8686, Japón), excepto en breves reseñas en coneccion con revisiones o actividades académicas. En caso de publicar los resultados de este manual en artículos, reuniones, impresiones, internet, etc., por favor citar este manual y su URL. Además, por favor contáctenos a través del siguiente sitio web.

https://www.jircas.go.jp/en/publication/manual_gudeline/31

Las condiciones mencionadas anteriormente se aplican a todas las versiones de este manual que son actualizadas periódicamente.

Aunque el derecho de autor de este manual pertenece a JIRCAS, los derechos (©) de autor de otras producciones en este manual pertenecen a sus respectivas organizaciones. Para los productos con marca comercial (™) o marcas comerciales registradas (®), por favor referirse a manuales de instrucción del fabricante.

Contenido

Capítulo 1: Evaluación de resistencia a roya de la soja

Sección	Página
1-1. Multiplicación de urediniosporas de roya	3
1-2. Aislamiento mono-lesión	6
1-3. Inoculación de soja con suspensión de esporas	9
1-3'. Inoculación de soja con suspensión de esporas (por método de hoja desprendida)	14
1-4. Evaluación de la patogenicidad de la roya	15
1-5. Resistencia a roya en genotipos de soja	18
1-6. Tolerancia a roya en genotipos de soja	21
1-7. Análisis de datos	23

Capítulo 2: Análisis de marcadores de Secuencia simple repetida (SSR)

(Hacia la selección asistida por marcadores para introducir *Rpp* genes)

Sección	Página
2-1. Muestra de hoja	25
2-2. Extracción de ADN	27
2-3. Ajuste de la concentración de ADN	30
2-4. PCR	32
2-5.Electroforesis en gel de acrilamida	34
2-6. Análisis de datos	38

Agradecimientos	45
Referencias	47
Autores	50

Capítulo 1

Evaluación de resistencia a roya de la soja

1-1. Multiplicación de urediniosporas de roya

Antes de su uso experimental las esporas de roya obtenidas de cultivos de soja a campo o preservadas a −80°C deberían ser multiplicadas sobre folíolos sanos de variedades de soja para la preparación de esporas de alto capacidad germinativa. Se recomienda la multiplicación de esporas por el "método de cultivo de hojas" porque permite la propagación de múltiples aislamientos (poblaciones) en una simple cámara de crecimiento sin contaminación cruzada. Para la multiplicación de esporas se deben usar plantas de soja sanas. Además, si se sospecha que la población de roya a multiplicar contiene varias razas se recomienda usar variedades susceptibles sin genes de resistencia para mantener la composición original de razas en la población después de la etapa de multiplicación.

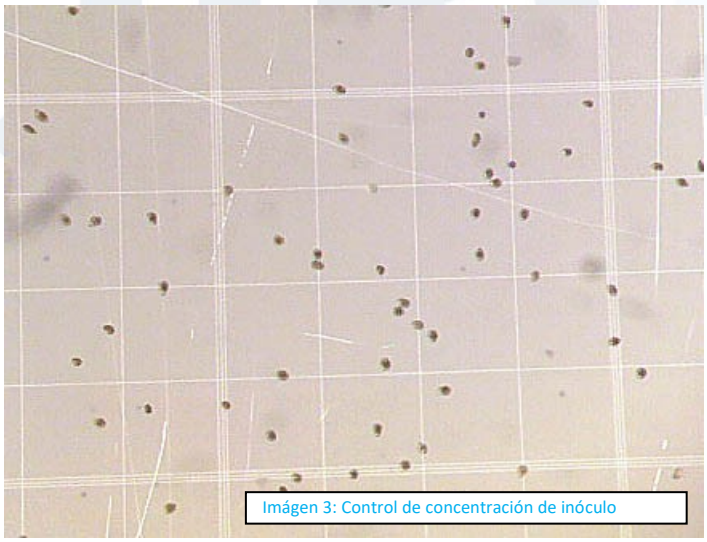
(Protocolo)

Imagen 1: Plantas en cámaras de creciimiento

1. Sembrar plantas de soja susceptibles (por ejemplo los cultivares BRS154 y BRS184) en una cámara de crecimiento (imágen 1).
2. Obtener folíolos maduros de plantas.
3. Frotar con los dedos la cara inferior de las hojas con agua destilada por aproximadamente 10 segundos por folíolo para facilitar la aplicación de la suspensión de esporas.
4. Cortar la base (5–10 mm) de los folíolos, ubicarlos en cajas de Petri, y cubrir la base de los folíolos con papel esterilizado humedecido con agua destilada (*1) (imágen 2).
5. Suspender esporas [descongeladas (*2) o frescas] en una solución de Tween® al 0.04%.
6. Diluir la suspension de esporas con la solución de Tween® al 0.04% y ajustar la concentratión al 5–10 × 10^4 esporas/mL (esto puede cambiar dependiendo del porcentaje de germinación de las mismas usando un hematocitómetro (imágen 3) (*3).

Imágen 2: Hojas para inoculación

7. Preparar la solución de inóculo (aproximadamente 100 µL por folíolo).
8. Aplicar homogeneamente la suspensión de esporas sobre la cara inferior de las hojas usando un pincel.
9. Ubicar las cajas de Petri en un lugar oscuro a 21°C por 12 horas (*4).
10. Usar el remanente de la suspensión de esporas para determinar su porcentaje de germinación (*5).
11. Transferir las cajas de Petri a una cámara de crecimiento a 21°C y dejar los folíolos por aproximadamente 13 días o más.
12. Humedecer el papel en las cajas de Petri con agua destilada (*1) aproximadamente dos veces por semana y reemplazar los papeles esterilizados cuando sea requerido.
13. Recolectar las esporas de los folíolos sobre un papel parafinado cuando se observen esporas en las lesiones de roya de los folíolos (imágen 4).
14. Transferir las esporas recolectadas a microtubos de 2-mL (o tubos Falcon® de 15- o 50-mL) y ubicar los tubos destapados en un desecador por una noche para secar las esporas.
15. Sellar los microtubos y almacenarlos a −80°C (o en nitrogeno líquido).
16. Repetir las etapas 12–15 para cosechar varias veces las esporas.


Imágen 3: Control de concentración de inóculo

Imágen 4: Recolección de esporas

*1: En lugar de agua destilada, podría ser utilizada una solución diluída 500 veces de Hyponex® (Hyponex, Japón) o 40 ppm de ácido giberélico.

*2: Para descongelar las esporas, incubar los microtubos con las esporas congeladas a −80°C (o en nitrógeno líquido) en un baño de agua a 39°C por 1 minuto.

*3: Para el hematocitómetro "Fuchs–Rosenthal: Bright-Line (profundidad= 0.2 mm)" la concentración de esporas (esporas/mL) es calculada como "el número de esporas en 1 mm" × 0.5 × 10^4.

*4: Las cajas de Petri pueden ser cubiertas con papel de aluminio antes de ubicarlas en la cámara de crecimiento a 21°C.

*5: Ver la sección "1-3. Inoculación de soja con suspensión de esporas" para más detalles.

(Requerimientos)

· Agua destilada

· Solución [diluída 500 veces de Hyponex® (Hyponex, Japón) o 40 ppm de ácido giberélico] (en lugar de agua destilada, opcional)

· Cajas de Petri (de vidrio o plástico)

· Papel esterilizado (Kimwipe®, etc., cortar a 1.5 cm × 4.0 cm, autoclave)

· **Solución Tween® 0.04%** (10 mL de agua destilada + 4 µL de *polyoxyethylene sorbitan monolaurate*; Tween 20, Promega; preparar una solución fresca por cada vez).

· Papel parafinado

· Microtubos de 2.0 mL (o tubos Falcon® de 15/50-mL)

· Tijeras de laboratorio

· Pincel de pintar

· Contador (para contar número de esporas)

· Hemocitómetro

· Cámara de crecimiento [para crecimiento de plantas; 24°C, 14-h fotoperíodo de luz, lámparas fluorescente de más de 19,000 lux. En JIRCAS se usa Biotron (Nippon Medical & Chemical Instruments Co.)]

· Cámara de crecimiento [para hojas; 21°C, fotoperíodo de 12-hs, y aproximadamente 3,000 lux con lámparas fluorescentes. En JIRCAS se usa Biotron (Nippon Medical & Chemical Instruments Co.)]

· Freezer a −80°C (o un tanque de nitrógeno líquido)

· Baño de agua a 39°C (para descongelar esporas)

· Microscopio estereoscópico

· Desecador

1-2. Aislamiento mono-lesión

Las esporas de roya obtenidas de campo deben ser consideradas como una población sospechosa de contener varias razas de roya. Si se está llevando a cabo un estudio de razas del patógeno, la población del patógeno debe ser purificada a un aislamiento usando "aislamiento por lesión simple".” El método de cultivo de hoja descripto en la sección “1-1. Multiplicación de urediniosporas de roya” debería ser usado para el aislamiento mono-lesión.

Para la multiplicación de esporas deben ser usadas variedades susceptibles para mantener la composición de razas en la población de roya. Para el aislamiento mono-lesión podrían ser usadas variedades resistentes, y el uso de variedades resistentes resulta en aislamientos de roya con virulencia específica a genes de resistencia (*Rpp*: Resistente a *Phakopsora pachyrhizi*) o variedades resistentes.

(Protocolo)

1. Preparar los folíolos para cultivo de hojas siguiendo las etapas 1–4 en la sección “1-1. Multiplicación de urediniosporas de roya.”
2. Suspender esporas (descongeladas o frescas) en solución Tween® 0.04%.
3. Aplicar la suspensión de esporas (aproximadamente 20 µL de 1×10^4 esporas/mL) sobre la cara inferior de las hojas con un pequeño pedazo de papel de filtro usando un par de pinzas (*1).
4. Colocar las cajas de Petri en un lugar oscuro a 21°C durante la noche (*2).
5. Transferir las cajas de Petri a una cámara de crecimiento a 21°C and cultivar los folíolos.
6. Cuando las lesiones aparecen sobre los folíolos inoculados (aproximadamente 7-10 días) cortar el folíolo en segmentos (5 × 5 mm ~) de modo que cada segmento tenga una lesión simple (*3).
7. Ubicar cada segmento de hoja sobre papel (*4) estéril humedecido con agua destilada (*5) en otra caja de Petri.
8. Incubar la caja de Petri en una cámara de crecimiento hasta que el uredinio formado en el segmento de la hoja eclosione y produzca esporas (aproximadamente 14-20 días; imagen 5).
9. Transferir el segmento de la hoja con la lesión esporulante a microtubos de 2.0-mL (*6).
10. Agregar 100 µL de Tween® 0.04% al microtubo.
11. Use un vortex brevemente para suspender las esporas, coloque la suspension utilizando una micropipeta (100 µL suspensión por hoja) sobre el envés de una hoja de una variedad susceptible previamente frotada.

12. Deparame homogeneamente la suspension utilizando un pedazo de papel de filtro con una pinza.
13. Cosechar esporas frescas de las hojas infectadas del cultivo (de aproximadamente 2 - 4 semanas) (*7).
14. Repetir el proceso de multiplicación para preparar suficientes esporas para inocular en los experimentos subsiguientes.

*1: Desparrame la gota de suspension utilizando un pedazo de papel de filtro agarrado con una pinza (Figura 1).

*2: Las cajas de Petri pueden ser cubiertas con papel de aluminio para mantener en oscuridad.

*3: Las hojas deberán ser recortadas en segmentos, previo a que se desarrollen esporas, para que no haya contaminación cruzada.

*4: Para evitar la deshidratación de los segmentos de hoja recortados se utilizan 10 pedazos de papel.

*5: Tambien se puede utilizar solusion 1/2,000 × Hyponex® o 40 ppm ácido gibberellico.

*6: Pueden ser almacenados a −80°C.

*7: Ver etapas 9–16 en la sección "1-1. Multiplicación de urediniosporas de roya" para más detalles.

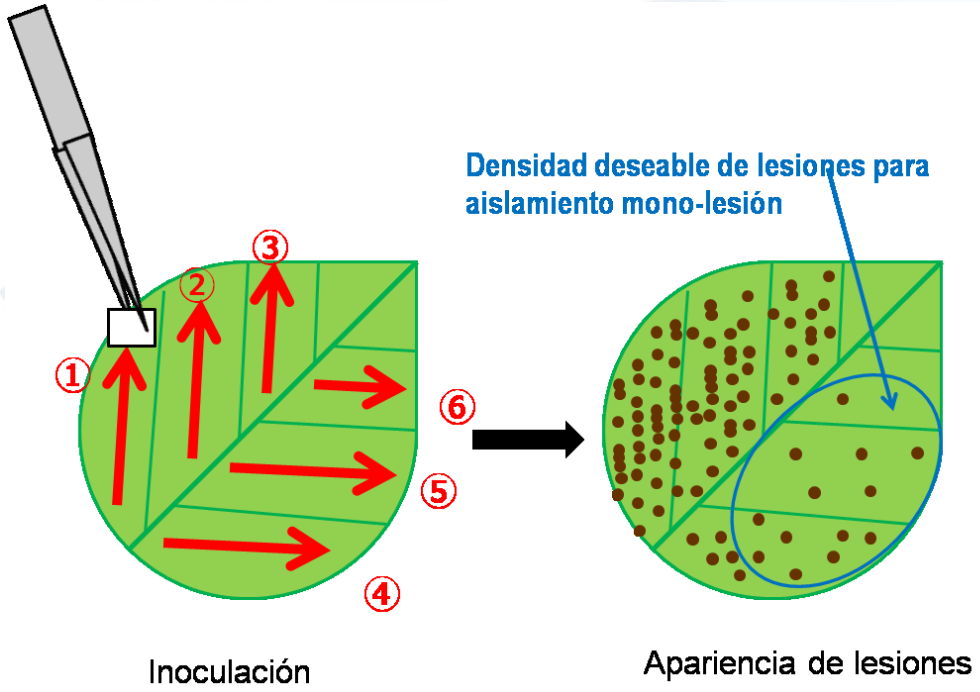


Figura 1. Método para desparramar inóculo y obtener densidad adecuada de lesiones de roya. Las flechas rojas indican la dirección y el orden de pasada-única entre las nervaduras de la hoja.

Imagen 5: lesion esporulando en un fragment de hoja

(Requerimientos)

· Agua destilada

· Cajas de Petri

· Papel esterilizado (Kimwipe®, etc., cortar a un tamaño de 1.5 × 4.0 cm, autoclave)

· **Solución de Tween® 0.04%** (10 mL de agua destilada + 4 µL de *polyoxyethylene sorbitan monolaurate*; Tween 20, Promega; preparar una solución fresca por vez)

· 40 ppm de ácido giberélico o solución 1/2,000× Hyponex®

· Papel de filtro

· Microtubos de 2.0-mL

· Pincel de pintura

· Contador (para contar número de esporas)

· Hemocitómetro

· Bisturí

· Un par de pinzas

· Cámaras de crecimiento [para cultivo de hojas; 21°C, 12-horas de fotoperíodo de luz, aproximadamente 3,000 lux de lámparas fluorescentes. En JIRCAS se usa Biotron (Nippon Medical & Chemical Instruments Co.)

· Freezer a −80°C (o un tanque de nitrógeno líquido)

· Microscopio (estereoscópico)

1-3. Inoculación de soja con suspensión de esporas

Para la inoculación de soja deben ser usadas plantas sin ningún tipo de infección de enfermedad. Para prevenir infección natural de roya y otras enfermedades de soja se recomienda incubar las plantas de soja en cámaras de crecimiento. También pueden ser usados invernáculos libres de enfermedad. Sin embargo, las plantas en invernáculo podrían ser afectadas por factores ambientales tales como densidad de fotones, longitud del día, temperatura, etc. Tanto la patogenicidad de la roya (sección 1-4 "Evaluación de patogenicidad de roya") como la resistencia a roya en genotipos de soja (sección 1-5 "Resistencia a roya de genotipos de soja") son evaluados usando el mismo protocolo.

Para evaluar patogenicidad de aislamientos de roya usamos un juego de variedades diferenciales (Cuadro 1). Para prevenir variación fenotípica en las variedades las mismas fueron multiplicadas a partir de descendencia de semilla única. Podemos comparar la patogenicidad de aislamientos de roya usando el mismo juego de variedades y metodología de evaluacion. Este juego de variedades puede ser distribuido para uso en investigación según el acuerdo de transferencia de materiales (MTA). Por favor evitar cualquier contaminación cuando multipliquen las semillas. En el 2016, nuestro consorcio para la investigacion sobre la roya asiatica decidió reducir el número de variedades diferenciales de 18* a 12, excluyendo las variedades que supuestamente llevan el mismo gen *Rpp* (alelo)**.

*El grupo anterior de variedades diferenciales consistió de
1: PI 200492 (Komata, *Rpp1*); **2**: PI 368039 (Tainung 4, *Rpp1*); **3**: PI 230970 (No. 3, *Rpp2*);
4: PI 417125 (Kyushu 31, *Rpp2*); **5**: PI 462312 (Ankur, *Rpp3*); **6**: PI 459025 (Bing Nan, *Rpp4*);
7: PI 200526 (Shiranui, *Rpp5*); **8**: PI 416764 (Akasaya, *Rpp3*); **9**: PI 587855 (Jia Bai Jia, *Rpp1-b*);
10: PI 587880A (Huang Dou, *Rpp1-b*); **11**: PI 587886 (Bai Dou, *Rpp1*);
12: PI 587905 (Xiao Huang Dou, *Rpp1-b*); **13**: PI 594767A (Zhao Ping Hei Dou, *Rpp1-b*);
14: BRS154 (Susceptible); **15**: TK5 (Taita Kaohsiung 5, Susceptible);
16: PI 548628 (Wayne, Susceptible); **17**: PI 567102B (MARIF 2767, *Rpp6*);
18: No6-12-1 (*Rpp2+Rpp4+Rpp5*).

