

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**RESISTÊNCIA DA SOJA À FERRUGEM ASIÁTICA E AO OÍDIO:  
HERANÇA DE CARACTERES QUALI-QUANTITATIVOS E  
MAPEAMENTO GENÉTICO**

Lizandra Lucy Catelli

Orientador: Prof. Dr. Antônio Orlando Di Mauro  
Co-orientadores: Dr. Carlos Alberto Arrabal Arias  
Dr. Ricardo Vilela Abdelnoor

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Fevereiro de 2009

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**LIZANDRA LUCY CATELLI** - nascida em Alvorada do Sul-PR, em 23 de abril de 1978. Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Filadélfia de Londrina, em Londrina-PR (conclusão em 2003) e mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas pela Universidade Estadual de Londrina - UEL (conclusão em 2005). Atualmente é integrante do projeto de pesquisa em melhoramento e diversidade genética de soja para resistência a ferrugem asiática, na Estação Experimental Boliche, em Guayaquil no Equador.

**Dedico**

Vó Germana,  
exemplo de vida e amor incondicional

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, essência da minha vida pelo talento e direção a mim concedido para realização deste trabalho.

Aos Drs. Antonio Orlando Di Mauro, Carlos Alberto Arrabal Arias e Ricardo Vilela Abdelnoor, pela orientação e oportunidade de realizar o trabalho.

Aos pesquisadores Francismar C. Marcelino, Naoki Yamanaka, Elizeu Binneck, Álvaro Manoel de Almeida, Janete Aparecida D. Senna e Ivan Schuster, pelas valiosas sugestões no desenvolvimento do trabalho.

Aos membros da banca examinadora Drs. Francismar Correa Marcelino, Eduardo Antônio Gavioli, Rinaldo Cesar de Paula, Maria Aparecida Pessôa da Cruz Centurion, pelas valiosas correções e sugestões para aperfeiçoamento do trabalho.

A Paula Camargo por toda a ajuda e dedicação durante o trabalho mostrando-se a cada dia uma grande profissional.

A Michelle Rincão, Amanda Rusiska, Luana Gonçalves de Souza, Barbara Panoff, Adriana Polizel, por todo apoio nas avaliações e no decorrer dos experimentos.

A Renata Fuganti, Danielle Cristina Gregório, Maria Aparecida dos Santos, Noéle Giacomini Torres pelas correções da tese e as excelentes sugestões no trabalho.

A Renata Stolf pela amizade e pelas experiências vividas durante o percurso do doutorado.

A Selma Pereira, Amanda Paiva, João Victor, André Passionoto, Maria Cecília, Rodrigo Pereira, Gustavo, Salvador, Guto, Joyce, Glória, Cibelle, Larissa e Fabiana pela convivência e incentivo no decorrer do doutorado.

Aos funcionários do laboratório de Biotecnologia Vegetal e Bioinformática, Silvana Marin, César Silveira, Márcia e Vera Pierotti, pelos ensinamentos, conselhos e valiosa amizade.

A todos amigos do Laboratório de Biotecnologia, que de alguma maneira contribuíram para a realização do trabalho.

Aos amigos de Jaboticabal, em especial, Daniela Sarti, Dani Gaucha, Marcelo Marchi pela excelente convivência.

Aos amigos Maria Claudia, Érica Perna, Leandro, José, Márcia, Higo, Claudio, Viviane, Rodrigo, Angélica, Magda, Luciana e Érica Brito, por entenderem minha ausência e apoiarem em todos os passos da minha vida.

A Alexander Davalos, sempre me apoiando e ajudando com muito amor e paciência.

A minha família, presente em todos os momentos da minha vida com amor, apoio e incentivo.

A UNESP-FCAV, FINEP, CAPES e a Embrapa Soja pelo apoio financeiro, concessão da bolsa e disponibilização de estrutura física para a realização deste trabalho.

