

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E
VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**MAPEAMENTO MOLECULAR DO LOCO *Rpp5* DE
RESISTÊNCIA À FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA**

Thaiza Galhardo Silva Morceli

Orientador: Prof. Dr. Antonio Orlando Di Mauro

Co-orientadora: Profa. Dra. Sandra Helena Unêda Trevisoli

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias
e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal,
como parte das exigências para a obtenção do título
de Doutor em Agronomia (Genética e Melhoramento
de Plantas)**

**JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Agosto de 2008**

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

THAIZA GALHARDO SILVA MORCELI – nascida em Ribeirão Preto – SP, em 20 de março de 1979. Possui graduação em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário Barão de Mauá, em Ribeirão Preto – SP, concluído em janeiro de 2001. Em julho de 2004, obteve o título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas pela UNESP - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal. Obteve o título de Doutor em agosto de 2008, pela mesma Universidade. Atou como estagiária no projeto Genoma SUCEST - FAPESP no Centro Brasileiro de Estocagem de Clones pertencente a UNESP-FCAV.

“Quando se crê em Deus não há cotidiano sem milagres”

Nikos Kazantzakis

Aos meus pais Reginaldo e Marli, meus irmãos Thales e Maisa, meus avós Paulo e Maria pessoas especiais na minha vida, que merecem todo amor, carinho e gratidão que meu coração pode oferecer.

DEDICO.

**Ao meu marido Antonio, meu amigo, meu companheiro, meu eterno amor.
À minha filha Giovanna, meu presente de Deus, meu amor maior.**

OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo que tem me proporcionado, por me guiar em todos os momentos e por encher de graças a minha vida, e a São Frei Galvão meu grande intercessor.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de estudos.

À UNESP pela extraordinária estrutura física e pessoal que possibilitaram a concretização de mais esta etapa.

Ao Programa de Genética e Melhoramento de Plantas pela oportunidade concedida para a realização do curso.

A todos os funcionários da Seção de Pós-Graduação, por estarem sempre prontos a ajudar.

Ao Prof. Dr. Antonio Orlando Di Mauro pela orientação e oportunidade de desenvolver este trabalho.

Aos pesquisadores da TMG Romeu Kiihl e Éberson Calvo pela concessão do material estudado e ao colega Alexandre Garcia pelas valiosas contribuições.

Aos professores dos Departamentos de Tecnologia e Biologia que muito contribuíram para meu aperfeiçoamento e aquisição de conhecimento.

A todos os Professores e Funcionários do Departamento de Fitotecnia pelo convívio e atenção dispensada.

Aos membros da banca examinadora por suas valiosas contribuições.

Aos meus Tios e primos pelo carinho, incentivo e torcida.

Aos meus cunhados Júnior e Giovanna e minha sobrinha Ana Cláudia pelos agradáveis momentos de descontração.

À minha sogra, sogro, minhas cunhadas Thais e Junya e meu sobrinho Marcelinho pelo apoio e amizade.

A minha família Cuiabana pela amizade, encorajamento e apoio.

Ao Prof. Dr. José Baldin Pinheiro pela contribuição técnica e apoio para a conclusão do trabalho.

À colega Patrícia Ferreira Cunha Souza pela gentil contribuição e ensinamentos na parte de etiologia da ferrugem.

A todos os colegas e amigos do Departamento de Produção Vegetal, especialmente Melina, Dani Sarti, Marcelo, Daniel (Nabu) pelo convívio de trabalho e amizade.

À amiga Danielle Gregório pelos esclarecimentos que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Às minhas grandes amigas Dani Jovino, Paula Demore, Juliana Rossi e Michele Miyazaki. .

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

OBRIGADA!

SUMÁRIO

RESUMO	ii
SUMMARY	iii
I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Soja: descrição botânica e morfológica.....	3
2.2. Origem, expansão e diversidade da cultura da soja.....	4
2.3. Importância econômica da soja.....	7
2.4. Ferrugem asiática da soja	8
2.4.1. Etiologia	8
2.4.2. Epidemiologia	9
2.4.3. Sintomatologia	11
2.4.4. Histórico no Brasil	13
2.4.5. Estratégias de manejo e controle da ferrugem	14
2.4.6. Controle genético.....	16
2.5. Marcadores moleculares	17
2.5.1. Tipos de marcadores moleculares.....	18
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1. Condução do experimento	25
3.2 Material Vegetal	25
3.3 Inoculação e Avaliação Fenotípica da Geração F ₂	26
3.4 Coleta de tecido foliar.....	26
3.5 Extração de DNA.....	27
3.6 Marcadores SSR para Ferrugem Asiática	29
3.7 Análise dos Dados	30
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
V. CONCLUSÕES	41
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
APÊNDICE.....	54
Apêndice A.....	54
Apêndice B.....	56
Apêndice C.....	58

MAPEAMENTO MOLECULAR DO LOCO *Rpp5* DE RESISTÊNCIA À FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA

RESUMO - A ferrugem asiática da soja, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* (Sidow & P. Sidow) foi relatada no Brasil ao final da safra 2001 e já nas safras seguintes, ocasionou severas perdas de produtividade. Cinco genes de resistência à ferrugem asiática da soja (*Rpp1* a *Rpp5*) estão descritos na literatura. O objetivo geral deste trabalho foi identificar marcadores moleculares microssatélites ligados ao gene de resistência a *P. pachyrhizi* presente na linhagem de soja PI 200526. Uma população de plantas F₂ derivada do cruzamento entre esta linhagem e a cultivar suscetível Coodetec 208, foi artificialmente inoculada e avaliada quanto à sua reação de resistência à ferrugem. Marcadores microssatélites foram testados nos genitores e em dois *bulks* contrastantes para possibilitar a identificação de possíveis marcadores ligados. Os três marcadores polimórficos que foram caracterizados como potencialmente associados com a resistência à ferrugem asiática foram, posteriormente, avaliados em toda a população. A resistência comportou-se como governada por um gene com dominância completa. O gene de resistência da PI 200526 foi mapeado no grupo de ligação N da soja, estando próximo ao marcador Sat_166. Existe grande possibilidade de que o gene mapeado neste estudo corresponda ao novo loco de resistência à ferrugem asiática da soja, denominado de *Rpp5*, recentemente descrito.

PALAVRAS-CHAVE: genes de resistência, *Glycine max*, marcadores microssatélites, seleção assistida.

MOLECULAR MAPPING OF *Rpp5* RESISTANCE LOCUS TO ASIAN SOYBEAN RUST

SUMMARY- The Asian soybean rust caused by the *Phakopsora pachyrhizi* (Sidow & P. Sidow) fungus was related in Brazil at the end of 2001 crop year, and already in the following seasons, caused severe losses in productivity. Five distinct resistance genes to Asian rust (*Rpp1* to *Rpp5*) are described. The main objective of this work was to identify microsatellite markers linked to a resistance gene to *P. pachyrhizi* present in the soybean line PI 200526. One population of F₂ plants originated from the cross between this resistant line and the susceptible cultivar Coodetec 208 was artificially inoculated and evaluated for the Asian rust resistance. Microsatellite markers were tested on parents and in the two contrasting bulks to enable the identification of linked markers. The three polymorphic markers that were identified potentially associated with resistance to Asian rust were then evaluated throughout the progeny. The resistance showed to be governed by a gene with complete dominance. The resistance gene of PI 200526 was mapped on the soybean linkage group N, being close to Sat_166 marker. Possibly, the gene mapped on this linkage group is part of the new locus of resistance to Asian soybean rust, called *Rpp5*, recently described.

KEYWORDS: resistance genes, *Glycine max*, microsatellites markers, assisted selection.

I. INTRODUÇÃO

A soja é uma espécie originária da Ásia, e vem sendo cultivada há centenas de anos. Graças as suas características nutritivas e industriais e à sua adaptabilidade a diferentes latitudes, solos e condições climáticas, o cultivo se expandiu por todo o mundo, constituindo-se na principal leguminosa cultivada atualmente (MARTINS, 2006).

A produção mundial de soja prevista para o ano agrícola 2007/08 é de cerca de 221,3 milhões de toneladas, sendo que os Estados Unidos deve produzir 71,2 milhões de toneladas segundo o relatório do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), mantendo-se como o maior produtor mundial, seguido do Brasil com uma produção estimada em 59,6 milhões de toneladas (CONAB, 2008).

Embora o Brasil tenha aumentado sua produção e produtividade nos últimos anos, a cultura apresenta potencial ainda maior, e dentre os fatores que impedem que seu potencial máximo seja atingido estão as doenças (ALVES, 2007). Aproximadamente 50 doenças já foram identificadas no Brasil, e este número continua aumentando devido à expansão das fronteiras agrícolas e a prática da monocultura.

Sob este aspecto, a doença que mais preocupa os sojicultores atualmente, é a ferrugem asiática, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* que desde a sua primeira ocorrência foi responsável por severos danos econômicos, causando perdas de rendimento de até 70% (SOARES et al., 2004; SILVA, 2007).

Os sintomas associados a esta doença são a presença de lesões formadas nas folhas que podem ser classificadas como do tipo castanho clara (TAN), característica de plantas suscetíveis e do tipo castanho avermelhada (RB – Reddish Brown), típicas de plantas resistentes (ZAMBENEDETTI et al., 2007).

O uso de fungicidas é o método mais empregado para o controle da doença, porém sua aplicação deve ser feita de forma racional para não

inviabilizar a cultura e agredir o meio ambiente de forma indiscriminada (GODOY & CANTERI, 2004). Dessa maneira, o uso de cultivares resistentes é o método mais indicado para o controle da doença.

Estão referenciados até o momento na literatura, cinco genes de resistência dominantes e independentes: *Rpp1*(PI 200692), *Rpp2* (PI 230970), *Rpp3* (PI 462312) e *Rpp4* (PI 459025) (BROMFIELD & HARTWIG, 1980; MCLEAN & BYTH, 1980; HARTWIG & BROMFIELD, 1983; HARTWIG, 1986) *Rpp5* (PI 200487) (GARCIA et al., 2008). Existem, no entanto, evidências experimentais de novos genes e estudos detalhados estão sendo desenvolvidos para confirmar estes resultados. Com relação às cultivares disponíveis, não existe, até o presente momento, nenhum registro no cadastro nacional de cultivares, de um genótipo que seja portador de qualquer gene de resistência a este patógeno.

As cultivares comerciais, geralmente, são desenvolvidas utilizando-se transferência de alelos de resistência oriundos de fontes exóticas e, muitas vezes, não adaptadas, para cultivares elite. No processo de transferência de genes de resistência, os marcadores moleculares podem-se constituir em uma ferramenta bastante útil. Esses marcadores, se estreitamente ligados aos genes de resistência, podem ser usados na seleção assistida por marcadores (SAM), particularmente nas etapas iniciais e intermediárias do melhoramento (ALZATE-MARIN et al, 2005).

A busca de fontes de resistência para a ferrugem asiática deverá ser contínua e o monitoramento dos diversos genes de resistência nos genótipos será fundamental para o desenvolvimento de cultivares com resistência satisfatória.

Deste modo, o objetivo deste trabalho foi mapear um loco de resistência presente na linhagem resistente PI 200526, dentro do mapa genético da soja, utilizando marcadores microssatélites ou SSR (*Single Sequences Repeats*).

II. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Soja: descrição botânica e morfológica

A soja cultivada comercialmente hoje (*Glycine max* (L) Merrill) é uma planta herbácea, incluída na divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Fabales, família Fabaceae (CAPELLARI Jr et al., 1999).

É uma planta de ciclo anual, sendo que as cultivares brasileiras têm ciclos entre 100 e 160 dias, e podem ser classificadas em grupos de maturação, como: precoce, semiprecoce, médio, semitardio e tardio, dependendo da região.

A soja apresenta três tipos principais de folhas: as cotiledonares, que constituem o primeiro par; as unifoliadas (primárias), que se sucedem aos cotilédones e as trifoliadas, que seguem as primárias e constituem todas as demais folhas da planta (VIEIRA & CASTRO, 2004).

As folhas são ovaladas e as flores são brancas ou roxas, localizadas em ramacenos curtos axilares e, ou, terminais, sobre pequenos pendúnculos. As vagens são retas ou ligeiramente curvadas, contendo cada uma, uma a quatro sementes ovaladas ou subesféricas (SEDIYAMA et al., 1999).

A planta de soja tem porte ereto e crescimento morfológico diversificado, apresentando hastes e vagens pubescentes. A altura varia de 0,3 a 2,0 metros podendo ser muito ou pouco ramificada. A espécie cultivada possui $2n = 40$ cromossomos (Apêndice A) (SEDIYAMA et al., 1985).

Os estádios de desenvolvimento para a cultura da soja foram estabelecidos por FEHR & CAVINESS em 1977, para aumentar a precisão com que se descreve a planta ao longo do seu crescimento (fase vegetativa) e desenvolvimento (fase reprodutiva) (Quadro 1).

Quadro 1. Estádios fenológicos de plantas de soja, segundo FEHR & CAVINESS (1977).

Estádio	Descrição
<i>Fase vegetativa</i>	
V _c	Da emergência a cotilédones abertos.
V ₁	Primeiro nó; folhas unifolioladas abertas.
V ₂	Segundo nó; primeiro trifólio aberto.
V ₃	Terceiro nó; segundo trifólio aberto.
V _n	Enésimo (último) nó com trifólio aberto, antes da floração.
<i>Fase reprodutiva</i>	
R ₁	Início da floração.
R ₂	Floração plena.
R ₃	Início da formação de vagens.
R ₄	Vagens completamente desenvolvidas.
R ₅	Início da formação de sementes.
R ₆	Vagens com granação completa, folhas verdes.
R ₇	Início da maturação (50% de amarelamento de folhas e vagens).
R ₈	Ponto de maturação de colheita.

Fonte: Adaptado de ARANTES et al., 1998.

2.2. Origem, expansão e diversidade da cultura da soja

Evidências históricas e geográficas indicam que a soja (*Glycine max* (L.) Merrill) foi domesticada no século XI A.C. no norte da China. A partir da sua origem, a soja expandiu-se para o Sul da China, Coréia, Japão e Sudeste da Ásia. Os europeus tiveram conhecimento da soja por volta de 1712 através de um botânico alemão. Em 1740 sementes de soja levadas por missionários chineses eram cultivadas na França como planta hortícola (GIBSON & BENSON, 2005).

Na América do Norte, a primeira menção sobre soja na literatura data de 1804, cultivada na Pensilvânia, nos Estados Unidos (SEDIYAMA et al., 1999). Desde então, diversos experimentos foram conduzidos com soja naquele país.