** PI 587886 (RDV2) no fue excluída del nuevo grupo ya que puede tener un alelo *Rpp1* diferente al de PI 200492 (RDV1) (Yamaoka et al. 2014). PI 416764 (RDV5) tampoco fue excluída ya que ésta puede tener otro gen flanqueando al gen *Rpp3* de PI 462312 (RDV4) u otro alelo de resistencia *Rpp3* (Hossain et al. 2015). Aunque dos variedades, PI 587880A (RDV9) and PI 594767A (RDV10) pueden portar el mismo gen *Rpp1-b*, ambas están incluídas en el nuevo grupo ya que son materiales importantes pra el desarrollo de líneas casi-isogénicas y líneas con *Rpp*-piramidados (Tabla 9).

Cuadro 1. Variedades diferenciales de soja *

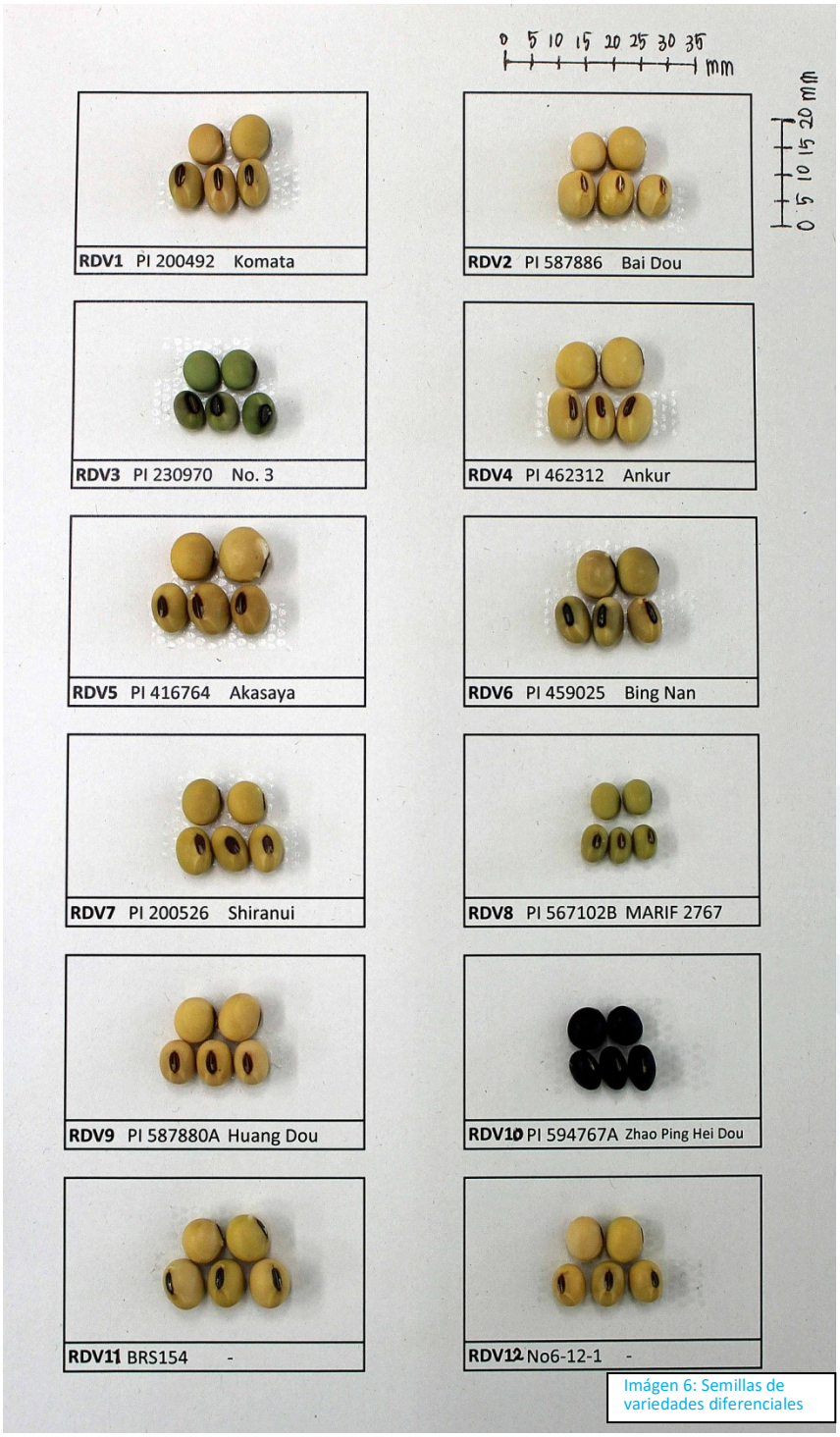
No.	Genotipo	Alternativa	***Rpp***	Origen	Prev No	Peso 100-semillas**	Color de flor	Color de vaina	Color de pubescencia	Color de hilio**	Color Semilla**	Color cotyledon**	Referencia
RDV1	PI 200492	Komata	***Rpp1***	Japón	1	23.47g	Morado***	Pardo	Pardo	Pardo	Amarillo	Amarillo	Hartwig and Bromfield, 1983
RDV2	PI 587886	Bai Dou	***Rpp1***	China	11	20.99g	Morado	Pardo Claro	Blanco	Pardo Claro	Amarillo	Amarillo	Ray et al., 2009
RDV3	PI 230970	No. 3	***Rpp2***	Japón	3	13.08g	Morado	Gris	Blanco	Negro	Verde	Verde	Hartwig and Bromfield, 1983
RDV4	PI 462312	Ankur	***Rpp3***	India	5	22.90g	Blanco	Gris	Blanco	Pardo	Amarillo	Amarillo	Hartwig and Bromfield, 1983
RDV5	PI 416764	Akasaya	***Rpp3***	Japón	8	29.88g	Morado	Pardo Oscuro	Pardo Oscuro	Pardo Oscuro	Amarillo	Amarillo	Hossain et al.,2015
RDV6	PI 459025	Bing Nan	***Rpp4***	China	6	24.75g	Morado	Pardo Claro	Pardo	Negro	Amarillo-Verdoso	Amarillo	Hartwig, 1986
RDV7	PI 200526	Shiranui	***Rpp5***	Japón	7	19.66g	Morado	Gris	Pardo Oscuro	Pardo****	Amarillo	Amarillo	Garcia et al., 2008
RDV8	PI 567102B	MARIF 2767	***Rpp6***	Indonesia	17	8.36g	Morado	Pardo	Pardo	Pardo	Verde-Amarillento	Amarillo	Li et al., 2012
RDV9	PI 587880A	Huang Dou	***Rpp1-b***	China	10	21.36g	Morado	Pardo	Pardo	Pardo	Amarillo	Amarillo	Ray et al., 2009
RDV10	PI 594767A	Zhao Ping Hei Dou	***Rpp1-b***	China	13	13.46g	Morado	Pardo	Pardo	Negro	Negro	Amarillo	Hossain et al., 2015
RDV11	BRS154	-	**(Ninguno)**	Brasil	14	21.22g	Blanco	Pardo Claro	Pardo	Negro	Amarillo	Amarillo	Akamatsu et al., 2013
RDV12	No6-12-1	-	***Rpp2, 4, 5***	Japón	18	17.10g	Morado	Pardo	Pardo	Pardo Oscuro	Amarillo	Amarillo	Yamanaka et al., 2013; 2015c

*Este grupo de variedades diferenciales se renovó en 2016.

**Las semillas utilizadas para la caracterización se cultivaron en el campo experimental de JIRCAS en Tsukuba, Ibaraki Japan (E140.08, N36.05) en 2014 (Junio - Noviembre). Ver la imagen de las semillas (imágen 6) en la siguiente página. El resto de las características fenotípicas se evaluaron en el mismo campo en 2015.

***Aunque el gen *Rpp1* de este diferencial se confirmó en poblaciones BC_3F_2, el color de flor en PI 200492 es blanco, diferente al reportado en la base de datos del USDA (https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/search.aspx).

****El color de hilio de PI 200526 es negro en la base de datos del USDA (https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/search.aspx).



Imágen 6: Semillas de variedades diferenciales

Para la inoculación se utiliza la primera hoja trifoliada de plantas de soja en estado de crecimiento V3–V4. Sin embargo debe tomarse en cuenta la observación visual de la madurez de las hojas debido a que el crecimiento y la madurez dependen de la variedad de soja utilizada. En esta sección se menciona el protocolo para la inoculación. Por favor ver la siguiente sección: 1-3' para el protocolo de inoculación por el método de cultivo de hojas.

(Protocolo)

1. Sembrar las semillas en macetas con tierra (*1).
2. Hacer crecer tres plantas por variedad en una cámara de crecimiento (24°C, fotoperíodo de 14-hs de luz, y lámparas fluorescentes de más de 19,000 lux.
3. Inocular las plantas de soja cuando todos los materiales lleguen al estado de crecimiento V3–V4 (*2).
4. Frotar con agua destilada el envés de las hojas utilizando los dedos (**la hoja trifoliada más baja**), por un tiempo aproximado de 10 segundos por folíolo.
5. Suspender esporas [descongeladas (*2) o frescas] en una solución de Tween® al 0.04%.
6. Diluir la suspension de esporas con la solución de Tween® al 0.04% y ajustar la concentratión a 50,000 esporas/mL usando un hematocitómetro (*4).
7. Preparar la solución del inóculo (*5).
8. Aplicar la suspensión de esporas homogeneamente sobre la cara inferior de las hojas usando un pincel de pintar.
9. Cubrir las plantas inoculadas con bolsas plásticas (para mantener alta humedad) y colocarlas en un lugar oscuro a aproximadamente 24°C por 12 horas.
10. Usar la suspensión de esporas remanente para determinar el porcentaje de germinación de las esporas (ver el siguiente protocolo).
11. Transferir las plantas inoculadas a una cámara de crecimiento a 24°C y dejarlas más de 13 dias.
12. Usar los folíolos infectados para la evaluación 14 días después de la inoculación.

*1: En lugar de sembrar las semillas se pueden transplantar plántulas de una semana crecidas en vermiculita (o cámaras de germinación).

*2: Aproximadamente 3 semanas después de la siembra de las semillas.

*3: Para descongelar las esporas, incubar los microtubos con las esporas congeladas a −80°C (o en nitrógeno liquido) en un baño de agua a 39°C por 1 minuto.

*4: Esta concentración es para esporas con moderada germinabilidad (60–80%)

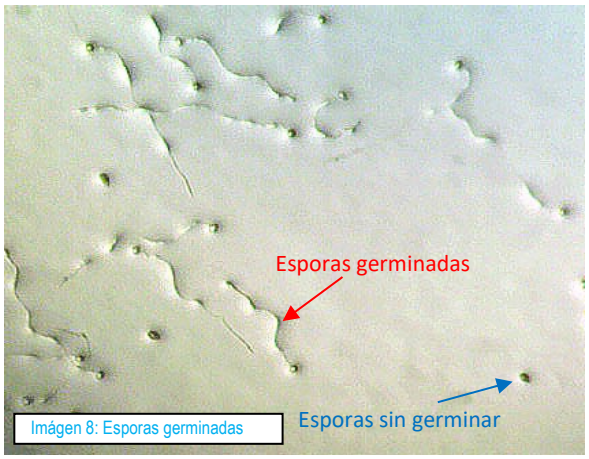
*5: Aproximadamente 100 µL por folíolo.

(Protocolo para determinar germinación de esporas)

1. Vertir aproximadamente 1.0 mL de 0.5% Agar gel (calentado para derretir) sobre un portaobjetos de vidrio.
2. Agregar 15–20 µL de la suspensión de esporas sobre el gel.
3. Colocar el portaobjetos de vidrio en una caja de Petri con un pedazo de papel humedecido (imágen 7).
4. Colocar la caja de Petri en el mismo lugar donde fueron ubicadas las plantas inoculadas (por ejemplo, la cámara de crecimiento).

5. Después de 4–12 horas, contar, bajo microscopio el número de esporas germinadas y no germinadas (más de 300 en total) (imágen 8).
6. Calcular el porentaje de germinación de esporas.

Imágen 7: Prueba de germinación



Imágen 8: Esporas germinadas

(Requerimientos)

· Agua destilada

. **Solución de Tween 0.04%** (10 mL de agua destilada + 4 µL de *polyoxyethylene sorbitan monolaurate*; Tween 20, Promega; preparar una solución fresca por vez)

· **Agar gel 0,5%** (100 mL de agua destilada + 0.5 g de agar, autoclave)

· Cámara de crecimiento [para crecimiento de plantas; 24°C, fotoperíodo de 14-hs, y más de 19,000 lux con lámparas fluorescentes. En JIRCAS se usa Biotron (Nippon Medical & Chemical Instruments Co.)

· Maceta (tamaño: approximadamente 1/10,000 a)

· Hematocitómetro

· 5 Tubos Falcon de 50-mL

· Pincel de pintar

· Bolsas plásticas

· Portaobjetos

· Baño de agua a 39°C

· Cajas de Petri (de vidrio o plásticas)

· Microscopio estereoscópico

· Contador (para contar el número de esporas)

1-3'. Inoculación de soja con suspensión de esporas

(Por el método de hoja desprendida)

Como está mencionado en la sección 1-1, "método de hoja desprendida" el mismo es de utilidad porque permite la inoculación de múltiples aislamientos de roya (poblaciones) en una sola cámara de crecimiento. Para este método es necesrio usar hojas sanas para la inoculación. Por favor tomar en cuenta las diferencias en las condiciones de crecimiento para las plantas y para las hojas.

(Protocolo)

1. Llevar a cabo la inoculación siguiendo las etapas 1–10 en la sección "1-1. Multiplicación de urediniosporas de roya" usando las plantas que desea evaluar para resistencia. (*1)
2. Transferir las cajas de Petri a una cámara de crecimiento a 21°C y cultivar las hojas por más de 13 dias.
3. Humedecer el papel en las cajas de Petri con agua destilada (*2) aproximadamente dos veces por semana y reemplazar el papel esterilizado cuando se requiera (*3).
4. Usar folíolos infectados para la evaluación después de 14 días de la inoculación. Para la evaluación seguir las etapas menciondas en las secciones 1-4 o 1-5 (*4).

*1: Aunque cualquier hoja adulta se puede utilizar para la multiplicación de esporas, para la evaluación de resistencia se recomienda inocular la hoja trifoliada y madura más baja.

*2: En lugar de gua detilada puede ser usada una solución Hyponex diluída 500 veces o 40 ppm de ácido giberélico.

*3: Para evitar el colapso de esporas acumuladas el reemplazo de papel debe ser realizado cuidadosamente.

*4: Los niveles críticos para NoU, %LU, and SL en los ensayos de hoja desprendida son diferentes a aquellos realizados en plántula.

(Requerimientos)

· (Los mismos que en la sección 1-1)

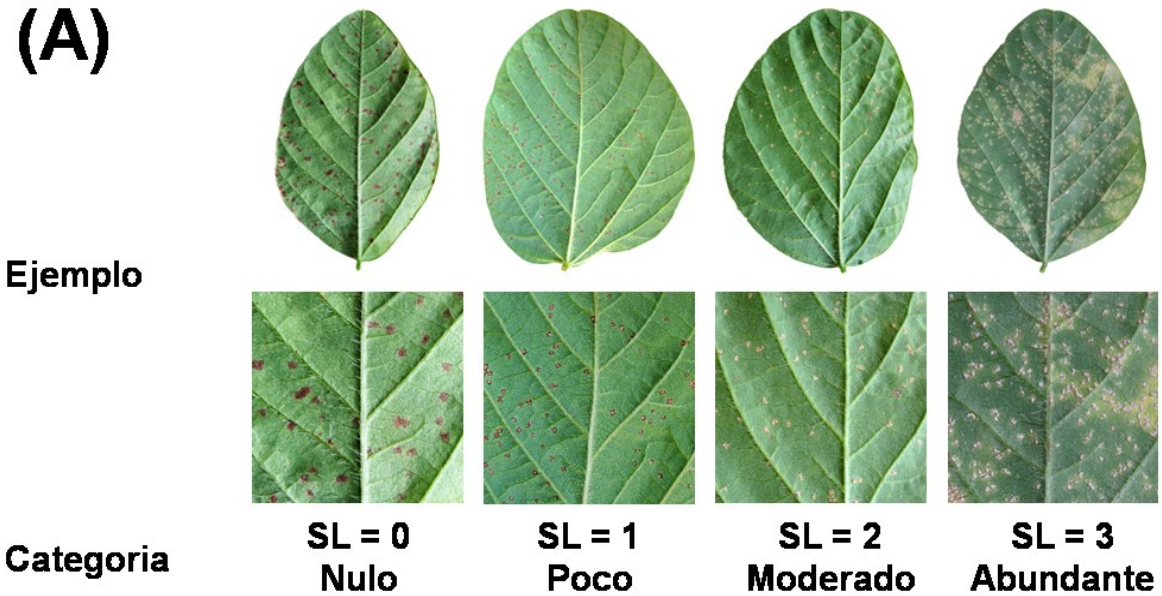
1-4. Evaluación de la patogenicidad de la roya

Para la evaluación de la patogenicidad de los aislamientos de roya o de la población (sección 1-4) y de la resistencia de los genotipos de soja (sección 1-5), clasificación del "tipo de lesión (infección)" se usa comúnmente la respuesta de la soja luego de la inoculación. Sin embargo, existen algunas diferencias observadas entre estas metodologías propuestas para evaluar.

