Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Mapeamento de genes associados à resistência da soja a ferrugem
asiática (*Phakopsora pachyrhizi*)

Carlos Eduardo de Araujo Batista

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Agronomia, Área de Concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2008

Carlos Eduardo de Araujo Batista
Biólogo

Mapeamento de genes associados à resistência da soja a ferrugem asiática
(*Phakopsora pachyrhizi*)

Orientador:
Prof. Dr. JOSÉ BALDIN PINHEIRO

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Agronomia, Área de Concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Batista, Carlos Eduardo de Araujo

Mapeamento de genes associados à resistência da soja a ferrugem asiática
(*Phakopsora pachyrhizi*) / Carlos Eduardo de Araujo Batista. - - Piracicaba, 2008.
56 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. Ferrugem – Doença de planta 2. Genes 3. Mapeamento genético 4. Resistência
genética vegetal 5. Soja I. Título

CDD 633.34
B333c

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

Aos meus pais Carmelita e Francisco

Dedico

Aos Agricultores brasileiros

Ofereço

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela minha existência, pela saúde, força e amor que me permitir todos os dias respirar e proporcionar eu finalizar este trabalho;

A Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), pela estrutura excepcional que possui para a formação profissional dos alunos;

Ao Departamento de Genética da ESALQ pela oportunidade oferecida para a realização do curso de mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos;

Ao Professor José Baldin Pinheiro pela oportunidade, orientação, apoio e confiança durante o desenvolvimento deste trabalho, auxílio aos colegas e além do exemplo profissional;

A Professora Maria Imaculada Zucchi pela co-orientação, amizade e confiança no meu trabalho;

Aos professores da ESALQ/USP e UNICAMP pelos valiosos ensinamentos durante o curso. Sempre serei grato a vocês;

Ao Pesquisador da Embrapa, meu ex-orientador e amigo Paulo A. Vianna Barroso pelos ensinamentos e confiança,

Aos meus amigos e acolhedores, a Márcia Nóbrega e Alderi Emídio, pela amizade e apoio durante todo o curso de mestrado;

Aos Pesquisadores da TMG Romeu A. S. Kiihl, Arlindo Harada e Éberson S. Calvo pela concessão do material estudado;

Aos funcionários do Departamento de Genética da ESALQ/USP, em especial ao Marcio, Amaral, Ronaldo, Salete, Carlinhos, Cândida Vanderléia Oliveira (Leia), Neuza, Berdan, Fernando, Carlão (meu chará), Bete e Cláudio Segatelli;

Aos amigos de Piracicaba: Camila, Eulália, Michele (mimi), Fátima, Alan (coxinha), Onildo, Maria Aparecida, Maria Marta, Helen Penha, Larissa, Ligia, Josy, Paula, Paulo Fernando, Bruno Mulato, Milene pelo apoio durante a realização dos meus trabalhos laboratoriais e principalmente, pelos momentos de descontração; e também a amiga Stella pela revisão deste texto.

Gostaria de agradecer em especial a Helen pela amizade e convivência no decorrer do curso, e principalmente por me ajudar nos momentos difíceis e nos momentos de comemoração.

A todos que contribuíram, mas que não foram mencionados... Obrigado.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
1 INTRODUÇÃO.....	9
2 DESENVOLVIMENTO.....	11
2.1 A cultura da soja.....	11
2.2 A ferrugem asiática.....	12
2.3 Marcadores microssatélites.....	17
2.4 Análise de segregantes agrupados e mapeamento.....	19
2.5 Mapeamento genético.....	19
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Material experimental.....	23
3.2 Avaliação fenotípica das gerações F ₂ e F ₃	23
3.3 Extração de DNA.....	27
3.4 Avaliação de polimorfismo de marcadores microssatélites e a análise de segregantes agrupados.....	27
3.5 Eletroforese.....	28
3.6 Coloração com nitrato de prata para detecção dos marcadores SSR.....	29
3.7 Avaliação do gel.....	29
3.8 Mapeamento dos genes.....	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1 Avaliação fenotípica das populações.....	31
4.2 Análise de segregantes agrupados.....	32
4.3 Considerações finais.....	42
5 CONCLUSÕES.....	44
REFERÊNCIAS.....	45

RESUMO

Mapeamento de genes associados à resistência da soja a ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*)

O custo ferrugem que engloba gastos com fungicidas, os custos operacionais das aplicações, perdas de produção, e redução na arrecadação de impostos representa um elevado valor para sojicultura mundial. Assim, a ferrugem asiática da soja apresenta-se como um dos grandes desafios para a pesquisa agrícola nos próximos anos, pois o controle químico da doença é alternativa obrigatória enquanto não se dispõe de cultivares resistentes. Porém a prática representa aumento considerável no custo de produção. No Brasil estima-se que este custo, para duas aplicações gire, em torno de US\$ 40,00.ha⁻¹, sem contar os gastos operacionais com máquinas e combustível, ou seja, gasto apenas o fungicida. Considerando o exposto, este trabalho tem como objetivo avaliar duas fontes de resistência à ferrugem asiática da soja (PI 200487 e PI 459025A), e verificar se os genes responsáveis pela reação ao patógeno já foram descritos na literatura, ou seja, identificar seus respectivos grupos de ligação. A estratégia de segregantes agrupados (Bulked segregant analysis) foi utilizada para mapear os genes de interesse. Os resultados obtidos permitiram chegar as seguintes conclusões: a) a técnica BSA foi eficiente para detectar locos relacionados com a resistência à ferrugem asiática da soja; b) a PI 459025 (Bing Nam) apresenta o gene de resistência *Rpp4* localizado no grupo de ligação G e c) A PI 200487 (Kinoshita) apresenta um gene diferente daqueles descritos na literatura, sendo este localizado no grupo de ligação N. Este gene pode ser denominado de *Rpp5*.

Palavras chave: *Glycine max*, Resistência genética, Resistência a doenças; Ferrugem asiática da soja; *Phakopsora pachyrhizi*; Mapeamento genético, Marcadores microssatélites

ABSTRACT

Mapping of genes associated to Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*)

The costs due to Asian soybean rust, which consists of fungicides, operational application costs and reduction in paid taxes, represent severe losses for worldwide soybean production. Thus, Asian soybean rust represents one of the most challenging problems for agricultural research in the future, since chemical control of the disease is the obligated alternative while resistant cultivars are unavailable. However, fungicide application significantly increases production costs. In Brazil, it is estimated that the costs of two applications are of approximately US\$ 40,00.ha⁻¹, aside the operational costs incurred due to machinery and fuel, that is, the figure represents solely fungicide costs. Taking into account the previous considerations, the present work aims to evaluate two sources of resistance to Asian soybean rust (PI 200487 and PI 459025A), and to verify if the genes involved in pathogen-responses have already been described in previous work, by identifying their respective linkage groups. Bulk segregant analysis was used to map the genes of interest. The results allowed the following conclusions: a) BSA was effective to detect loci associated to Asian soybean rust resistance; b) PI 459025A (Bing Nam) carries the resistance gene *Rpp4* mapped to the linkage group G and c) PI 200487 (Kinoshita) has a novel resistance gene mapped to the linkage group N. The identified gene is denominated *Rpp5*.

Key words: *Glycine max*, genetic resistance, disease resistance; Asian soybean rust, *Phakopsora pachyrhizi*; genetic mapping, SSR markers

1 INTRODUÇÃO

O Brasil com sua área territorial de âmbito continental revelou-se desde sua colonização ter aptidão pelas culturas agrícolas. Nos últimos anos o país vem ganhando destaque e respeito no agronegócio mundial. Essa posição de destaque, no âmbito mundial do agronegócio, coloca o país como um dos principais produtores agrícolas do continente americano e do mundo todo. Internamente, o agronegócio é responsável por um constante aumento do Produto Interno Bruto (PIB) e avanço deste setor da economia. Desde 2002 o agronegócio brasileiro responde por mais de 40% do total das exportações anuais e é responsável direto pelo superávit da balança comercial observado nos últimos anos.

Este cenário positivo deve-se às atividades de vários setores da agropecuária, mas o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento destaca que este desempenho diferenciado está relacionado ao complexo soja (grão, farelo e óleo). O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) e conseguiu arrecadar, na produção de 2006/07, com as exportações desta cultura US\$ 10 bilhões (ABIOVE, 2007).

As condições climáticas brasileira fizeram com que a cultura da soja se adaptasse bem em diversas regiões permitindo o aumento da fronteira agrícola. Entretanto, este cenário positivo de desenvolvimento pode estar ameaçado ou não se concretizar, devido à ocorrência e ao aparecimento de novas doenças que poderão afetar toda a cadeia produtiva.

Uma das principais e mais severa dessas doenças é a ferrugem asiática, causada pelo fungo biotrófico *Phakopsora pachyrhizi*. A ferrugem é uma doença altamente destrutiva e pode causar perdas de até 80% da produção. Sua ocorrência foi relatada em diversos países em todo o mundo, incluindo países da Ásia (Austrália, China, Índia, Taiwan, Filipinas e Tailândia), da América do Sul (Brasil, Argentina, Bolívia e Paraguai) e da África (Zimbábue, Nigéria e África do Sul). Em 1998, a ferrugem migrou da Ásia para o Zimbábue, a partir de onde se espalhou por toda África. Em 2001, a doença foi encontrada na América do Sul e, finalmente em 2003, foi relatada sua ocorrência no hemisfério norte.

Desta forma, a busca por cultivares resistentes ao fungo (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow e Sydow) é uma demanda crescente pelos sojicultores (EMBRAPA SOJA, 2007).

Em virtude deste novo problema na cultura os programas de melhoramento de soja estão estudando novas fontes de resistência, principalmente com a utilização de germoplasma exótico como fonte de genes de resistência. No Brasil, este problema foi agravado, pois o patógeno passou por um processo de adaptação resultando, possivelmente, em novas raças, principalmente na região do Cerrado. Com isso, verificou-se a quebra da resistência vertical ou monogênica de importantes fontes até então utilizadas. Considera-se como o principal desafio para a cultura da soja a identificação de novas fontes de resistência disponibilizando-as para os programas de melhoramento da cultura.

No Brasil, na safra 2006/07, o custo ferrugem que engloba gastos com fungicidas, custos operacionais das aplicações, perdas de produção e redução na arrecadação de impostos ficou em aproximadamente US\$ 2,2 bilhões (EMBRAPA SOJA, 2007). Assim, a ferrugem asiática da soja apresenta-se como um dos grandes desafios para a pesquisa agrícola nos próximos anos, pois o controle químico da doença é alternativa obrigatória enquanto não se dispõe de cultivares resistentes. Porém a prática representa aumento considerável no custo de produção. Segundo Yorinori (2004a), o custo do controle químico (média de duas aplicações), é avaliado em torno de US\$ 40,00 / ha, desconsiderando-se os gastos com máquinas, isto é apenas o fungicida.