A partir de 1880 a soja adquiriu importância nos Estados Unidos como planta forrageira. Em 1920 a área destinada a produção de grãos era de 76 mil ha, e a destinada a produção de forragem, pastagem e silagem chegava a 300

mil ha. A partir de 1941, a área cultivada para grãos superou a cultivada para forragem, cujo cultivo declinou rapidamente, até desaparecer em meados dos anos 60, enquanto a área cultivada para a produção de grãos crescia de forma exponencial, não apenas nos EUA, como também no Brasil e na Argentina, principalmente (BERTRAND et al., 1987).

No Brasil, a soja foi primeiramente introduzida na Bahia, em 1882. Em 1908, imigrantes japoneses a introduziram em São Paulo; e em 1914 foi levada ao Rio Grande do Sul pelo professor E. C. Craig, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SEDIYAMA et al., 1999).

Somente a partir da década de 1960, impulsionada pela política de subsídios ao trigo, visando auto-suficiência, a soja se estabeleceu como cultura economicamente importante para o Brasil. Seu cultivo foi estabelecido inicialmente no Rio Grande do Sul, e posteriormente, se expandiu para os estados de Santa Catarina, Paraná e São Paulo (MUELLER & BUSTANTE, 2002).

O Centro-Oeste surgiu como uma nova opção produtiva da soja, a partir da década de 1970, quando houve uma mecanização na agricultura e o desenvolvimento de novas cultivares adaptadas às diferentes regiões edafoclimáticas do País. Esta região é, atualmente, a maior produtora de soja do país, ocupando uma condição geopolítica que favorece a produção.

A cultura da soja tem alcançado a cada ano, índices de produção cada vez mais elevados, decorrentes da inserção constante de tecnologia que ignora as questões de solo e climas. Atualmente a soja é cultivada em praticamente todo o território nacional, sendo o principal produto agrícola do país.

Grande parte deste sucesso deve-se à pesquisa com melhoramento genético. Estimativas de ganho genético de produtividade indicam que até a década de 90 o ganho genético médio para produtividade da soja no Brasil foi algo próximo de 0,9 % ao ano. Sem dúvida, além de melhorar o potencial genético produtivo per se, outras duas grandes contribuições do melhoramento genético da soja no Brasil podem ser destacadas. A primeira foi a adaptação da soja às baixas latitudes através da introdução de genes para “período juvenil longo” no germoplasma brasileiro. A segunda, dando sustentação à primeira,

foram os diversos trabalhos em melhoramento para resistência genética às doenças mais expressivas da cultura (KIIHL & CALVO, 2006).

As estratégias de melhoramento, entretanto, não foram acompanhadas de avaliações do aumento ou da redução da diversidade genética da soja cultivada. Estimativas sobre a variabilidade genética da cultura têm destacado que o germoplasma brasileiro provém de base genética restrita, tendo se originado de poucas linhagens ancestrais (PRIOLLI et al., 2004).

No Brasil, BONETTI (1983) estimou que cerca de 70% dos cultivares desenvolvidos para o Rio Grande do Sul, na década de 60, descendiam das cultivares americanas Hill, Hood ou ambas. HIROMOTO & VELLO (1986), utilizando coeficiente de parentesco de Malécot, determinaram a base genética do germoplasma da soja e relataram que 100% do conjunto gênico de soja existente no Brasil na época era originário da contribuição de apenas 26 ancestrais, tendo 11 linhagens asiáticas ancestrais contribuindo com mais de 90%. Quatro ancestrais com maior contribuição para o germoplasma brasileiro são os mesmos que dão maior contribuição para o germoplasma do sul dos Estados Unidos, evidenciando que, possivelmente, os cultivares brasileiros foram desenvolvidos com a utilização de genótipos oriundos daquela região.

Dessa maneira, há a necessidade de aumentar a base genética dos cultivares brasileiros, para evitar o perigo da vulnerabilidade do germoplasma e o estabelecimento de patamares baixos na produção de grãos.

Dentre os métodos de melhoramento, duas estratégias são particularmente importantes para maximizar a variabilidade genética: a) Seleção recorrente, que consiste na sintetização de uma população base geneticamente divergente, seleção dos melhores genótipos e recombinação para formar a nova população melhorada, e esta, por sua vez, poderá ser utilizada para iniciar um novo ciclo de seleção e b) Cruzamentos amplos, envolvendo normalmente um genótipo elite e um genótipo exótico, que inclui todo material não-adaptado ou não-comercial (variedades antigas e espécies silvestres) e que podem ser utilizados como fonte de novos genótipos para o melhoramento. Neste caso, são necessários dois a três retrocruzamentos utilizando o genitor elite como parental recorrente, a fim de produzir uma

progênie sem as características indesejáveis do germoplasma exótico. O produto final das duas metodologias é a obtenção de linhas puras que podem ser lançadas como novas cultivares, ou utilizadas como genitores em cruzamentos dentro do programa de melhoramento genético da cultura (BRONDANI, et al., 2003)

2.3. Importância econômica da soja

A soja é uma das principais espécies graníferas e a mais importante oleaginosa cultivada em escala mundial. No Brasil é a cultura agrícola com maior extensão de área plantada (FURTADO, 2007), sendo que na safra 2007/08, foram cultivados 329,3 mil hectares (CONAB, 2008).

Atualmente, o país se destaca no cenário mundial como o segundo maior produtor e exportador de soja, sendo responsável por 38% do comércio global, sendo superado apenas pelos Estados Unidos (UNFRIED, 2007).

A produção nacional de soja na safra 2007/2008 foi estimada em 59,6 milhões de toneladas, superior à safra anterior em 2,1%. O referido aumento é atribuído às boas condições climáticas aliadas ao alto nível tecnológico. Do total produzido, a região Centro-Sul responde por 90,9% (54,2 milhões de toneladas) e a região Norte/Nordeste por 9,1% (5,4 milhões de toneladas) (CONAB, 2008).

Além da sua importância em valores econômicos, a soja apresenta-se como um grão com valiosas características nutricionais para humanos e animais. Devido a sua composição, a soja pode ser utilizada em vários produtos industriais e como matéria-prima para agroindústrias. Os grãos de soja podem ser processados, gerando inicialmente o óleo, o farelo e a farinha.

O farelo é o principal subproduto da soja, considerando-se que o resultado do processamento gera cerca de 78% de farelo protéico e 20% de óleo. Os indicadores da safra 2007/2008 apontam para a industrialização de 30 milhões de toneladas de soja. O montante deve resultar em 23 milhões de

toneladas de farelo e 5,7 milhões de toneladas de óleo (ANUÁRIO BRASILEIRO DE SOJA, 2007).

Os benefícios da produção de soja para a economia brasileira são indiscutíveis. A cultura deve ser encarada como uma cadeia que movimenta a indústria, o comércio e vários serviços. Restringir as análises somente ao campo é ignorar a importância social da cultura. O complexo soja representa, sozinho, 12% do Produto Interno Bruto (PIB). Em 2007, U\$11,4 milhões foram exportados (FMT, 2007).

2.4. Ferrugem asiática da soja

2.4.1. Etiologia

A ferrugem da soja é causada por duas espécies de fungos basidiomicetos: o *Phakopsora pachyrhizi*, que causa a ferrugem asiática, presente na maioria dos países que cultivam a soja e o *Phakopsora meibomia*, agente etiológico da ferrugem americana, que acomete uma ampla gama de hospedeiros desde Porto Rico até o sul do Paraná (YORINORI et al., 2004).

Estas espécies foram descritas como sendo distintas em 1980, e em 1992, foram identificadas as diferenças morfológicas, genéticas e patológicas, destacando a maior agressividade de *P. pachyrhizi* perante *P. meibomia* (UNFRIED, 2007).

A principal diferença entre as duas espécies de *Phakopsora* está nos teliósporos. *P. pachyrhizi* possui teliósporos organizados em duas a sete camadas, as paredes dos esporos são amarelo escuro a hialino, com espessura mais ou menos uniforme de 1 µm ou levemente mais grossa na região superior e com até 3 µm de espessura nas células das camadas apicais. *P. meibomia* apresenta teliósporos organizados em uma a quatro camadas, raramente cinco, os esporos têm paredes de coloração canela a castanho

claras, com 1,5 a 2,0 μm de espessura e com células da camada apical com espessura de até 6 μm (ONO et al., 1992).

As duas espécies podem ser distinguidas através da utilização de técnicas convencionais, que incluem a identificação através de microscópio e teste de inoculação em diferentes espécies hospedeiras ou cultivares; além de técnicas moleculares, através da utilização de iniciadores específicos que flaqueiam as regiões ribossomais ITS (“Internal Transcribed Sequences”)1 e 4 (SOUZA et al., 2006).

2.4.2. Epidemiologia

As ferrugens são causadas por parasitas obrigatórios (biotróficos), isto é, não matam seus hospedeiros, mas desenvolvem estratégias efetivas para explorar células vivas como fontes de alimento (SILVA, 2007). Sua sobrevivência na entressafra ocorre em hospedeiros alternativos e em soja “guaxa” (MARTINS, 2006; PASSINI, 2007).

O ciclo de vida do agente etiológico da ferrugem asiática inicia-se quando os uredósporos, oriundos das urédias, germinam e produzem um tubo germinativo que cresce através da superfície da folha até que se forma um apressório (Figura 1).

Ao contrário da maioria dos fungos causadores de ferrugens que penetram por aberturas naturais, como estômatos, os urediniósporos da ferrugem da soja podem penetrar também diretamente pela cutícula da folha, epiderme e principalmente nas junções entre as células aumentando assim a rapidez da infecção (ZAMBENEDETTI et al., 2007).

Para que ocorra o processo infeccioso é necessário a presença de umidade nas folhas por período prolongado, no mínimo de seis horas (FMT, 2007). A germinação dos uredósporos ocorre em uma hora à temperatura ambiente de 25 a 27°C, porém a penetração no tecido da folha pode ocorrer à temperatura variando de 8 a 28°C. Sob condições favoráveis, as primeiras

lesões podem ser visíveis entre quatro a cinco dias após a inoculação e as primeiras frutificações (urédias) e esporulações aparecem entre seis e sete dias após a inoculação (YORINORI et al., 2004).

O estágio uredinial de *P. pachyrhizi* é o mais comumente encontrado nos campos brasileiros, porém em situações desfavoráveis, este fungo pode iniciar o estágio telial, já que os teliosporos têm melhor sobrevivência em condições adversas. Dessa maneira, apesar da formação de télia não estar diretamente relacionada com a infecção primária de *P. pachyrhizi*, ela pode ser útil para a geração de variabilidade do patógeno, devido a ocorrência de reprodução sexuada (Patrícia Ferreira Cunha Souza, Msc - Comunicação pessoal).

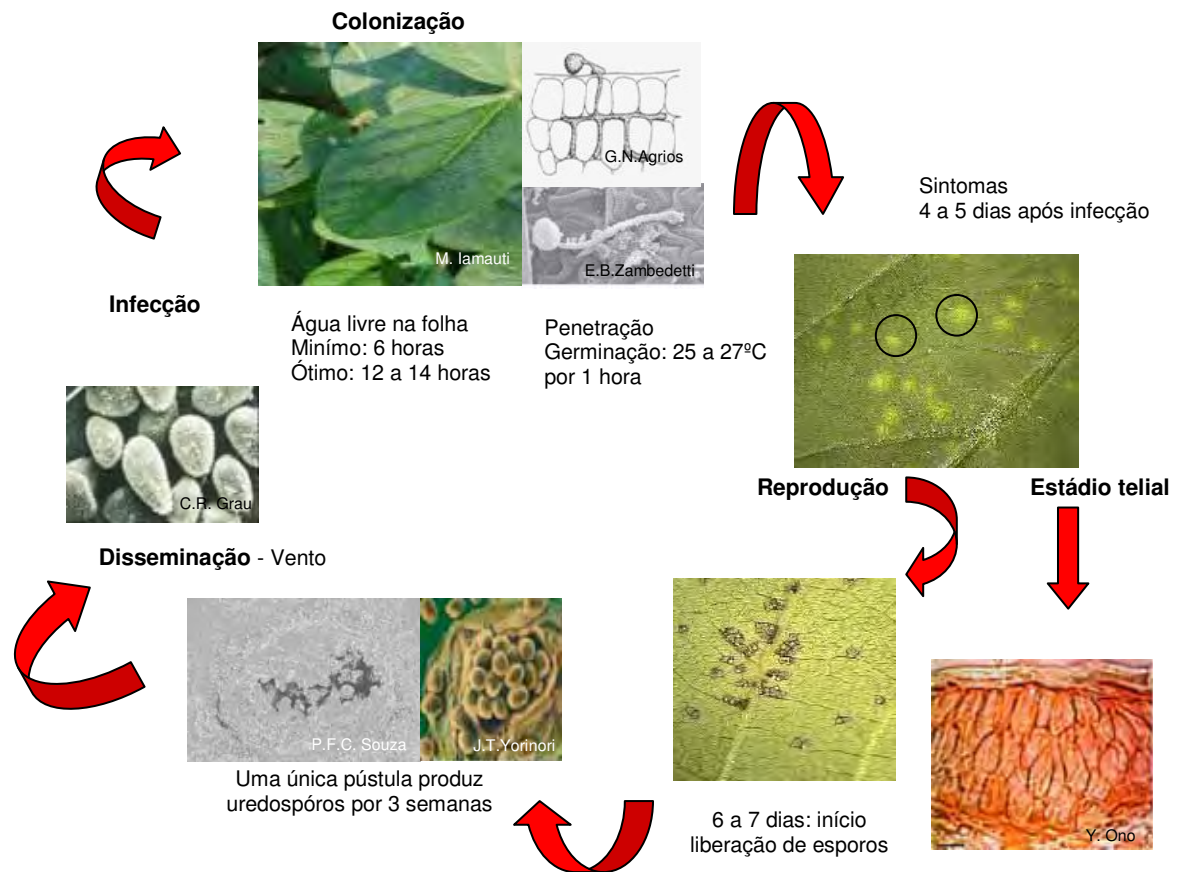


Figura 1. Ciclo de vida de *Phakopsora pachyrhizi*, agente etiológico da ferrugem asiática da soja.

2.4.3. Sintomatologia

Os sintomas da ferrugem asiática podem surgir em qualquer momento do ciclo fenológico da cultura, porém tem surgido de forma mais freqüente em plantas próximas à floração, ou em pleno estádio (AZEVEDO et al., 2007).

Os primeiros sintomas da ferrugem são caracterizados por minúsculos pontos, de no máximo um milímetro de diâmetro, de coloração esverdeada a cinza-esverdeada. No local correspondente ao ponto, observa-se, inicialmente, uma minúscula protuberância, semelhante a uma ferida, que é o início da formação da urédia. Progressivamente, as urédias, também chamadas de pústulas adquirem coloração castanho clara a castanho escura, que abrem-se em um minúsculo poro, expelindo os uredósporos (YORINORI et al., 2004).

Os uredósporos, inicialmente de coloração cristalina, tornam-se bege e acumulam-se ao redor dos poros e são carregados pelo vento. O número de urédias , por ponto, pode variar de uma a seis (YORINORI et al., 2004).