E também, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
RESUMO.....	x
SUMMARY.....	xi
CAPITULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	1
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1 Soja .....	3
2.2 Doenças que ocorrem na soja.....	4
2.2.1 Ferrugem asiática da soja ( <i>Phakopsora pachyrhizi</i> ).....	5
2.2.1.1 Agente causador .....	5
2.2.1.2 Histórico da doença.....	5
2.2.1.3 Epidemiologia .....	6
2.2.1.4 Sintomatologia .....	7
2.2.1.5 Perdas .....	8
2.2.1.6 Controle da doença .....	9
2.2.1.7 Genótipos resistentes .....	10
2.2.2 Oídio da soja ( <i>Erysiphe diffusa</i> sin. <i>Microsphaera diffusa</i> ).....	12
2.2.2.1 Agente causador .....	12
2.2.2.2 Morfologia.....	12
2.2.2.3 Histórico.....	13
2.2.2.4 Epidemiologia .....	13
2.2.2.5 Sintomas e desenvolvimento da doença .....	14
2.2.2.6 Perdas .....	15
2.2.2.7 Controle da doença .....	16
2.2.2.8 Genótipos resistentes .....	16
2.3 Mecanismos de agressão e defesa nas interações planta-patógeno.....	18
2.4 Marcadores moleculares .....	20
2.5 Mapas genéticos .....	22
3 OBJETIVOS .....	27
3.1 Objetivos Específicos .....	28
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	29
CAPÍTULO 2 - RESISTÊNCIA À FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA: HERANÇA DE CARACTERES QUALITATIVOS E QUANTITATIVOS E MAPEAMENTO GENÉTICO ....	46
RESUMO.....	46
Introdução .....	47

Material e Métodos .....	48
Material Genético .....	48
Instalação e delineamento do experimento .....	49
Inoculação e Avaliação.....	49
Extração de DNA e Estratégia de Mapeamento .....	50
Análise dos Dados.....	52
Resultados .....	54
Dados quantitativos .....	54
Dados qualitativos .....	57
Discussão.....	60
Herança dos genes maiores.....	60
Herança dos caracteres quantitativos .....	61
Mapeamento molecular .....	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	67
CAPÍTULO 3 - MAPEAMENTO MOLECULAR DE UM NOVO GENE DE RESISTÊNCIA AO OÍDIO DA SOJA.....	75
RESUMO.....	75
Introdução .....	76
Material e Métodos.....	77
Resultados e Discussão.....	80
REFERÊNCIAS BIBIOGRÁFICAS .....	87
CAPÍTULO 4 - CONCLUSÕES .....	94

**LISTA DE ABREVIATURAS**

- AFLP - “Amplified Fragment Length Polymorphism” ou Polimorfismo de Comprimento de Fragmento Amplificado
- Avr - avirulência
- BAC - “Bacterial Artificial Chromosome” ou Cromossomo Artificial Bacteriano
- BSA - “Bulked Segregant Analysis” ou Análise de Agrupamentos Segregantes
- CID – “Carbon isotope discrimination” ou discriminação isotópica do carbono
- cM - centiMorgan
- DNA – “Deoxyribonucleic acid” ou Ácido desoxirribonucléico
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- EST - “Expressed Sequence Tags” ou Etiquetas de Sequências Expressas
- Fflr – “First flower” ou Início do florescimento
- GQMol - Genética Quantitativa e Molecular
- GL – “Linkage Group” ou Grupo de Ligação
- HR - “Hipersensitive Response” ou Resposta de Hipersensibilidade
- ITS - “Internal Transcribed Sequences” ou Sequências Internas Transcritas
- Lf – “Leaf area” ou Área foliar
- Lflt shape - “Leaflet Shape” ou Formato da folha
- Lf wdth - “Leaf width” ou Largura da folha
- LOD – “Logarithm of ODDs” Logaritmo dos nós
- MAS - “Marker Assisted Selection” ou Seleção Assistida por Marcadores
- PCR - “Polymerase Chain Reaction” ou Reação em Cadeia da Polimerase
- PI – “Plant Introduction” ou Introdução de Plantas
- PR - “Pathogenesis Related” ou Relacionada à Patogênese
- QTL - “Quantitative Trait Locus” ou Loco de Característica Quantitativa
- R - “Resistance” ou Resistência
- RAPD - “Random Amplified Polymorphic DNA” ou DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso
- RB - “Reddish-Brown” ou Marrom-Avermelhado