Considerando o exposto, este trabalho tem como objetivo avaliar duas fontes de resistência à ferrugem asiática da soja (PI 200487 e PI 459025A), e verificar se os genes responsáveis pela reação de resistência ao patógeno já foram descritos na literatura, ou seja, identificar seus respectivos grupos de ligação.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 A cultura da soja

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] atualmente é a espécie vegetal cultivada de maior importância econômica e social para o Brasil, sendo a que mais se destaca. A expansão do cultivo desta cultura teve início no final dos anos 60, tornando-se, em curto período de tempo, um dos principais produtos da exploração agrícola e da economia brasileira. Com isso, a soja deu ao Brasil grande destaque no agronegócio mundial, tornando-se o segundo maior produtor e primeiro em produtividade (MAPA, 2006; ABIOVE, 2007); e assim, ser o detentor de 38% do comércio mundial desta oleaginosa (VISÃO AGRÍCOLA, 2006).

A relação entre o consumo de soja e a saúde humana tem sido amplamente estudada pelas características nutricionais, quer seja pelo elevado teor de proteína de qualidade nutricional adequada, pelo conteúdo significativo de minerais e fibras ou, ainda, pela quantidade reduzida de gordura saturada (GRIESHOP; FAHEY JR, 2001; YOUNG, 1991). É também considerado um grão versátil no que se refere ao grande número de produtos e subprodutos que podem se originar a partir dos grãos. O óleo, a lecitina e o óleo refinado são obtidos a partir do óleo bruto, processo em que também é produzida a lecitina, agente emulsificante utilizado na indústria de alimentos. O farelo de soja é amplamente utilizado na ração animal, como fonte protéica complementar ao milho (ANUÁRIO BRASILEIRO DA SOJA, 2006).

A cultura da soja com o “complexo soja” (grão, farelo e óleo bruto) faz com que o Brasil arrecade anualmente US\$ 10 bilhões para economia nacional apenas com as exportações, o que equivale a 40% do total das exportações do agronegócio brasileiro, ultrapassando o total arrecadado anualmente pelos Estados Unidos, que exportam de US\$ 7,5 a 8.0 bilhões em soja (ROESSING, 2004; MAPA, 2006; ABIOVE, 2007).

Deve ser ressaltado que a soja também se destaca como uma matéria-prima que representa grande potencial para a produção do biodiesel. Apesar da soja, juntamente com o algodão, apresentar menores teores de óleo do que outras oleaginosas como a mamona, seu uso torna-se economicamente vantajoso devido à estrutura de produção, distribuição e de esmagamento existente no Brasil. Com a implantação do Plano

Nacional de Agroenergia. Com isso, o valor final da soja poderá ser mais lucrativo devido ao seu uso no processamento para produção do biodiesel, agregando valor e aumentando a demanda pela produção de grãos da cultura (ESALQ, 2007).

A soja possui ainda grande potencial a ser explorado, quando considerada a variabilidade genética disponível para aumentar a produtividade e a capacidade brasileira de expansão de área para cultivo, com os programas de melhoramento genético participando ativamente deste processo, visando o real estabelecimento do Brasil perante o mercado mundial. Porém, a longevidade deste êxito depende da estabilidade do “complexo soja” que está condicionado a riscos, em que as doenças são o maior limitante para os sucessivos incrementos na produtividade (ARIAS, 2004).

2.2 A ferrugem asiática

As ferrugens provocam constantemente enormes perdas em várias culturas, principalmente em gramíneas, como trigo, cevada, milho e cana. Além dos danos causados em gramíneas, causam redução de produtividade também em soja, café e feijão e frutíferas (BEDENDO, 1995).

A ferrugem asiática da soja é causada por *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd., que é um fungo agressivo, foi observada pela primeira vez no Japão em 1903. Esta doença ocorre a mais de 50 anos na Ásia e Austrália (HARTMAN, 2005). Na América do norte foi relatada pela primeira vez no Havaí em 1994. E posteriormente, foi encontrado na África e América do Sul, sendo que neste último a ocorrência do fungo nos campos foi em 2001.

Desde a constatação da ferrugem asiática no Brasil na safra 2001/02 até a safra 2005/06, a ferrugem representou um custo na ordem US\$ 7,7 bilhões, que inclui as perdas de produtividade, os custos operacionais com as aplicações e a compra de fungicidas (YORINORI, NUNES JUNIOR, 2006). Na safra 2006/07, o “custo ferrugem” foi de US\$ 2,2 bilhões. Representando um dispêndio na produção de US\$ 9,9 bilhões desde a sua chegada ao Brasil. Isso representa o equivalente às divisas arrecadadas pelo Brasil em exportações de soja em 2006. (EMBRAPA SOJA, 2007; ABIOVE, 2007; MAPA, 2007).

Os principais agravantes da ferrugem nas condições brasileiras são a extensão territorial das lavouras e a monocultura continuada, favorecendo a maior produção de inóculo e disseminação deste, além do aparecimento de diferentes isolados/raças do patógeno. O clima favorável, falhas nas aplicações de fungicidas, alta densidade de plantas, período de semeadura que se estende de setembro a janeiro, além da sobrevivência do patógeno em plantas voluntárias de soja e plantas daninhas, ou outras espécies hospedeiras que sobrevivem no período da entressafra, são os fatores suplementares que diminuem a eficiência do controle da doença (YORINORI, NUNES JUNIOR, 2006).

Segundo Hartman et. al (2004) em avaliações realizadas com as raças de ferrugem coletadas em regiões estratégicas onde ela ocorre no mundo, verificou-se que as raças presentes no Brasil são as mais agressivas de toda amostragem. Aliado a estes resultados, Kato e Yorinori (2006) e Calgaro et al. (2006) confirmaram, respectivamente, a existência de diferentes raças e divergência genética da ferrugem no Brasil.

A ferrugem manifesta-se de forma irregular, de acordo com as condições ambientais, principalmente, umidade e temperatura. O sintoma da doença é caracterizado por pequenos pontos com menos de 1 mm de diâmetro, de coloração pardo-avermelhada, na parte superior das folhas. Estas lesões podem coalescer em infecções severas, formando grandes manchas castanhas, causando o amarelecimento e queda prematura das folhas. Os sintomas da ferrugem podem ser confundidos com a septoriose (*Septoria glycines* Hemmi), doença incluída no complexo de doenças de final de ciclo da soja; porém, a ferrugem difere desta por apresentar coloração mais avermelhada e pela ausência de halo amarelado nas lesões. Há ainda, duas doenças que podem ser confundidas com a ferrugem, o crestamento bacteriano (*Pseudomonas savastanoi* pv. *Glycinea*) e o crestamento foliar de cercospora (*Cercospora kikuchii*). A ferrugem difere destas pela ausência de halo amarelado nas lesões (EMBRAPA SOJA, 2004).

Segundo Hartman et al. (1997), a ferrugem asiática da soja ocorre em folhas com lesões palha (TAN) com pouca necrose a marrom avermelhado escuro (*Redish brown – RB*) e necrose extensiva, com uma ou muitas urédias erumpentes, globosas e estioladas, que encerram os uredosporos. As lesões TAN caracterizam genótipos

suscetíveis à ferrugem, enquanto que as lesões RB (*reddish brown*) caracterizam a reação de resistência dos genótipos (Figura 1). Segundo Bromfield (1984) os níveis de infecção foram estimados da seguinte forma; tipo 0 sem sinais ou sintomas macroscopicamente visíveis; tipo 1, lesões necróticas escuras avermelhadas com pouca urédias; tipo 2, lesões escuras avermelhadas com uma ou duas urédias esporulando espaçadas por lesão; tipo 3, lesões escuras avermelhadas com três ou mais urédias esporulando profusamente; tipo 4, lesão TAN com duas a cinco urédias por lesão e tipo 5, lesão TAN com mais de cinco urédias por lesão. Infecção tipo 0 indica alta imunidade ou próximo a imunidade; tipos 1, 2 e 3 com lesões necróticas escura avermelhadas mostram resistência específica ao hospedeiro e tipos 4 e 5 lesões TAN indicando hospedeiros suscetíveis.

Figura 1 - Plantas com sintomas de ferrugem asiática, em que: A = 1 lesão tipo TAN, B = lesão tipo RB e C = os dois tipos de lesões na mesma planta

Muitos aspectos do patossistema ainda são desconhecidos resultando no campo numa complexa interação de fatores. Com a abundância de umidade, devido à precipitação e ao orvalho, e também com a variação da temperatura que se torna ótima, promovendo uma infecção mais eficiente. Estes fatores são importantes para a estabilidade inicial e o rápido desenvolvimento epidêmico. A germinação dos esporos é afetada pela temperatura que pode ficar entre 18 a 25°C, considerada ótima, sendo que a taxa de infecção máxima ocorre com um período de orvalho de 10 a 12 h. Com decréscimo da temperatura abaixo da ótima, o comprimento do período de orvalho é

importante para o aumento da infecção. (MARCHETTI, MELCHING, BROMFIELD, 1976).

A precipitação pode ser a chave variável que prediz como será a severidade da ferrugem asiática da soja (TSCHANZ, SHENG, TSAI, 1982). Em experimentos conduzidos em vários locais, o fungo se desenvolveu mais rapidamente onde as chuvas eram mais regulares. No entanto, em períodos de pouca precipitação, o início da doença ocorreu mais tardiamente e a taxa de desenvolvimento foi reduzida (TSCHANZ, 1984).

Uma medida de controle econômico e efetivo da ferrugem é a obtenção de cultivares com alta resistência e produtividade. Compete aos programas de melhoramento genético produzir e fornecer as cultivares/sementes com tecnologia agregada e resistentes à ferrugem, representando menores custos de produção e menor utilização de defensivos agrícolas. A identificação de genes de resistência é o primeiro passo nesta direção, e à medida que se conhece a expressão desses genes endógenos em resposta aos agentes que causam a doença, pode-se melhor definir melhor a estratégia de ação (BOHNERT et al., 2001; KAWASAKI et al., 2001; MENTEWAB et al., 2005; MOY et al., 2004; SCHENK et al., 2000).

Uma proposição recente feita por Bonde et al. (2006) sugere que em programas de melhoramento se utilize na avaliação da reação a doença o número de urédias por lesão e o diâmetro das urédias, por possibilitar a detecção tanto da presença de um gene maior de resistência, quanto à resistência parcial, ou seja, uma reação intermediária entre os sintomas de suscetibilidade (TAN) e de resistência (RB). Entretanto, este procedimento pode ser inviável na seleção de um elevado número de linhagens, sendo recomendado na confirmação final da resistência de genótipos elites.