As lesões formadas nas folhas podem ser classificadas como do tipo castanho clara com muitos soros urediniais e abundante esporulação (TAN) ou castanho avermelhada com poucos soros urediniais e com pouca ou nenhuma esporulação (RB - Reddish Brown) (ZAMBENEDETTI et al., 2007) (Figura 2).

Lesões do tipo RB são típicas de genótipos resistentes ou de efeito principal a essa doença. Estes tipos de lesões podem ser descritos como uma reação de hipersensibilidade. Nestas, as células do hospedeiro, próximas ao local de infecção do patógeno, morrem logo após a infecção. O patógeno *P. pachyrhizi* é um parasita obrigatório, ou seja, necessita de células vivas para sobreviver e se multiplicar e, com a morte dessas células, o crescimento do patógeno é limitado ao local de infecção. Do ponto de vista do melhoramento genético, a planta com reação de hipersensibilidade é considerada resistente, por ter a reprodução do patógeno limitada, cessando o processo epidêmico no campo (ZAMBENEDETTI et al., 2007).

As plantas infectadas desenvolvem a doença rapidamente, ocasionando queda prematura das folhas, aparentando o fim do desenvolvimento da cultura.

Essa queda prematura das folhas não permite a plena formação dos grãos, sendo que, quanto mais cedo ocorrer a desfolha, menor será o tamanho dos grãos e, conseqüentemente, maior será a perda de rendimento e qualidade das sementes (EMBRAPA, 2004).

A velocidade de aumento no número de lesões é determinada fundamentalmente, pelos fatores climáticos reinantes na área, pelo manejo cultural da lavoura e pela resistência que determinados genótipos apresentam (COSTA, 2007).



Figura 2. Sintomas de plantas resistentes e suscetíveis à ferrugem asiática da soja. A: Lesões do tipo RB, características de genótipos resistentes. B: Lesões do tipo TAN, características de genótipos suscetíveis.

2.4.4. Histórico no Brasil

O primeiro registro de ocorrência de ferrugem na soja foi em 1979, em Minas Gerais (DESLANDES, 1979). Na época, essa constatação foi de grande preocupação devido ao alto potencial de danos que esta doença apresentava nos países asiáticos, porém a não confirmação desse potencial fez com que as pesquisas fossem desativadas em 1989 (YORINORI, 1997).

Na época, o fungo foi identificado como *P. pachyrhizi*, ao adotar a classificação disponível, baseada apenas na planta hospedeira. No entanto, trabalhos recentes confirmaram que a espécie que ocorria no Brasil naquela época era *P. meibomiae* (CARVALHO JR & FIGUEIREDO, 2000).

A ferrugem asiática da soja, causada por *P. pachyrhizi* foi identificada pela primeira vez no Brasil, no ano de 2001, em áreas de soja safrinha e “guaxa” no Estado do Paraná. Na safra 2001/02 a doença foi observada primeiramente em Londrina, espalhando-se rapidamente, atingindo-se os estados do Rio Grande do Sul, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Goiás e Mato Grosso. Nestes estados, as lavouras mais atingidas registraram perdas de rendimento variando de 30 a 75%, totalizando uma perda estimada de US\$125,5 milhões (YORINORI et al., 2002).

Na safra 2002/03 o quadro de ocorrência da ferrugem foi diferente da anterior. Nas localidades do Centro-Sul, apesar da chuva abundante, as altas temperaturas impediram o desenvolvimento da doença na época normal, porém, causou perdas em plantios tardios. Nessa safra, uma nova raça de *P. pachyrhizi* causou perdas severas na região Centro-Oeste e Norte do Brasil, atingindo também a soja de entressafra no Maranhão. O custo total, ao nível de lavoura atingiu US\$ 1,16 bilhões e as perdas de arrecadação, em função das perdas de grãos, foram de US\$ 1,29 bilhões (YORINORI et al., 2003).

A safra 2003/04 foi caracterizada pela falta de fungicidas no mercado. O volume da perda de soja por ferrugem foi estimado em 4,6 milhões de toneladas, correspondendo a US\$ 1,22 bilhões. Nesta safra a ferrugem foi detectada em todos os estados produtores do Brasil, exceto o estado de Roraima (YORINORI et al., 2004).

A safra seguinte, 2004/05, os gastos com controle químico atingiram US\$ 860 milhões, elevando o custo da doença, ao nível de lavoura, para US\$ 2,08 bilhões. As perdas de arrecadação, em função das perdas de grãos, foram estimadas em US\$ 200 milhões (YORINORI et al., 2005).

No ano de 2005/06, era esperado que se produzisse 63 milhões de toneladas, porém alcançou-se uma produção de 51 milhões de toneladas. Perdas essas causadas por longos períodos sem chuva e pela agressiva ocorrência da ferrugem asiática. Nesta safra, a perda em grãos foi de US\$ 2,9 milhões e o custo com controle químico foi estimado em US\$ 1,75 bilhões. As perdas de arrecadação alcançaram US\$5,14 bilhões (IBGE, 2006).

As perdas em grãos provocadas pela ferrugem asiática da soja totalizaram aproximadamente 4,5% da produção brasileira de soja em 2006/07, o que equivale a 2,67 milhões de toneladas de grãos ou US\$ 615,7 milhões. O custo da operação de controle, cuja média nacional ficou em 2,3 aplicações por hectare, na safra 2006/07 foi de US\$ 2,19 bilhões (SILVA, 2007).

Na safra atual, foram constatados 2106 focos de ferrugem no Brasil, sendo que o estado mais atingido foi o Paraná com 1038 focos da doença (CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM, 2008). No Rio Grande do Sul, os números apontam para valores próximos a R\$ 2,1 bilhões nos gastos com controle da ferrugem, e perdas que podem chegar a R\$ 488 milhões (EMBRAPA, 2008).

2.4.5. Estratégias de manejo e controle da ferrugem

Os principais fatores que reduzem a eficiência do controle da ferrugem no Brasil são a extensão territorial das lavouras e a monocultura, favorecendo a maior produção e disseminação do inóculo, surgimento de diferentes isolados/raças do patógeno, falhas na aplicação de fungicidas, além da sobrevivência do patógeno em restos culturais (UNFRIED, 2007).

Dessa maneira, diversas medidas são fundamentais para o controle da ferrugem da soja (SOARES et al, 2004), tais como: semear preferencialmente

cultivares precoces e no início da época recomendada para cada região; evitar prolongar o período de semeadura, pois a soja semeada tardiamente (ou de ciclo longo) irá sofrer maiores danos, devido a multiplicação do fungo nos primeiros plantios, além de semear a soja com densidade de plantas que forneça bom arejamento foliar com o objetivo de otimizar a penetração e a cobertura foliar pelos fungicidas (YORINIRI et al., 2004; MARTINS, 2006).

Uma nova medida de manejo foi adotada por alguns estados produtores de soja (Mato Grosso, Goiás, Mato Grosso do Sul, Maranhão, São Paulo e Tocantins) regulamentada por uma Instrução Normativa, que estabelece o “vazio sanitário” constituindo em um período de 90 dias sem soja durante a entressafra, tanto a semeada quanto as plantas voluntárias. Esse período foi determinado, incluindo uma margem de segurança, em função do maior período de sobrevivência observado do patógeno, que foi de 55 dias em folhas jovens infectadas armazenadas na sombra (GODOY et al., 2006).

Esta medida visa à eliminação da chamada “ponte-verde”, ou seja, proporcionar um período de entressafra sem plantas de soja no ambiente a fim de favorecer a diminuição do fungo, principalmente para os primeiros cultivos de soja da região, retardando a entrada da doença e favorecendo o escape da maioria das plantações com relação ao período de maior quantidade de inóculo no ambiente (BARROS, 2008).

Além dessas ações estratégicas de manejo integrado de doenças, o monitoramento constante, acentuando-se quando a soja estiver próxima a floração, especialmente se o ambiente estiver favorável (chuva e/ou abundante orvalho) e aos primeiros sinais da doença, torna-se necessário para a tomada de decisão sobre o início e o sucesso do controle curativo (BARROS, 2008).

A aplicação de fungicidas como controle preventivo e curativo é atualmente a prática mais adotada pelos produtores. REIS et al. (2007) concluíram que o controle químico através do triazol (tetraconazol) e da mistura de triazol + estrobilurina (pyraclostrobina + poxiconazol), apresentaram controle eficiente do fungo favorecendo a redução do progresso da ferrugem.

Porém, a aplicação de defensivos deve ser feita de forma racional para não inviabilizar a cultura e agredir o meio ambiente de forma indiscriminada (GODOY & CANTERI, 2004).

2.4.6. Controle genético

O melhoramento genético da soja é responsável pela eliminação ou minimização dos danos causados por várias doenças. Compete ao melhoramento genético produzir e fornecer as cultivares/sementes com tecnologia agregadas e resistentes a doenças, representando menores custos de produção e menor utilização de defensivos agrícolas. Desta forma, os benefícios ao meio ambiente e sociedade em geral são inquestionáveis. Para tanto, trabalhos e publicações relacionados à resistência genética da soja à ferrugem e às fontes dos genes que a conferem, são encontrados na literatura mundial e são, inclusive, o ponto de partida para as pesquisas visando resistência genética (UNFRIED, 2007).

Cinco genes de resistência (*Rpp1* – *Rpp5*) identificados em introduções de plantas (PI's) estão referenciados até o momento na literatura.

Através da inoculação com dois isolados de ferrugem Taiwan-72-1 e Índia-73-1, BROMFIELD & HARTIWIG (1983) comprovaram a existência de um gene dominante diferente conferindo resistência específica à ferrugem da soja em cada um das PI's estudadas (PI 200492, PI 230970, PI 462312). Estes genes estavam localizados em locos diferentes e foram designados *Rpp1*, *Rpp2* e *Rpp3*, respectivamente, nas PI 200492, PI 230970 e PI 462312.

HARTIWIG (1986) identificou na PI 459025, um gene de resistência dominante presente em um loco diferente dos outros três descritos por BROMFIELD & HARTIWIG (1983). Este gene foi denominado *Rpp4*.

GARCIA et al. (2008) identificaram um gene de resistência presente na PI 200456. Este novo loco de resistência foi mapeado no grupo de ligação N e foi denominado *Rpp5*.

No Brasil, a busca por cultivares resistentes foi iniciada em 2001. A cultivar FT-2 e vários genótipos descendentes dessa cultivar, se mostraram resistentes quando inoculadas com esporos de *P. pachyrhizi*, apresentando reação de hipersensibilidade, com lesões RB com pouco ou nenhuma esporulação (EMBRAPA, 2004).

Em 2003, um isolado proveniente de regiões do Mato Grosso (Sorriso e Lucas do Rio Verde) foi capaz de vencer a resistência da cultivar FT-2 e conseqüentemente, de todas as demais cultivares identificadas, sendo caracterizada, portanto, como uma nova raça do fungo (AZEVEDO et al., 2007).

Esta nova raça de *P. pachyrhizi* quebrou a resistência conferida pelos genes *Rpp1* e *Rpp3*. Em virtude dessa quebra de resistência, não foi possível a realização de experimentos para determinar se o alelo presente em FT-2 é um derivado de *Rpp1* ou *Rpp3*; entretanto, a genealogia desta cultivar sugere que este seja *Rpp3* (POLIZEL, 2005).

Os resultados da identificação de fontes de genes de resistência à ferrugem; assim como informações novas a respeito dos genes e/ou novos genes presentes nas respectivas fontes ou introduções em estudo, ainda são incipientes, porém são de importância inquestionável para o progresso da obtenção de uma resistência duradoura (UNFRIED, 2007).

2.5. Marcadores moleculares

Marcadores são fatores morfológicos, fisiológicos, bioquímicos ou genéticos passíveis de serem identificados, herdáveis e que permitem o estudo comparativo de genótipos e suas progênies. Dentre os marcadores existentes, os marcadores de DNA são os mais interessantes, devido à ausência de efeito ambiental, abundância e alto polimorfismo (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Os marcadores de DNA foram inicialmente utilizados no melhoramento de plantas no início da década de 1980. Resumidamente, esses marcadores são segmentos de DNA que estão fisicamente ligados a locos que determinam características de interesse. Podem ser evidenciados por métodos que combinam o uso de enzimas de restrição à hibridização entre seqüências complementares de DNA, ou pela “Polymrase Chain Reaction” (PCR). O grande potencial do uso de marcadores no melhoramento reside no fato deles serem praticamente ilimitados em número, de fácil detecção e se comportarem como “caracteres” de herança simples e previsível, não sendo afetados pelo meio ambiente (ALZATE-MARIN et al., 2005).

Uma das etapas mais importantes no uso de marcadores moleculares é o estabelecimento da relação entre um dado marcador e um loco de interesse. Esta é uma etapa trabalhosa que exige bastante critério. Devido ao fenômeno de recombinação, as regiões que circunvizinham o loco de interesse podem ser distintas, mesmo em genótipos aparentados. Dessa maneira, para cada população, marcadores específicos devem ser identificados. Em muitos casos, no entanto, um mesmo marcador pode ser útil em diferentes populações derivadas de cruzamentos diferentes (ALZATE-MARIN et al., 2005).

2.5.1. Tipos de marcadores moleculares

Atualmente, existe uma grande variedade de marcadores moleculares disponíveis para diferentes espécies vegetais. Dentre os quais pode-se destacar: “Restriction Fragment Length Polymorphisms” (RFLP), “Randomly Amplified Polymorphic DNA” (RAPD), “Amplified Fragment Length Polymorphism” (AFLP) e os marcadores microssatélites ou SSR (“Simple Sequence Repeats”).

Na técnica de RFLP, o DNA total de um indivíduo é inicialmente isolado e clivado com enzimas de restrição. Os fragmentos obtidos são separados por eletroforese e transferidos para uma membrana de nitrocelulose ou náilon. Em

seguida, fragmentos específicos podem ser detectados pela incubação da membrana com uma sonda previamente marcada (radioativamente ou a frio). A posição da membrana onde a sonda hibridiza pode ser determinada por autoradiografia. O polimorfismo entre diferentes indivíduos decorre de variações nas seqüências primárias dos sítios de restrição ou na mudança de posição devido a inserções e/ou deleções (ALZATE-MARIN et al., 2005).

Entre as vantagens do RFLP, pode-se destacar a expressão codominante, a alta reprodutibilidade, além da possibilidade de utilização de sondas heterólogas, o que permite o mapeamento comparativo entre espécies. Porém, as dificuldades inerentes à técnica, o grande número de etapas e o uso, em muitos casos, de sondas radioativas, impedem que o RFLP seja extensivamente utilizado no melhoramento (ALZATE-MARIN et al.; 2005, CAIXETA et al., 2006).