El color de la lesión (LC) ha sido utilizado tradicionalmente para evaluar la resistencia a la roya de la soja. Sin embargo, particularmente bajo condiciones de cámara de crecimiento, ha sido demostrado que LC no siempre es indicativo de resistencia (Yamanaka et al., 2010). Nosotros utilizamos los siguientes cuatro caracteres de resistencia: Nivel de esporulación (SL), número de uredinia por lesión (NoU), frecuencia de lesiones con uredinia (%LU), y frecuencia de uredinias abiertas (%OU). Tomando en cuenta el hecho de que estos cuatro caracteres están altamente correlacionados entre sí (Yamanaka et al., 2010, 2011), "SL" y "NoU" son usados principalmente para evaluar "la patogenicidad de los aislamientos de roya" (Akamatsu et al., 2013; Yamaoka et al., 2014) y para evaluar la "resistencia de los genotipos de roya" (Yamanaka et al., 2011).

(Protocolo)

1. 2 semanas luego de la inoculación cuidadosamente desprenda los folíolos infectados de la plantas.
2. Si el numero de muestras es bajo y se puede evaluar todo en un solo día, comenzar la evaluación siguiendo el " Paso 6."
3. Por el contrario, si el número de muestras es muy alto como para evaluar todo en un solo día, coloque los folíolos desprendidos en cajas de Petri con el envés de la hoja mirando hacia arriba.
4. Asegurarse de que las cajas de Petri estén selladas (para proteger los folíolos de la deshidratación) y preservar a −80°C (o −20°C) hasta su evaluación.
5. Descongelar las muestras a temperatura ambiente antes de su evaluación.
6. Evaluar SL a ojo desnudo utilizando la escala de la Figura 2A.
7. Remover las esporas utilizando un pincel.
8. Contar NoU (tanto cerradas como abiertas) en 30 lesiones bajo el estereoscopio (Figura 3).
9. Determinar la reacción de las variedades diferenciales (Cuadro 1) de acuerdo al criterio en el Cuadro 2.



(B)

Categoria	Ejemplo	Caracteristica
0:Nulo		No se observa esporulación ninguna bajo estereoscopio. Se observan uredinia.
1:Poco		Se observa poca esporulación. Se observa esporulación a ojo desnudo. Uredinia a veces parecen cerradas en este nivel de esporulación.
2:Moderado		Esporulación moderada se define como más esporas que '1: Poco' pero menos que '3: Abundante'. La variación en la esporulación en esta categoría es grande.
3:Abundante		Se observa esporulación masiva. La columna de esporas a veces se colapsa por la propia producción tan abundante de esporas.

Figura 2. Escala para la evaluación visual de SL (A) y para la evaluación bajo microscopio (B)

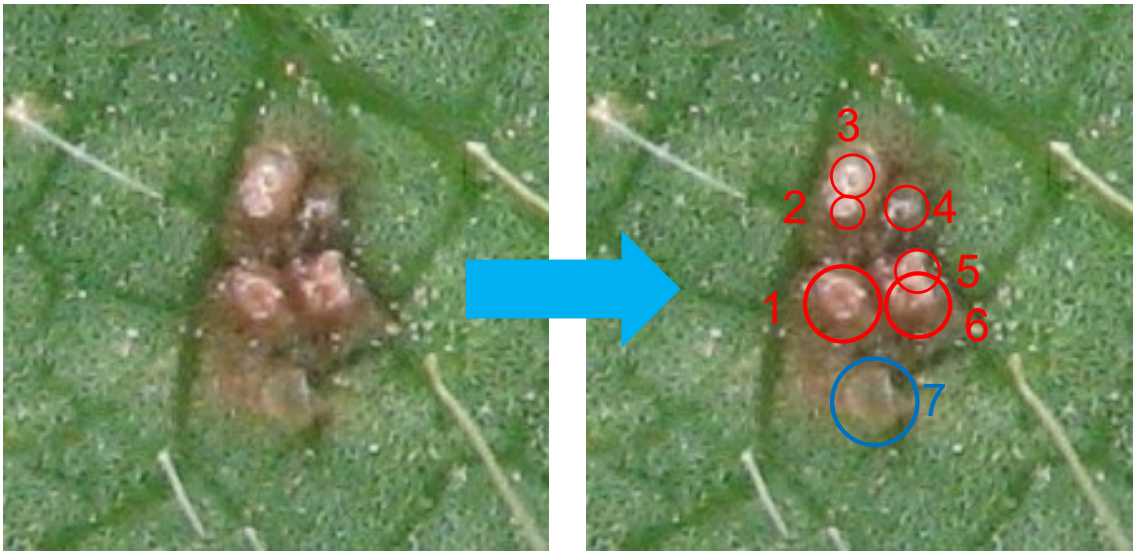


Figura 3. Ejemplo de como contar NoU. En esta lesión se observan seis uredinia abiertas (**rojo**) y una cerrada (**azul**). El NoU y %OU son calculados como 7 y 85.7%, respectivamente.

Cuadro 2. Criterio de clasificación para la reacción de la roya en variedades diferenciales (Akamatsu et al., 2013). Esta clasificación fue aplicada para evaluar la patogenicidad de la población de roya y de los aislamientos. SL fue evaluado a ojo desnudo, y NoU fue calculado de 30 lesiones evaluadas bajo estereoscopio.

Presencia de lesiones	SL	NoU*	Tipo de reacción del differencial
−	-	-	Resistente (inmune)
+	**0 or 1**	**× <1.5**	Resistente
+	**2 or 3**	**× <1.5**	Intermedia
+	**0 or 1**	**1.5≤ ×**	Intermedia
+	**2 or 3**	**1.5≤ ×**	Susceptible

* Para ensayos de hoja-desprendida, el valor de corte para NoU= 1.2 en vez de 1.5 (Yamanaka et al. 2013)

(Requerimientos)

· Freezer −80°C (o −20°C)

· Pincel

· Cajas de Petri (vidrio o plástico)

· Estereoscopio

1-5. Resistencia a roya en genotipos de soja

Para determinar el **"grado de resistencia de los genotipos de soja,"** el número de uredinia por lesión (NoU), frecuencia de lesiones con uredinia (%LU), y grado de esporulación (SL) en lesiones de varios genotipos de soja (fuentes de resistencia, poblaciones de mapeo, o líneas de mejoramiento) son evaluados bajo esteroscopio. Además de NoU, %LU, y SL [así como caracteres opcionales como color de lesión (LC) y frecuencia de uredinia abiertas (%OU)] son valores numéricos. Así, podrían usarse para quantitative trait locus (QTL) y otros análisis estadísticos.

Los dos criterios descriptos en la sección 1-4 y 1-5 son similares entre sí. Si comparamos el criterio aquí descripto con el de la sección 1-4, vemos que niveles de resistencia más débiles tienden a ser considerados como "resistente," pues identificar este tipo de resistencia puede tener valor para genetistas o para fines de mejoramiento.

(Protocolo)

1. 2 semanas luego de la inoculación cuidadosamente desprenda los folíolos infectados de la plantas.
2. Si el numero de muestras es bajo y se puede evaluar todo en un solo día, comenzar la evaluación siguiendo el " Paso 6."
3. Por el contrario, si el número de muestras es muy alto como para evaluar todo en un solo día, coloque los folíolos desprendidos en cajas de Petri con el envés de la hoja mirando hacia arriba.
4. Asegurarse de que las cajas de Petri estén selladas (para proteger los folíolos de la deshidratación) y preservar a −80°C (o −20°C) hasta su evaluación.
5. Descongelar las muestras a temperatura ambiente antes de su evaluación.
6. Evaluar el SL de 30 lesiones bajo estereoscopio utilizando la escala de la Figura 2B.
7. Remover las esporas de folíolos infectadas utilizando un pincel.
8. Contar NoU y número de uredinia abiertas (opcional, Figura 3) y evaluar LC (opcional, Figura 4) en 30 lesiones bajo estereoscopio.
9. Entrar los datos en un hoja de cálculo (vea ejemplo de hoja de cálculo Microsoft Office Excel® en Figura 5). %LU y %OU pueden ser calculados usando la función de cálculo.
10. Clasifique los valores fenotípicos NoU, %LU, y SL en "**Resistente**" o "**Susceptible**" de acuerdo al criterio en el Cuadro 3.
11. Finalmente determine los genotipos de soja resistentes de acuerdo al criterio en el Cuadro 4.

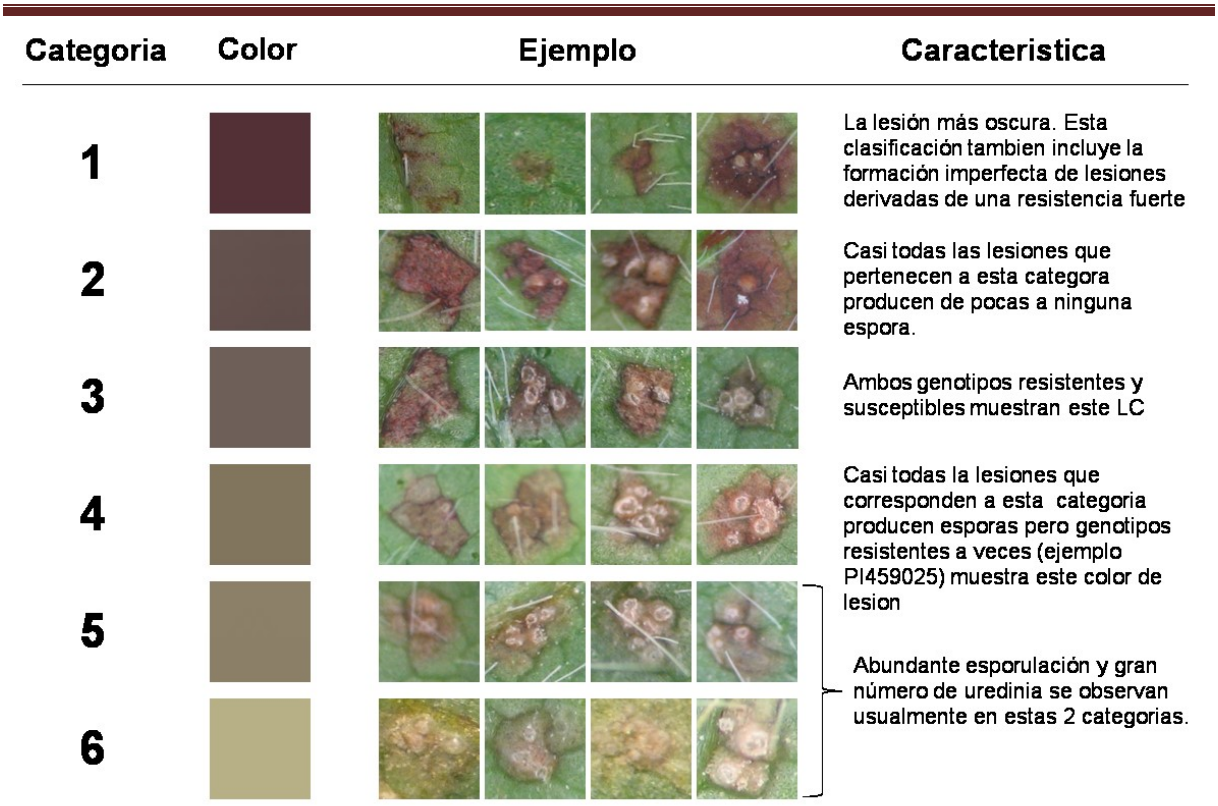


Figura 4. Seis tipo de categorias de color de lesion (LC) en lesions de roya de la soja. Las fotografias fueron tomadas luego de la remosión de las uredionosporas para revelar claramente el color de la lesión.

Materiales de soja utilizados para la evaluación

Datos numericos individuales para cada una de las 30 lesiones (LC, Total NoU, NoU abiertas, y SL)

Fenotipo del material calculado en base a las 30 lesiones (LC, NoU, %LU, %OU, y SL)

No.	Genotype	LC	Total NoU	Open NoU	SL	NoL	LC	SD	NoU	SD	OU	%LU	SL	SD
1	PI200492	5 5 4 4 5 5 5 5 5 3	5 2 3 5 6 4 7 5 3 4	5 2 3 5 6 4 7 5 3 3	3 3 3 3 3 3 3 3 3 3	30	4.9	0.4	4.9	1.5	93.8%	100.0%	3.0	0.0
		5 5 5 5 5 5 5 5 4 5	5 6 7 6 5 6 6 8 3 3	5 6 7 6 5 4 5 7 3 3	3 3 3 3 3 3 3 3 3 3						137			
		4 5 5 5 5 6 5 5 5 5	3 4 3 6 6 3 5 5 7 5	3 3 3 6 5 2 5 4 7 5	3 3 3 3 3 3 3 3 3 3						146			
3	PI230970	3 3 3 3 3 3 3 3 3 3	5 3 3 5 7 1 3 4 4 2	5 3 3 5 5 1 3 3 4 2	3 3 3 3 3 3 3 3 3 3	30	3.0	0.0	3.7	1.8	94.6%	100.0%	3.0	0.0
		3 3 3 3 3 3 3 3 3 3	6 5 3 2 8 3 1 6 4 5	6 5 3 2 8 3 1 6 4 5	3 3 3 3 3 3 3 3 3 3						106			
		3 3 3 3 3 3 3 3 3 3	3 5 5 5 3 2 1 2 4 2	3 5 4 5 3 2 1 2 3 1	3 3 3 3 3 3 3 3 3 3						112			
4	PI417125	5 5 5 4 4 4 4 4 5 5	3 4 2 2 3 3 4 2 2 2	3 4 2 2 2 3 2 2 2 2	3 3 3 2 2 2 3 3 3 2	30	4.8	0.4	2.9	1.3	85.2%	100.0%	2.8	0.4
		5 5 5 5 4 4 5 5 5 5	5 3 2 3 2 3 4 7 4 3	5 2 2 3 1 3 3 7 2 3	3 3 3 3 3 3 3 3 3 3						75			
		5 5 5 5 5 5 5 5 5 5	3 3 3 5 1 1 2 2 3 2	2 1 3 5 1 1 1 2 2 2	3 3 3 3 2 3 3 3 3 3						88			
7	Shiranui	4 4 4 4 4 4 5 5 4 4	1 2 1 2 1 1 2 1 1 1	1 2 1 2 1 1 2 1 1 1	1 1 1 1 3 1 1 1 2 2	30	4.1	0.3	1.6	0.7	87.5%	100.0%	1.5	0.7
		4 4 5 4 4 4 4 4 4 4	1 1 4 1 2 1 2 1 1 2	0 1 3 1 1 1 2 1 1 2	1 2 1 1 1 1 1 1 3 1						42			
		4 4 4 4 4 4 4 4 4 4	1 2 2 2 2 2 2 3 2 1	1 2 2 1 2 1 2 3 1 1	2 2 2 1 1 1 2 2 2 3						48			
13	PI459025A	5 5 4 4 5 4 3 3 2 2	1 0 1 1 1 0 1 2 0 3	0 0 1 1 1 0 0 1 0 2	2 2 1 2 1 2 1 1 1 2	30	3.3	0.8	1.6	1.1	61.2%	83.3%	0.9	0.8
		2 4 4 3 3 3 3 3 3 3	3 1 2 3 2 0 3 2 1 3	3 1 0 1 0 0 2 0 1 3	2 2 0 0 1 1 1 1 1 1						30			
		4 3 3 3 4 3 3 3 3 3	2 1 1 2 0 2 3 3 2 3	1 1 0 1 0 1 2 3 1 3	1 0 0 0 0 0 0 0 0 0						49			

Figura 5. Ejemplo de hoja de cálculo para evaluar los características de la lesiones. El cuadro muestra el fenotipo de cinco lesions.

Cuadro 3. Criterio de clasificación para evaluar fenotipos resistentes o susceptible para los tres siguientes caracteres %LU, NoU, and SL. Estos valores son calculados como promedio de 30 lesiones.

Carácter de resistencia	Fenotipo resistente	Fenotipo susceptible
%LU*	0.0≤ × <70.0	70.0≤ × ≤100.0
NoU*	0.0≤ × <2.0	2.0≤ ×
SL*	0.0≤ × <2.0	2.0≤ × ≤3.0

* Para los experimentos de hoja-desprendida, los valores críticos de corte son %LU=80.0, NoU=1.2, y SL=1.5 (Yamanaka et al. 2013)

Cuadro 4. Criterio de clasificación de resistencia a roya en genotipos de soja.

Categoria	Criterio
Immune	Sin lesiones
Altamente resistente	Lesiones con el fenotipo resistente para los tres caracteres y *sin presencia de uredinia*
Resistente	Lesiones con el fenotipo resistente para los tres caracteres y *con presencia de uredinia*
Moderadamente resistente	Lesiones con fenotipo resistente para alguna de los tres caracteres
Susceptible	Lesiones con fenotipo susceptible para los tres caracteres de resistencia

(Requerimientos)

- Freezer −80°C (o −20°C)
- Pincel
- Cajas de Petri (vidrio o plástico)
- Estereoscopio

1-6. Tolerancia a roya en genotipos de soja

La resistencia observada en las lesiones de roya es utilizada comunmente para evaluar "patogenicidad de la población de roya o de aislamientos" y "resistancia de genotipos de soja." Sin embargo, el "grado de amarillamiento de la hoja" e "índice de infección (IFI)" fueron utilizados alguna vez para identificar genotipos de soja tolerantes a la roya de la soja (Yamanaka et al., 2011; 2015b). Por lo tanto, para identificar candidatos para los programas de mejoramiento la evaluación de estos dos caracteres también se describe en el manual.

Si las características de la lesion de resistencia no fueran a ser evaluados, el indice de infección podria ser evaluado a menos de 2 semanas de la inoculación, mientras que le amarillamiento foliar se debería evaluar luego de las 2 semanas de inoculación (aproximadamente 3 semanas después de la inoculación) para observar diferencias claras entre genotipos. No hay criterio de clasificación establecido para estos dos caracteres todavía, aunque algunas variedades claramente se diferencian de otras (imagen 9).