Na literatura, até o momento estão relatados para ferrugem asiática quatro genes de resistência dominantes e independentes: *Rpp1* (PI 200692), *Rpp2* (PI 230970), *Rpp3* (PI 462312) e *Rpp4* (PI 459025) (BROMFIELD E HARTWIG, 1980; McLEAN e BYTH, 1980; HARTWIG e BROMFIELD, 1983; HARTWIG, 1986). Das quatro fontes de resistência já descritas na literatura, apenas aquelas com os genes *Rpp2* e *Rpp4* permanecem resistentes á ferrugem no Brasil (ARIAS et al., 2004). Segundo Hartman, Miles e Frederich (2005) no momento a PI 459025, também denominada de Bing Nan,

apresenta o gene *Rpp4*, sendo uma importante fonte de resistência para a ferrugem asiática.

No melhoramento atual, a exploração da resistência parcial é a opção viável para a obtenção de resistência duradoura. Linhagens com resistência parcial foram identificadas e caracterizadas com base no período latente e no número de urédias por lesão, ou considerando o desenvolvimento lento da doença (TSCHANS, WANG, 1980; ZAMBOLIM, VALE, CHAVES, 1983; HARTMAN, WANG, TSCHANZ, 1991).

Estudos realizados em casa de vegetação com combinações de isolados do patógeno revelaram que a reação do tipo RB (*redish brown*) tende a ter um maior período latente. Sendo reduzido o aumento no número de pústula fora deste período resultando em poucas lesões ao se comparar com os genótipos com interações suscetíveis que resultam em reações do tipo TAN (BROMFIELD, 1980; WANG; HARTMAN, 1992). O impedimento principal para o desenvolvimento de linhagens com reduzida taxa de desenvolvimento da doença tem sido a dificuldade de se avaliar genótipos de populações segregantes ou de acessos com diferentes períodos de maturação. Além das diferenças fisiológicas, há diferenças nas condições ambientais, pois as plantas amadurecem em diferentes períodos em função do seu ciclo de maturação. Contudo, segundo Wang e Hartman (1992) a identificação e utilização da resistência parcial nos programas de melhoramento genético de plantas ainda é limitado. Outro agravante comentado por Carneiro (2007) é que a tolerância é uma característica associada à rusticidade dos genótipos, não sendo compatível com a seleção para elevada produtividade e como isso, dificultando o processo de melhoramento para obtenção de linhagens com características desejáveis.

Unfried (2007), em seus experimentos avaliando a tolerância da soja a ferrugem asiática comenta a existência de mecanismo de tolerância, e que na ausência de genes principais de resistência, esta tolerância é passível de seleção. O passo seguinte é entender a genética envolvida na tolerância da soja à ferrugem e como os genótipos apresentam altos níveis de produtividade com alta severidade da ferrugem e lesões do tipo TAN.

Outra ferramenta que pode ser utilizada e citada por Cook (1998) é a biologia molecular que possibilita a identificação dos genes e de seus produtos gênicos envolvidos em infecções por patógenos. Tem-se observado notáveis avanços e

grandes surpresas no estudo de doenças em plantas. É sabido que plantas não apresentam um sistema circulatório e habilidades para produzir anticorpos, dependendo de diferentes estratégias de defesa em relação às utilizadas pelos animais. Plantas com habilidades de resistência a infecções a um patógeno particular são tidas como resistentes ao patógeno, e patógenos que não apresentam capacidades de ataque são referidos como avirulentos. A resistência é herdável e o melhoramento de plantas tem vislumbrado obter variedades altamente produtivas com resistência a doenças.

O entendimento do mecanismo básico pelo qual certos patógenos causam doenças ou não em certos hospedeiros tem intrigado e motivado os patologistas de plantas. Plantas, na natureza, geralmente são resistentes a um número maior de patógenos. A habilidade de um patógeno causar doença em uma planta hospedeira é usualmente uma exceção à regra. Isto porque as plantas têm a habilidade de reconhecimento de uma potencial invasão pelo patógeno e montam defesas bem sucedidas. De modo inverso, os patógenos serão bem sucedidos quando causarem doenças. Eles agirão de duas formas dentro do hospedeiro evitando o reconhecimento ou reprimindo seu mecanismo de defesa (STASKAWICZ, 2001).

2.3 Marcadores microssatélites

Os microssatélites ou seqüências simples repetidas (*Simple Sequence Repeats* - SSR) são pequenas extensões de seqüências de DNA contendo de um a seis pares de bases, repetidos em tandem. Estas seqüências são altamente variáveis, amplamente distribuídos pelo genoma e representa uma nova geração de marcador genético poderoso para estudo em eucariotos (LIU E WENDEL, 2001).

Evidências demonstram que a distribuição genômica dos microssatélites não é aleatória. Presumivelmente, porque eles afetam a organização da cromatina, regulação da atividade gênica, recombinação, replicação do DNA, ciclo celular e a maquinaria de reparo (MMR) (LI et al. 2002). Ainda tem sido demonstrado na literatura que um grande número de microssatélites estão localizados em regiões de transcrição do genoma, incluindo seqüências expressas (ESTs) (MORGANTE, HAHAFFEY E POWELL, 2002).

Segundo Ferreira e Grattapaglia (1998) devido à expressão codominante e o multialelismo, os marcadores microssatélites são os marcadores que possuem o mais elevado conteúdo de informação de polimorfismo (PIC). Por isso, estes marcadores são muito utilizados em estudos de genética de populações de espécies silvestres, devido sua confiabilidade, praticidade operacional, robustez e serem mais informativos geneticamente. Outra vantagem desses marcadores é que ocorre a conservação de sítios de microssatélites entre espécies relacionadas, tornando possível em alguns casos, a transferência destes marcadores entre espécies ou mesmo gênero usando-se *primers* heterólogos (MOORE, DEVOS, WANG, GALE, 1991).

Em plantas, uma busca em bancos de dados de seqüências de DNA publicados revelou que sítios de microssatélites são largamente distribuídos com uma frequência de uma cada 50 mil pares de bases. (FERREIRA E GRATTAPAGLIA, 1998). Sendo amplamente utilizados nos estudos de diversidade genética, caracterização de germoplasma, construção de mapas genéticos, mapeamentos de genes e QTLs.

Uma possível solução para esta complexidade é o uso de marcadores de DNA com locos únicos com múltiplos alelos. Em soja, o alto polimorfismo natural dos microssatélites (SSR) é completamente nítido como visto em trabalhos iniciais de Akkaya, Bragwat, Cregan (1992); Morgante, Olivieri (1993); Diwan e Cregan, (1997). Estes autores têm descrito o alto grau de polimorfismo dos locos microssatélites com até 26 alelos. Considerando este alto nível de diversidade alélica é provável que quando os marcadores microssatélites forem utilizados, em populações derivadas da hibridização de genótipos de soja adaptados, se encontre polimorfismo considerável. Os marcadores moleculares com múltiplos alelos são mais úteis que os marcadores dialélicos quando se procura segmentos genômicos em populações derivadas de linhagens puras ou populações acasaladas naturalmente. (CREGAN, BHAGWAT, AKKAYA, JIANG, 1994).

Em soja, os marcadores microssatélites têm sido muito utilizados para o mapeamento de genes específicos que determinam características agronomicamente importantes e, também, para identificação de QTLs de importância econômica, envolvidos na produtividade de grãos e na resistência genética a pragas e doenças, que são características de herança completa (WEBB et al., 1995; BACHMAN et al.,

2001; SCHUSTER et al., 2001; YANG et al., 2001; YUAN et al., 2002; MILES et al., 2006; SILVA, et al., 2008; MONTEROS et al., 2007).

2.4 Análise de segregantes agrupados e mapeamento genético

A técnica de segregantes agrupados proposta por Michelmore, Paran, kesseli, (1991) e denominada de *Bulked Segregant Analysis* (BSA) apresenta grande vantagem no mapeamento de genes, pois pode agilizar a detecção de marcadores ligados a caracteres de interesse. Esta estratégia minimiza o tempo empregado na busca do resultado e envolve o uso da diferença entre dois conjuntos de DNAs genômicos provenientes de indivíduos avaliados quanto à reação de interesse classificando os genótipos em resistentes e suscetíveis. Os DNAs dos segregantes são agrupados em amostras (*bulks*) e são comparados com o padrão observado nos genitores resistente e suscetível. Nesta população haverá genótipos idênticos ou contrastantes para uma região particular do genoma. Entretanto, estas duas amostras, serão diferentes geneticamente somente na região selecionada a ser estudada. Após, obtenção das gerações F_1 , F_2 e F_3 . Os indivíduos F_2 e F_3 são avaliados para o caráter, então, os indivíduos F_2 são separados nos seus respectivos grupos (resistente e suscetível). O DNA de 10 plantas de cada um desses grupos é misturado, formando duas amostras ou agrupamento (*bulks*), os quais serão analisados quanto ao perfil molecular. Assim, para a região de interesse o marcador poderá ser polimórfico e para todas as outras regiões do genoma, monomórfico (MICHELMORE et al., 1991). Os marcadores polimórficos são considerados como marcas promissoras para se verificar a associação com o fenótipo (resistente ou suscetível).

2.5 Mapeamento genético

A construção de mapas de ligação envolve basicamente a aplicação das técnicas de genética molecular aos conceitos originais da herança apresentados por Mendel em seus trabalhos com ervilhas (BATESON, SAUNDERS E PUNNETT, 1904) e em *Drosophila* por Morgan et al. (1915). Muitos genótipos apareciam mais frequentemente

do que outros, indicando que pares de genes não segregavam de forma independente. Este fenômeno foi interpretado como ligação gênica, que é a base do mapeamento genético (MORGAN, 1915).

O mapeamento genético toma como base a hipótese de que a co-segregação de dois marcadores indica a existência de ligação situados no mesmo cromossomo, e que a probabilidade de ocorrer permutas genéticas entre esses dois marcadores é menor, quanto menor for a distância entre eles. Dessa forma, é possível ordenar linearmente a informação genética ao longo dos cromossomos.

Haldane (1919) definiu a distância entre dois genes como uma medida do número de *crossing-over* entre eles. A função de Haldane admite que a ocorrência de permuta se dê de modo independente (ausência de interferência), seguindo uma distribuição de Poisson, sendo que a unidade de distância ficou conhecida como Morgan (M). Posteriormente, Kosambi (1944), propôs uma outra função em que é admitida a ocorrência de permutas próximas como eventos não independentes (presença de interferência). Assim, esta função assume a interferência completa entre regiões arbitrariamente próximas, sendo decrescente para locos mais distante, e igual a zero para locos de segregação independente.