O RAPD é uma variação da técnica de PCR, diferindo desta por utilizar apenas um iniciador. Para que haja amplificação de um fragmento, duas seqüências de DNA complementares ao iniciador aleatório devem estar adjacentes e em orientação oposta. Cada um desses iniciadores aleatórios dirige a síntese de vários segmentos de DNA, de vários pontos do genoma, resultando em vários fragmentos no gel (BROGIN, 2005).

As bases moleculares do polimorfismo revelado pelo RAPD podem ser mutações de ponto no sítio de pareamento do iniciador, que impedem o seu pareamento e a conseqüente amplificação do fragmento de DNA. Deleções ou inserções entre dois sítios de pareamento de iniciadores são outras fontes de polimorfismo geradas por esses marcadores (CAIXETA et al., 2006).

As grandes vantagens da técnica RAPD são: a simplicidade, a rapidez na obtenção de dados e o custo relativamente reduzido.

Os marcadores RAPD se comportam como marcadores dominantes, ou seja, não é possível distinguir indivíduos homozigotos dominantes de heterozigotos em uma população, sendo esta, uma de suas desvantagens, além da baixa reprodutibilidade dos resultados, o que limita até certo ponto, o seu uso generalizado. Para contornar essa limitação, marcadores RAPD podem ser transformados em marcadores SCAR ("Sequence Characterized

Amplified Regions”). Neste caso o fragmento de DNA correspondente ao marcador RAPD é clonado, seqüenciado e dois iniciadores mais longos são sintetizados e utilizados com uma temperatura de anelamento mais elevada, tornando o processo de amplificação mais estável e reprodutível.

O marcador molecular AFLP é uma técnica que combina a clivagem de fragmentos de DNA com enzimas de restrição e a amplificação desses fragmentos por PCR. Nessa técnica, o DNA é digerido com enzimas de restrição, sendo ligados às suas extremidades, adaptadores que servem de sítios de ligação para iniciadores na reação de PCR (ALZATE-MARIN et al.; 2005).

Diferentes enzimas de restrição e iniciadores estão disponíveis, o que fornece alto grau de flexibilidade, permitindo um padrão eletroforético que pode ser manipulado para aplicações específicas, fornecendo uma eficiente análise do polimorfismo presente no genoma (CAIXETA et al., 2006). As suas limitações são o elevado custo e as dificuldades inerentes à técnica.

Os genomas eucariotos são densamente povoados por seqüências simples repetidas, as quais constituem em um a seis nucleotídeos repetidos em tandem. Essas regiões são denominadas microssatélites (CAIXETA et al., 2006).

Os SSR ou microssatélites baseiam-se na amplificação via PCR dessas seqüências simples repetidas utilizando iniciadores específicos complementares às regiões que flanqueiam essas seqüências. As seqüências flanqueadoras são conservadas dentro de uma espécie, permitindo a seleção de iniciadores de PCR que possam ser utilizados para amplificar os SSRs. Após a amplificação dessas regiões específicas, o polimorfismo no tamanho dos fragmentos obtidos é devido ao número diferente de repetições das seqüências simples (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Em um estudo de SSR utilizando 34 espécies de plantas, o elemento repetido mais comum foi dinucleotídeo AT (MORGANTE & OLIVIERI, 1993)

Os marcadores SSR são altamente polimórficos, abundantes e distribuídos por todo o genoma. Com o desenvolvimento e a publicação dos iniciadores para amplificação de SSRs da soja, marcadores para todos os

grupos de ligação puderam ser mapeados (CREGAN et al., 1999; SONG et al., 2004). Em soja, os marcadores SSR têm sido muito utilizados para o mapeamento de genes específicos que determinam características agronomicamente importantes, como resistência a doenças e, também, para a identificação de locos de características quantitativas (“Quantitative Trait Loci” ou QTLs) de importância econômica, envolvidos na produtividade de grãos e na resistência genética a pragas e doenças (FRANCIA et al., 2005).

A grande limitação dos SSR é a necessidade de serem isolados e desenvolvidos especificamente para cada espécie, não sendo possível utilizar a estratégia de desenho de iniciadores universais. No entanto, esta desvantagem é compensada pela facilidade e eficiência do uso desses marcadores pela comunidade. Uma vez desenvolvidos, eles podem ser utilizados com facilidade e a rapidez típica da técnica de PCR (CAIXETA et al., 2006).

2.6. Mapeamento Genético de Genes de Resistência

O mapa genético de uma espécie é um modelo abstrato do arranjo linear de um grupo de genes ou marcadores (SCHUSTER & CRUZ, 2004).

A grande disponibilidade de marcadores neutros, altamente polimórficos, cuja herança não sofre influência ambiental, 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 (SILVA, 2007).

A construção de mapas de ligação tem como base a análise de segregação de centenas de marcadores e, por isso, é computadorizada. Programas como “Mapmaker” (LANDER et al., 1987), “Linkage 1” (SUITER et al., 1983), “Gmendel” (LIU & KNAPP, 1990) e GQMOL 9.1 (CRUZ & SCHUSTER, 2006), foram desenvolvidos para auxiliar na análise genética dos

dados visando à construção de mapas genéticos (CARNEIRO & VIEIRA, 2002).

A seleção da população para mapeamento envolve a escolha de genitores, os quais devem ser suficientemente contrastantes para garantir o máximo de polimorfismo, e a determinação do tipo de população, sendo considerada uma etapa crítica para o sucesso da construção do mapa (STAUB et al., 1996).

Diversos tipos de populações podem ser utilizadas para o mapeamento. Para espécies vegetais passíveis de autofecundação, como a soja, podem ser utilizadas as populações F₂, F₃ ou F_n, os duplo haplóides, as linhagens endogâmicas recombinantes (“Recombinant Inbred Lines” ou RILs) e populações derivadas de retrocruzamento (SILVA, 2007).

A escolha do tipo de população mais apropriada ao mapeamento está relacionada com o tipo de marcador empregado. O máximo de informação genética é alcançado quando se usa uma população F₂ e marcadores codominantes (CARNEIRO & VIEIRA, 2002).

O tamanho da população também é algo determinante para o sucesso do trabalho. O tamanho da população de mapeamento pode ser definido considerando-se a precisão desejada para a estimativa de frequência de recombinação. Quanto maior o tamanho da população, maior será a resolução do mapa e, conseqüentemente, menores frequências de recombinação poderão ser estimadas. Populações F₂ com marcadores codominantes são aquelas que demandam o menor tamanho de população. (SCHUSTER & CRUZ, 2004).

A busca por marcadores ligados ao caráter que se pretende mapear é uma etapa decisiva no trabalho de mapeamento. Uma estratégia interessante é a análise de segregantes agrupados (“Bulked Segregant Analysis” ou BSA - MICHELMORE et al., 1991). Este método consiste na avaliação de dois grupos de indivíduos obtidos de pontos extremos da curva de distribuição do caráter em estudo. Espera-se que os alelos dos marcadores que estiverem associados aos alelos do caráter que está sendo mapeado estejam distribuídos de forma desigual entre os dois grupos, possibilitando sua detecção. A BSA tornou a

identificação de marcadores moleculares ligados a caracteres de interesse um processo mais eficiente. Este método tem sido utilizado com sucesso na detecção de marcadores moleculares associados a genes de resistência a doenças (ZHAO et al., 2005).

Os caracteres mapeados devem distribuir-se de acordo com um padrão de segregação mendeliana. Este padrão pode ser verificado através do teste do Quiquadrado (χ^2). É recomendado, preferencialmente, o descarte dos locos que apresentam distorções da segregação mendeliana para não comprometer a qualidade do mapa (BEARZOTI, 2000).

A falta de aditividade das freqüências de recombinação levou ao desenvolvimento das funções de mapeamento. Elas são utilizadas para converter freqüências de recombinação, expressas em unidades de mapa (centiMorgan ou cM) em medidas de distância com propriedades mais interessantes para o ordenamento dos locos. As mais conhecidas são as de Haldane (HALDANE, 1919) e de Kosambi (KOSAMBI, 1944). A função de Haldane admite a independência das permutas nos intervalos adjacentes, enquanto a função de Kosambi considera a interferência. Uma vez estimadas as freqüências de recombinação e estabelecida a função de mapeamento, a etapa seguinte é formar os grupos de ligação contendo os marcadores ligados. Dois marcadores são considerados ligados quando a freqüência de recombinação entre eles for inferior a um limite predefinido e/ou o LOD score ("Logarithm of ODs" ou Logaritmo dos Nós) for inferior a um limite também predefinido.

A distância máxima de ligação utilizada como padrão em vários programas de mapeamento é 37,2 cM e o LOD score igual a 3,0. Um LOD score igual a 3 indica que a ocorrência de ligação é mil vezes mais provável que a de segregação independente (BEARZOTI, 2000; SCHUSTER & CRUZ, 2004).

O desenvolvimento de mapas genéticos é considerado uma das aplicações de maior impacto da tecnologia de marcadores moleculares. Presta-se às análises filogenéticas, e potencialmente, ao melhoramento de plantas. Diante desses avanços, procedimentos como a localização e o

mapeamento de QTL's (*Quantitative Trait Loc*), estudos de sintonia e clonagem de genes com base em mapas genéticos passaram a representar complementos importantes a serem considerados em programas de melhoramento das mais variadas espécies vegetais (SILVA, 2007).

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Condução do experimento

As etapas de cultivo, inoculação e coleta foram realizadas em parceria com a Empresa Tropical Melhoramento e Genética (TMG), localizada em Cambé, Paraná e as etapas moleculares foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Melhoramento de Plantas do Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, campus de Jaboticabal.

3.2 Material Vegetal

Uma população F_2 , contendo 100 indivíduos derivada do cruzamento entre a linhagem PI 200526, resistente à ferrugem asiática, e a cultivar brasileira Coodetec 208, suscetível a este patógeno, foi utilizada para a caracterização fenotípica quanto à reação de resistência.

A população de mapeamento e os genitores foram cultivados em casa de vegetação com temperatura controlada variando entre 20°C a 25°C e umidade em torno de 90%.

A semeadura foi realizada em vasos de sete litros contendo uma mistura de solo, areia e esterco bovino, esterilizado com brometo de metila. Em cada vaso foram cultivadas três plantas F_2 , as quais foram devidamente identificadas com um número correspondente para a avaliação da reação à ferrugem asiática e para a coleta de folhas para as análises moleculares.

3.3 Inoculação e Avaliação Fenotípica da Geração F₂

Para a avaliação fenotípica da reação à ferrugem, foram realizadas inoculações a partir de uma população fúngica coletada de plantas de soja da cultivar BRSMS Bacuri, naturalmente infectadas durante a safra de 2004/05 em Cambé, Paraná.

Essa cultivar é portadora do mesmo gene presente na cultivar FT-2 (BROGIN et al., 2004), cuja resistência foi quebrada durante a safra 2003/04.

O inóculo foi preparado a partir de folhas infectadas, que foram lavadas em solução de água destilada visando a retirada dos esporos da superfície abaxial das folhas. A contagem dos esporos da suspensão foi realizada em câmara de contagem de células (Neubauer) para a obtenção de uma concentração de 10⁴ uredosporos/mL. Foi adicionado à solução final, o espalhante adesivo Tween 20 na proporção de 0,5 ml/lde solução.

A primeira inoculação foi realizada quando a planta atingiu o estágio V₃ da escala de FEHR & CAVINESS (1977), sendo feitas posteriormente mais sete inoculações, em um intervalo de quatro dias.

Após o aparecimento dos sintomas, plantas resistentes e suscetíveis foram discriminadas pelas reações típicas de cada situação. Lesões RB são características de genótipos resistentes e lesões TAN caracterizam os genótipos suscetíveis. Essa avaliação qualitativa classificou cada uma das 100 plantas F₂ em resistentes e suscetíveis de acordo com a reação do genótipo à presença da doença.

3.4 Coleta de tecido foliar

Trifólios de cada uma das plantas F₂ e dos genitores foram coletados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido.

Os trifólios ainda congelados foram liofilizados em um equipamento FreeZone 12L (LabConco). As amostras foram alíquotadas em microtubos de 1,5 µl, sendo posteriormente estocados em freezer -80°C até a realização dos estudos moleculares.

3.5 Extração de DNA

Trifólios dos genótipos parentais e dos indivíduos da população segregante foram submetidos à extração de DNA, pelo método CTAB (Brometo de Cetiltrimetilamônio), conforme descrito por FERREIRA & GRATTAPAGLIA (1998), com algumas modificações.

O tampão de extração foi preparado utilizando-se CTAB 2%, 8,12 g de NaCl, 4 mL de uma solução 0,5M EDTA e 10 ml de uma solução Tris-HCl pH 8,0. Completou-se o volume para 100 ml com água Milli-Q. A solução foi colocada em agitador, para completa dissolução dos componentes, aquecendo a mesma a cerca de 45° C. Em capela de exaustão, acrescentou-se 2 µl de 2-β-Mercapto-etanol para cada mililitro de tampão de extração. O ideal é manter o tampão de extração aquecido até a sua utilização.

As extrações de DNA ocorreram diretamente em microtubos de 1,5 ml, contendo 10 µg de tecido foliar liofilizado.

O tecido foliar foi ressuspendido em 700 µl de tampão de extração CTAB e, posteriormente incubado por 30 minutos a 65°C. Durante a incubação, os tubos foram agitados em intervalos de 10 minutos para homogeneização da suspensão. Os tubos foram retirados do banho-maria e esfriados em capela de exaustão. Neste local, foi realizada a primeira extração com solvente orgânico pela adição de 600 µl de CIA (clorofórmio-álcool isoamílico 24:1). Os tubos foram agitados por 5 minutos, invertendo-se no mínimo 20 vezes, ou até se formar uma emulsão homogênea.

As fases foram separadas por centrifugação em microcentrífuga, a velocidade de 16000 x g, durante 5 minutos. Logo após, os tubos foram

retirados cuidadosamente da microcentrífuga, evitando perturbar a interface entre as duas fases formadas. A seguir, a fase aquosa (superior) foi retirada em cerca de três alíquotas de 180 µl e disposta em novo tubo. Este procedimento ajuda a evitar possíveis contaminações com a fase orgânica inferior.

Ao novo tubo, foi adicionado isopropanol frio (-20° C) na proporção de 2/3 do volume da solução aquosa, perfazendo um volume de cerca de 400 µl. A mistura foi gentilmente agitada para precipitação dos ácidos nucleicos. O sedimentado (“pellet”) de DNA foi formado após a centrifugação dos tubos a 7400 x g por 4 minutos. O sobrenadante foi descartado.

Duas lavagens de 10 minutos com 1 ml de etanol 70% foram realizadas, sendo o sobrenadante retirado após cada uma delas. Em seguida, nova lavagem foi realizada com 1 ml de etanol absoluto durante 3 minutos, sendo o sobrenadante novamente descartado. Nesta fase, é preciso retirar o máximo possível do etanol, posteriormente, os tubos permanecem abertos em fluxo laminar durante alguns minutos, até que o sedimento de DNA esteja completamente seco.