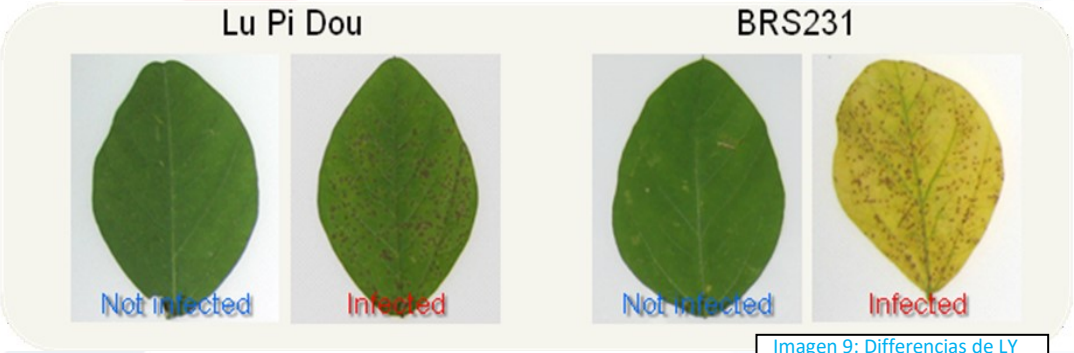


Imagen 9: Differencias de LY para RAS en dos variedades

(Protocolo)

1. Cuidadosamente desprenda los folíolos infectados de plantas 1-3 semanas pos-inoculación (*1).
2. Si el numero de muestras es bajo y se puede evaluar todo en un solo día, comenzar la evaluación siguiendo el " Paso 6."
3. Por el contrario, si el número de muestras es muy alto como para evaluar todo en un solo día, coloque los folíolos desprendidos en cajas de Petri con el envés de la hoja mirando hacia arriba.
4. Asegurarse de que las cajas de Petri estén selladas (para proteger los folíolos de la deshidratación) y preservar a −80°C (o −20°C) hasta su evaluación.
5. Descongelar las muestras a temperatura ambiente antes de su evaluación.
6. Evaluar las lesiones utilizando la siguiente metodología:
7. Evaluar el grado de amarillamiento usando la escala de la Figura 6.
8. Medir el area (cm^2) infectada en foliolo utilizando un escaner.

9. Cubra el foliolo con una hoja plastica y cuente el número de lesions del foliolo escaneado con un contador de colonias.
10. Calcule el índice de infección con la siguiente fórmula:

$$\text{Indice de infección} = \frac{10^4 \cdot \text{NoL}}{\text{LA} \cdot \text{NGS}}$$

LA: area de foliolo (cm^2).

NoL: número de lesiones por foliolo individual.

NGS: número de esporas germinadas en 1 mL de una suspensión de esporas..

*1: Los folíolos usados para la evaluación de la secciones 1-4 y 1-5 pueden ser utilizados también para evaluar tolerancia.

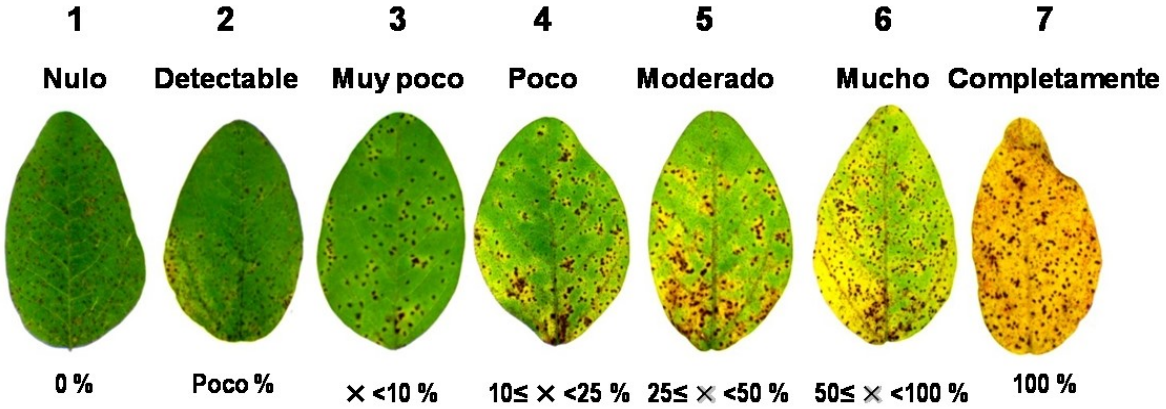


Figura 6. Niveles estandares de amarillamiento foliar. El grado de amarillamiento demide visualmente y se categoriza en siete clases a: Sin Amarillo, a 7: Completamente Amarillo. Un estimativo del porcentaje de area de amarillamiento tambien aparece en la figura.

(Requerimientos)

· Freezer a −80°C (o −20°C)

· Escaner (para índice de infección; Area Meter AM200, ADC BioScientific Ltd.)

· Contador de colonias (para índice de infección; CC-1, AS ONE Corporation)

· Pincel

· Caja de Petri (vidrio o plástico)

· Estereoscopio

1-7. Análisis de datos

Diferencias patogenicas (geográficas o estacional) entre poblaciones de roya pueden ser estimadas usando análisis de conglomerados (cluster) utilizando los datos obtenidos en la secciones: 1-4 o 1-5. Si se usa el set de variedades diferenciales (**Cuadro 1**), se pueden detector diferencias entre sus muestra(s) de roya y las muestras de América Latina (Akamatsu et al., 2013; 2017; Garcia-Rodriguez et al., 2017; Silvina et al., 2019), Bangladesh (Hossain and Yamanaka, 2018) y/o Japón (Yamaoka et al., 2014). El análisis de conglomerado es apropiado par aver diferencias entre muestras de roya (grupos de muestras), los análisis de Componentes Principales o de Teoria de Cuantificación III son apropiados para ver diversidad patogénica entre los grupos de muestras.

Aquí, el analisis de conglomerado usando R software (R Development Core Team, 2013) se introduce para ver diferencias patogénicas entre muestras de roya. Pero la similitud entre genotipos de soja basados en la reacción de la muestra de roya también se puede analizar convirtiendo la categoría (Resistente/Intermedio/Susceptible) a números (0/1/2), otros valores numéricos como NoU o SL puede ser utilizados también para el análisis.

(Protocolo)

1. Prepare los datos crudos en hoja de cálculo Excel (imagen 10), salvar archivo con extensión ".csv". Aquí, "TEST.csv" (Datos de reacción de 13 muestras de roya a 12 variedades) se salva en "disco, C:" en la PC.
2. Iniciar el programa "R" (imagen 11) (version 3.4.3 con archivos "pvclust" y "ca")
3. Leer el archivo entrando con
   > **library(pvclust)**
4. Leer los archivos de datos entrando con
   > **TEST <- read.csv("C:/TEST.csv", header=T, row.names=1)**
5. Realizar análisis de clúster entrando con (*1)
   > **result<-pvclust(t(TEST), method.hclust="average", method.dist="euclidian", nboot=10000)**
6. Output el dendrogram entrando con (image 11) (*2)
   > **plot(result)**

*1: Condiciones: Método = UPGMA; Distancia = euclidiana; Bootstrap resampling = 10,000 veces;

*2: au: "approximately unbiased" p-valor aproximado imparcial, pb: "bootstrap probability value", valor de probabilidad bootstrap.

	RDV1	RDV2	RDV3	RDV4	RDV5	RDV6	RDV7	RDV8	RDV9	RDV10	RDV11	RDV12
BRP-2	2	2	2	2	2	1	2	-	2	0	-	-
BRP-2.1	2	2	2	2	2	2	2	-	0	0	2	0
BRP-2.6	2	2	2	2	2	2	1	-	0	0	2	0
BRP-2.5	2	2	2	2	2	0	2	-	2	2	2	0
BRP-2.49	2	2	2	2	2	0	2	-	0	0	2	0
T1-2(Jp)	0	2	2	0	0	0	0	-	0	0	2	0
E1-4-12(Jp)	0	2	0	0	0	0	0	-	0	0	2	-
Race _1(Jp)	0	2	2	0	0	2	0	-	0	-	-	-
Race_2(Jp)	0	2	2	0	0	0	0	-	0	-	-	-
Race_3(Jp)	0	2	1	0	0	0	0	-	0	-	-	-
Race_4(Jp)	0	2	0	0	0	0	0	-	0	-	-	-
Race_5(Jp)	0	0	0	0	0	0	0	-	0	-	-	-
Race_6(Jp)	0	0	0	0	0	0	0	-	0	-	-	-

Imagen 10: ejemplo de archivo de datos

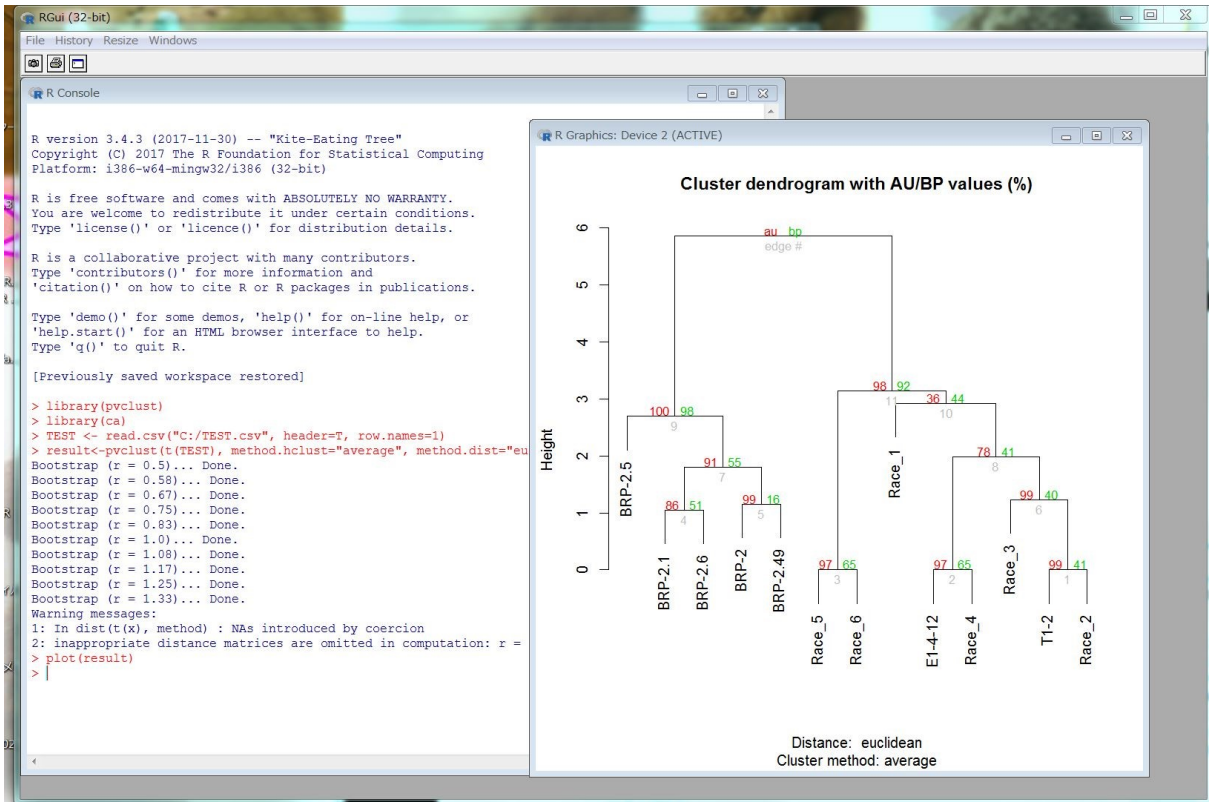


Imagen 11: ejemplo de análisis

Capítulo 2

Análisis de marcadores de Secuencia simple repetida (SSR)

(Hacia la selección asistida por marcadores para introducir *Rpp* genes)

2-1. Muestra de hoja

Para la extracción de ADN es preferible utilizar hojas jóvenes, sanas y sin amarillamiento. En particular, hojas pequeñas en desarrollo contienen mayor número de células por volumen de tejido. Por lo tanto, una mayor cantidad de ADN puede ser extraído de ellas. De hecho, la extracción de ADN de tejido de hojas pequeñas (uno o dos foliolos) en estadios iniciales de crecimiento de soja provee una adecuada cantidad de ADN para el análisis utilizando marcadores moleculares tales como secuencias simples repetidas (SSR). Dado que muchas plantas retrocruzadas deben ser analizadas usando marcadores SSR antes de floración (Cregan et al., 1999), se recomienda el uso de hojas de plantas jóvenes (en estadío V2) para la extracción de ADN.

(Protocolo)

1. Colectar foliolos jóvenes sanos (*1).
2. Colocar el foliolo con un área de 4–8 cm^2 en un tubo de 2-mL (*2).
3. Colocar los tubos en hielo (*3) para transportar al laboratorio.
4. Adicionar tres “bolitas de albumina (*4)” en cada tubo.
5. Colocar los tubos en N_2 líquido (*5).
6. Mezclar en vortex los tubos hasta convertir los foliolos en polvo.
7. Remover las “bolitas de albumina” de los tubos.
8. Preservar los tubos a -80°C hasta la extracción de ADN (*6).

*1: Podrían ser colectados foliolos de plantas en estadio V2.

*2: Foliolos mas grandes podrían ser cortados pero sin dañarlos demasiado.

*3: Podrían dejarse por varias horas.

*4: En lugar de bolitas de albumina, otros tipos de bolitas pueden ser usadas para romper el tejido foliar.

*5: Después de este paso, nunca descongelar las muestras hasta la adición de CTAB 1.5x.

*6: En su lugar, la preservación a -20°C también es posible por pocos días.

(Requerimientos)

· Microtubos de 2-mL (son recomendados aquellos de Eppendorf)

· Bolitas de albumina (ϕ5 mm; Ito Seisakusho Co., Ltd.; pueden ser usadas otras bolitas)

· Nitrógeno líquido (5 L para <200 muestras)

· Vortex

· Freezer a -80°C (o -20°C)

· Guantes para manipular el nitrógeno líquido

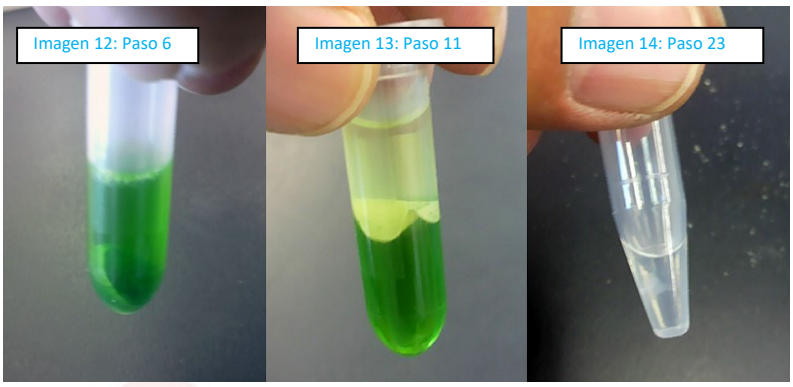
2-2. Extracción de ADN

Para el análisis de marcadores SSR, una solución de ADN de alta calidad no siempre es necesaria. Si bien la extracción de ADN acorde al método CTAB (Murray y Thompson, 1980) es descripta en este manual, otros métodos incluyendo protocolos de extracción más sencillos pueden ser usados para preparar muestras de ADN para el análisis. Si el ADN es extraído utilizando otros métodos diferentes al método CTAB descripto en este manual, podría ocurrir una amplificación inestable de productos de PCR, debido a la degradación de ADN y el deterioro de la calidad del ADN extraído durante el almacenamiento.

(Protocolo)

1. Calentar CTAB 1.5x en un horno microondas.
2. Adicionar 1.0 mL de CTAB 1.5x a un tubo de 2.0 mL conteniendo la muestra freezada a -80°C (*1).
3. Agitar en vortex brevemente la mezcla de CTAB y la muestra de hoja.
4. Colocar las muestras en un incubador o baño de agua a 56°C por 15 minutos y mezclar la solución 2-3 veces.
5. Agitar en vortex la mezcla brevemente.
6. Centrifugar a 15,300 g por 10 minutos a temperatura ambiente (*2) (imagen 12).
7. Transferir el sobrenadante (800–900 µL) a tubos nuevos de 2-mL.
8. Adicionar 1.0 mL de CIAA (*3).
9. Agitar en vortex la mezcla brevemente.
10. Colocar está en un agitador orbital o “shaker” por 15 minutos
11. Centrifugar a 15,300 g por 10 minutos a temperatura ambiente (imagen 13).
12. Transferir el sobrenadante a tubos nuevos de 2.0 mL usando tips cortados (*4).
13. Adicionar 1,200 µL de Tampón de precipitación CTAB al sobrenadante.
14. Mezclar la solución (*5).
15. Centrifugar a 15,300 g por 10 minutos a temperatura ambiente (*6).
16. Descartar el sobrenadante.
17. Adicionar 100 µL de NaCl 1 M y 0.1 µL de ARNasa (*7).
18. Mezclar, agitar en vortex, y girar para decantar.
19. Colocar las muestras en un incubador o baño de agua a 37°C y agitar la solución hasta que el precipitado (PPT) esté completamente disuelto en la solución de NaCl.
20. Girar para decantar.
21. Adicionar 200 µL de etanol 99.5% almacenado a −20°C.
22. Mezclar la solución (*8).
23. Centrifugar a 15,300 g por 10 minutos a temperatura ambiente (imagen 14).

24. Descartar el sobrenadante.
25. Escurrir el sobrenadante invirtiendo los tubos sobre un papel.
26. Adicionar 50–100 µL de TE 10% (*9).
27. Mezclar la solución hasta que el PPT esté completamente disuelto en TE 10%.
28. Mantener las muestras a 4°C para almacenaje de corto plazo (por unas pocas semanas) o a -20°C para almacenaje de largo plazo.