A grande disponibilidade de marcadores neutros, altamente polimórficos, cuja herança não sofre influência ambiental (segregação mendeliana), aliada a procedimentos estatísticos complexos, tem permitido a construção de mapas de ligação para a maioria das espécies vegetais de interesse agrônomo, até mesmo para aquelas de longo ciclo de vida, como as florestais e as frutíferas. A construção de mapas de ligação tem como base a análise de segregação de centenas de marcadores e, por isso, requer recursos computacionais (CARNEIRO E VIEIRA, 2002). Para obtenção do mapa de ligação são utilizados programas como Mapmaker (LANDER et al., 1987), "Linkage 1" (SUITER et al.; 1983), "Gmendel" (LIU E KNAPP, 1992) desenvolvidos para serem ferramentas importantes na análise genética dos dados visando à construção de mapas genéticos.

Para a realização do mapeamento necessita-se de uma população segregante formada a partir de genitores contrastantes com máximo de polimorfismo para a característica. A população de mapeamento a ser utilizada pode ser: F_2 , retrocruzamento, linhagens puras recombinantes e duplo-haplóides. Esta etapa é

considerada crítica para o sucesso da construção do mapa. Não deve ser esquecido que estas populações apresentem locos em desequilíbrio de ligação (STAUB et al., 1996; PATERSON et al., 1991; TANKSLEY, 1993).

A próxima etapa é a escolha do tipo de marcador a ser empregado na análise molecular de genotipagem. De acordo com Coelho (2000) deve-se considerar o conteúdo informativo dos marcadores de natureza codominantes (RFLPs e SSRs) em relação aos marcadores dominantes (AFLP)s, além de aspectos como custo, tempo necessário para a realização das avaliações, e dificuldades práticas inerentes à execução de cada técnica. Tanto o grau de cobertura do genoma como a densidade do mapa a ser construído, são funções diretas do número de marcadores (LIU, 1998; LYNCH E WALSH, 1998). Outro fator importante envolve a verificação da distorção da segregação mendeliana. Segundo Liu (1998), os locos que apresentam distorção mendeliana afetam os testes estatísticos usados para detectar a ligação, podendo gerar falsos positivos. É recomendado, preferencialmente, o descarte dos locos que apresentam distorções da segregação mendeliana para não comprometer a qualidade do mapa (YAO, et al.; 1999; BEARZOTI, 2000).

Para formação dos mapas, diversos tratamentos estatísticos podem ser utilizados para estimar a frequência de recombinantes, entre eles, o método dos momentos, o método dos quadrados mínimos e o da verossimilhança. Para demonstrar que dois locos estão ligados, pode-se utilizar as razões de verossimilhança, em que o numerador corresponde à função de verossimilhança considerando $r = 0,5$ (ausência de ligação) e, o denominador, a função que possui a estimativa de máxima verossimilhança de r (estimativa da fração de recombinação entre locos). Para facilitar a interpretação, essa razão é colocada no logaritmo com base 10, sendo este termo definido com *LOD score*. Por exemplo, um LOD igual a 3 indica que a ocorrência de ligação é mil vezes mais provável que a de segregação independente (BEARZOTI, 2000).

Para a separação dos grupos de ligação, são realizados testes considerando duas marcas (locos) de cada vez, admitindo a hipótese de que a frequência entre ambas é igual a 0,5 (H_0 : segregação independente). Outro procedimento estatístico

utilizado pra detectar a ligação (desequilíbrio de ligação), além da máxima verossimilhança, é o teste de aderência (χ^2).

Após o conhecimento das frações de recombinação entre cada par de marcadores, e já discriminados os grupos de ligação, torna-se necessário determinar a melhor ordem para os marcadores dentro de cada grupo de ligação. Esta ordenação de locos é feita pelo processo que visa minimizar o número de *crossing-overs* (CARNEIRO E VIEIRA, 2002).

Com a utilização da estratégia de segregantes agrupados (BSA) em que se realiza uma triagem prévia de marcadores, para otimizar o mapeamento de regiões flanqueando locos de interesse, tem-se uma importante ferramenta para detecção de associação de um marcador e a característica avaliada. Espera-se que o alelo marcador esteja associado com o alelo que participa do controle genético do caráter.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material experimental

Os genótipos exóticos PI 200487 (Kinoshita, Figura 2a) e PI 459025A (Bing Nan, Figura 2c) foram utilizados como genitores para a síntese das populações. Eles foram escolhidos por serem considerados fontes de diferentes genes para resistência da soja a ferrugem asiática. Estas introduções foram cruzadas com a cultivar COODETEC 208 (Figura 2b), que é suscetível, mas apresenta diversas características de interesse agrônomo. Estes materiais foram fornecidos pela empresa Tropical Melhoramento Genético (TMG).

Figura 2 - Genitor resistente Kinoshita com lesão tipo RB (a), genitor suscetível CD 208 com lesão tipo TAN (b) e genitor resistente Bing Nan com lesão RB (c)

3.2 Avaliação fenotípica das gerações F_2 e $F_{2:3}$

As populações foram avaliadas em casa-de-vegetação quanto à reação ao patógeno. Esta avaliação fenotípica foi realizada em 200 indivíduos da geração F_2 , sendo coletado material foliar de cada uma destas plantas, para a genotipagem utilizando marcadores microssatélites. As folhas foram coletadas no estágio (V1-V2), folha primária ou trifólio completamente desenvolvido a partir do nó unifoliar, de acordo com a escala de FEHR e CAVINESS (1981) e mantidas em Freezer (-80°C) até o momento da extração de DNA.

A população foi conduzida e avaliada em casa-de-vegetação um experimento com temperatura controlada, variando entre $20-28^{\circ}\text{C}$, e assim possibilitando um maior

controle do patógeno, evitando consequentemente, sua disseminação pelo local e garantindo o desenvolvimento satisfatório das plantas F_2 .

Utilizaram-se vasos de sete litros distribuídos em duas fileiras por mesa (Figura 3a). Em cada vaso cultivaram-se três plantas F_2 , recebendo identificação com um número correspondente a cada genótipo (Figura 3b).

Para confirmação da resistência a geração $F_{2:3}$ foi fenotipada utilizando-se 10 indivíduos originados de cada planta F_2 . A avaliação da resistência foi feita com base no tipo de reação apresentada pela planta após a inoculação do patógeno (lesão RB: resistente ou lesão TAN: suscetível). A fenotipagem da geração $F_{2:3}$ foi adotada para melhorar a precisão da avaliação e confirmar o resultado, uma vez que na geração F_2 a avaliação foi realizada numa única planta. Desta forma, a fenotipagem será confirmada em plantas F_3 , permitindo assim o uso de repetições (10 plantas F_3 originados de um indivíduo F_2). Para a composição das amostras de segregantes agrupados considerou-se como resistente às plantas com lesão do tipo RB tanto na geração F_2 como em todas as plantas F_3 e vice-versa para suscetível. Esta etapa de avaliação fenotípica foi realizada nas dependências da empresa TMG. Posteriormente, dez indivíduos resistentes e dez suscetíveis foram escolhidos para comporem as amostras de segregantes agrupados (mistura de DNA).

Figura 3 - Disposição do experimento na casa de vegetação (a) e identificação dos genótipos (b)

Antes da inoculação com o patógeno foram coletadas folhas trifoliadas (Figura 4) completamente desenvolvidas das plantas F₂, para a posterior genotipagem do material vegetal, sendo estas identificadas e acondicionadas a –20°C.

Figura 4 - Coleta das folhas para extração do DNA

Para a avaliação fenotípica da reação à ferrugem, foram realizadas inoculações a partir de uma mistura de isolados da doença. O inóculo foi preparado a partir da coleta de folhas infectadas, que foram lavadas em solução água + tween 20 (espalhante) visando à retirada dos esporos da superfície abaxial, com o auxílio de um pincel (Figura 5). As plantas F₂ foram pulverizadas com água destilada + Tween 20 (1 gota para cada 100 ml de água), calibrada para 10⁴ uredosporos/mL, utilizando pulverizador manual. A primeira inoculação foi realizada quando a planta atingiu o estágio V2 da escala de FEHR e CAVINESS (1981), quando a primeira folha trifoliolada está estendida, isto é, com os três folíolos expandidos e a segunda folha trifoliolada já se apresenta aberta, de tal modo que os seus bordos de cada folíolo não estão se tocando. Foram realizadas posteriormente mais sete inoculações, em um intervalo de quatro dias.

Figura 5 - Coleta de esporos do fungo para o preparo do inoculo

A avaliação fenotípica da reação à ferrugem, foi realizada de acordo com o tipo de lesão (RB: resistente ou TAN: suscetível), que é relativo ao tipo de reação genética do material à presença da doença. As lesões das cultivares suscetíveis são predominantemente castanho-claras, porém, quando em alta incidência podem causar crestamento foliar; e em cultivares resistentes ou tolerantes, as lesões são predominantemente castanho-avermelhadas; essas lesões são mais numerosas na base e nas bordas dos folíolos das folhas baixas, por serem áreas com maior umidade e por haver microclima favorável à germinação, penetração e infecção dos tecidos foliares (FMT, 2006). Sendo assim, a avaliação realizada foi unicamente qualitativa, classificando cada uma das 200 progênies F_2 como resistente ou suscetível de acordo com o tipo de reação à ferrugem.

O mesmo procedimento foi adotado na avaliação da geração F_3 . Como mencionado anteriormente, esta geração também foi avaliada fenotipicamente, pois apesar da qualidade e rapidez na obtenção da geração F_2 , a avaliação da resistência é feita em nível de plantas individuais, o que diminui a precisão da avaliação. Este problema foi contornado com a utilização da geração F_3 , ou seja, a genotipagem foi realizada na geração F_2 e a reação à doença avaliada novamente em plantas F_3 , permitindo assim o uso de repetições (10 plantas F_3 originadas de um indivíduo F_2). Considerou-se como resistente às plantas com lesão do tipo RB tanto na geração F_2 como em todas as plantas F_3 . Para a análise com marcadores moleculares foram

utilizados apenas 96 indivíduos amostrados ao acaso na população, uma vez que a genotipagem de 200 indivíduos é onerosa e demorada.

3.3 Extração de DNA

As extrações de DNA dos genótipos foram realizadas seguindo o protocolo CTAB (DOYLE&DOYLE, 1987) com modificações. O DNA obtido foi ressuspenso em 100ul de tampão TE (Tris HCl e EDTA pH 8,5, 0,5 molar). A estimativa da concentração, da qualidade e da integridade do DNA extraído foi realizada por eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídio. Quantidades conhecidas de DNA do fago λ *lambda* foram aplicadas no gel em concentrações de 50ng até 200ng. Posteriormente, foram feitas as diluições com concentrações de 10ng DNA por microlitro de solução de DNA.