RFLP - "Restriction Fragment Length Polymorphism" ou Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição

RGAs - "Resistance Gene Analogs" ou Análogos de Genes de Resistência

RILs - "Recombinant Inbred Lines" ou Linhagens Endogâmicas Recombinantes

SCAR - "Sequence Characterized Amplified Regions" ou Regiões Amplificadas Caracterizadas por Sequências

SCN - "Soybean Cyst Nematode" ou Nematóide do Cisto da Soja

SDS - "Sudden death syndrome" ou Síndrome da morte súbita

Sd fill - "Seed filling" ou Enchimento de grãos

SGQ - Sistema de Genética e Quantitativa

SNPs - "Single Nucleotide Polymorphism" ou Sequências Únicas de Nucleotídeo

SSR - "Simple Sequence Repeat" ou Sequência Simples Repetida

VNTR - "Variable Number of Tandem Repeats" ou Sequências Adjacentes que se Repetem em Número Variável

## RESISTÊNCIA DA SOJA À FERRUGEM ASIÁTICA E AO OÍDIO: HERANÇA DE CARACTERES QUALI-QUANTITATIVOS E MAPEAMENTO GENÉTICO

**RESUMO** - Os fungos patogênicos *Phakopsora pachyrhizi* e *Erysiphe diffusa* causam a ferrugem asiática e oídio, respectivamente, em soja, e são responsáveis por grandes perdas nas áreas sojícolas de muitos países. O objetivo deste trabalho foi estudar a herança de caracteres qualitativos e quantitativos e mapear genes de resistência dessas doenças, utilizando populações de plantas  $F_2$  e  $F_{2:3}$  derivados dos cruzamentos entre os genótipos resistentes à ferrugem asiática PI 200487 e PI 200526 com o genótipo suscetível BRI98-641. Ambos os genótipos apresentaram um gene dominante para a resistência, os quais foram mapeados no mesmo grupo de ligação da soja (GL-N). Adicionalmente, as análises quantitativas demonstraram que o modelo aditivo-dominante foi suficiente para explicar a herança dos dois caracteres, número de urédias e severidade, mostrando que alguns genes adicionais de efeito menores podem contribuir para a resposta da severidade da ferrugem asiática nas duas populações. No entanto, o número de urédias demonstrou ser menos influenciado pelas condições ambientais, indicando que os genes podem estar concentrados apenas nos parentais resistentes, evidenciando o caráter de resistência. A severidade continua sendo importante na seleção, pois demonstra melhor o caráter seletivo e pela facilidade de avaliação. Para oídio da soja o gene de resistência foi mapeado em uma população  $F_{2:3}$ , derivada do cruzamento entre os genótipos BR01-22106 (resistente) e PI 200487 (susceptível). A resistência ao oídio nesta população foi determinada por um único gene dominante e permitiu o mapeamento de um loco red no grupo de ligação C2 da soja. Os marcadores associados ao *Rpp* e *Red* identificados neste trabalho mostraram-se potencialmente úteis na seleção assistida de plantas resistência para o desenvolvimento de cultivares elites carregando estes genes e para manter competitividade e sustentabilidade do agronegócio brasileiro da soja.

Palavras-Chave: *Glycine max*, *Phakopsora pachyrhizi*, *Erysiphe diffusa*, microssatélites, resistência a doença.