Após a secagem, o sedimento foi então ressuspendido em 100 µl de Tampão TE (10mM Tris pH 8,0 + 1mM EDTA), contendo 10 µg/ml de RNase e incubado a 37° C em banho-maria, por aproximadamente 60 minutos para a digestão do RNA, e purificação do DNA.

O DNA extraído foi quantificado, mediante leitura da densidade ótica a 260 e 280 nm em aparelho BioPhotometer Eppendorf AG. Posteriormente à quantificação, a integridade do DNA foi observada pela visualização em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo. Posteriormente, alíquotas das amostras de DNA foram diluídas e como solução de trabalho. Parte foi estocada a -20° C para uso posterior.

De acordo com os resultados da avaliação fenotípica quantidades equimolares de DNA de 10 indivíduos resistentes e 10 suscetíveis foram utilizados para a montagem dos *bulks* contrastantes, conforme a metodologia de BSA ou “Bulked Segregant Analysis” (MICHELMORE et al., 1991). As

amostras de DNA dos genitores e dos dois bulks foram utilizadas para os testes de marcadores microssatélites (SSR).

3.6 Marcadores SSR para Ferrugem Asiática

Para facilitar a identificação de marcadores ligados ao gene de resistência à ferrugem asiática presente na linhagem PI 200526, foram utilizados neste trabalho, primeiramente, marcadores conhecidos por sua ligação a locos de resistência a doenças da soja. Estratégia similar também foi utilizada para mapear outros locos de resistência na soja (MIAN et al., 1999; GORDON et al., 2006; SILVA et al., 2008). Assim, foram testados 50 marcadores microssatélite para verificar o polimorfismo entre os genitores, sendo que nove deles se apresentaram polimórficos e foram utilizados na discriminação dos bulks contrastantes.

A informação de seqüência dos iniciadores para todos os marcadores SSR utilizados está disponível no site “Soybase” (<http://soybase.agron.iastate.edu/resources/ssr.php>).

As reações de amplificação foram realizadas com um volume total de 20 µl, utilizando 300 ng de DNA genômico de soja, 1,5 mM de MgCl₂, Tampão PCR 1X (10 mM Tris-HCl, pH 8,0 e 50 mM KCl), 0,2 mM de dNTP's, 1U de Taq-DNA polimerase e 10 µM de cada iniciador “Forward” e “Reverse”.

A ciclagem consistiu de 7 minutos a 94°C; 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C, 2 minutos a 72°C, seguidos por 7 minutos a 72°C.

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose de alta resolução (agarose 1000), a uma concentração de 3% para melhor padrão de diferenciação de bandas, em tampão TAE (2 M Tris, 100 mM EDTA, 1M ácido acético) e corados com brometo de etídeo. A eletroforese procedeu-se a 80 V por cerca de duas horas. A visualização foi feita em luz UV através de transluminador e fotografada pelo sistema Kodak EDAS 290. O tamanho de cada marca foi estimado por meio de comparação com o marcador

de tamanho 100 pb e também pelas ferramentas digitais do Programa Kodak EDAS 290.

Para confirmar uma possível ligação, os marcadores polimórficos entre os genitores e os bulks contrastantes foram, posteriormente, testados em toda a progênie.

3.7 Análise dos Dados

Todos os marcadores, bem como, a reação fenotípica à ferrugem da população foram avaliados quanto ao seu padrão de herança baseados nos resultados da avaliação das progênies. A razão de segregação para os marcadores SSR e os fenótipos observados (avaliação fenotípica) foram submetidos ao teste de aderência seguindo o modelo de um gene dominante utilizando o teste do Qui-quadrado ($P > 0,05$). A análise de ligação e a construção do mapa foram realizadas com o auxílio do programa GQMOL 9.1 (CRUZ & SCHUSTER, 2006) utilizando a função de mapeamento de Kosambi (KOSAMBI, 1944). O critério de ligação foi um LOD score maior que 3,0 e uma distância máxima de 37,2 cM.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A população segregante foi avaliada quanto à reação a ferrugem asiática da soja após a inoculação do fungo *P. pachyrhizi*. O inóculo utilizado representa uma mistura de isolados que contém a nova raça encontrada na região centro-oeste que quebrou a resistência dos genes *Rpp1* e *Rpp3*.

As reações genéticas à ferrugem asiática foram avaliadas nos genitores (linhagem PI 200526 e cultivar Coodetec 208), assim como nos 100 indivíduos da progênie F₂, pertencentes a este cruzamento. Todas as plantas da cultivar suscetível apresentaram lesões TAN enquanto a linhagem PI 200526 apresentou somente lesões do tipo RB, característica de genótipos resistentes.

Das 100 progênies F₂, 82 foram caracterizadas como resistentes e 18, como suscetíveis (Apêndice B). A proporção observada foi testada para verificar a conformidade com a proporção mendeliana esperada de 3:1.

Na Tabela 1, pode ser observado o valor de Qui-quadrado (χ^2) de 2,61 que confirma, satisfatoriamente, a segregação esperada.

Portanto, no cruzamento avaliado neste estudo, a resistência envolve um único gene, com dominância completa. Resultados semelhantes foram encontrados por GARCIA et al., 2008, que mapearam o gene *Rpp5* em três genótipos exóticos. Dois outros genes de ação dominante (*Rpp2* e *Rpp4*) que condicionam resistência à ferrugem asiática foram encontrados nas linhagens PI 230970 e PI 459025, respectivamente, por SILVA et al.(2008). HYTEN et al. (2007) encontraram marcadores ligados ao gene dominante (*Rpp1*) na PI 200429 condicionando resistência ao isolado de ferrugem India-73-1.

Tabela 1. Análise por Qui-quadrado da segregação fenotípica da população F₂ de mapeamento do gene de resistência (*Rpp5*) e dos marcadores SSR polimórficos.

Caráter	Proporção observada*		Segregação	Teste Qui-quadrado (χ^2)	
	A	B		χ^2	
Avaliação Fenotípica	82	18	3:1	2,61 ^{ns}	
Marcador	R	H	S	Segregação	χ^2
Satt009	27	46	27	1:2:1	0,64 ^{ns}
Satt152	29	45	26	1:2:1	1,18 ^{ns}
Sat_166	28	46	26	1:2:1	0,72 ^{ns}

A = plantas que apresentaram lesões do tipo RB (resistentes); B = plantas que apresentaram lesões do tipo TAN (suscetíveis).

R = homocigoto resistente; H= heterocigoto; S = homocigoto suscetível.

ns = não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Do total de 50 iniciadores testados, nove marcadores comportaram-se como polimórficos, sendo que destes, três (Satt009, Satt152, Sat_166) possibilitaram a diferenciação entre os bulks resistente e suscetível (Apêndice C).

Cada um dos marcadores SSR polimórficos foi usado na avaliação dos bulks (Figura 3) e, posteriormente, em todos os indivíduos da população de mapeamento F₂ (Figuras 4, 5 e 6).

Primeiramente, foram testados os marcadores ligados aos locos *Rpp2* e *Rpp4* descritos por SILVA et al. (2008), uma vez que ainda não há estudos sobre as raças da ferrugem no Brasil e devido ao fato destes locos conferirem resistência à maioria dos isolados caracterizados em outros países (YAMAOKA et al., 2002). Esta análise demonstrou que a resistência da PI 200526 envolve um novo gene, sendo possivelmente o *Rpp5*, já que os marcadores utilizados apresentaram-se monomórficos.

Os marcadores SSR polimórficos também foram testados quanto à adequação para a observação de segregação, onde os mesmos se enquadraram satisfatoriamente à razão esperada para uma herança co-dominante (1:2:1), de acordo com a natureza do marcador, considerando um nível de significância de 5% (Tabela 1).

O teste de Qui-quadrado também foi utilizado para testar a hipótese de segregação independente de cada marcador com o gene de resistência, ou seja, a hipótese de 9:3:3:1, (Tabela 2).

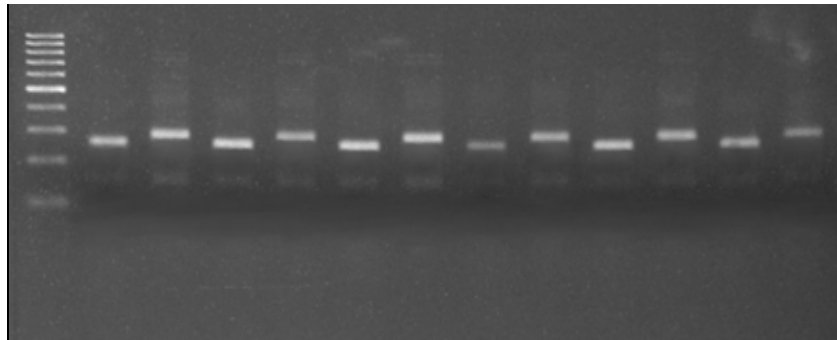
Tabela 2. Análise por Qui-quadrado da hipótese de segregação independente de cada marcador com o gene de resistência (*Rpp5*).

Marcador	Teste Qui-quadrado (χ^2)	
	Segregação	χ^2
Satt009	9:3:3:1	31,27*
Satt152	9:3:3:1	32,55*
Sat_166	9:3:3:1	52,60*

Para o marcador Satt009 o valor de χ^2 foi de 31,27 ($P < 0,001$); para o marcador Satt152 o valor de χ^2 foi de 32,55 ($P < 0,001$) e, finalmente, para o marcador Sat_166 o valor de χ^2 foi de 52,60 ($P < 0,001$). Todos os valores de Qui-Quadrado foram altamente significativos o que indica que a hipótese de segregação independente não foi aceita, podendo-se, portanto, concluir que os marcadores SRR estão ligados ao loco de resistência à ferrugem (*Rpp5*).

Com auxílio do programa GQMOL 9.1 (CRUZ & SCHUSTER, 2006) foram estimadas as distâncias entre cada marcador ao loco *Rpp5*, o desvio padrão e os valores de LOD score. (Tabela 3).

PM PR PS R1 S1 R2 S2 R3 S3 R4 S4 R5 S5



PM PR PS R6 S6 R7 S7 R8 S8 R9 S9 R10 S10

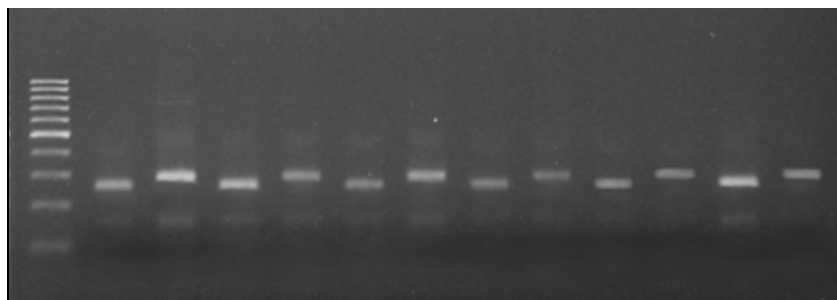


Figura 3. Perfil do marcador microssatélite Sat_166 em cada um dos indivíduos dos bulks resistente e suscetível. PM = 100pb; PR = parental resistente; PS = parental suscetível, R1 a R10 = Indivíduos pertencentes ao bulk resistente (indivíduos (indiv.): 4; 8; 9; 14; 23; 42; 45; 78; 86; 91) S1 a S10 = Indivíduos pertencentes ao bulk suscetível (indiv.: 3; 12; 37; 48; 51; 58; 62; 74; 90).

Tabela 3. Estimativa das distâncias entre cada marcador e o loco *Rpp5*, desvio padrão e valores de LOD score gerados pelo programa GQMOL 9.1 (Cruz & Schuster, 2008).

Marcadores	Distância (cM)	Desvio-padrão	LOD score
Satt009	20,9	4,21	6,11
Satt152	27,4	4,11	6,64
Sat_166	9,1	2,95	11,68

O loco *Rpp5* foi mapeado no grupo de ligação N da soja próximo ao marcador Sat_166 a uma distância estimada em $9,1 \pm 2,9$ cM. Os marcadores Satt009 e Satt152 foram posicionados a uma distância estimada de $20,9 \pm 4,2$ cM. e $27,4 \pm 4,1$ cM, respectivamente.

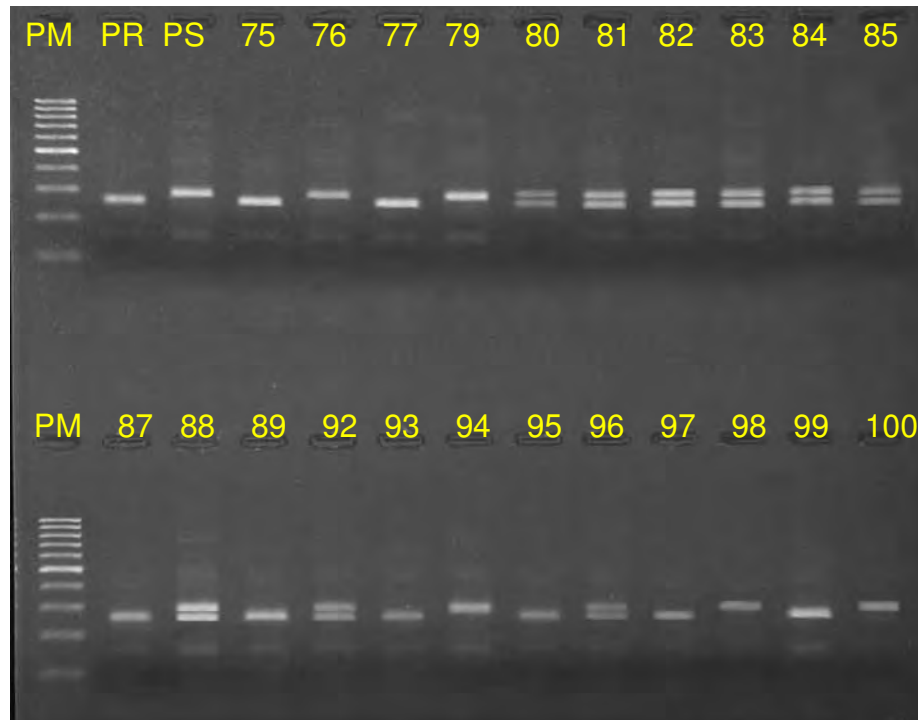


Figura 4. Perfil do marcador microssatélite Sat_166 em indivíduos da população de mapeamento F_2 . PM = 100pb; PR = parental resistente; PS = parental suscetível.

O mapa de ligação gerado neste estudo indica que a ordem dos marcadores moleculares microssatélite foi consistente com o mapa de ligação consenso da soja com pequenas diferenças de distância (Figura 7). Estas diferenças na posição do loco se devem ao fato de que as análises de ligação foram realizadas em populações de mapeamento diferentes.