3.4 Avaliação de polimorfismo de marcadores microsatélites e a análise de segregantes agrupados

As reações de amplificação foram realizadas em solução contendo tampão PCR (10mM de Tris-HCl pH 8,3 e 50mM KCl), 4mM de cloreto de magnésio, 0,2 μ M de primer direito e reverso, 1,0 unidade de Taq DNA polimerase, 0,2mM de dNTP e 30 ng de DNA genômico dos genótipos selecionados após a classificação quanto à resistência e suscetibilidade a ferrugem asiática. Os genótipos foram amplificados com locos microsatélites, sendo 120 destes distribuídos nos diferentes cromossomos da espécie. Além destes, os microsatélites dos grupos de ligação G e J foram utilizados por representarem regiões associadas com outros genes de interesse.

A amplificação foi realizada em termociclador programado para uma desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida por 32 ciclos a 94°C por 1minuto, temperatura de anelamento por 1 minuto, sendo que nesta etapa a temperatura de anelamento dos *primers* é particular para cada par de *primer*, podendo variar de 46°C

até 65°C e a 72°C por um minuto para amplificação do DNA. Posteriormente, houve uma amplificação final de 10 minutos.

A estratégia de segregantes agrupados foi utilizada para agilizar o desenvolvimento da pesquisa, pois minimiza o tempo empregado na busca do resultado. Como mencionado anteriormente, esta técnica envolve o uso da diferença entre dois conjuntos de DNAs genômicos de uma população segregante originada de um cruzamento simples. No presente estudo, duas populações foram utilizadas, ou seja, duas fontes de resistência à ferrugem asiática foram cruzadas com uma cultivar comercial.

De cada cruzamento, após a avaliação fenotípica das gerações F₂ e F₃, duas amostras contrastantes foram elaboradas, sendo uma composta por dez indivíduos resistentes e outra com dez indivíduos suscetíveis, em ambas as gerações avaliadas. Estas amostras foram comparadas com os genomas dos genitores utilizando-se marcadores microssatélites.

Tanto os indivíduos da amostra agrupada (*bulk*) suscetível como a resistente foram selecionados por apresentarem genótipos idênticos para uma região particular do genoma (reação à doença). Entretanto, estas amostras agrupadas diferem geneticamente somente na região selecionada a ser estudada. Assim, verifica-se associação de um marcador com o fenótipo avaliado, ou seja, locos que conferem resistência ou suscetibilidade serão ressaltados evidenciando polimorfismo e os demais locos serão monomórficos (MICHELMORE et al., 1991).

3.5 Eletroforese

Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel denaturante de poliacrilamida a 6%. As condições de corrida foram 80 watts e temperatura de 50° ou 55°C, utilizando tampão TBE (0,09M tris, 0,09M ácido bórico e 2mM EDTA). Antes da aplicação no gel os produtos da reação foram desnaturados com tampão de carregamento por cinco minutos a 95°C e rapidamente colocados em gelo.

3.6 Coloração com nitrato de prata para detecção dos marcadores SSR

Os géis de poliacrilamida foram corados com nitrato de prata seguindo metodologia desenvolvida por Creste et al. (2001). Para isto, o gel foi fixado com solução contendo 10% (v/v) etanol e 1% (v/v) ácido acético por dez minutos, lavado com água destilada por um minuto, foi oxidado com solução de ácido nítrico 1,5% (v/v) por três minutos, lavado com água destilada por um minuto, tratado com nitrato de prata 0,2% (p/v) por 20 minutos (no escuro), lavado duas vezes com água destilada por 30 segundos, revelado com solução reveladora (30gL^{-1} Na_2CO_3 ; 0,54 mL por litro de formaldeído 37%) gelada até o aparecimento das bandas. A reação foi interrompida com solução de ácido acético 5% (v/v) por cinco minutos e, finalmente, lavou-se o gel corado com água destilada por dez minutos deixando-o secar ao ar livre e após um dia o gel foi digitalizado.

3.7 Avaliação do gel

Os géis de SSR foram analisados quanto ao tamanho dos pares de bases para cada par de primer. Os tamanhos dos fragmentos da amplificação foram estimados com marcador de peso molecular conhecido (*ladder*) com tamanhos de pares de bases conhecidas, sendo posteriormente feita a digitalização dos géis.

3.8 Mapeamento dos genes

Após a obtenção dos dados por meio dos marcadores microssatélites o programa Mapmaker/EXP 3.0 (LANDER et al. 1987) foi utilizado para realizar a análise de ligação, utilizando a função de mapeamento de Kosambi, com distância máxima de 37,2 centimorgans, que é a distância entre os marcadores e com valor mínimo de LOD de 3,0 para o número mínimo de marcadores utilizados. Como critérios pra a formação dos grupos de ligação, a função de Kosambi admite a ocorrência de permutas próximas como eventos não independentes (presença de interferência). Assim, esta função

assume a interferência completa entre regiões arbitrariamente próximas, sendo decrescente para locos mais distantes, e igual a zero para locos independentes (WEIR, 1996; LIU, 1998).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação fenotípica das populações

As populações segregantes foram avaliadas quanto à reação a ferrugem asiática da soja após a inoculação do fungo *P. pachyrhizi*. O inóculo utilizado representa uma mistura de isolados coletados em diferentes locais do Brasil e contém a nova raça encontrada na região centro-oeste que quebrou a resistência dos genes *Rpp1* e *Rpp3*. A inoculação foi realizada em casa-de-vegetação para que houvesse maior controle do experimento.

A avaliação fenotípica da geração F_2 da população obtida no cruzamento envolvendo a PI 200487 (Kinoshita) apresentou 77 indivíduos resistentes e 19 suscetíveis. Com base nos resultados obtidos verificou-se que a segregação obtida nesta geração foi de 3:1, ou seja, indicando que a característica é controlada por um gene com dois alelos, havendo dominância de um alelo sobre o outro (Tabela 1). Na população F_2 envolvendo o genitor PI 459025 (Bing Nam) foram observados 76 indivíduos resistentes e 20 suscetíveis. Assim, verificou-se também nesta população uma segregação de 3:1, indicando que a característica, neste outro genitor, também é controlada por um gene com dois alelos, havendo dominância de um alelo sobre o outro (Tabela 1).

Tabela 1 - Análise da segregação nas gerações F_2 e $F_{2:3}$ derivadas dos cruzamentos PI 200487 x CD 208 e PI 459025 x CD 208

Genitor resistente	Geração F_2					Geração $F_{2:3}$					
	R	S	Total	Esperado	$\chi^2_{0,05}$	R	H	S	Total	Esperado	$\chi^2_{0,05}$
PI 200487 (<i>Rpp</i> ₋)	77	19	96	3:1	1,38 ^{ns}	25	52	19	96	1:2:1	1,42 ^{ns}
PI 459025 (<i>Rpp4</i>)	76	20	96	3:1	0,89 ^{ns}	27	49	20	96	1:2:1	1,06 ^{ns}

Na geração $F_{2:3}$ de cada população sintetizada, foram avaliadas dez plantas originadas de cada planta F_2 , sendo este procedimento adotado para confirmar a reação observada nas plantas F_2 . Nas duas populações avaliadas observou-se a segregação de 1:2:1 (Tabela 1), sendo que naquela envolvendo o genitor Kinoshita (PI 200487) verificou-se 25 progênies homozigotas resistentes, 52 heterozigotas resistentes e 19 homozigotas suscetíveis. No cruzamento envolvendo a PI 459025 (Bing Nan), do total de 96 progênies avaliadas, observou-se 27 homozigotas resistentes, 49 heterozigotas resistentes e 20 homozigotas suscetíveis.

4.2 Análise de segregantes agrupados

Na população formada pelo cruzamento entre a PI 200487 (Kinoshita) e a cultivar Coodetec 208 foram testados 140 locos microsatélites, dos quais 72 apresentaram polimorfismo entre os genitores, sendo possível a visualização de alguns destes na Figura 6. Estes 72 locos foram utilizados para verificar a associação entre o fenótipo do caráter, ou seja, a reação a doença com o marcador microsatélite. Assim, os genitores resistente e suscetível (GR e GS) foram comparados com as amostras formadas por indivíduos resistentes e suscetíveis (BR e BS) seguindo o procedimento proposto por Micheltmore et al. (1991).

Figura 6 - Perfil de gel de poliácridamida dos genitores Coodetec 208 (esquerda) e PI Kinoshita (direita), evidenciando os polimorfismos com os locos microsatélites

Utilizando-se os 72 microsatélites polimórficos observou-se que apenas o loco Satt080 revelou associação entre os genitores e as amostras correspondentes, ou seja, o mesmo padrão de bandas (Figuras 7). Após esta etapa este loco foi utilizado para

genotipar todos os 10 indivíduos de cada amostra (*bulk*) confirmando assim sua associação com a reação de resistência e suscetibilidade à doença.

Figura 7 - Perfil de gel de poliacrilamida nos genitores suscetível e resistente (GS e GR) e nas amostras suscetível e resistente (BS e BR) utilizando o loco Satt080

A evidência preliminar de ligação gênica, entre o marcador selecionado e o loco de resistência, foi confirmada através da genotipagem utilizando todos os 96 indivíduos da geração segregante F_2 (Figura 8). Esta etapa representou um estudo de co-segregação entre o marcador e o fenótipo, na qual posteriormente se estimou o valor da frequência de recombinações entre o marcador Satt080 e o loco (*Rpp*_) que controla o caráter de resistência estudado.

O marcador Satt080 está localizado no grupo de ligação N, sendo este, diferente dos demais encontrados (*Rpp1*, *Rpp2*, *Rpp3* e *Rpp4*). Desta forma, este poderá ser um novo loco controlando o caráter estudado.

Figura 8 - Perfil do gel de poliacrilamida dos 96 indivíduos utilizando os locos Satt080

Após a localização do marcador SSR no grupo de ligação esta região foi saturada com novos microssatélites. Para isto, 16 novos *primers* foram sintetizados (Tabela 2) abrangendo uma distância máxima de 10 cM do marcador Satt080 encontrado utilizando a estratégia de segregantes agrupados. A escolha dos novos

marcadores foi baseada no mapa genético integrado da soja obtido por Song et al. (2004).

Tabela 2 - Novos marcadores microssatélites sintetizados para saturação do grupo de ligação N

Microssatélites	Posição cM
Sat_186	30,11
Satt530	32,85
Sat 683	34,52
Satt675	34,65
Satt624	35,32
Sat_084	36,86
Satt393	37,44
Satt584	37,98
Satt485	38,07
Sat_166	38,59
Sat_208	39,35
Satt125	40,63
Sat_275	40,81
Sat_280	43,45
Satt080	45,14
Sat_266	47,28
Satt387	53,25

Entre os 16 novos locos, 11 apresentaram polimorfismo para os genitores e apenas dois apresentaram associação com a reação de resistência e suscetibilidade à doença. Estes foram os marcadores Satt675 e Sat_275, como podem ser visualizados na Figura 9.