## SOYBEAN RESISTANCE TO ASIAN RUST AND POWDERY MILDEW: INHERITANCE OF QUALI-QUANTITATIVE CHARACTERES AND GENETIC MAPPING

**SUMMARY** - The pathogenic fungi *Phakopsora pachyrhizi* and *Erysiphe diffusa* cause the Asian rust and powdery mildew diseases, respectively, in soybean and are responsible for severe yield reduction around the world. The aim of this work was to study the inheritance of qualitative and quantitative resistance characters and to map disease resistance genes in  $F_2$  e  $F_{2:3}$  soybean populations, derived from the crosses between Asian rust resistance genotypes, PI 200487 and PI 200526, with the susceptible genotype BRI98-641. Both genotypes revealed a dominant resistance gene that was mapped in the same soybean linkage group (LG-N). In addition, quantitative analysis demonstrated that the additive-dominant model was sufficient to explain the inheritance of both characters, number of uredinia and severity, showing that some additional genes can contributed to soybean response to Asian rust severity in the two populations. However, the number of uredinia showed to be less influenced by environmental conditions, demonstrating that gene could be concentrated the in PI 200487 and PI 200526 and be evidence for resistance character. The severity remains important in the selection process because showing the best selective character and the available to evaluation. For powdery mildew, the resistance gene was mapped on linkage group C2 in a  $F_{2:3}$  populations derived from the cross between BR01-22106 (resistant) and PI 200487 (susceptible) genotypes. The powdery mildew resistance was determined by one dominant gene, mapped on linkage group C2 of soybean. The associate markers to *Rpp* and Red genes will be very useful to assist the selection of resistant plants on the development of elite cultivars carrying these genes and keep the competitiveness and sustainability of soybean Brazilian agribusiness.

**Keywords:** *Glycine max*, *Phakopsora pachyrhizi*, *Erysiphe diffusa*, microsatellites, disease resistance.

## CAPITULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

### 1 INTRODUÇÃO

A cultura da soja vem se expandindo progressivamente, tornando-a de grande importância econômica no mundo. Atualmente, são produzidas, por ano, cerca de 236 milhões de toneladas deste grão. Nesse contexto, o Brasil aparece como o segundo maior produtor, com uma produção de 60,2 milhões de toneladas na safra 2007/08, aproximadamente 25% de toda a produção mundial. De modo geral, estresses bióticos e abióticos limitam a distribuição geográfica das culturas e acarretam reduções significativas no crescimento e na produtividade de espécies economicamente importantes (CONAB, 2009).

Algumas doenças fúngicas têm recebido grande atenção devido aos prejuízos que têm causado à produção de soja. Dentre elas, a ferrugem asiática é atualmente a principal doença que acomete a produção de soja no Brasil e uma das mais importantes do mundo. Outra doença, o oídio da soja, também tem apresentado severa incidência em diversas cultivares em praticamente todas as regiões sojícolas, desde os Cerrados até o Rio Grande do Sul (SARTORATO & YORINORI, 2001).

A primeira doença denominada como ferrugem asiática da soja (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow & Sydow), é descrita na literatura apresentando cinco genes resistentes dominantes, classificados como *Rpp1* a *Rpp5* (CHENG & CHAN, 1968; HIDAYAT & SOMAATMADJA, 1977; BROMFIELD & HARTWIG, 1980; HARTWIG, 1986; GARCIA et al., 2008), sendo que os genes *Rpp1* e *Rpp3* não são mais efetivos no Brasil devido à alta virulência do patógeno, e os outros genes que permanecem efetivos já foram mapeados através de marcadores moleculares nos grupos de ligação J, G, N e C2 da soja (SILVA et al., 2008; GARCIA et al., 2008; HYTEN et al., 2009). Além destes genes, existem genótipos que possuem genes de resistência a ferrugem como, Hyuuga e a PI 200492,

nos quais ainda não se determinou a relação com os genes *Rpp*, porém localizados nos grupos de ligação C2 e G (HYTEN, 2006; MONTEROS et al., 2007)