*1: No descongelar la muestra antes de adicionar el CTAB 1.5X.

*2: En el caso de un rotor Eppendorf, F45-30-11, la centrifugación debería ser realizada a **15,300 g o 12,000 rpm.**

*3: Una campana de extracción química debería ser usada por seguridad.

*4: No pipetear la capa blanca del medio.

*5: Algunas veces aparece el PPT. En este paso, es posible suspender la extracción almacenando la solución por un día a 4°C.

*6: Un PPT de ADN blancuzco podría ser observado; sin embargo, este no siempre es visible.

*7: Preparar una mezcla de NaCl y ARNasa con antelación. En este paso, es posible suspender el proceso de extracción de ADN almacenando la muestra a 4°C por 1 día.

*8: En este paso debe observarse un PPT blancuzco de ADN. Es posible suspender la extracción en este paso almacenando la muestra a -20°C por 1 día.

*9: El volumen del Tampón TE podría ser cambiado dependiendo del tamaño del PPT (Más Tampón es necesario para PPT más grandes).

(Requerimientos)

· **Tampón CTAB 1.5×** (7.5 g de CTAB + 30.7125 g de NaCl + 37.5 mL de Tris 1 M + 15 mL de EDTA 0.5 M para 500 mL, autoclave)

· **CIAA** (24:1, 500 mL de cloroformo + 20.83 mL de alcohol isoamilico)

· **Tampón de precipitación CTAB** (10 g de CTAB + 50 mL de Tris-HCl 1 M + 20 mL de EDTA 0.5 M para 1 L, autoclave)

· **NaCl 1 M** (5.844 g de NaCl para 100 mL, autoclave)

· **ARNasa** (ribonucleasa A, 10 mg/mL)

· **Etanol 99.5%** (almacenado a −20°C)

· **Tampón TE 10%** (10 mL de Tampón TE + 90 mL de H_2Od, autoclave)

· **Tris-HCl 1.0 M (pH = 8.0)** (disolver 60.55 g de Tris-HCl en 350 mL de H_2Od, ajustar el pH a 8.0 con HCl, completar el volumen hasta 500 mL adicionando H2Od, autoclave)

· **EDTA 0.5 M (pH = 8.0)** (disolver 55.83 g de EDTA en 180 mL de H_2Od, ajustar el pH a 8.0 con NaOH 10 N, completar el volumen hasta 300 mL adicionando H_2Od, autoclave)

· **Tampón TE** (5 mL de Tris-HCl 1 M + 1 mL de EDTA 0.5 M para 500 mL, autoclave)

· **HCl** (para ajustar pH, HCl 50% es más fácil de manejar)

· **NaOH 10 N** [para ajustar pH, 100 g de NaOH+ 60 mL de H2Od (autoclavada); completar el volumen hasta 250 mL adicionando H_2Od]

· Microtubos (2 mL, 1.5 mL)

· Microondas

· Incubador a 56°C o Baño de agua (con agitador)

· Vortex

· Centrifuga (para microtubos de 2.0- y 1.5-mL)

· Campana química (para uso de cloroformo)

· Agitador orbital

· Freezer a −20°C y −80°C

· Refrigerador a 4°C

2-3. Ajuste de la concentración de ADN

Un espectrofotómetro (tal como NanoDrop, Thermo Fisher Scientific Inc.) es deseable para una medida exacta y eficiente. Para el análisis de marcadores SSR, no siempre es necesario el ajuste exacto de la concentración de ADN. En su lugar, la concentración de ADN puede ser estimada usando electroforesis en gel de agarosa. Además, una persona entrenada puede pasar por alto el proceso de diluir el ADN extraído si la cantidad de ADN extraída puede ser estimada en base a su experiencia. Se debe tener en cuenta que para la PCR no es deseable utilizar ni grandes, ni pequeñas cantidades de templado de ADN. Asimismo se debe prestar atención a la contaminación con bromuro de etidio (EtBr). Si se prefieren colorantes inocuos como el "GelRed™" (Biotium, Inc.), consulte la sección "2-5. Electroforesis en gel de acrilamida" para más detalles.

(Protocolo)

1. Preparar un del de agarosa al 0.8% y el Tampón de electroforesis para sistema Mupid usando TBE 0.5×.
2. Preparar una solución de carga o "loading" (3 µL de solución de DNA + 1 µL de tampón de carga o "loading", ver Tabla 5; confirmar que el PPT DNA este completamente disuelto).
3. Cargar la solución en los pocillos del gel. (Ej. Calle 1: referencia 10 ng/µL; Calle 2: referencia 20 ng/µL; Calle 3: referencia 50 ng/µL; Calle 4: referencia 100 ng/µL; Calle 5: muestra de ADN extraído con dilución 20×).
4. Realizar la electroforesis a 100 V por 20 minutos.
5. Teñir el gel con solución de EtBr por 10 minutos.
6. Visualizar las bandas de ADN bajo transiluminador UV.
7. Fotografiar el gel (si el gel está muy teñido, colocarlo en H2Od por 10 minutos).
8. Determinar la concentración aproximada en comparación con el ADN de Referencia (Si la señal de la muestra es igual al ADN de Referencia 50 ng/µL, la concentración de la muestra de ADN es 50 ng/µL × 20, lo cual es equivalente a 1,000 ng/µL; ver Figura 7).
9. Preparar 100 µL de solución de ADN 50 ng/µL para cada muestra.

Tabla 5. Ejemplo de preparación de soluciones de ADN para chequeo.

Calle	Patrones y muestras	Preparación de soluciones para chequeo
1	Referencia 10 ng/µL *	3 µL de Solución de ADN de referencia 10 ng/µL + colorante de carga 10×
2	Referencia 20 ng/µL *	3 µL de Solución de ADN de referencia 20 ng/µL + colorante de carga 10×
3	Referencia 50 ng/µL *	3 µL de Solución de ADN de referencia 50 ng/µL + colorante de carga 10×
4	Referencia 100 ng/µL *	3 µL de Solución de ADN de referencia 100 ng/µL + colorante de carga 10×
5	Solución de ADN extraído**	3 µL de Solución de ADN extraído diluido a 20× con TE 10%

*Todas las soluciones de ADN de referencia son preparadas desde una solución 100 ng/µL por dilución serial.

**La concentración de ADN extraído generalmente se ubica en el rango de 400 a 2,000 ng/µL.

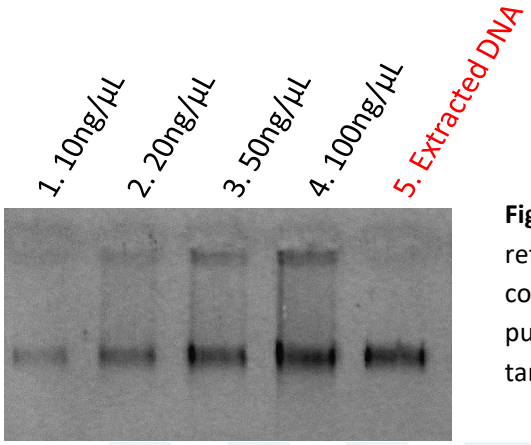


Figura 7. Imagen del gel de las muestras de ADN de referencia estándar y del ADN extraído. Comparado con los ADN's de referencia, el nuevo ADN extraído puede ser similar al de la calle 3. 50ng/µL, y por lo tanto, estimado como 50ng/µL X 20= 1000ng/µL

(Requirementos)

· **Tampón TBE 0.5×** (dilución 20× de TBE 10× usando H_2Od)

· **Agarosa** (para electroforesis)

· **Solución EtBr** (15 µL de 10 mg/mL solución EtBr en 300 mL de H_2Od autoclavada; en lugar de EtBr, se recomienda el uso de sustancias químicas menos dañinas, tal como GelRed™)

· **Solución de carga o Loading (10×)** [0.25% azul de bromofenol + 0.25% xilencianol + 40% (p/v) sacarosa, autoclave]

· **Solución de ADN de Referencia (10, 20, 50, y 100 ng/µL)** (ADN λ /ADN genómico de soja cuya concentración se ha ajustado exactamente de antemano)

· **TBE 10×** (54 g de Tris + 55 g de ácido bórico + 20 mL de EDTA 0.5 M por 500 mL, autoclave)

· Sistema Mupid® (Advance Co. Ltd.)

· Transiluminador UV

· Cámara (con filtro para UV)

2-4. PCR (para marcadores SSR)

En lugar de "Quick Taq® HS DyeMix" (Toyobo Co., Ltd.) utilizada en este manual, varias *Taq* polimerasas pueden ser usadas para la amplificación de SSR. Sin embargo, en caso de que se utilicen otras *Taq* polimerasas, las condiciones (composición de reactivos de PCR, condición térmica de PCR, etc.) también necesitarían ser cambiadas para evitar bandas poco claras que pudieran producirse debido a la amplificación inespecífica o baja eficiencia de amplificación específica. Las secuencias de todos los cebadores o "primers" SSR de soja nombrados en este manual están disponibles en SoyBase (Grant et al., 2010).

(Protocolo)

1. Preparar, en hielo, la siguiente mezcla para la reacción de PCR (Tabla 6) para cada marcador SSR.

Tabla 6. Composición de los reactivos para PCR

Reactivos de PCR	Para una reacción	Para 17 reacciones
H_2Od	3 µL	51 µL
Quick Taq® HS DyeMix 2×	5 µL	85 µL
primers 5 µM (forward + reverse)	1 µL	17 µL
ADN 50 ng/µL	1 µL	-
Total	10 µL	9 µL × 17*

*Si 14 plantas BC_1F_1 necesitan ser chequeadas, debe ser preparada una solución maestra ("master mix") para un total de 17 reacciones (14 BC_1F_1 + dos padres + una adicional para reserva).

2. Adicionar 9 µL de la mezcla a microtubos de 0.25-mL, placas para PCR de 96 o 384 pocillos.
3. Adicionar 1 µL de solución de ADN 50 ng/µL.
4. Sellar o tapar los microtubos.
5. Mezclar la solución y girar para decantar los tubos.
6. Colocar en el ciclador térmico e iniciar la reacción usando las condiciones descriptas en la Tabla 7.
7. Sacar las muestras de PCR del ciclador térmico.
8. Girar para decantar los tubos, adicionar 1 µL del colorante de carga 10×, mezclar bien, y girar para decantar los tubos nuevamente. (*1)
9. Usar los productos de PCR para electroforesis o preservar a −20°C por unos pocos días hasta la electroforesis.

*1: Aunque la solución " Quick Taq® HS DyeMix" contiene el colorante de carga, la adición de colorante de carga 10 × para los productos de PCR facilitará la carga de las muestras de PCR en los pocillos del gel.

Tabla 7. Condiciones térmicas para PCR

Pasos	Temperatura	Tiempo
1. Precalentamiento, desnaturalización	96°C	2 min
2. Desnaturalización	94°C	1 min
3. Hibridación	48°C	1 min
4. Extensión	68°C	1 min
5. Repetir 32 veces los pasos 2–4		
6. Conservación	10°C/4°C	-*

*Hasta quitar los productos de la máquina.

(Requerimientos)

- **H2Od Autoclavada** (usar solo para PCR)
- **Quick Taq® HS DyeMix 2×** (Toyobo Co., Ltd., conservada a −20°C)
- **Primers o Cebadores** (solución de trabajo conteniendo 5 µM de primers de avance o "forward" y 5 µM de primers de retroceso o "reverse", cada uno preparado a partir de 100 µM de solución stock de primers forward y 100 µM de solución stock de primers reverse y Tampón TE)
- **Solución de ADN 50 ng/µL** [muestras de prueba, padres, y una planta heterocigota (F_1)]
- **Microtubos de 1.5-mL** (para la solución maestra)
- **Microtubos de 0.25-mL /placas de 96- (384) pocillos** (para reacción de PCR, junto con las tapas o sellos)
- **Colorante de carga (10×)** [0.25% de azul de bromofenol + 0.25% de xylencianol + 40% (p/v) sacarosa, autoclavar]

- Ciclador térmico para 96 pocillos o 384 pocillos.

2-5. Electroforesis en gel de acrilamida

Aquí, describimos una unidad de electroforesis de placas de gel de acrilamida de 16-cm^2 (Nihon Eido, Co.). En JIRCAS, son utilizadas dos unidades de electroforesis con cuatro geles (NA-1114) y seis geles (NA-1116) (Yamanaka et al., 2006, 2007a, 2007b) (imagen 15). Estas unidades son también utilizadas en Embrapa-Soja (Brazil), Nikkei-Cetapar (Paraguay), IPTA (Paraguay), INTA (Argentina), INIA (Uruguay) y BSMRAU (Bangladesh).

En lugar de bromuro de etidio (EtBr), se recomienda el uso de sustancias químicas menos dañinas como GelRed™ (Biotium, Inc.) para la tinción del gel, pese a que el EtBr sea uno de los químicos más rentables para este propósito. Este manual proporciona protocolos utilizados en JIRCAS para EtBr y también para GelRed™. El sistema de detección (para visualizar las bandas de productos de PCR) empleado para GelRed™ es el mismo que el utilizado para EtBr. Si se utiliza otro productos de tinción que no sea EtBr / GelRed™, se debe comprobar si el sistema de detección es apropiado.

Para la visualización de productos amplificados, pueden ser utilizados varios escáneres de geles. Dichos escáneres son útiles para fotografías múltiples geles (hasta 9 geles) con una alta calidad de imagen. En JIRCAS, son usados "Typhoon 9410 (GE Healthcare)" y "Pharos FX™ (Bio-Rad)."

Imagen: NA-1116 (Izquierda) y NA-1114 (derecha)

(Protocolo)

1. Limpie las placas de vidrio y peines con etanol al 99,5%.
2. Montar las placas de vidrio con las tiras de silicona y clips.
3. Prepare la solución para el gel de corrida o "running gel" utilizando un matraz cónico con un agitador (ver Tabla 8).
4. Verter la solución de gel de corrida (aproximadamente 16 ml por unidad) entre un par de placas de vidrio.
5. Verter H2Od sobre la solución de gel de corrida hasta cubrirlo, para iniciar la polimerización del gel.
6. Luego de completada la polimerización, remover el agua usando papel de filtro.
7. Preparar la solución de gel de apilamiento o "stacking gel" usando tubo Falcon® de 50-mL (o 15-mL) (ver Tabla 8).
8. Verter la solución de gel de apilamiento (aproximadamente 3 mL por unidad) entre el par de placas de vidrio.
9. Insertar los peines entre las placas de vidrio.

10. Luego de completada la polimerización, quitar los peines del gel bajo agua corriente (*1).
11. Lavar los pocillos con agua utilizando una jeringa hipodérmica para remover cualquier excedente liquido del gel de apilamiento (*2).
12. Retirar las tiras de silicona y los clips.
13. Preparar la unidad de electroforesis y verter el tampón Tris-glicina en la unidad (* 3).
14. Cargar los productos de PCR y el marcador de peso molecular en los pocillos (*4).
15. Iniciar la electroforesis (*5).
16. Parar la electroforesis 0–30 min después que la banda de xilencianol haya migrado fuera del gel.
17. Quitar los geles de las placas de vidrio (*6).
18. Teñir el gel con solución de EtBr (10 µL/200 mL H_2Od) por 10 min (*7).
19. Visualizar las bandas de ADN bajo un transiluminador UV.
20. Fotografiar el gel.
21. Asignar genotipos a las plantas de soja.

Tabla 8. Composición de los geles de corrida y apilamiento.

Gel de corrida	Para 1 gel	2	3	4	5	6
Solución stock de acrilamida 30	10.0 mL	20.0 mL	30.0 mL	40.1 mL	50.1 mL	60.1 mL
H_2Od	3.7 mL	7.4 mL	11.1 mL	14.9 mL	18.6 mL	22.3 mL
Tris-HCl 1.5 M (pH 8.8)	4.7 mL	9.5 mL	14.2 mL	18.9 mL	23.6 mL	28.4 mL
APS 10%	71.8 µL	143.6 µL	215.3 µL	287.1 µL	358.9 µL	430.7 µL
TEMED	17.8 µL	35.6 µL	53.3 µL	71.1 µL	88.9 µL	106.7 µL
Total	18.5 mL	37.1 mL	55.6 mL	74.2 mL	92.7 mL	111.2 mL

Gel de apilamiento	Para1 gel	2	3	4	5	6
Solución stock de acrilamida 30	0.7 mL	1.4 mL	2.0 mL	2.7 mL	3.4 mL	4.1 mL
H_2Od	2.3 mL	4.6 mL	6.9 mL	9.2 mL	11.5 mL	13.8 mL
Tris-HCl 0.5 M (pH 6.8)	1.1 mL	2.2 mL	3.2 mL	4.3 mL	5.4 mL	6.5 mL
APS 10%	33.8 µL	67.5 µL	101.3 µL	135.0 µL	168.8 µL	202.5 µL
TEMED	4.5 µL	9.0 µL	13.5 µL	18.0 µL	22.5 µL	27.0 µL
Total	4.1 mL	8.2 mL	12.3 mL	16.4 mL	20.4 mL	24.5 mL

* 1: Retirar los peines tan pronto como detecte la formación del pocillo.

* 2: Eliminar totalmente cualquier excedente de la solución de gel de apilamiento.

* 3: El tampón de corrida puede ser utilizado varias veces (por lo general una o dos veces); sin embargo, el uso múltiple prolonga la duración de la electroforesis.

* 4: Los marcadores peso molecular se utilizan como referencia para calcular los tamaños de las bandas polimórficas en la selección asistida por marcadores y para identificar cualquier problema en la electroforesis en caso de que no se observen bandas nítidas.

* 5: Realizar la electroforesis a 300 V durante aproximadamente 5-6 h. También es posible realizar la electroforesis durante la noche a un voltaje menor (50-60 V). Para la electroforesis nocturna, el voltaje podría ser establecido al principio a 300V por 15 min, luego cambiado a 50-60 V durante la noche y vuelto a cambiar a 300V en la mañana hasta completar la electoforesis.