Figura 9 - Perfil de gel de poliácridamida dos microssatélites Sat_275 e Satt 675, respectivamente, confirmando a associação dos genitores com as amostras correspondentes

Posteriormente, analisou-se a segregação dos 96 indivíduos utilizando os dois novos microssatélites (Figura 10).

Figura 10 - Perfis dos géis de poliacrilamida dos 96 indivíduos utilizando os locos Sat_275 e o Satt675, respectivamente (A e B)

Posteriormente, o teste do qui-quadrado foi empregado para verificar se havia distorção da segregação nos marcadores quanto à proporção mendeliana esperada de 1:2:1 (Tabelas 3 e 4). Todos os marcadores mapeados neste trabalho se enquadram satisfatoriamente à razão esperada para uma herança co-dominante, ou seja, não foi encontrada distorção de segregação nos marcadores utilizados.

Tabela 3 - Análise de segregação para os marcadores microssatélites na geração F₂ considerando o novo loco encontrado

Marcador	Padrão observado			Padrão Esperado	$\chi^2_{0,05}$	Probabilidade %
	A	B	C			
Satt275	25	53	18	1:2:1	2,44 ^{ns}	29,55
Satt080	20	56	20	1:2:1	2,67 ^{ns}	26,35
Satt675	27	47	22	1:2:1	0,56 ^{ns}	75,47

Utilizando o programa Mapmaker, determinou-se a ordem e a distância desses marcadores em relação ao loco associado com a resistência sendo estas: 22,1 cM do Satt675, 12,6 cM do Sat_275 e 11,4 cM do Satt080 (Figura 11), ou seja, os marcadores SSRs Sat_275 e Satt080 flanqueiam o loco envolvido no controle da ferrugem asiática no grupo de ligação N. Estes marcadores foram descritos como pertencentes ao grupo

de ligação N por CREGAN et al. (1999a e 1999b). A identificação deste loco associado à resistência num novo grupo de ligação foi inicialmente apresentada por Ortiz et al. (2007). Um novo estudo realizado por Catelli et al. (2007) em que também se utilizou a PI 200487 como um dos genitores no mapeamento encontrou-se somente o marcador Satt152 situado a 14,3 cM do loco de resistência, sendo que este marcador também está posicionado no grupo de ligação N. O loco Satt080 é o mesmo observado neste estudo, sugerindo que este novo loco *Rpp_* está presente também na PI Shira Nuhi. Assim, considera-se de elevada importância a saturação desta região, para a identificação de marcadores mais próximos ao novo loco envolvido na resistência a ferrugem asiática, garantindo sua utilização segura no processo de seleção assistida por marcadores moleculares em programas de melhoramento de soja.

Grupo de ligação N

Figura 11 - Representação gráfica parcial do grupo de ligação N da soja, indicando o posicionamento do gene de resistência à ferrugem (*Rpp_*) em relação aos marcadores SSR identificados

Na população sintetizada a partir do cruzamento entre PI459025 (Bing Nam) e Coodetec 208 também foram testados 140 microssatélites distribuídos nos diferentes cromossomos da espécie. Além destes, os microssatélites dos grupos de ligação G e J foram utilizados, uma vez que representam regiões com diversos outros genes de interesse (*hots spots*). É sabido que no grupo de ligação G foram descobertos QTLs para resistência a outras doenças, como para nematóide da galha, podridão da haste, nematóide do cisto. (LI et al., 1991; TAMULONIS et al., 1997; ARAHANA et al., 2001; YUE et al., 2001). Além disso, o gene *Rpp1* também está inserido no grupo de ligação G (HYTEN et al., 2007).

Dentre os 72 locos polimórficos identificou-se, pela análise de segregantes agrupados, que cinco deles apresentavam a correspondência desejada, ou seja, revelando o mesmo padrão de bandas entre os genitores e as amostras (*bulks*) compostas por indivíduos resistentes e suscetíveis (Figura 12). Destes, os microssatélites Satt288, Satt191 e Sct_199 estão localizados no grupo de ligação G (Cregan et al., 1999a e Song et al., 2004) e foram utilizados no mapeamento do loco de resistência. Na literatura Hartwig (1986) relata que Bing Nam (PI 459025) apresenta apenas o gene de resistência *Rpp4* sendo este loco posicionado no grupo de ligação G com base nos resultados obtidos.

Figura 12 - Perfil de gel de poliacrilamida nos genitores suscetível e resistente (GS e GR) e nas amostras suscetível e resistente (BS e BR) utilizando os locos Satt191, Sct_199 e Satt288, respectivamente, confirmando a associação dos genitores com os *bulks* correspondentes

Após esta etapa realizou-se o estudo de co-segregação entre os marcadores e o fenótipo, no qual se estimou o valor da frequência de recombinações entre os marcadores que estão no grupo de ligação G e o loco *Rpp4* que controla a resistência à ferrugem asiática da soja.

Tabela 4 - Análise de segregação para os marcadores microsatélites na geração F₂ considerando o loco *Rpp4*

Marcador/caráter	Padrão observado			Padrão Esperado	$\chi^2_{0,05}$	Probabilidade %
	A	B	C			
Satt288	23	56	17	1:2:1	3,42 ^{ns}	18,11
Satt191	25	49	22	1:2:1	0,23 ^{ns}	89,15
Sct_199	26	47	23	1:2:1	0,14 ^{ns}	92,96

Nesta população de mapeamento, todos os marcadores também apresentaram a proporção esperada para uma herança co-dominante. Utilizando o programa Mapmaker, determinou-se a ordem e distância desses marcadores em relação ao loco associado com a resistência sendo estas: 7,8 cM do Satt191, 21,0 cM do Sct_199 e 8,1 cM do Satt288 (Figura 13).

O trabalho realizado por Nuntapunt et al. (2004) na Tailândia, também relata a localização de um gene de resistência neste grupo de ligação flanqueado pelos microsatélites Satt12 e Satt472. Entretanto, os autores não esclarecem qual a fonte de resistência utilizada para a síntese da população de mapeamento.

Outro resultado disponível na literatura foi apresentado por Silva et al. (2006 e 2008), também utilizando a estratégia de segregantes agrupados (BSA). Os autores utilizaram uma população F₂ originada do cruzamento entre a PI 459025 (Bing Nam) e a cultivar BRS 184. Neste trabalho os autores mapearam o gene *Rpp4* a 1,9 cM de Satt 288 e 12,8 cM de AF162283, ou seja, no mesmo grupo de ligação encontrado neste estudo. Mesmo assim, considera-se fundamental a saturação da região com novos marcadores para a identificação de marcas mais próximas ao gene para a utilização segura no processo de seleção assistida.

Dentre as fontes de resistência já descritas na literatura, este loco reportado na população e o *Rpp2* são os únicos genes que permanecem resistentes à ferrugem no Brasil (Arias et al., 2004).

Grupo de ligação G

Figura 13 - Representação gráfica parcial do grupo de ligação G da soja, indicando o posicionamento do gene de resistência à ferrugem (*Rpp4*) em relação aos marcadores microssatélites identificados

4.3 Considerações finais

A identificação de todos os genes relacionados com a resistência à ferrugem asiática da soja em seus respectivos grupos de ligação é fundamental para auxiliar os programas de melhoramento genético. Assim, espera-se no futuro que a seleção de genótipos resistentes seja auxiliada pelas informações moleculares, permitindo também a piramidação destes genes, e como consequência a diminuição dos custos para o agricultor com inseticidas e os danos causados ao meio ambiente pela aplicação destes defensivos agrícolas (LI et al., 2007).

O gene de resistência *Rpp4* é conhecido há mais de trinta anos, mas só agora com o surgimento da doença na América do Sul ele se tornou, juntamente com *Rpp2*, objeto de estudos de mapeamento. Maior atenção tem sido dada a estes dois genes, pois a nova raça surgida no Brasil quebrou a resistência dos outros dois genes descritos *Rpp1* e *Rpp3*.

Os dois genes estudados comportaram-se como caracteres dominantes confirmando os estudos prévios de Hartwig (1986) e Hartwig e Bromfield (1983). Entretanto, observa-se que novos genes podem estar envolvidos no controle desta importante doença da soja. Isto foi verificado na PI 200487 com base nos resultados deste estudo.

O loco associado ao gene *Rpp4* está localizado numa região denominada de *hots spots* para genes de resistência, ou seja, a região cromossômica vizinha deste loco contém um grupo significativo de genes para resistência a enfermidades. Destaque pode ser dado a podridão da haste (ARAHANA et al., 2001), nematóide de cisto e galha (WANG et al., 2001 e YUE et al., 2001), podridão de *Phytophthora* (DEMIRBAS et al., 2001), síndrome da morte súbita (CHANG et al., 1997) e o gene *Rpp1* para ferrugem asiática (HYTEN, et al., 2007). Considera-se interessante a utilização da seleção assistida para acelerar o processo de melhoramento para o caráter

Os mapas de ligação obtidos para os dois genes neste estudo revelam a mesma ordem dos marcadores presentes no mapa de ligação apresentado por Song et al. (2004). Entretanto, considera-se que um mapa mais saturado envolvendo estas regiões torna-se necessário. De qualquer forma, os marcadores obtidos neste trabalho serão de grande utilidade para assistir a introgressão dos genes de resistência. Além disso,

descreve-se um novo loco envolvido no controle do caráter, loco este ainda não relatado na literatura.

Apesar das duas fontes de resistências utilizadas neste estudo não serem adaptadas às condições climáticas brasileiras, e nem possuírem características agronômicas favoráveis, considera-se que o conhecimento das regiões que flanqueiam os genes *Rpp4* e *Rpp_*, assim como os demais genes conhecidos na literatura é fundamental para uma estratégia integrada de controle da ferrugem asiática. Entende-se que a introgressão de vários genes de resistência represente a melhor estratégia para prolongar a vida da cultivar, ou seja, retardar a quebra da resistência incorporada.

5. Conclusões

- A técnica BSA foi eficiente para detectar locos relacionados com a resistência à ferrugem asiática da soja;
- A PI 459025A (Bing Nam) apresenta o gene de resistência *Rpp4* localizado no grupo de ligação G.
- A PI 200487 (Kinoshita) apresenta um gene diferente daqueles descritos na literatura, sendo este localizado no grupo de ligação N. Este gene pode ser denominado de *Rpp5*.

REFERÊNCIAS

ABIOVE. Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais. Dados do Complexo Soja. Disponível em: <www.abiove.com.br>. Acesso em: 10 fev. 2007.

AKKAYA, M.S.; BHAGWAT, A.A.; CREGAN, P.B. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. **Genetics**, Pettsburg v. 132, p. 1131-1139, 1992.

ARAHANA, V.S.; GRAEF, G.L.; SPECHT, J.E.; STEADMAN, J.R.; ESKRIDGE, K.M.; Identification of QTLs for resistance to *Sclerotinia Sclerotiorum* in soybean. **Crop Science**, Madison, v.41, p.180-188, 2001.