Vários trabalhos de mapeamento dos locos de resistência à ferrugem asiática têm sido conduzidos. O loco *Rpp1* foi mapeado entre os marcadores SSR Sct_187 e Sat_164, à uma distância de 0,4 cM de ambos os marcadores, no grupo de ligação G da soja (HYTEN et al., 2007). Além do loco *Rpp1*, alelos

identificados em outras variedades também foram mapeados. O loco identificado na cultivar japonesa Hyuuga foi mapeado entre os marcadores SSR Satt460 e Satt307, no grupo de ligação C2, às distâncias de 0,8 cM e 2,4 cM, respectivamente (MONTEROS et al., 2007). Nesta mesma região genômica, foi mapeado o loco presente na cultivar FT-2, localizando-se entre os marcadores SSR Satt460 e Satt079, às distâncias de 20,3 cM e 7,8 cM, respectivamente (BROGIN et al. 2004; POLIZEL et al., 2006).

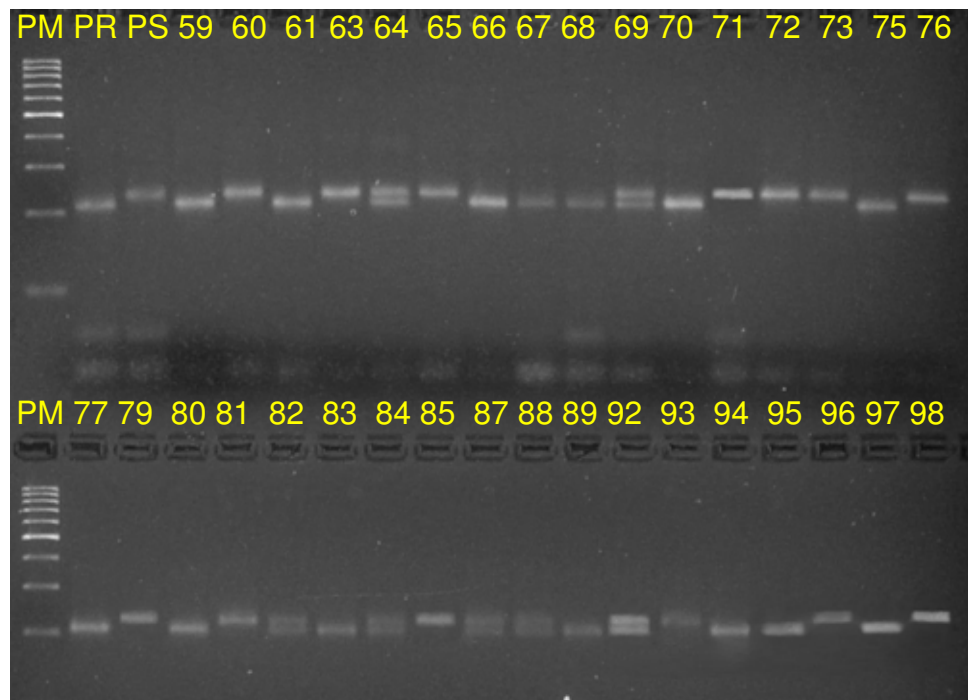


Figura 5. Perfil do marcador microsatélite Satt009 em indivíduos da população de mapeamento F_2 . PM = 100pb; PR = parental resistente; PS = parental suscetível.

Os marcadores microsatélites (Satt009, Satt152 e Sat_166) ligados ao loco de resistência *Rpp5* apresentaram-se potencialmente úteis na seleção assistida por marcadores em programas de melhoramento visando resistência a *P. pachyrhizi*.

Outros marcadores moleculares ligados a várias doenças da soja foram relatados na literatura. FUNGANTI et al. (2004) identificaram o marcador

Satt114 ligado ao loco de resistência ao nematóide da galha no grupo de ligação F. O marcador Satt215 mostrou-se ligado ao gene *Rbs1* que confere resistência a podridão-parda-da-haste causada pelo fungo *Phialophora gregata*, com eficiência de seleção de 88% (BACHMAN et al., 2001). Um novo gene, *Rcs_{Peking}*, que confere resistência a mancha-olho-de-rã foi mapeado a 1,1 cM do marcador Satt244 no grupo de ligação G (YANG et al., 2001).

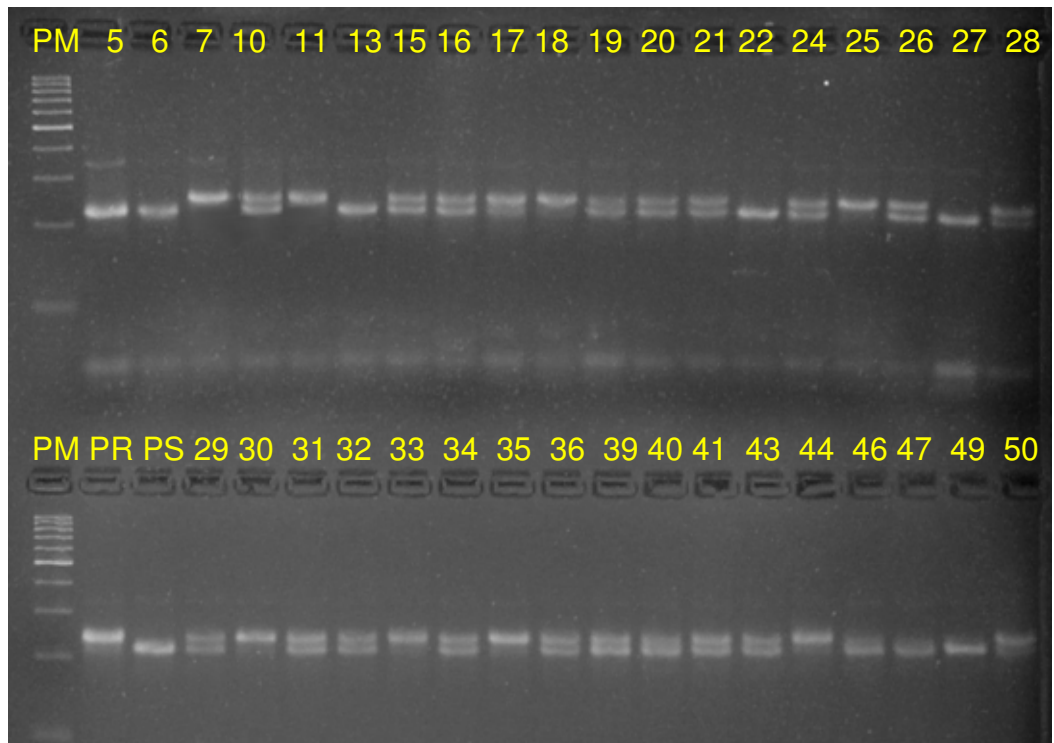


Figura 6. Perfil do marcador microssatélite Satt152 em indivíduos da população de mapeamento F₂. PM = 100pb; PR = parental resistente; PS = parental suscetível.

Conforme mencionado, o loco de resistência mapeado neste trabalho foi posicionado em uma região do grupo de ligação N onde já foram mapeados locos de característica quantitativa (QTLs) de outras doenças, indicando que genes e QTLs ligados a doenças podem estar organizados em *clusters*, e dessa maneira a estratégia de buscar marcadores próximos a locos de

resistência já conhecidos, constitui-se em uma estratégia que pode fornecer grande sucesso no processo seletivo de populações superiores.

Alguns QTLs significativos para a resistência a algumas doenças da soja foram mapeados na região cromossômica vizinha ao loco de resistência à ferrugem, denominado de *Rpp5*, descrito neste trabalho (Figura 1). Próximos ao marcador Satt009, foram mapeados QTLs para o patógeno *Sclerotinia sclerotiorum*, fungo causador do mofo branco na cultura da soja (ARAHANA, 2001). Em uma região cromossômica adjacente encontra-se mapeado um QTL para o nematóide do cisto, causador de uma das mais sérias ameaças a sojicultura. (CONCIBIDO et al., 1997).

Ainda no grupo de ligação N, outros locos qualitativos e quantitativos de resistência a doenças foram mapeados. WENG et al. (2001) encontraram a 3,2 cM do marcador Satt009, um loco de resistência a *Phytophthora sojae*, patógeno causador da podridão radicular em soja. Ligado ao marcador Satt080, foi mapeado um QTL de resistência a *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, causador da podridão vermelha da raiz, também conhecida com síndrome da morte súbita da soja (NJITI et al., 2002).

Alguns trabalhos de genômica funcional da soja sob infecção com ferrugem asiática foram realizados recentemente. A análise de expressão gênica de uma cultivar americana de soja através de microarranjos de DNA revelou que a maioria dos genes que mudaram sua expressão em situação de infecção precoce foram genes de resposta de defesa (PANTHEE et al., 2007). Este trabalho, entretanto, foi conduzido utilizando um genótipo para o qual não se conhece a resposta à ferrugem, uma vez que as plantas inoculadas não apresentaram sintomas de infecção. A infecção foi dada como positiva através da amplificação de um fragmento específico do fungo nas amostras de cDNA das folhas inoculadas. Deste modo, não é possível relacionar os genes expressos diferencialmente com um mecanismo de resistência, mas sim com um mecanismo de resposta a infecção.

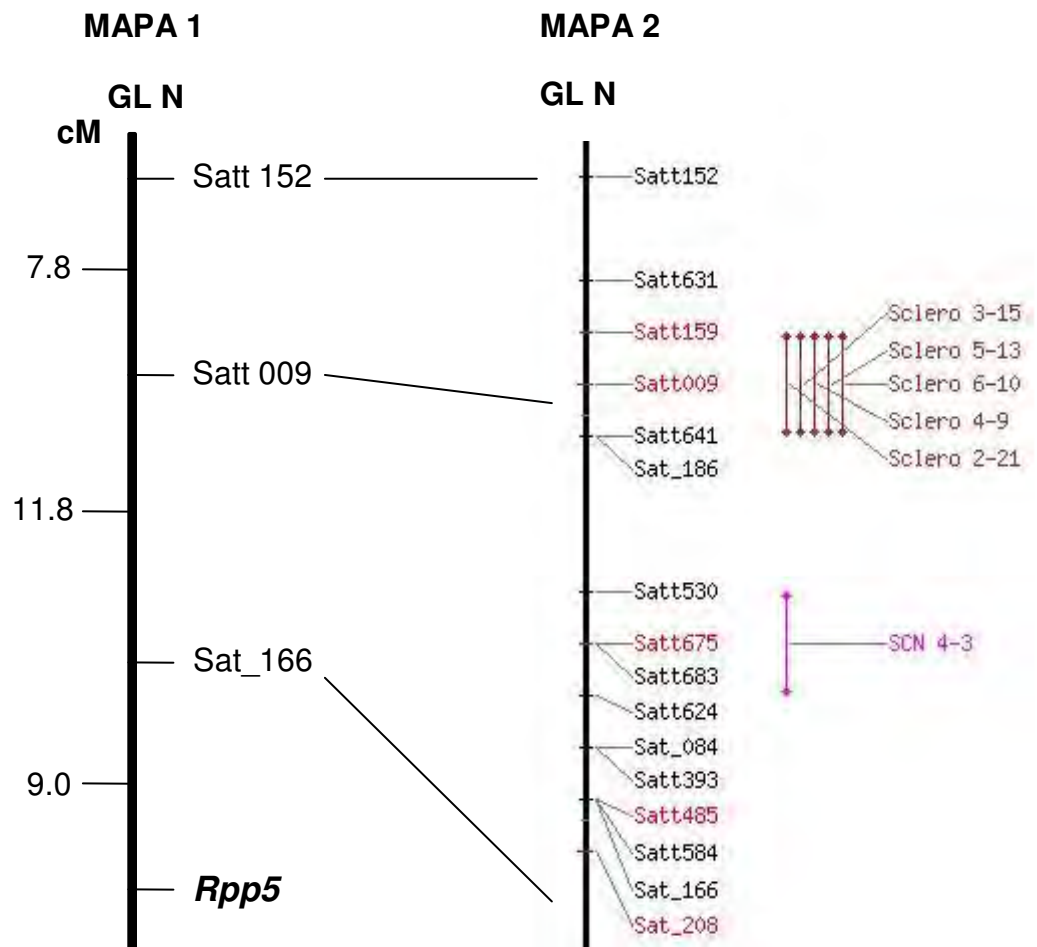


Figura 7. Mapa de ligação indicando o posicionamento do gene de resistência à ferrugem asiática da soja (*Rpp5*) em relação aos marcadores SSR polimórficos. Mapa 1: mapa genético gerado neste estudo; Mapa 2: parte do grupo de ligação consenso N, indicando os marcadores mapeados na região e os QTLs para locos de resistência mapeados nesta região (Sclero – *Sclerotinia sclerotiorum* e SCN - Nematóide do cisto). A porção do mapa de ligação consenso foi gerada na página da web do Soybase (mapa físico da cultivar Williams; Soybase, 2007).

Em outro trabalho de análise de expressão gênica utilizando o mesmo microarranjo comercial (MORTEL et al., 2007), foram analisados dois genótipos de soja, Embrapa 48 (suscetível) e PI230970 (resistente, possuidora do gene *Rpp2*), no decorrer dos primeiros sete dias após a inoculação em intervalos variáveis de 6 h a 1 dia. Foram detectadas mudanças na expressão dos mRNAs, com um pico de expressão de genes relacionados à defesa dentro das primeiras 12 h após a infecção, em ambos os genótipos, e outro próximo de 96 h após infecção no genótipo suscetível e próximo de 72 h após infecção no genótipo resistente, indicando uma expressão gênica relativamente precoce nos mecanismos mediados pelo gene *Rpp2*.

Em ambos os trabalhos, a análise de microarranjos foi conduzida utilizando microarranjos de oligonucleotídeos comerciais (“Soybean Genome GeneChip Array”, Affymetrix), os quais representam mais de 37.500 transcritos da soja. Os oligonucleotídeos presentes no microarranjo comercial são restritos a certos germoplasmas e condições de cultivo, o que representa uma limitação da técnica.

Apesar de terem sido incluídas na fabricação destes microarranjos oligonucleotídeos representando genes de resposta ao nematóide do cisto (*Heterodera glycines*) e à podridão da raiz (*Phytophthora sojae*), não foram representados genes de defesa a fungos biotróficos, para os quais as plantas apresentam mecanismos específicos de defesa. Assim, é provável que estes microarranjos não contemplem algumas ou várias das seqüências ativadas em interações compatíveis e incompatíveis entre soja e ferrugem asiática. Até o momento, não foram publicados trabalhos relatando a clonagem de genes envolvidos na reação da soja à ferrugem asiática (SILVA, 2007).