* 6: Confirmar la dirección del gel (el frente y la parte posterior, y los lados derecho e izquierdo)

* 7: Para el sistema "GelRed™", consulte el siguiente protocolo adicional:

(Protocolo para el sistema de tinción GelRed™)

Preparación de la solución de tinción "GelRed™"

1. Mezclar 67,5 µl de GelRed™ en 450 ml de H_2O destilada.
2. Use esta solución aproximadamente siete veces para tres a seis geles (para Pharos FX™).
3. Si la señal del pocillo no puede ser vista, aumentar la concentración GelRed™ o disminuir el número de veces que se utiliza la solución.

Protocolo

1. Trasladar los geles a la solución de tinción GelRed™
2. Agitar suavemente en un agitador durante 1 hora a temperatura ambiente.
3. Transferir los geles a H_2Od para su escaneo.
4. Escanear los geles utilizando un escáner (Typhoon o Pharos FX™) o fotografiar bajo un transiluminador UV.

(Requerimientos)

· **Tris-HCl 1.5 M (pH = 8.8)** (disolver 90.825 g de Tris-HCl en 400 mL de H_2Od, ajustar el pH a 8.8 con HCl, completar el volumen a 500 mL por adición de H_2Od, autoclavar)

· **Tris-HCl 0.5 M (pH = 6.8)** (disolver 30.275 g de Tris-HCl in 400 mL de H_2Od, ajustar el pH a 6.8 con HCl, completar el volumen a 500 mL por adición de H_2Od, autoclavar)

· **Solución stock de acrilamida 30%** (disolver 150 g de monómero de acrilamida + 4 g de N,N'-metilenobisacrilamida en 500 mL de H_2Od, filtrar a través de un filtro 0.4–0.8-µm, conservar a 4°C)

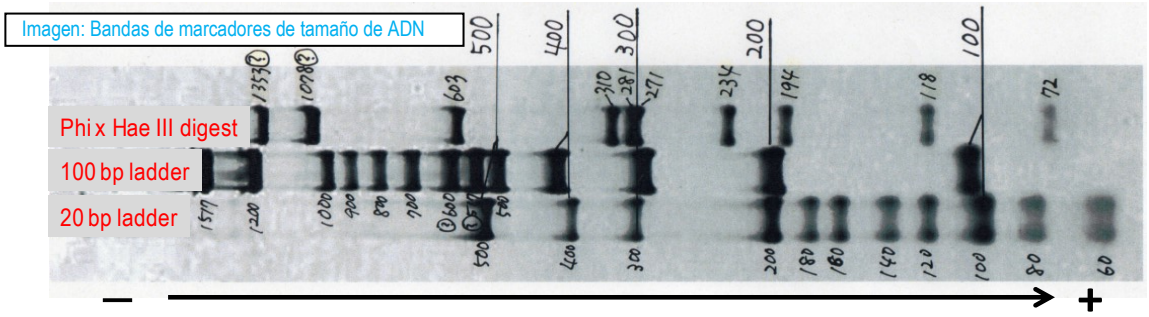
· **H2Od autoclavada** (para dilución, 500 mL, autoclave)

· **APS 10%** (peroxidisulfato de amonio, disolver 100 mg en 1 mL de H_2Od autoclavada, conservar a −20°C después de la preparación)

· **TEMED** (N,N,N,N-tetrametil etilenodiamina, 4°C)

· **Tampón Tris-glicina** (preparar una dilución 1× a partir de la solución de Tris-glicina 10x por adición de H_2Od

· **Marcador de Peso molecular** o "ladder" (para marcadores SSR, es usado un marcador de tamaño –escalonado- de 20-bp/marcador digerido PhiX-*Hae*III) (ver imagen para chequear el patrón y tamaño de bandas en gel de acrilamida)



· **Solución EtBr** (15 µL/300 mL de H_2Od autoclavada, 4°C)/ **Solución GelRed™** (a temperatura ambiente)

· **Etanol 99.5%** (para limpieza de las placas de vidrio)

· **Tris-glicina 10×** (30.3 g de Tris + 144.1 g de glicina para 1 L, autoclavar)

· Unidad de electroforesis en gel de acrilamida (Nihon Eido Co., NA-1114 o NA-1116)

· Agitador magnético

· Pipeta de medición / cilindro graduado (para medir la solución de gel)

· Frasco cónico

· Papel de filtro (cortado en trozos pequeños)

· Jeringa hipodérmica

· Suministro de energía eléctrica

· Espátula (para el pesaje de cantidades pequeñas de reactivos en polvo y para la separación del gel de las placas de vidrio)

· Transiluminador UV / escáner de gel

· Cámara fotográfica (con filtro para UV)

2-6. Análisis de datos

Para determinar si las plantas retrocruzadas llevan los alelos de resistencia específicos para *Rpp*, considerando la recombinación entre los marcadores SSR y el *Rpp,* se deben seleccionar los dos marcadores polimórficos más cercanos que flanqueen el Rpp. Cuando una variedad recurrente se cruza con F_1 (o plantas retrocruzadas), una proporción de 1: 1 indica que la progenie es homocigota o heterocigota para el alelo del padre recurrente.

La Figura 8 muestra un ejemplo de selección asistida por marcadores (MAS) en plantas BC_1F_1. Si las plantas BC_1F_1 que son heterocigotas para un marcador de SSR que flanquea la localización genómica de *Rpp4* son también heterocigóticas para el otro marcador que flanquea la localización genómica opuesta del mismo gen (Silva et al, 2008; García et al., 2008; Yamanaka et al, 2008; Lemos et al, 2011), la progenie podría ser considerada como portadora del alelo de resistencia del gen de resistencia en un estado heterocigoto y podría ser utilizado para el siguiente retrocruzamiento. Actualmente están disponibles materiales de soja resistentes para MAS incluidas líneas con *Rpp* apilados o piramidados (Tabla 9) y variedades portadoras de cada uno de los *Rpp1-6* (Tabla 10).

Como referencia, en las Figuras 9 a-d se muestran los mapas de ligamiento genético alrededor de las regiones *Rpp*. Los mapas ayudarán en la selección de marcadores SSR para su material genético a mejorar. Tabla 11 lista los marcadores que nuestro grupos trabaja para hacer MAS. Estos marcadores fueron seleccionados basado en mapas (Figures 9 a-d).

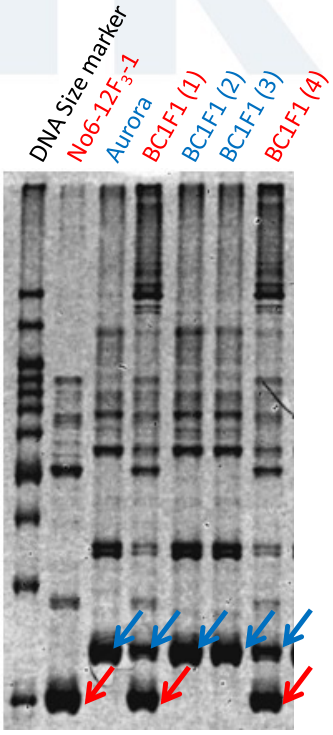


Figura 8. Imagen en gel de los productos de PCR para el marcador SSR Satt288 ligado a *Rpp4*. El padre no recurrente, "No6-12F_3-1" es portador del alelo de resistencia de *Rpp4*, pero el parental recurrente "Aurora" no lo posee. De las 4 plantas BC1F1, la BC1F1 (1) y (4) son heterocigotas para el locus Satt288 pero (2) y (3) son homocigotas para el padre recurrente.

Banda de PCR derivada de "Aurora"

Banda de PCR derivada de "No6-12F_3-1"

Tabla 9. Lineas con genes *Rpp*-piramidados desarrolladas por JIRCAS hasta el 2019[a]. Todas las líneas listadas aquí son consideradas como línea pura, pues alcanzaron la generación de F_8 por SSD.

Nombre	***Rpp***	Parental femenino	Parental masculino
Dos genes			
Mo84-6	***Rpp1 + Rpp2***	PI 200492	An76-1
Py4-4-12-3	***Rpp1 + Rpp3***	Mo84-6	Hyuuga
Mo83-7	***Rpp1 + Rpp4***	PI 200492	An76-1
Py7-1-82	***Rpp1-b + Rpp2***	PI587880A	No12-1-A
Py5-2-24-13	***Rpp1-b + Rpp4***	No6-12-B	PI587880A
Py7-1-47	***Rpp1-b + Rpp5***	PI587880A	No12-1-A
Oy7-5-9	***Rpp2 + Rpp3***	An76-1	Hyuuga
An76-1	***Rpp2 + Rpp4***	BRS 184 × PI 230970	BRS 184 × PI 459025
No12-1-A	***Rpp2 + Rpp5***	An76-1	Kinoshita
Oy15-3	***Rpp3 + Rpp4***	An76-1	Hyuuga
Py8-1-15-11	***Rpp3 + Rpp5***	No12-1-A	Hyuuga
No6-12-B	***Rpp4 + Rpp5***	An76-1	Kinoshita
Tres genes			
Py4-4-5	***Rpp1 + Rpp2 + Rpp3***	Mo84-6	Hyuuga
Mo42-1	***Rpp1 + Rpp2 + Rpp4***	PI 200492	An76-1
Py7-1-8-5	***Rpp1-b + Rpp2 + Rpp5***	PI587880A	No12-1-A
Py5-2-31-3	***Rpp1-b + Rpp4 + Rpp5***	No6-12-B	PI587880A
Oy49-4	***Rpp2 + Rpp3 + Rpp4***	An76-1	Hyuuga
Py8-1-15-6	***Rpp2 + Rpp3 + Rpp5***	No12-1-A	Hyuuga
No6-12-1	***Rpp2 + Rpp4 + Rpp5***	An76-1	Kinoshita
Py6-1-17	***Rpp3+ Rpp4 + Rpp5***	Hyuuga	No6-12-B
Cuatro genes			
Py1-1-45	***Rpp1 + Rpp2 + Rpp3 + Rpp4***	Mo42-1	Oy49-4
Py2-3-39	***Rpp1 + Rpp2 + Rpp4 + Rpp5***	No6-12-1	Mo42-1
Py3-1-31	***Rpp2 + Rpp3 + Rpp4 + Rpp5***	Oy49-4	No6-12-1

[a] Estos líneas con *Rpp*-piramidados puedes ser distribuidas para uso de investigación con un acuerdo Material Transfer Agreement (MTA) así como también el set de variedades diferenciales mostradas en la Tabla 1.

Tabla 10. Variedades Resistentes a RAS

Nombre de la línea	Número de PI	*Rpp* [a]	Origen	No. Dif. [b]	Referencia
Komata	PI 200492 [c]	*Rpp1*	Japón	RDV1	Hyten et al. (2007)
Bai Dou	PI 587886	*Rpp1*	China	RDV2	Ray et al. (2009)
Xiao Jin Huang	(No asignado)	*Rpp1*	China	-	Yamanaka et al. (2015)
Himeshirazu	PI 594177	*Rpp1*	Japón	-	Yamanaka et al. (2015)
Jia Bai Jia	PI 587855	*Rpp1-b*	China	-	Yamanaka et al. (2016)
Huang Dou	PI 587880A	*Rpp1-b* [?]	China	RDV9	Ray et al. (2009)
Xiao Huang Dou	PI 587905	*Rpp1-b* [?]	China	-	Hossain et al. (2014)
Zhao Ping Hei Dou	PI 594767A	*Rpp1-b* [?]	China	RDV10	Hossain et al. (2014)
Min Hou Bai Sha Wan Dou	PI 594538A	*Rpp1-b*	China	-	Chakraborty et al. (2009)
Gou Jiao Huang Dou	PI 594760B	*Rpp1, rpp1*	China	-	Garcia et al. (2011)
Jin Yun Dou	PI 561356	*Rpp1*	China	-	Kim et al. (2012)
No. 3	PI 230970 [d]	*Rpp2*	Japón	RDV3	Silva et al. (2008)
Hougyoku	PI 224270	*rpp2*	Japón	-	Garcia et al. (2008)
Iyodaizu B	(No asignado) [e]	*Rpp2*	Japón	-	Yamanaka et al. (2015)
Ankur	PI 462312	*Rpp3*	India	RDV4	Hyten et al. (2009)
Akasaya	PI 416764	*Rpp3*	Japón	RDV5	Hossain et al. (2014)
Hyuuga [f]	PI 506764	*Rpp3* [g]	Japón	-	Monteiros et al. (2007)
FT-2 [h]	PI 628932	*Rpp3*	Brasil	-	Brogin et al. (2005)
MARIF 2740	PI 567099A	*Rpp3* [i]	Indonesia	-	Ray et al. (2011)
Bing Nan	PI 459025	*Rpp4*	China	RDV6	Silva et al. (2008)
Takema	PI 423972	*Rpp4-b*	Japón	-	King et al. (2017)
Shiranui	PI 200526	*Rpp5*	Japón	RDV7	Garcia et al. (2008)
Awashima Zairai	PI 200456	*Rpp5*	Japón	-	Garcia et al. (2008)
Kinoshita	PI 200487	*Rpp5*	Japón	-	Garcia et al. (2008)
Orba [j]	PI 471904	*rpp5*	Indonesia	-	Garcia et al. (2008)
MARIF 2767	PI 567102B	*Rpp6* [k]	Indonesia	RDV8	Li et al. (2012)
-	PI 605823	*Rpp7*	Vietnam	-	Childs et al. (2018)

Dado que los genes de resistencia están mapeados con marcadores moleculares, podemos utilizarlos en el mejoramiento asistido por marcadores para RAS. Parte de la información se obtuvo de los sitios web del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) y del Instituto Nacional de Ciencias Agrobiológicas de Japón (NIAS).

[a] Los genes de resistencia se representan como *Rpp* (si el alelo resistente es dominante) o *rpp* (si el alelo resistente es recesivo), respectivamente.

[b] Número de identificación de las variedades diferenciales (Tabla 1).

[c] PI 368039 (Tainung 4: Dif. No. 2) deriva de PI 200492, por lo que podrían compartir el mismo alelo *Rpp1* (Boerma et al. 2011).

[d] Se ha reportado que PI 197182, PI 230971 y PI 417125 (Dif. No. 4) portan el mismo *Rpp2* que PI 230970 (Laperuta et al. 2008).

[e] Varias PIs están presentes para 'Iyodaizu'.

[f] Se reportó que PI 506764 (Hyuuga) porta también *Rpp5* (Kendrick et al. 2011).

[g] 'Hyuuga' deriva de 'Asomusume' × 'Akasaya' por lo que presentaría el mismo alelo *Rpp3* que 'Akasaya'

[h] La variedad resistente a RAS, 'BRSMS-Bacuri' deriva de 'FT-2' por lo que presentaría el mismo alelo resistente *Rpp3.*

[i] Se ha reportado que PI 567099A porta el gen *Rpp3* u otro gen cercano a *Rpp3* (Ray et al. 2011).

[j] La variedad taiwanesa resistente a RAS, 'TK 5' (Dif. No. 15) se desarrolló a partir de 'Orba'.

[k] La otra variedad Indonesian variedad, PI 567104B es reportada como portadorea de *Rpp6* u otro gen cerca del mismo (Liu et al. 2016)

Sitio web de USDA: http://www.ars-grin.gov/npgs/acc/acc_queries.html
Sitio web de NIAS: http://www.gene.affrc.go.jp/index_en.php

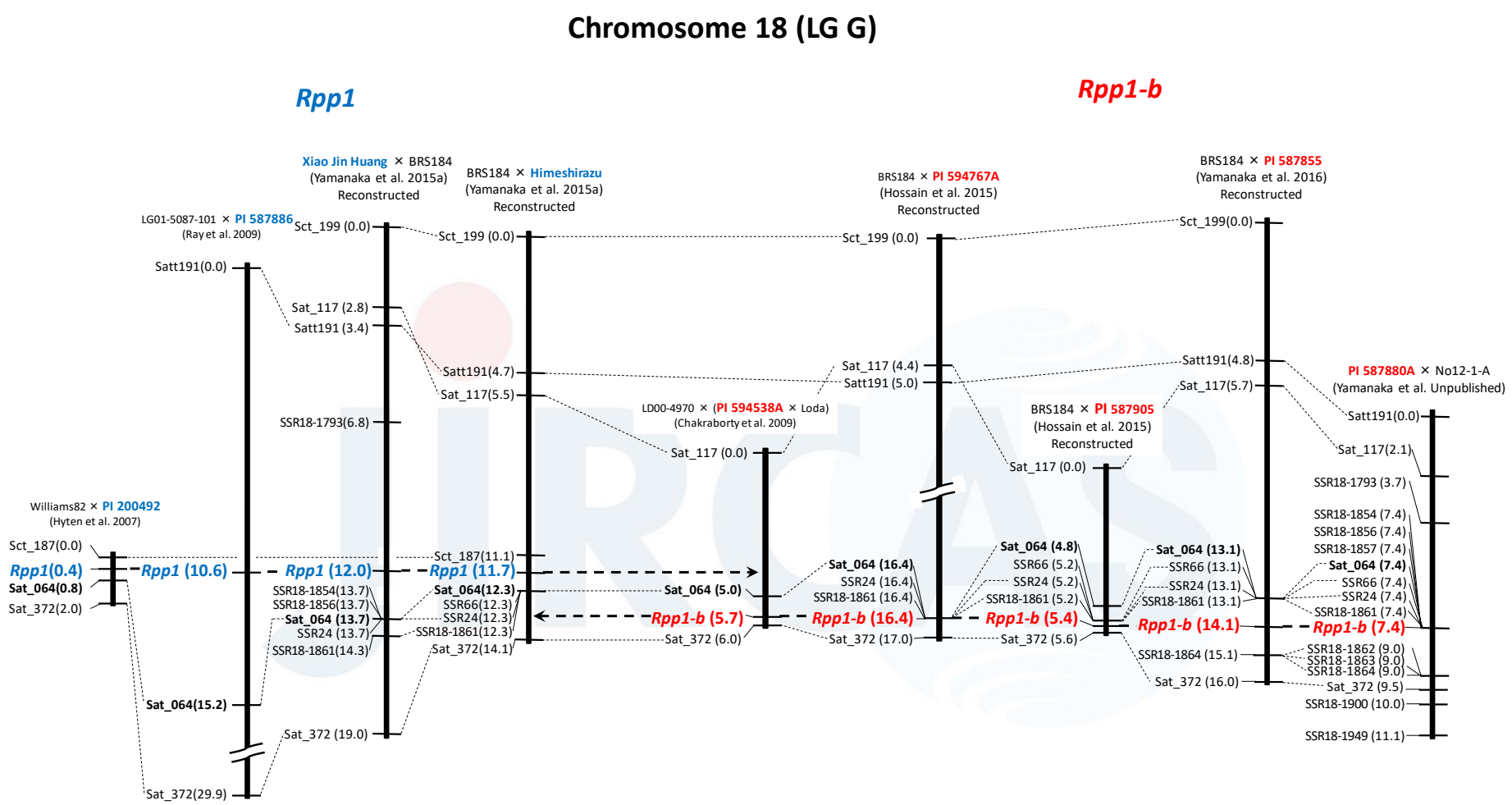


Figura 9a. Mapa de ligamiento genético del cromosoma 18 (grupo de ligamiento: LG G) donde se localizan *Rpp1* y *Rpp1-b*. Nuestros mapas de ligamiento (Hossain et al., 2015; Yamanaka et al., 2015a; 2016; no publicado) se muestran junto con los mapas de ligamiento previamente reportados (Chakraborty et al., 2009; Hyten et al., 2007; Ray et al., 2009). El nombre del marcador, la distancia desde la parte superior del grupo de ligamiento y el nombre del *Rpp* se muestran en la izquierda de cada grupo de ligamiento. El locus *Rpp1* y las variedades portadoras de *Rpp1* se muestran en azul y el locus *Rpp1-b* y las variedades portadores de *Rpp1-b* se muestran en rojo, respectivamente.