ARIAS, C.A.A. Potencial Genético da Soja: progressos e limitações para alta produtividade. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 7, 2004. Foz do Iguaçu. **Proceedings...** Londrina: Embrapa Soja, p. 1263-1268.

BACHMAN, M. S.; TAMULONIS, J.P.; NICKELL, C.D.; BENT, A.F. Molecular markers linked to brown stem rot resistance genes, [Rbs.sub.1] and [Rbs.sub.2], in soybean. **Crop Science**, Madison, v.41, n.2, p.527-535, 2001.

BATERSON, W.; SANDERS, E.R.; PUNETT, R.C. Experimental studies in the physiology of heredity. London, **Reports to the Evolution committee of the Royal Society**, London, v.12, p. 1-131, 1904.

BEARZOTI, E. Mapeamento de QTL. In: PINHEIRO, J.B, CANEIRO, I.F. (Eds). **Análise de QTL no melhoramento de plantas**. Goiânia: FUNAPE, p.36-223, 2000.

BEDENDO, I. P. Ferrugens. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. 3ª ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, cap. 30, p. 602-626.

BOHNERT, H.J.; AYOUBI, P.; BORCHERT, C.; BRESSAN, R.A.; BURNAP, R.L.; CUSHMAN, J.C.; CUSHMAN, M. A.; DEYHOLOS M., FISCHER, R. A genomics approach towards salt stress tolerance. **Plant Physiology Biochem**, Paris, v.39, p.295-311, 2001.

BONDE, M.R.; NESTER, S.E.; AUSTIN, C.N.; STONE, C.L.; FREDERICK, R.D. Evaluation of Virulence of *Phacopsora pachyrhizi* and *P. meibomia* isolates. **Plant Disease**. Saint Paul, v. 90, n.6, p. 7108-716, 2006.

BROMFIELD, K.R.; HARTWIG, E.E. Resistance to soybean rust and mode of inheritance. **Crop Science**, Madison, v.20, n. 2, p. 254-255, 1980.

BRONFIELD, K. R. **Soybean Rust**. St. Paul: American Phytopathological Society, 1984. p. 95, (Monograph 11).

BRONFIELD, K.R. World Soybean Rust Situation. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 1976, Danville. **Proceeding...** Danille: The Interstate Printers and Publishers, 1976. p.491-500.

CALGARO, L.C.; RODRIGUEZ, G.A.; VIEIRA, E.S.N.; DALLA NORA, T.; MENDES, C.S.; SCHUSTER, I. Variabilidade genética entre amostras de *Phakopsora pachyrhizi* Sidow avaliada por marcadores RAPD. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 4., 2006, Londrina, **Anais...** Londrina: Embrapa soja, 2006. p 44-45.

CARNEIRO, L.C. **Caracterização epidemiológica da resistência parcial e análise da tolerância de genótipos de soja à ferrugem asiática**. 2007. 75p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

CARNEIRO, M.S.; VIEIRA, M.L.C. Mapas genéticos em plantas. **Brangantia**, Campinas, v.61, n.2, p.89-100, 2002.

CATELLI, L.L.; ARIAS, C.A.A.; CAMARGO, P.O.; MARIN, S.R.R.; ABDELNOOR, R.V. Mapeamento molecular do gene de resistência à ferrugem asiática nos genótipos PI 200487 (Kinoshita) e Shiranui. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 40, 2007. Marigá. **Anais...** Marigá: Fitopatologia Brasileira. 2007, V.32, p.S325,

CHANG, S.J.C.; DOUBLER, T.W.; KILO, V.Y.; ABUTHREDEIH, J.; PRABHU, R.; FREIRE, V.; SUTTNER, R.; KLEIN, J.; SCHMIDT, M.E.; GIBSON P.T.; LIGHTFOOT, D.A. Association of loci underlying field resistance to soybean sudden death syndrome (SDS) and Cyst nematode (CSN) Race 3. **Crop Science**, Madison, v.37, p.965-971, 1997.

COELHO, A.S.G. Considerações gerais sobre a análise de QTL's. In: Pinheiro, J.B.; CARNEIRO, I.F. (Eds). **Análise de QTL no melhoramento de plantas**, Goiânia: FUNAPE, p.1-36, 2000.

COOK, R.J. The molecular mechanisms responsible for resistance in plant-pathogen interactions of the gene-for-gene type function more broadly than previously imagined. **PNAS**, Washington, v.95, p. 971-9712, 1998.

CREGAN, P.B.; BHAGWAT, A.A.; AKKAYA, M.S.; JIANG, R. Microsatellite fingerprinting and mapping of soybean. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, Durant, v.5, p. 49-61, 1994.

CREGAN, P.B.; JARVIK, T.; BUSH, A.L.; SHOEMAKER, R.C.; LARK KG, KAHLER, A.L.; KAYA, N.; VANTOAI, T.T.; LOHNES, D.G.; CHUNG, L.; SPECHT, J.E. An integrated genetic linkage map of the soybean genome. **Crop Science**, Madison, v.39, p.1464-1490, 1999a.

CREGAN, P.B.; MUDGE, J.; FICKUS, E.W.; MAREK, L.F.; DANESH, D.; DENNY, R.; SHOEMAKER, R.C.; MATTHEWS B.F.; JARVIK, T.; YOUNG, N.D. Targeted isolation of simple sequence repeat markers through the use of bacterial artificial chromosomes. **Theoretical and Applied Genetics**, Verlag, v.98, p.919-928, 1999b.

CRESTE, S. TULMANN-NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v.19, p.299-306, 2001.

DA SILVA, D.C.G. **Mapeamento molecular dos genes de resistência à ferrugem asiática da soja *Rpp2* e *Rpp4* e caracterização das mudanças transcricionais na planta de soja durante a interação com o fungo da ferrugem.** 2007. 80p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2007.

DEMIRBAS A.; RECTOR B.G.; LOHNES D.G.; FIORITTO, R.T.; GRAEF, G.L; CREGAN, P.B.; SHOEMAKER, R.C.; SPECHT, J.E. Simple sequence repeat markers linked to the soybean rps genes for phytophthora resistance, **Crop Science**, Madison, v.41, p.1220-1227, 2001.

DIWAN, N.; CREGAN, P.B. Automated sizing of fluorescent-labeled simple sequence repeat (SSR) markers to assay genetic variation in soybean. **Theoretical Applied Genetics**, Verlag, v.95, p.723-733, 1997.

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

EMBRAPA SOJA 2007. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro Nacional de Pesquisa de Soja. **Prejuízo com ferrugem da soja se mantém estável nesta safra.** Disponível em: <www.cnpso.embrapa.br/noticia/ver_noticia.php?cod_noticia=380>. Acesso em: 15 de maio. 2007.

EMBRAPA SOJA. **Tecnologias de Produção de soja – Paraná 2005.** Londrina: Embrapa Soja, 2004. p. 171-218.

Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Centro de Estudos Avançados em Economia. **Análise de custos e de tributos nas cinco regiões do Brasil suporte a tomada de decisão e à formulação política.** Parte 1 – Cálculos e análises dos custos de produção do biodiesel até a usina. Disponível em: <<http://cepea.esalq.usp.br/biodiesel>> Acesso em: 20 de nov. 2007.

FEHR, W.R.; CAVINESS, C.E. Stage of soybean development. **Ames:** Iowa State University, 1981. 12p. (Iowa Cooperative Extensive Service. Special Report, 80).

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3^a ed. Brasília: **EMBRAPA**, CENARGEN, 1998. 220p.

GRIESHOP, C. M.; FAHEY JR., G.C. Comparason of quality characteristics soybeans from Brazil, China and United States. **Journal of Agricultural and Food chemistry**, Easton, v.49, n.5, p. 2669-2673, 2001.

HALDANE. J. B.S. The combination of linkage values and the calculations of distances between the loci of linked factors. **Journal of genetics**. London, v.8, p.299-309, 1919.

HARTIWIG, E.E.; BROMFIELD, K.R. Relationships among three genes conferring specific resistance to rust in soybeans. **Crop Science**, Madison, v.23, n. 1, p. 237-239, 1983.

HARTMAN, G.; BONDE, M.R.; MILES, M.M.; FREDERICK, R.D. Variation of *Phakopsora pachyrhizi* isolates on soybean. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 7., 2004, Foz do Iguassu. **Proceedings...** Londrina: Embrapa Soja, 2004. p. 440-446.

HARTMAN, G.; MILES, M.R.; FREDERICK, R.D. Breeding for Resistance to Soybean Rust. **Plant Disease**. St Paul, v. 89, n. 6. p. 664-666, 2005.

HARTMAN, G.L.; WANG, T.C.; SHANMUGASUNDARAM, S. Soybean Rust Research: Progress and Future Prospects. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 5., 1994, Chiang Mai. **Proceeding...** Bangkok: Banpot Napompeth, 1997. p. 180-186.

HARTMAN, G.L.; WANG, T.C.; TSCHANZ, A.T. Soybean rust development and the quantitative relationship between rust severity and soybean yield. **Plant Disease**, St. Paul, v. 75, n.6, p.596-600, 1991.

HARTWIG, E. E. Identification of a fourth major gene conferring resistance to soybean rust. **Crop Science**, Madison, v. 26, n.4, p.1135-1136, 1986.

HYTEN D.L.; HARTMAN, G.L.; NELSON, R.L.; FREDERICK, R.D.; CONCIBIDO, V.C.; NARVEL, J.M.; GREGAN, P.B. Map location of the *Rpp1* locus that confers resistance to soybean rust in soybean. **Crop Science**, Madison, v.47, p.837-838, 2007.

KATO, M.; YORINORI, J.T. Variabilidade Patogênica da *Phakopsora pachyrhizi* no Brasil. In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 28., 2006, Londrina. **Anais...** Londrina: Embrapa Soja – Fundação Meridional – Fundação Triângulo, 2006. p. 147-149.

KAWASAKI, S.; BORCHET C.; DEYHOLOS, M.; WANG, H.; BRAZILLE, S.; KAWAI K.; GALBRAITH D.; BOHNERT, H.J. Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. **Plant Cell**, Norwich, v.13, p. 889-905, 2001

KOSAMBI, D.D. The estimation of map distance from recombination values. **Annuaire of Eugenetics**, Washington, v.12, p.172-175, 1944.

LANDER, E.S.; GREEN, P.; ABRAHAMSON, J.; BARLOW, A.; DALY, M.J.; LINCOLN, S.E.; NEWBURG, L. MAPMAKER: an interactive computer program for constructing genetic linkage maps of experimental and natural populations. **Genomics**, Massachusetts, v.1, p.174-181, 1987.

LI, Y.C.; KOROL, A.B.; FAHIMA, T.; BEILES, A.; NEVO, E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, Vancouver, v.11, p.2453-2465, 2002.