Os marcadores SSR ligados ao loco de resistência à ferrugem da soja (*Rpp5*), descrito neste trabalho, podem ser de grande utilidade para o processo de seleção assistida visando a introgressão de múltiplos locos em uma única cultivar. Porém, estudos adicionais deverão ser realizados para melhor conhecimento da região do genoma onde o gene de resistência foi mapeado.

V. CONCLUSÕES

1. A resistência à ferrugem asiática presente na linhagem PI 200526 apresentou-se governada por um único gene com ação dominante, sendo denominado de *Rpp5*.

2. O loco de resistência *Rpp5* presente na linhagem PI 200526 foi mapeado no grupo de ligação N da soja, próximos a outros locos e QTLs ligados a doenças já mapeados. Indicando uma possível organização destes em clusters.

3. Os marcadores SSR Satt009, Satt152 e Sat_166 apresentaram-se como promissores para a seleção assistida de genótipos de soja com a mesma fonte de resistência utilizada neste estudo.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANUÁRIO BRASILEIRO DE SOJA 2007. Disponível em: http://www.anuarios.com.br/port/anuario_capa.php?idAnuario=14

ALVES, S.A.M. **Quantificação de parâmetros da pré-penetração e monocíclicos relacionados ao patossistema *Phakopsora pachyrhizi*-soja.** 2007. 64p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

ARAHANA, V.S.; GRAEF, G.L.; SPECHT, J.E.; STEADMAN, J.R.; ESKRIDGE, K.M. Identification of QTLs for resistance of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Crop Science**. v.41, n.1, p.180-188, 2001.

ARANTES, N.E.; PENNA, J.C.V.; SILVA, C.M. **Guia técnico de campo: Algodão e Soja.** Belo Horizonte: APSEMG, 1998. 176p.

AZALTE-MARIN, A.L.; CERVIGNI, G.D.L.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatol. Brás.**, v.30, n.4, p.333-342, 2005.

AZEVEDO, L.A.S.; JULIATTI, F.C.; BARRETO, M. Resistência de genótipos de soja à *Phakopsora pachyrhizi*. **Summa Phytopathologica**, v.33, n.3, p.252-257, 2007.

BACHMAN, M.S.; TAMULONIS, J.P.; NICKELL, C.D.; BENT, A.F. Molecular markers linked to brown stem rot resistance genes, *Rbs1* and *Rbs2*, in soybean. **Crop Science**. v.41, p.527-535, 2001.

BARROS, R. Doenças da cultura da soja. In: **Tecnologia e Produção** – Soja – 2007/2008. Campo Grande: Fundação MS, 2008.

BEARZOTI, E. Mapeamento de QTL. In: PINHEIRO, J.B.; CARNEIRO, I.F (Ed.). **Análise de QTL no melhoramento de plantas**. Goiânia: FUNAPE, 2000. p.63-223.

BERTRAND, J-P.; LAURENT, C.; LECLERCQ, V. **O mundo da soja**. São Paulo: HUCITEC, 1987. 139 p.

BONETTI, L.P. Cultivares e seu melhoramento genético. In: Fundação Cargill. **Soja e melhoramento**, v.2, p. 741-800, 1983.

BROGIN, R. L.; ARIAS, C. A. A.; VELLO, N. A.; TOLEDO, J. F. F.; PIPOLO, A. E.; CATELLI, L. L.; MARIN, S. R. R. Molecular mapping of a gene conferring resistance to soybean rust In: World Soybean Research Conference, 7., 2004, Iguasu Falls. **Abstracts...** Iguasu Falls: Embrapa, 2004, p. 318.

BROGIN, R.L. **Mapeamento de genes de resistência à ferrugem e de QTLs envolvidos na resistência à septoriose em soja**. 2005. 93p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

BRONDANI, C.; BRONDANI, R.P.V.; RANGEL, P.H.N. Utilização de marcadores moleculares em programas de ampliação da base genética de espécies cultivadas. Santo Antônio de Goiás : Embrapa Arroz e Feijão, 2003. 36 p. – (Documentos / Embrapa Arroz e Feijão, ISSN 1678-9644 ; 155).

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

CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYAMA, N.S. Tipos de marcadores moleculares. In: Borém, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. Viçosa: Editora UFV, 2006. p.09-78.

CAPELLARI Jr, L.; RODRIGUES, R.R.; SOUZA, V. **Apostila de botânica sistemática**. Piracicaba: Departamento de Ciências Biológicas, ESALQ/USP, 1999. 95p.

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

CARVALHO JR, A.A.; FIGUEIREDO, M.B. A verdadeira identidade da ferrugem da soja no Brasil. **Summa Phytopathologica**, v.26, n.2, p.197-200, 2000.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos: sexto levantamento**, março 2008. Brasília, 30f. 2008.

CONCIBIDO, V.C.; LANGE, D.A.; DENNY, R.L.; ORF, J.H.; YOUNG, N.D. Genome mapping of soybean cyst nematode resistance genes in “Peking”, PI 90763, and PI 88788 using DNA markers. **Crop Science**. V.37, p.258-264, 1997.

CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM, Ferrugem: apesar de menos agressiva, doença exige atenção, 2008. Disponível em: http://www.consorcioantiferrugem.net/index.php?Sobre_o_mapa:Em_destaque

COSTA, A.F. **Tratamento de sementes de soja com fungicidas para controle da ferrugem asiática da soja**. 2007. 48p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

CREGAN, P. B.; JARVIK, T.; BUSH, A. L.; SHOEMAKER, R. C.; LARK, K. G.; 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**, v. 39, n. 5, p. 1464-1490, 1999.

CRUZ, C.D.; SCHUSTER, I. **GQMOL**: aplicativo computacional para análise de dados moleculares e de suas associações com caracteres quantitativos, Versão 9.1. 2006

Disponível em <http://www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm>

DESLANDES, J.A. Ferrugem da soja e de outras leguminosas causadas por *Phakopsora pachyrhizi* no Estado de Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, v.4, p.337-339, 1979.

EMBRAPA. **Situação da Ferrugem Asiática da Soja no Brasil e na América do Sul** (Documentos). Londrina: Embrapa Soja, 2004. 30 p.

EMBRAPA – Levantamento quantifica perdas na soja no RS, 2008

Disponível

em:

<http://www.embrapa.br/embrapa/imprensa/noticias/2008/junho/2a-semana/levantamento-quantifica-perdas-na-soja-no-rs>

FEHR, W.R.; CAVINESS, J.A. **Stages of soybean development**. Ames: Iowa State University, 1977. 11p. (Special Report, 80).

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

FRANCIA, E.; TACCONI, G.; CROSATTI, C.; BARABASCHI, D.; BULGARELLI, D.; DALL'AGLIO, E.; VALE, G. Marker assisted selection in crop plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 82, n. 3, p. 317–342, 2005.

FUNGANTI, R.; BENEVENTI, M.A.; SILVA, J.F.V.; ARRIAS, C.A.A.; MARIN, S.R.R.; BINNEK, E.; NEPOMUCENO, A.L. Identificação de marcadores moleculares de microssatélites para a seleção de genótipos de soja resistentes a *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**. v.28, n.2, p.125-130, 2004.

FURTADO, G.Q. **Ferrugem asiática da soja: métodos de preservação dos urediniósporos e fatores relacionados à infecção do hospedeiro** 2007. 79p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

FMT – Fundação MT **Boletim de pesquisa de soja**. Rondonópolis: Fundação MT, 2007. 274p.

GARCIA, A.; CALVO, E.S.; KIIHL, R.A.S., HARADA, A.; HIROMOTO, D.M., VIEIRA, L.G.E. Molecular Mapping of Soybean Rust (*Phakopsora pachyrhizi*) Resistance Genes: Discovery of a Novel Locus and Alleles. **Theoretical and Applied Genetics**, 2008. Disponível online em: <http://www.springerlink.com/content/a657751v11520810/>

GIBSON, L.; BENSON, G. Origin, history and uses of soybean *Glycine max*. Disponível em: http://www.agron.iastate.edu/courses/agron212/Readings/Soy_history.htm

GODOY C.V.; CANTERI, M.G. Efeitos Protetor, Curativo e Erradicante de Fungicidas no Controle da Ferrugem da Soja Causada por *Phakopsora pachyrhizi*, em Casa de Vegetação. **Fitopatol. bras.**, v.29, n.1, p.97-101, 2004.

GODOY, C.V; Seixas, C.D.S.; Soares, R.M.; Henning, A.A Histórico do vazio sanitário como medida de manejo da ferrugem asiática da soja. Embrapa – Soja, 2006. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/download/HistoricoVazio.doc>

GORDON, S.G.; MARTIN, S.K.S.; DORRANCE, A.E. *Rps8* maps to a resistance gene rich on soybean molecular linkage group F. **Crop Science**, v.46, n.1, p.168-173, 2006.

HALDANE, J.B.S. The combination of linkage values, and the calculation of distance between the loci of linked factors. **Journal of Genetics**, v.8, p.299-309, 1919.

HARTWIG, 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.

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

HIROMOTO, D. M.; VELLO, N. A. The genetic base of Brazilian soybean (*Glycine Max* (L.) Merrill) cultivars. **Revista Brasileira de Genética**, v. 9, p. 295-306, 1986.

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

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2006.

Disponível em:
http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=726&id_pagina=1. Acesso 18 jun. 2008.

KIIHL, R.A.S., CALVO, E.S. A epopéia da soja no Brasil. In: International Workshop on Tropical Agriculture Development, 2006, Brasília. **Anais...**

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

LANDER, E. S.; GREEN, P.; ABRAHAMSON, J.; BARLOW, A.; DALY, J. M.; LINCOLN, S. E.; NEWBERG, L. Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. **Genomics**, v.1, n. 2, p.174-181, 1987.

LIU, B.H.; KNAPP, S.J. GMENDEL: a program for Mendelian segregation and linkage analysis of individual or multiple progeny populations using log-likelihood ratios. **Journal of Heredity**, v. 81, n. 5, p. 407-418, 1990.

MARTINS, J.A.S. **Caracteres epidemiológicos e uso da análise de agrupamento para a resistência parcial à ferrugem da soja**. 2006. 53p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

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

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 segregation populations. **Proceedings National Academy Science USA**, v.88, p.9828-9832. 1991.

MIAN, M.A.R.; WANG, T.Y.; PHILLIPS, D.V., ALVERNAZ, J.; BOERMAN, H.R. Molecular mapping of the Rcs3 gene for resistance to frogeye leaf spot in soybean. **Crop Science**, v.39, n.6, p.1687-1691, 1999.

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**, v.47, p. 829-834, 2007.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A.M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **Plant Journal**, v. 3, n. 1, p.175-182, 1993.

MORTEL, M. V. D.; RECKNOR, J. C.; GRAHAM, M. A.; NETTLETON, D.; DITTMAN, J. D.; NELSON, R. T.; GODOY, C. V.; ABDELNOOR, R. V.; ALMEIDA, A. M. R.; BAUM, T. J.; WHITHAM, S. A. Distinct biphasic mRNA changes in response to Asian Soybean Rust Infection. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 20, n. 8, p. 887- 899, 2007.

MUELLER, C.C.; BUSTAMANTE, M. **Análise da expansão da soja no Brasil**. Disponível em: <http://www.worldbank.org/rfpp/news/debates/mueller.pdf>

NJITI, V.N., MEKSEM, M.; IQBAL, J.; JOHNSON, J.E.; KASSEM, M.A.; ZOBRIST, F. KILO, V.Y.; LIGHTFOOT, D.A. Common loci underlie fiels resistance to soybean sudden death syndrome in Forrest, Pyramid, Essex, and Douglas. **Theoretical and Applied Genetics**. V.104, n.2, p.294-300, 2002.

ONO, Y.; BUTIRICÁ, P.; HENNEN, J.F. Delimitation of *Phakopsora* and *Physopella*, *Cerotelium* and their species im leguminosae. **Mycological Research**, v.96, n.10, p.825-850, 1992.

PASSINI, F.B. **Ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrizi*) da soja (*Glycine max*) na cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris*)**. 2007. 79p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa.

PANTHEE, D. R.; YUAN, J. S.; WRIGHT, D. L.; MAROIS, J. J.; MAILHOT, D.; STEWART, J. R. C.N. Gene expression analysis in soybean in response to the causal agent of Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow) in an early growth stage. **Functional and Integrative Genomics**, v. 7, n. 4, p. 291-301, 2007.

POLIZEL, A. 2005. **Identificação de novos marcadores ligados ao gene de resistência à ferrugem asiática da soja na cultivar 'FT-2'**. Monografia, Fundação Faculdades Luís Meneghel, Bandeirantes, 51p.

POLIZEL, A.; BROGIN, R. L.; SILVA, D. C. G.; YAMANAKA, N.; CATELLI, L. L.; MARIN, S. S. R.; ABDELNOOR, R. V. Mapeamento molecular de um gene de resistência à ferrugem da soja oriundo da cultivar 'FT-2'. In: Congresso Brasileiro de Genética, 51., 2006, Águas de Lindóia. **Anais...** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2006. p. 465.

PRIOLLI, R. H. G.; MENDES-JÚNIOR, C. T.; SOUSA, S. M. B.; SOUSA, N. E. A.; CONTEL, E. P. B. Diversidade genética da soja entre períodos e entre programas de melhoramento no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.10, p.967-975, 2004.

REIS, E.F.; LIMA NETO, V.C.; GODOY, C.V.; ROSA, C.T.; CASTANHO, H.E.; VICENTE, N.G. Controle químico da ferrugem asiática da soja na região sul do Paraná. **Scientia Agrícola**, v.8, n.3, p.310-323, 2007.

SCHUSTER, I.; CRUZ, C. D. **Estatística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados**. Viçosa MG: UFV, 2004. 568 p.

SEDIYAMA, T.; PEREIRA, M.G.; SEDIYAMA, C.S; GOMES, J.L. **Cultura da soja**. Viçosa: UFV, 1985, 96p.

SEDIYMA, T.; TEIXEIRA, R.C.; REIS, M.S. Melhoramento da soja. In: Borém, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: Editora UFV, 1999. p.487-531.

SILVA, D.C.G. **Mapeamento de genes de resistência da soja à ferrugem asiática e análise transcricional na interação patógeno-hospedeiro**. 2007. 153p. Tese (Doutorado) – UNESP, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.

SILVA, D.C.G.; YAMANAKA, N.; BROGIN, R.L., ARRIAS, C.A.A.; NEPOMUCENO, A.L.; MAURO, A.O.; PEREIRA, S.S.; NOGUEIRA, L.M.; PASSIANOTO, A.L.L.; ABDELNOOR, R.V. Molecular mapping of two loci that confer resistance to Asian soybean rust. **Theoretical and Applied Genetics**, 2008. Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/j55j21658243602u5/fulltext.pdf>.

SOARES, R.M.; RUBIN, S.A.L.; WIELEWICKI, A. P.; OZELAME, J. G. Fungicidas no controle da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) e produtividade da soja. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.4, p.1245-1247, 2004.