Chromosome 16 (LG J)

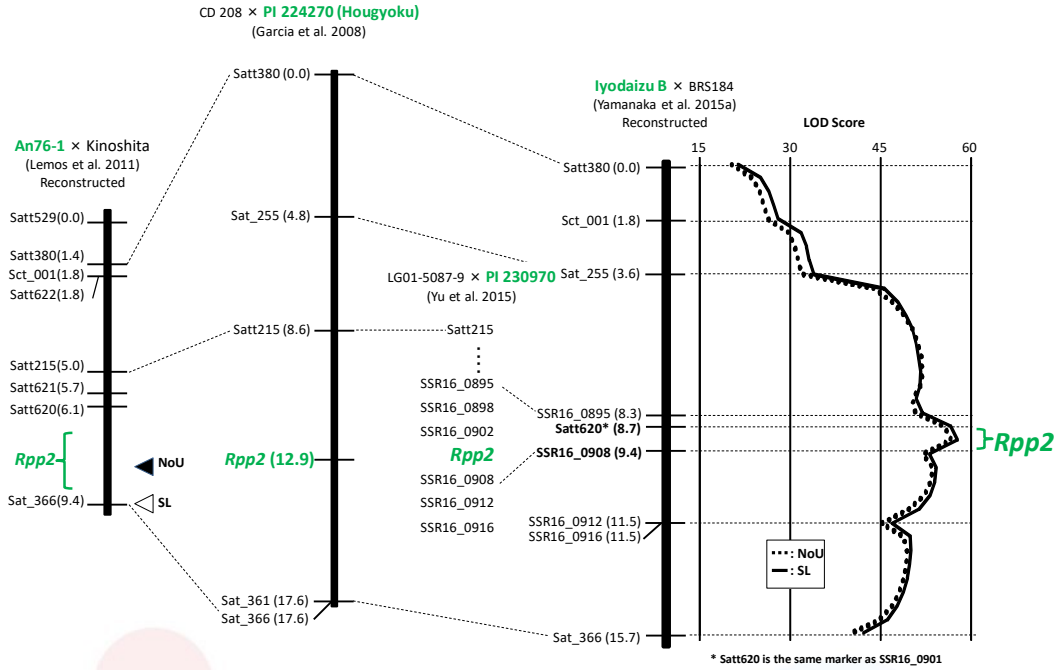


Figura 9b. Mapa de ligamiento genético del cromosoma 16 (LG J) donde se localiza *Rpp2*. Nuestro mapa (A la derecha: modificado de Yamanaka et al., 2015a; A la izquierda: modificado de Lemos et al., 2011) se muestra junto con mapas reportados previamente (Garcia et al., 2008; Yu et al., 2015). El nombre del marcador, la distancia desde la parte superior del grupo de ligamiento y el nombre del *Rpp* se muestran a la izquierda de cada grupo de ligamiento. El locus *Rpp2* y las variedades portadoras de *Rpp2* se muestran en verde. A la derecha del grupo de ligamiento de nuestro mapa para *Rpp2*, también se muestran las curvas LOD de los QTL para NoU y SL, junto a los picos de las curvas LOD (puntas de flecha).

Chromosome 6 (LG C2)

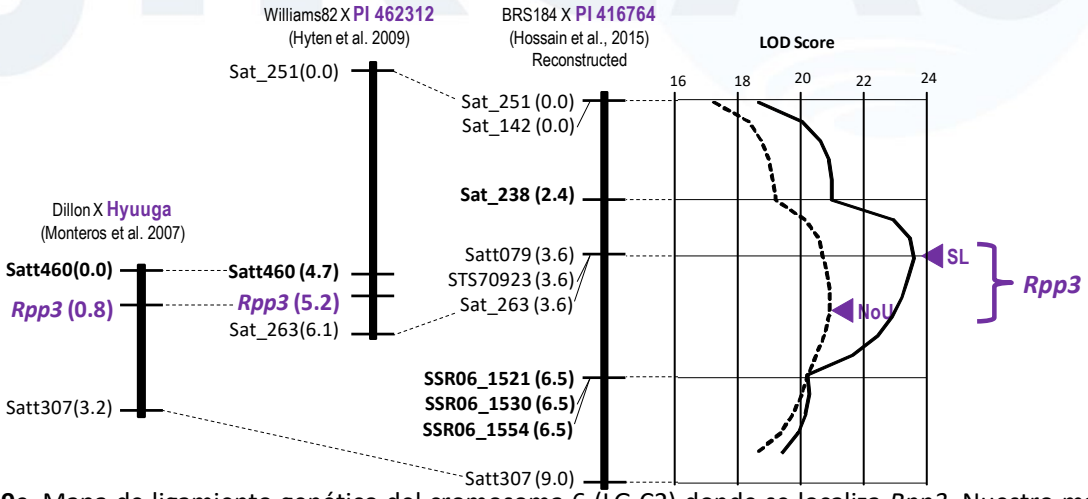


Figura 9c. Mapa de ligamiento genético del cromosoma 6 (LG C2) donde se localiza *Rpp3*. Nuestro mapa (extremo derecho, Hossain et al., 2015) se muestra junto con los mapas reportados previamente (Montero et al., 2007; Hyten et al., 2009). El nombre del marcador, la distancia desde la parte superior del grupo de ligamiento y el nombre del *Rpp* se muestran en la izquierda de cada grupo de ligamiento. El locus *Rpp3* y las variedades portadoras de *Rpp3* se muestran en morado. A la derecha del grupo de ligamiento de nuestro mapa para *Rpp3,* también se muestran las curvas LOD de los QTL para NoU y SL, junto a los picos de las curvas LOD (puntas de flecha).

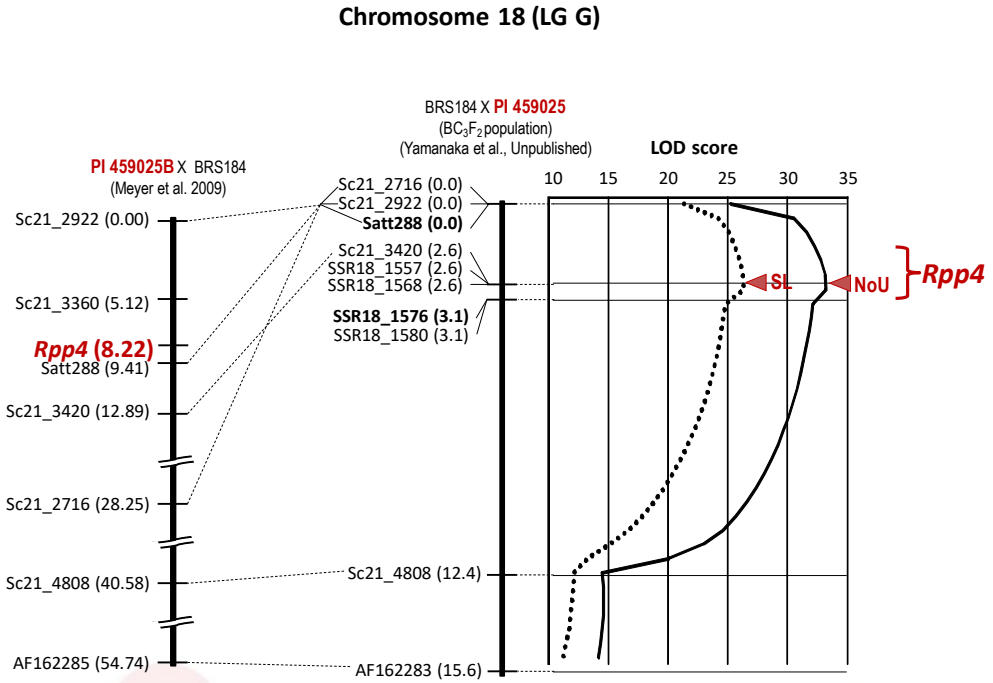


Figura 9d. Mapa de ligamiento genético del cromosoma 18 (LG G) donde se localiza *Rpp4*. Nuestro mapa (derecho, Yamanaka et al., inédito) se muestra junto con la mapa reportados previamente (Meyer et al., 2009). El nombre del marcador, la distancia desde la parte superior del grupo de ligamiento y el nombre del *Rpp* se muestran en la izquierda de cada grupo de ligamiento. El locus *Rpp4* y las variedades portadoras de *Rpp4* se muestran en marrón. A la derecha del grupo de ligamiento de nuestro mapa para *Rpp4,* también se muestran las curvas LOD de los QTL para NoU y SL, junto a los picos de las curvas LOD (puntas de flecha).

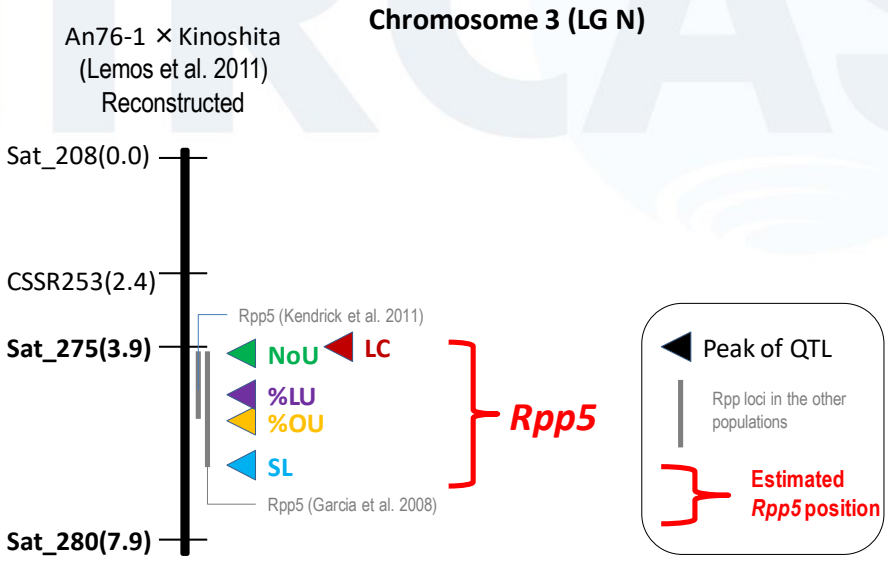


Figura 9e. Mapa de ligamiento genético del cromosoma 3 (LG N), donde se localiza *Rpp5*. Este mapa de ligamiento fue construido usando una población F_2 (141 plantas) derivadas del cruzamiento entre el cultivar An76-1 (*Rpp2* y *Rpp4*) y Kinoshita (*Rpp5*). Este mapa fue actualizado de nuestros estudios previos (Lemos et al., 2011). El nombre del marcador, la distancia desde la parte superior del grupo de ligamiento y el nombre del *Rpp* se muestran en la izquierda de cada grupo de ligamiento. A la derecha de grupo de ligamiento, se muestran los picos de QTL para cinco caracteres de resistencia por mapeo de intervalos compuesto y los locus *Rpp5* candidatos estimados usando una población F_2 y los reportados por otros estudios.

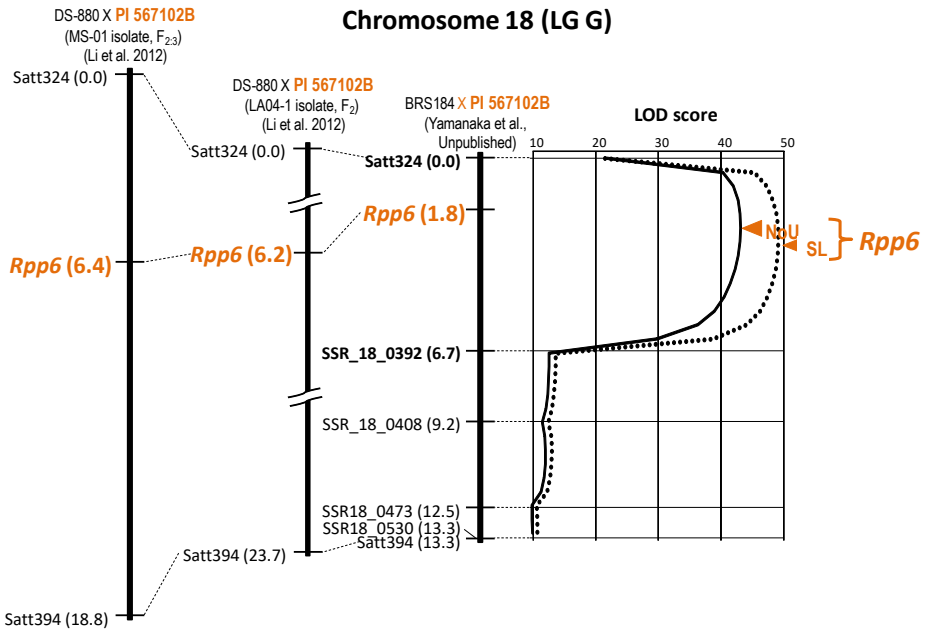


Figura 9f. Mapa de ligamiento genético del cromosoma 18 (LG G) donde se localiza *Rpp6*. Nuestro mapa (extremo derecho, Yamanaka et al., inédito) se muestra junto con los mapas reportados previamente (Li et al., 2012). El nombre del marcador, la distancia desde la parte superior del grupo de ligamiento y el nombre del *Rpp* se muestran en la izquierda de cada grupo de ligamiento. El locus *Rpp6* y la variedad portadoras de *Rpp6* se muestra en naranja. A la derecha del grupo de ligamiento de nuestro mapa para *Rpp6,* también se muestran las curvas LOD de los QTL para NoU y SL, junto a los picos de las curvas LOD (puntas de flecha).

Tabla 11. Marcadores SSR flanqueando los genes *Rpps*. Cada uno de los marcadores upper (U) y lower (L) son utilizados para MAS. En caso de que 2 marcadores esten listados para un flanco, el marker 1 anula al marker_2.