LI, Y.; HILL, C.B.; CARLSON, S.R.; DIERS, B.W.; HARTMAN, G.L. Soybean aphid resistance genes in the soybean cultivars Dowling and Jackson map to linkage group M. **Molecular Breeding**, New York, v.19, p. 25-34, 2007.

LIU, B.; WENDEL, J.F. Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. **Molecular Ecology**, Vancouver, v. 1, p. 205-208, 2001.

LIU, B.H. **Statistical genomics**. New York: CRC, 610p, 1998.

LIU, B.H.; KNAPP, S.J. GMEDEL: a programa for Mendelian segregation and linkage analysis of individual or multiple progeny populations using log-likelihood ratios. **Journal of Heredity**, Cary, v.81, n.5, p.407-418, 1992.

LYNCH, M.; WALSH, B. **Genetics and analysis of quantitative traits**. Sunderland: Sinauer Associates. 1998, 978p.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Principais produtos exportados e respectivos destinos**. Disponível em: <www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 20 ago. 2006.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Soja Brasil: série histórica de área cultivada, produção e produtividade**. Disponível em: <www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 20 abr. 2007.

MARCHETTI, M.A.; MELCHING, J.S.; BROMFIELD, K.R. The effects of temperature and dew period on germination and infection by uredospores of *Phakopsora pachyrhizi*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.66, n.4, p.461-463, 1976.

McLEAN, R.J.; BYTH, D.E. Inheritance of resistance to rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in soybeans. **Australian Journal Agricultural of Research**, Australia, v. 31, n. 5, p. 951-956, 1980.

MENTEWAB, A.; CARDOZA, V.; STEWART, C.N.J. Genomic analyses of the response of *Arabidopsis thaliana* to trinitrotoluene as revealed by cDNA microarrays. **Plant Science**, Madison, v.168, p.1409-1424.

MICHELMORE, R.W.; PARAN, I.; KESSELI, R.V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Genetics**, Pettsburg, v.88, p.9828-9832, 1991.

MILES, M.R.; FREDERICK, R.D.; HARTMAN, G. L. Evaluation of Soybean germplasm for resistance to *Phakopsora pachyrhizi*. **Plant Health Progr Online**. doi: 10.1094/PHP-2006-0104-01-RS

MONTEROS, M.J.; MISSAOUI, A. M.; PHILLIPS, D.V.; WALKER, D.R.; BOERMA, H.R. Mapping and confirmation of the 'Hyuuga' red-brown lesion resistance gene for asian soybean rust. **Crop Science**, Madison, v.47, p.829-836, 2007.

MOORE, G.; DEVOS, K.M.; WANG, Z.; GALE, M.D. Cereal Genome Evolution: Grasses, line up and from a circle. **Current Biology**, London, v.5, p.737-749, 1995.

MOORE, S.S.; SARGEANT, L.L.; KING, T.J.; MATTICK, J.S.; GEORGES, M.; HETZEL, D.J.S. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. **Genomics**, Massachusetts v. 10, p.654-660 1991.

MORGAN, T.H.; STURTEVANT, A.H.; MULLER, H.J.; BRIDGERS, C.B. **The mechanism of mendelian heredity**. Henry Holt and Company, New York: 1915, 262p.

MORGANTE, M. HANAFEY, M.; POWELL, W. Microsatélites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. **Nature Genetics**, New York, v.30, p. 194-200, 2002.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A.M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **Plant Journal**, Florida, v.3, p. 175-182, 1993.

MOY, P.; QUTOB, D.; CHAPMAN, B.P.; ATKINSON, I.; GIJZEN, M. Patterns of gene expression upon infection of soybean plants by *Phytophthora sojae*. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, Saint Paul, v.17, p.1051-1062, 2004.

NUNTAPUNT, M.; SRISOMBUN, S.; CHUNWONGSE, J. Soyebean breeding for rust resistance in Thailand and extent of rust resistant cultivars used. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 7, 2004. Foz do Iguaçu. **Proceedings...** Londrina: Embrapa Soja, p. 423-430.

ORTIZ, C.M.; BAJAY, M.M.; BATISTA, C.E.A.; CALVO, E.S.; KIIHL, R.A.S.; ZUCCHI, M.I.; PINHEIRO, J.B. Identificação de genes associados à ferrugem asiática da soja utilizando a estratégia de BSA. CONGRESSO DE BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS. 4., 2007, São Lourenço. **Anais...** São Lourenço. UFLA, 2007. CD-ROM.

PATERSON, A.H.; TANKSLEY, S.D.; SORRELLS, M.E. DNA markers in plant improvement. **Advances in Agronomy**, San Diego, v.46, p.99-104, 1977.

ROESSING, A. C. **Criação de Empregos pelo Complexo Agroindustrial da Soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2004. 50p.

SCHENK, P.M.; KAZAN, K.; WILSON, I.; ANDERSON, J.P.; RICHMOND, T.; SOMERVILLE, S.C.; MANNERS, J.M. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. **PNAS**, Washington, v.97, p.11655-11660. 2000.

SHUSTER, I.; ABDELNOOR, R.V.; MARIN, S.R.R.; CARVALHO, V.P.; KIIHL, R.A.S.; SILVA, J.F.V.; SEDIYAMA, C.S.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Identification of a new major QTL associated with resistance to soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*) **Theoretical and Applied Genetics**, Verlag, v.102, n.1, p. 91-96, 2001.

SILVA, D.C.G.; YAMANAKA, N.; BROGIN, R.L.; ARIAS, C.A.A.; NEPONUCENO, A.L.; DI MAURO, A.O.; PEREIRA, S.S.; NOGUEIRA, L.M. PASSIANOTTO, A.L.L.; ABDELNOOR, R.V. Molecular mapping of two loci that confer resistance to Asian rust in soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, Verlag, 2008, doi: 10.1007/s00122-008-0752-0.

SONG, Q.J.; MAREK L.F.; SHOEMAKER, R.C.; LARK, K.G.; CONCIBIDO, V.C.; DELANNAY X.; SPECHT, J.E.; CREGAN, P.B. A new integrated genetic linkage map of the soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, Verlag, v.109, p.122-128, 2004.

STASKAWICZ, B.J. Genetics of Plant-Pathogen Interactions Specifying Plant Disease Resistance. **Plant Physiology**, Bethesda, v.125, p. 73-76, 2001.

STAUB, J.E.; SERQUEN, F.C.; GUPTA, M. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. **HortScience**, Alexandria, v.31, n.5, p. 729-740, 1996.

SUITER, K.A.; WENDELL, J.F.; CASE, J.S. Linkage 1: a pascal computer-program for the detection and analysis of genetic-linkage. **Journal of Heredity**, cary, v.74, n.3, p.203-204, 1983.

TAMULONIS, J.P.; LUZZI, B.M.; HUSSEY, R.S.; PARROT, W.A.; BOERMA, H.R. DNA markers associated with resistance to Javanese root-knot nematode in soybean. **Crop Science**, Madison, v.37, p.783-788, 1997.

TANKSLEY, S.D. Mapping polygenes. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v.27, p.205-233, 1993.

TSCHANZ, A.T. **Soybean Rust Epidemiology**: final Report. Shanhua: AVRDC, 1984, 157p.

TSCHANZ, A.T.; SHENG, W.S.; TSAI, B.Y. Development of soybean rust resistance in advanced breeding lines. **Soybean Rust Newsletter**, Urbana – Chapaing, v.5, p.34-37, 1982.

TSCHANZ, A.T.; WANG, T.C. Soybean rust development and apparent infection rates at five locations in Taiwan. **Protection Ecology**, Taiwan, v.2, p.247-250, 1980.

UNFRIED, J.R. **Estratégias para seleção de linhagens experimentais de soja para tolerância à ferrugem e associações com outras doenças**. 2007. 220p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

VISÃO AGRÍCOLA, 2006. **Brasil é responsável por 38% do comércio mundial da soja**. Piracicaba, n 5, p. 73-74, 2006.

WANG, D.; ARELLI, P.R.; SHOEMAKER, R.C.; DIERS, B.W. Loci underlying resistance to race 3 of soybean cyst nematode in *Glycine soja* plant introduction 468916. **Theoretical and Applied Genetics**, Verlag, v. 103, p. 561-566, 2001.

WANT, T.C; HARTMAN, G.L. Epidemiology of soybean rust and breeding host resistance. **Plant Protection Bulletin**, Taiwan, v.34, p.109-124, 1992.

WEBB, D.M.; BALTAZAR, B.M.; RAO-ARELII, A.P.; SCHUPP, J.; CLAYTON, K.; KEIM, P.; BEAVIS, W.D. Genetic mapping of soybean cyst nematode race-3 resistance loci in the soybean PI 437654. **Theoretical and Applied Genetics**, Verlag, v.91, p.574-581, 1995.

WEIR, B. **Genetic data analysis**. 2ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1996. 447p.

YANG, W.; WEAVER, D.B.; NIELSEN, B.L.; QIU, J. Molecular mapping of a new gene for resistance to frogeye leaf spot of soya bean in "Peking". **Plant Breeding**, Verlag, v.120, p. 73-78, 2001.

YAO, Y.; BAN, M.; BRANDLE, J. A genetic linkage map for *Stevia rebaudiana*. **Genome**, Ottawa, v.42, n.4, p. 657-661, 1999.

YORINORI, J. T. Ferrugem da soja: panorama geral. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 7, 2004, Londrina: **Anais...** Londrina, Embrapa Soja, 2004. p. 1299-1307.

YORINORI, J.T.; NUNES JUNIOR, J. Soybean Germplasm with Resistance and Tolerance to "Asian" Rust and Screening Methods. In: SOUTH AMERICAN WORKSHOP ON SOYBEAN RUST. 2006, Londrina. **Anais...** Londrina: Embrapa Soybean, 2006. p. 13.

YOUNG, V. R. Soy protein in relation to human protein and amino acid nutrition. **Journal of American Dietetic Association**, New York, v.19, n.7, p. 828-835, 1991.

YUAN, J.; NJITI, U.N.; MERSEM, K.; IQBAL, M.J.; TRIWITAYAKORN, K.; KASSEN, M.A.; DAVIS, G.T.; SCHMIDT, M. E.; LIGHTFOOT, D.A. Quantitative trait loci in two soybean recombinant inbreed line populations segregant for yield and disease resistance. **Crop Science**, Madison v.42, p.271-277, 2002.

YUE, P.; ARELLI, P.R.; SLEPER, D.A. Molecular characterization of resistance to *Heterodera glycines* in soybean PI438489b. **Theoretical and Applied Genetics**, Verlag, v.102, p.921-928, 2001.

ZAMBOLIM, L.; do VALE, F.X.R.; CHAVES, G.M. Partial resistance of soybean cultivars to *Phakopsora pachyrhizi*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 8, n.2, p. 117-122, 1983.