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**, v. 109, n. 1, p. 122-128, 2004.

SOUZA, P.F.C.; ALVES, E. ; CASTRO, H.A. Influência da temperatura no desenvolvimento de teliósporos de *Phakopsora pachyrhizi* em folíolos de soja. **Summa Phytopathologica**, v. 32, p. 227-231, 2006.

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

SUITER, K.A.; WENDELL, J.F.; CASE, J.S. 1983. Linkage 1: a pascal computer program for the detection and analysis of genetic-linkage. **Journal of Heredity**, v.74, n.3, 203-204, 1993.

UNFRIED, J.R. **Estratégias para a seleção de linhagens experimentais de soja para a tolerância à ferrugem asiática e associações com outras doenças**. 2007. 220p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

VIEIRA, E.L.; CASTRO, P.R.C. **Ação de bioestimulante na cultura da soja (*Glycine Max (L.) Merrill*)**. Campinas: Stoller, 2004. 73p.

WENG, C.; YU, K.; ANDERSON, T.R; POYSA, V. Mapping genes conferring resistance to *Phytophthora* root rot of soybean, *Rps1a* and *Rps7*. **The Journal of Heredity**, v.92, n.5, p.442-446, 2001.

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

YANG, W.; WEAVER, D.B.; NIELSEN, B.L.; QIU, J. Molecular mapping of a new gene for resistance to frog-eye leaf spot in soybean in "Peking". **Plant Breeding**. v. 120, n.1, p.73-78, 2001.

YORINORI, J.T. Soja In: VALE, F.X.R; ZAMBOLIM, L. **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**. Visconde do Rio Branco, Minas Gerais: Suprema Gráfica e Editora, 1997. cap.21, 953-1023.

YORINORI, J.T.; PAIVA, W.M.; FREDERICK, R.D.; COSTAMILAN, L.M.; BERTAGNOLLI, P.F. Epidemia da ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi*) no Brasil e no Paraguai, em 2001 e 2002. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, p.178-179, 2002.

YORINORI, J.T.; PAIVA, W.M.; FREDERICK, R.D.; COSTAMILAN, L.M.; BERTAGNOLLI, P.F., GODOY, C.V.; NUNES JUNIOR, J. Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. **Phytopathology**, v.93, n.6, p.103, 2003.

YORINORI, J.T.; NUNES JR, J.; LAZZAROTTO, J.J. **Ferrugem “asiática” da soja no Brasil: evolução, importância econômica e controle**. Londrina, Paraná: Embrapa, 2004, 36p.

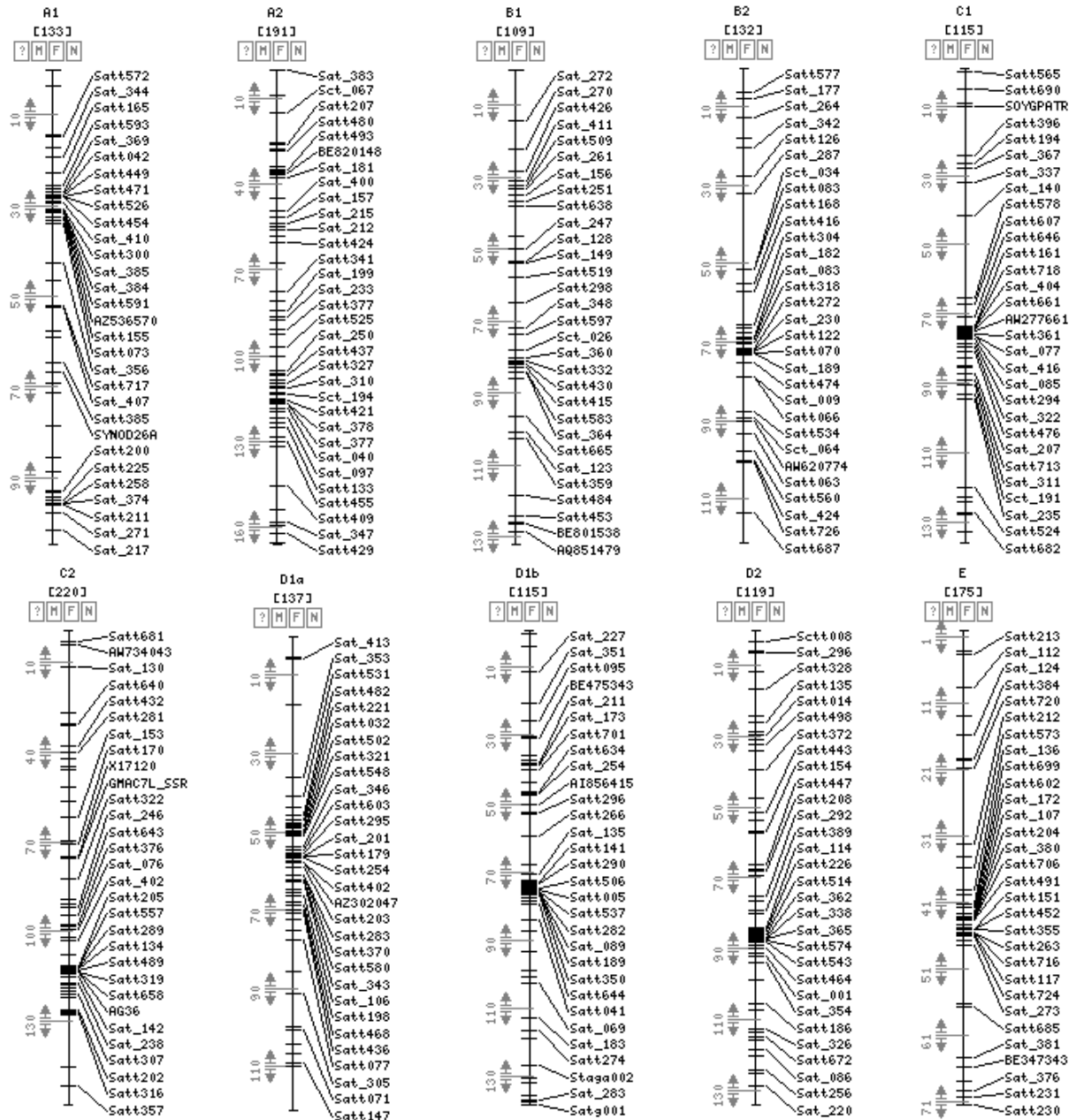
YORINORI, J.T.; PAIVA, W. M.; FREDERICK, R. D.; COSTAMILAN, L.M.; BERTAGNOLI, P. F.; HARTMAN, G. L.; GODOY, C. V.; NUNES, J. J. Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. **Plant Disease**, v. 89, n. 6, p. 675-677, 2005.

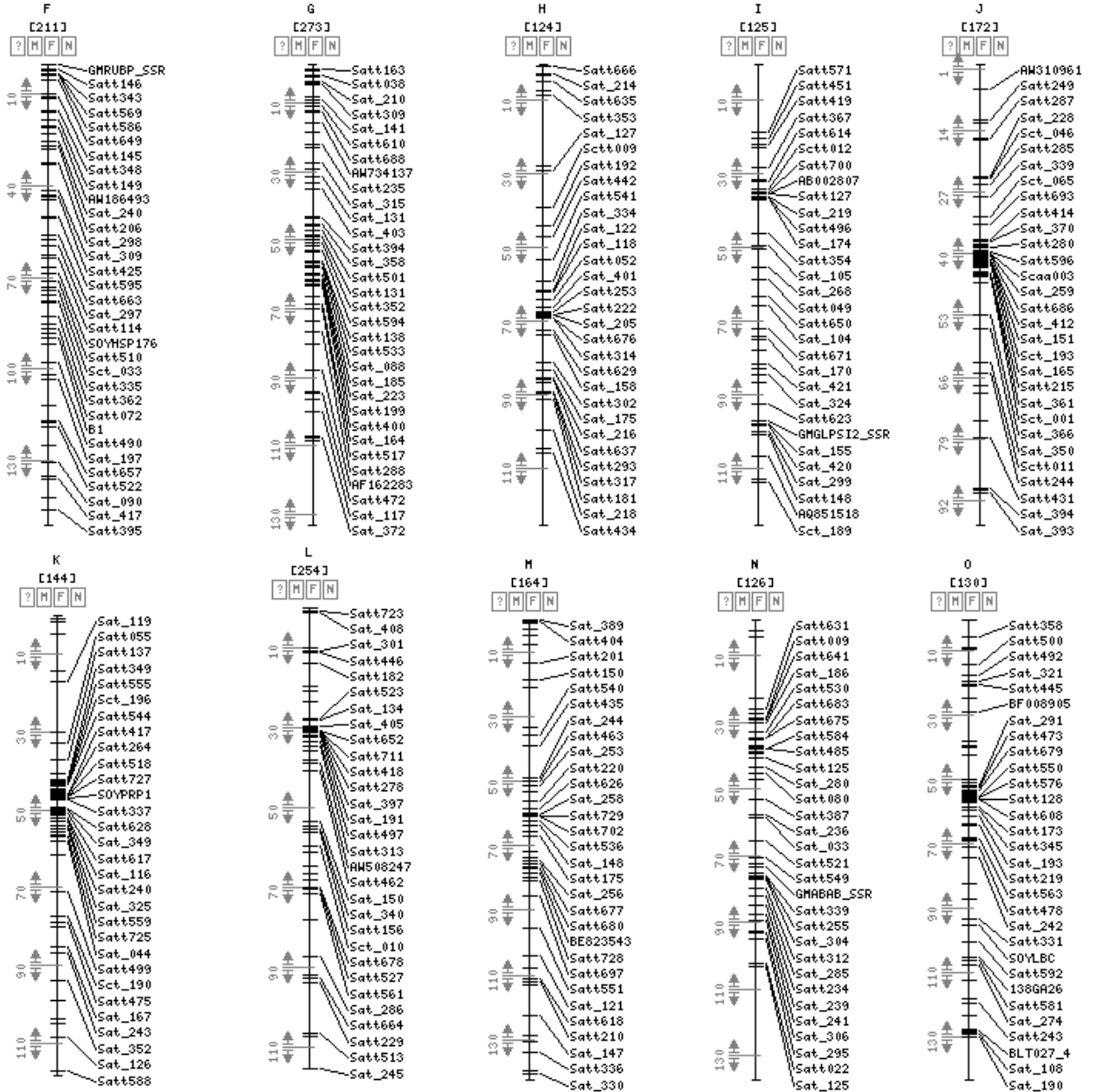
ZAMBENEDETTI, E.B.; ALVES, E.; POZZA, E.A.; ARAÚJO, D.V.; GODOY, C.V. Avaliação de parâmetros monocíclicos e da intensidade da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) em diferentes genótipos de soja e posições de copa. **Summa Phytopathologica**, v.33, n.2, p.178-181, 2007.

ZHAO, G.; ABLETT, G. R.; ANDERSON, T. R.; RAJCAN, I.; SCHAAFSMA, A. W. Inheritance and genetic mapping o resistance to rhizoctonia root and hypocotyl rot in soybean. **Crop Science**, v. 45, n. 4, p. 1441-1447, 2005.

APÊNDICE

Apêndice A. Grupos de ligação da soja.





Apêndice B. Classificação qualitativa dos indivíduos da população de mapeamento, quanto ao tipo de lesão (RB e TAN) e quanto a reação (R = resistente e S = suscetível).

Indivíduos	Lesões	Reação	Indivíduos	Lesões	Reação
1	RB	R	51	TAN	S
2	RB	R	52	RB	R
3	TAN	S	53	RB	R
4	RB	R	54	RB	R
5	RB	R	55	RB	R
6	RB	R	56	RB	R
7	RB	R	57	RB	R
8	RB	R	58	TAN	S
9	RB	R	59	RB	R
10	RB	R	60	RB	R
11	RB	R	61	RB	R
12	TAN	S	62	TAN	S
13	RB	R	63	RB	R
14	RB	R	64	RB	R
15	TAN	S	65	RB	R
16	TAN	S	66	TAN	S
17	RB	R	67	RB	R
18	RB	R	68	RB	R
19	RB	R	69	RB	R
20	RB	R	70	RB	R
21	RB	R	71	RB	R
22	RB	R	72	RB	R
23	RB	R	73	RB	R
24	TAN	S	74	TAN	S
25	RB	R	75	RB	R
26	RB	R	76	RB	R
27	RB	S	77	RB	R
28	RB	R	78	RB	R
29	RB	R	79	RB	R
30	TAN	S	80	RB	R
31	RB	R	81	TAN	S
32	RB	R	82	RB	R
33	RB	R	83	RB	R
34	RB	R	84	RB	R
35	RB	R	85	RB	R
36	RB	R	86	RB	R
37	TAN	S	87	RB	R
38	TAN	S	88	RB	R
39	RB	R	89	RB	R

40	RB	R	90	TAN	S
41	RB	R	91	RB	R
42	RB	R	92	RB	R
43	RB	R	93	RB	R
44	RB	R	94	RB	R
45	RB	R	95	TAN	S
46	RB	R	96	RB	R
47	RB	R	97	RB	R
48	TAN	S	98	RB	R
49	RB	R	99	RB	R
50	RB	R	100	RB	R

Apêndice C. Marcadores microsatélites utilizados para a detecção de polimorfismo e para o mapeamento do gene de resistência.

MARCADORES	GRUPO DE LIGAÇÃO	RESULTADO
Satt620	J	MN
Sat_366	J	MN
Sat_255	J	MN
Satt288	G	MN
Satt191	G	MN
Satt160	F	PG
Satt192	H	PG
Satt242	K	PG
Satt185	E	PG
Satt475	K	PG
Satt338	C1	PG
Satt294	C1	PG
Satt187	A2	PG
Sat_162	A2	PG
Satt009	N	PB
Satt152	N	PB
Sat_166	N	PB
Sat_124	E	MN
Satt309	G	MN
Satt114	F	MN
Satt423	F	MN
Sat_141	G	MN
Sat_168	G	MN
Sat_342	B2	MN
Satt126	B2	MN
Sat_287	B2	MN
Satt451	I	MN
Satt419	I	MN
Sat_132	O	MN

Sat_321	O	MN
Sat_347	O	MN
Satt314	H	MN
Satt127	I	MN
Sat_219	I	MN
Satt496	I	MN
Satt181	H	MN
Satt168	B2	MN
Satt416	B2	MN
Satt454	A1	MN
Satt300	A1	MN
Satt581	O	MN
Sat_038	O	MN
Satt644	D1b	MN
Sat_236	N	MN
Sat_250	A2	MN
Sat_097	A2	MN
Sat_129	A2	MN
Satt272	B2	MN
Sat230	B2	MN
Satt354	I	MN

MN = monomórfico.

PG = polimórfico entre os genitores.

PB = polimórfico entre os bulks.