		Marker	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
Rpp1	U_marker	**Sct_187**	CATGCTCCCATTCTCT	AACATTGGCTTTTTACTTAG
	L_marker_1	**Sat_064**	TAGCTTTATAATGAGTGTGATAGAT	GTATGCAAGGGATTAATTAAG
	L_marker_2	**SSR66**	AGATTGGGTGAGAACATAAG	GGAGAGCGTAAAAGAAATTC
Rpp1-b	U_marker_1	**SSR66**	AGATTGGGTGAGAACATAAG	GGAGAGCGTAAAAGAAATTC
	U_marker_2	**Sat_064**	TAGCTTTATAATGAGTGTGATAGAT	GTATGCAAGGGATTAATTAAG
	L_marker_1	**SSR18-1864**	TGAATGATATATGTTTTGCGAAGA	CAATAGAGCCGGATGGATGT
	L_marker_2	**Sat_372**	GCGTCTCGAGGTAATTATCTATTTATCTTTT	GCGAGTTTGGTAACATCGAGTATTGAT
Rpp2	U_marker_1	**Satt620**	GCGGGACCGATTAAATCAATGAAGTCA	GCGCATTTAATAAGGTTTACAAATTAGT
	U_marker_2	**SSR16_0895**	CATTCCCCAAGGCACATATT	TGGTTCTTTCTATGGCAGGG
	L_marker_1	**SSR16_0908**	TGCCCTACGATCTCTACGAAA	CGGACAAATGATCAGACCAA
	L_marker_2	**SSR16_0912**	TCGGGTGCTGCTAAAAATTC	AGTCAAAGGGGCTCTTGCTT
Rpp3	U_marker_1	**Sat_238**	GCGCTGAGACGTTTGTGATTGTTTGTAA	GCGGTGCATGCAATTCTAGTTAGATATT
	U_marker_2	**Satt460**	GCGCGATGGGCTGTTGGTTTTTAT	GCGCATACGATTTGGCATTTTTCTATTG
	L_marker_1	**SSR06_1521**	CAACCTCCCACCACTAAACTG	CCCTTTAGCCTTTTCTTTGC
	L_marker_2	**SSR06_1530**	CTTTTGAGTTTTGCCTCCCA	AGTCAAAGGGGCTCTTGCTT
Rpp4	U_marker_1	**Satt288**	GCGGGGTGATTTAGTGTTTGACACCT	GCGCTTATAATTAAGAGCAAAAGAAG
	U_marker_2	**Sc21_2922**	GACTCAACTCATCCGTGC	GAACATATACAAAGGAAGCAT
	L_marker_1	**SSR18_1576**	TTTTGCACTCCCTGATGGAT	AACAGGGAATACATGCCAAA
	L_marker_2	**SSR18_1580**	TGCCAAGAAACTATAGGCCG	TGAGTTTCCCTGGTAGTGTGG
Rpp5	U_marker	**Sat_275**	GCGCGCTGGCAATTATTCAAAACTTAACGAT	GCGAAGGCTACGGTGAATAGAAAGGAC
	L_marker	**Sat_280**	GGCGGTGGATATGAAACTTCAATAACTACAA	GGCGGGCTTCAAATAATTACTATAAAACTACGG
Rpp6	U_marker	**Satt324**	GTTCCCAGGTCCCACCATCTATG	GCGTTTCTTTTATACCTTCAAG
	L_marker_1	**SSR18_0392**	AAAATTTTCACTCCGGTCATT	ACTGCAGGAGCAAGAACCTC
	L_marker_2	**SSR18_0408**	GCAACAGGATTTGGAGCTGT	TGTGGTCTCGGTAGCCTTCT

Agradecimientos

Los autores dedican este manual al Dr. José Tadashi Yorinori, quien fue nuestro gran maestro y amigo. Él falleció el 13 de Junio de 2016.

Los autores están muy agradecidos a las siguientes personas por sus contribuciones a este manual:

Dr. Rafael Moreira Soares (Embrapa-Soja, Brasil)

Dr. José Tadashi Yorinori† (Dirección anterior: Tadashi Agro, Brasil)

Dr. Antonio Juan Gerardo Ivancovich (UNNOBA, Argentina)

Mr. Adrian Dario de Lucia (INTA-Cerro Azul, Argentina)

Ms. Monica Isabel Heck (INTA-Cerro Azul, Argentina)

Ms. Gabriela Morel (Dirección anterior: IPTA-CICM, Paraguay)

Ms. Ruth Scholz (IPTA-CICM, Paraguay)

Mr. Anibal Morel Yurenka (INBIO, Paraguay)

Mr. Christian Eduardo Riquelme Dujak (Dirección anterior: IPTA-CICM, Paraguay)

Mr. Wilfrido Morel (Fito Lab: IPTA-CICM, Paraguay)

Ms. Alicia Noelia Bogado (Dirección anterior: IPTA-CICM, Paraguay)

Ms. Romina Chávez Jara (Dirección anterior: IPTA-CICM, Paraguay)

Ms. Miori Uno Shimakawa (Nikkei-Cetapar, Paraguay)

Mr. Christian Espinola (Dirección anterior: Nikkei-Cetapar, Paraguay)

Mr. Iwao Ohyama (Dirección anterior: Nikkei-Cetapar, Paraguay)

Dr. Silvina Stewart (INIA-La Estanzuela, Uruguay)

Dr. Kazuhiro Suenaga (JIRCAS, Japón)

Ms. Mio Morishita (Dirección anterior: JIRCAS, Japón)

Ms. Yukie Muraki (JIRCAS, Japón)

Ms. Midori Hasegawa (Dirección anterior: JIRCAS, Japón)

Ms. Tomomi Mori (Dirección anterior: JIRCAS, Japón)

Ms. Akiko Takahashi (Dirección anterior: JIRCAS, Japón)

Dr. Noelle Giacomini Lemos (Dirección anterior: JIRCAS, Japón)

Dr. Md. Motaher Hossain (BSMRAU, Bangladesh)

Mr. Julio César García (INIFAP-Las Huastecas, Mexico),

Financiamiento: La creación de este manual fue apoyada financieramente por proyectos internacionales de JIRCAS, "Identificación de resistencia estable a roya asiática para Sudamérica (FY2005-2010)," "Desarrollo de tecnologías de mejoramiento para el incremento de la producción y el suministro estable de cultivos de secano (FY2011-2015)" y "Desarrollo de tecnologías de manejo para el control de plagas y enfermedades que migran entre países (FY2016-)."

Proveedor de materiales: los patógenos de roya de la soja descriptos en este manual derivan de la Universidad de Tsukuba y Embrapa-Soja. Las variedades diferenciales, exceptuando a la línea con piramidización de Rpp desarrollada por JIRCAS fueron provistas por Embrapa-Soja.

Abreviatura de los institutos: JIRCAS: Japan International Research Center for Agricultural Sciences; **Embrapa**: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária; **INTA**: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria; **IPTA-CICM**: Instituto Paraguayo de Tecnología Agraria- Centro de Investigación Capitán Miranda; **INIA**: Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria; **BSMRAU**: Bangabandhu Sheikh Mujibur Rahman Agricultural University; **UNNOBA**: Universidad Nacional del Noroeste de Buenos Aires, **INIFAP**: Institute Nacional de Investigaciones Forestales, Agricolas y Pecuarias

Referencias

Akamatsu H, Yamanaka N, Yamaoka Y, Soares RM, Morel W, Ivancovich AJG, Bogado AN, Kato M, Yorinori JT, Suenaga K (2013) Pathogenic diversity of soybean rust in Argentina, Brazil, and Paraguay. J Gen Plant Pathol 79: 28–40

Akamatsu H, Yamanaka N, Soares RM, Ivancovich AJG, Lavilla MA, Bogado AN, Morel G, Scholz R, Yamaoka Y, and Kato M (2017) Pathogenic variation of South American *Phakopsora pachyrhizi* populations isolated from soybeans from 2010 to 2015. JARQ 51: 221–232

Arias CAA, Toledo JFF, Almeida LA, Pipolo AE, Carneiro GES, Abdelnoor RV, Rachid BF, Ribeiro AS (2008) Asian rust in Brazil: varietal resistance. JIRCAS Working Rep No 58: 29–30

Chakraborty N, Curley J, Frederick RD, Hyten DL, Nelson RL, Hartman GL, Diers BW (2009) Mapping and confirmation of a new allele at *Rpp1* from soybean PI 594538A conferring RB lesion-type resistance to soybean rust. Crop Sci 49: 783–790

Childs SP, King ZR, Walker DR Harris DK, Pedley KF, Buck JW, Boerma HR, Li Z (2018) Discovery of a seventh *Rpp* soybean rust resistance locus in soybean accession PI 605823. Theor Appl Genet 131: 27–41

Cregan PB, Jarvik T, Bush AL, Shoemaker RC, Lark KG, Kahler AL, Kaya N, VanToai TT, Lohnes DG, Chung J, Specht JE (1999) An integrated genetic linkage map of the soybean genome. Crop Sci 39: 1464–1490

Garcia A, Calvo ÉS, Kiihl RA de S, Harada A, Hiromoto DM, Vieira LGE (2008) Molecular mapping of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) resistance genes: Discovery of a novel locus and alleles. Theor Appl Genet 117: 545–553

Garcia-Rodriguez JC, Morishita M, Kato M, Yamanaka N (2017) Pathogenic characteristics of the Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Mexico. Revista Mexicana de Fitopatología 35: 338-349

Grant D, Nelson RT, Cannon SB, Shoemaker RC (2010) SoyBase, the USDA-ARS soybean genetics and genomics database. Nucleic Acids Res 38: 843–846

Hartwig EE (1986) Identification of a fourth major gene conferring resistance to soybean rust. Crop Sci 26: 1135–1136

Hartwig EE, Bromfield KR (1983) Relationships among three genes conferring specific resistance to rust in soybeans. Crop Sci 23: 237–239

Hyten DL, Hartman GL, Nelson RL, Frederick RD, Concibido VC, Narvel JM, Cregan PB (2007) Map location of the *Rpp1* locus that confers resistance to soybean rust in soybean. Crop Sci 47: 837–840

Hyten DL, Smith JR, Frederick RD, Tucker ML, Song Q, Cregan PB (2009) Bulked segregant analysis using the GoldenGate assay to locate the *Rpp3* locus that confers resistance to soybean rust in soybean. Crop Sci 49: 265–271

Hossain MM, Akamatsu H, Morishita M, Mori T, Yamaoka Y, Suenaga K, Soares RM, Bogado AN, Ivancovich AJG, Yamanaka N (2015) Molecular mapping of Asian soybean rust resistance in soybean landraces PI 594767A, PI 587905 and PI 416764. Plant Pathol 64: 147–156

Hossain MM, Yamanaka N (2018) Pathogenic variation of Asian soybean rust pathogen in Bangladesh. J Gen Plant Pathol 85: 90–100

Kato M, Yorinori JT (2008) A study on a race composition of *Phakopsora pachyrhizi* in Brazil: a difficulty of race identification. JIRCAS Working Rep No 58: 94–98

Kendrick MD, Harris DK, Ha B-K, Hyten DL, Cregan PB, Frederick RD, Boerma HR, Pedley KF (2011) Identification of a second Asian soybean rust resistance gene in Hyuuga soybean. Phytopathology 101: 535–543

King ZR, Childs SP, Harris DK, Pedley KF, Buck JW, Boerma HR, Li Z (2017) A new soybean rust

resistance allele from PI 423972 at the *Rpp4* locus. Molecular Breeding 37: 62 (Online)

Laperuta LDC, Arias CAA, Ribeiro AS, Rachid BF, Pierozzi PHB, Toledo JFF, Pípolo AE, Carneiro GES (2008) New genes conferring resistance to Asian soybean rust: allelic testing for the *Rpp2* and *Rpp4* loci. Pesquisa Agropecuária Brasileira 43: 1741–1747

Lemos NG, Braccini AL, Abdelnoor RV, Olivaira MCN, Suenaga K, Yamanaka N (2011) Characterization of genes *Rpp2*, *Rpp4*, and *Rpp5* for resistance to soybean rust. Euphytica 182: 53–64

Li S, Smith JR, Ray JD, Frederick RD (2012) Identification of a new soybean rust resistance gene in PI 567102B. Theor Appl Genet 125: 133-142

Liu M, Li S, Swaminathan S, SahuLeonor BB, Leandro LF, Cardinal AJ, Bhattacharyya MK, Song Q, Walker DR, Cianzio SR (2016) Identification of a soybean rust resistance gene in PI 567104B. Theor Appl Genet 129: 863-877

McLean RJ, Byth DE (1980) Inheritance of resistance to rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in soybeans. Aust J Agric Res 31: 951–956

Meyer JDF, Silva DCG, Yang C, Pedley KF, Zhang C, van de Mortel M, Hill JH, Shoemaker RC, Abdelnoor RV, Whitham SA, Graham MA (2009) Identification and analyses of candidate genes for *Rpp4*-mediated resistance to Asian soybean rust in soybean. Plant Physiol 150: 295–307

Miles MR, Frederick RD, Hartman GL (2006) Evaluation of soybean germplasm for resistance to *Phakopsora pachyrhizi*. Plant Health Prog (doi: 10.1094/PHP-2006-0104-01-RS)

Monteros MJ, Missaoui AM, Phillips DV, Walker DR, Boerma HR (2007) Mapping and confirmation of the 'Hyuuga' red-brown lesion resistance gene for Asian soybean rust. Crop Sci 47: 829–836

Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res 8: 4321–4325

R Development Core Team (2013) R: A language and environment for statistical computing. Available at: http://www.R-project.org.

Ray JD, Morel W, Smith JR, Frederick RD, Miles MR (2009) Genetics and mapping of adult plant rust resistance in soybean PI 587886 and PI 587880A. Theor Appl Genet 119: 271–280

Silva DCG, Yamanaka N, Brogin RL, Arias CAA, Nepomuceno AL, Di Mauro A, Pereira S, Nogueira LM, Passianotto ALL, Abdelnoor RV (2008) Molecular mapping of two loci that confer resistance to Asian rust in soybean. Theor Appl Genet 117: 57–63

Stewart S, Rodrígue M, Yamanaka N (2019) Pathotypic variation of *Phakopsora pachyrhizi* isolates from Uruguay. Trop Plant Pathol (DOI: 10.1007/s40858-018-0269-2)

Yamanaka N, Hasran M, Xu DH, Tsunematsu H, Idris S, Ban T (2006) Genetic relationship and diversity of four *Mangifera* species revealed through AFLP analysis. Genet Resour Crop Evol 53: 949–954

Yamanaka N, Sato H, Yang Z, Xu DH, Catelli LL, Arias CAA, Abdelnoor RV, Nepomuceno AL (2007a) Genetic relationship of Japanese, Chinese and Brazilian soybean gene pools revealed by SSR markers. Genet Mol Biol 30: 85–88

Yamanaka N, Silva DCG, Gilli JR, Fuentes FH, Yang Z, Polizel A, Sato H, Watanabe S, Ban T, Homma Y, Harada K, Brogin RL, Nepomuceno AL, Abdelnoor RV (2007b) Application of DNA markers for identifying genes for resistance to soybean diseases in South America and for evaluating genetic relationships among soybean gene pools. JIRCAS Working Rep No 51: 47–54

Yamanaka N, Silva DCG, Passianotto ALL, Nogueira LM, Polizel AM, Pereira SS, Santos JVM, Brogin RL, Arias CAA, Hoffmann-Campo CB, Nepomuceno AL, Abdelnoor RV (2008) Identification of DNA markers and characterization of the genes for resistance against Asian soybean rust. JIRCAS Working Rep No 58: 99–107

Yamanaka N, Yamaoka Y, Kato M, Lemos NG, Passianotto ALL, Santos JVM, Benitez ER, Abdelnoor RV, Soares RM, Suenaga K (2010) Development of classification criteria for resistance to soybean rust and differences in virulence among Japanese and Brazilian rust populations. Trop Plant

Pathol 35: 153–162

Yamanaka N, Lemos NG, Akamatsu H, Yamaoka Y, Silva DCG, Passianotto ALL, Abdelnoor RV, Soares RM, Suenaga K (2011) Soybean breeding materials useful for resistance to soybean rust in Brazil. JARQ 45: 385–395

Yamanaka N, Lemos NG, Uno M, Akamatsu H, Yamaoka Y, Abdelnoor RV, Braccini AL, Suenaga K (2013) Resistance to Asian soybean rust in soybean lines with the pyramided three *Rpp* genes. Crop Breed Appl Biotechnol 13: 75–82

Yamanaka N, Hossain MM, and Yamaoka Y (2015a) Molecular mapping of Asian soybean rust resistance in Chinese and Japanese soybean lines, Xiao Jing Huang, Himeshirazu, and Iyodaizu B. Euphytica 205: 311-324

Yamanaka N., Lemos NG, Jara RC, Hossain MM, Suenaga K, Yamaoka Y (2015b) Prevention of leaf yellowing in Asian soybean rust infected plants is associated with green cotyledon color and the infection index. Euphytica 205: 475-482

Yamanaka N., Morishita M, Mori T, Lemos NG, Hossain MM, Akamatsu H, Kato M, Yamaoka Y (2015c) Multiple *Rpp*-gene pyramiding confers resistance to Asian soybean rust isolates that are virulent on each of the pyramided genes. Trop Plant Pathol 40: 283–290

Yamanaka N., Morishita M, Mori T, Muraki Y, Hasegawa M, Hossain MM, Yamaoka Y, Kato M, (2016) The locus for resistance to Asian soybean rust in PI 587855. Plant Breed 135: 621–626

Yamaoka Y, Fujiwara Y, Kakishima M. Katsuya K, Yamada K, Hagiwara H (2002) Pathogenic races of *Phakopsora pachyrhizi* on soybean and wild host plants collected in Japan. J Gen Plant Pathol 68: 52–56

Yamaoka Y, Yamanaka N, Akamatsu H, Suenaga K (2014) Pathogenic races of soybean rust *Phakopsora pachyrhizi* collected in Tsukuba and vicinity in Ibaraki, Japan. J Gen Plant Pathol 80: 184–188

Yu N, Kim M, King ZR, Harris DK, Buck JW, Li Z, Diers W (2015) Fine mapping of the Asian soybean rust resistance gene *Rpp2* from soybean PI 230970. Theor Appl Genet 128: 387-396

La versión en Español de este manual fue traducida (en orden alfabético) por

Dr. Luciano Nobuhiro Aoyagi (JIRCAS, Japan),

MC. Julio César García (INIFAP-Las Huastecas, Mexico),

Ing Agr. Monica Isabel Heck (INTA-Cerro Azul, Argentina),

Dr. Antonio Gerardo Ivancovich (UNNOBA, Argentina),

Ing. Agr. Miguel Lavilla (UNNOBA, Argentina),

Ing. Agr. Adrian Dario de Lucia (INTA-Cerro Azul, Argentina), y

Dr. Silvina Stewart (INIA-La Estanzuela, Uruguay)

Autores:

Naoki Yamanaka, Ph.D.

Investigador Senior, Japan International Research Center for Agricultural Sciences (JIRCAS), Japón

Masayasu Kato, Ph.D.

Lider del Proyecto, JIRCAS, Japón

Hajime Akamatsu, Ph.D.

Jefe de Investigación, National Agriculture and Food Research Organization, Central Region Agricultural Research Center (NARO/CARC),Japón (Posición anterior: Investigador Senior, JIRCAS, Japón)

Yuichi Yamaoka, Ph.D.

Profesor, University of Tsukuba, Japón