Outra doença que acomete os níveis de produção da soja em várias regiões brasileiras é o oídio da soja [*Erysiphe diffusa* (Cooke & Peck) BRAUN & TAKAMATSU, 2000], que a partir da safra 1996/1997 teve uma maior importância decorrente a diversos surtos epidêmicos relatados. Estudos de herança identificaram a presença de um único gene dominante controlando a resistência ao oídio (GONÇALVES et al., 2002; UNÊDA-TREVISOLI et al., 2002; ARIAS et al., 2004). No entanto, muitos dos genótipos de soja ainda não foram mapeados, abrindo a possibilidade de se identificar um novo gene de resistência ao oídio da soja como ocorreu nos estudos que identificaram o gene de resistência ao oídio (*Rmd*) mapeado no grupo de ligação J (POLZIN et al., 1994).

O desenvolvimento de genótipos de soja resistentes às principais doenças é uma necessidade para a agricultura do país. O alto custo de um programa de melhoramento genético, principalmente, devido às avaliações extensivas dos genótipos, indica a necessidade da criação de estratégias para aumentar sua eficiência. Mecanismos de seleção que possibilitem identificar genótipos promissores, logo no início da fase de avanço de gerações, após os cruzamentos, são de grande interesse, por exemplo, a identificação de marcadores moleculares ligados a genes que conferem resistência a patógenos. A utilização de marcadores moleculares pode, ainda, permitir a localização genômica dos locos de resistência, o que cria a possibilidade de clonagem dos mesmos através de estratégias de clonagem posicional, facilitando assim a piramidação de genes em cultivares elites, além de facilitar o entendimento de mecanismos moleculares e evolução de resistência a doenças permitindo a seleção de marcadores moleculares em programas de melhoramento.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Soja

A soja é uma planta da família Fabaceae gênero *Glycine*. A espécie cultivada no Brasil é a *Glycine max* (L.) Merrill. Antes de existirem registros escritos sobre a sua utilização, sabe-se que a soja era um grão fundamental para a alimentação na Ásia, especialmente na China, Japão e Coréia. A produção e consumo de soja não teve grande expressão fora da Ásia até 1900, mas desde então o seu consumo na Europa, América e África aumentou exponencialmente e esta cultura assumiu significativa importância tanto na alimentação humana como animal. Atualmente, os países com maior produção do grão são os Estados Unidos, o Brasil e a Argentina.

A produção mundial corresponde a 236,08 milhões de toneladas, com uma área plantada de 93,9 milhões de hectares. Este complexo agroindustrial da soja movimenta aproximadamente US\$ 215 bilhões/ano (USDA, 2008). A sojicultura brasileira apresenta números expressivos que traduzem a grande importância econômica e social que a atividade gera para a economia do país. O Brasil consolida-se como o segundo maior produtor mundial, com área plantada de 21,25 milhões de hectares, 0,3% menor que a da safra 2007/2008, estima-se uma redução de produção na ordem de 3,8% (2,3 milhões de toneladas) em relação à safra anterior. Tal fato se deve às estiagens ocorridas na Região Sul, sobretudo no Paraná e Rio Grande do Sul, e na Região Centro Oeste, principalmente no Mato Grosso do Sul, que contribuíram para a redução da produtividade média do país, afetando, sobremaneira, a produção nacional estimada em 57,76 milhões de toneladas (CONAB, 2009).

O Brasil é o maior exportador do mundo em grãos de soja, tendo também participações no farelo e no óleo de soja. O quadro de oferta e demanda mostra que o país exporta em média 40% do que produz, demonstrando a dependência do comércio exterior. Isto o torna vulnerável às incertezas da economia mundial. Ainda assim, as expectativas são de estabilidade nas cotações ao longo do ano de 2009, principalmente

porque, ao contrário do milho, basicamente não há outra *commodity* que concorra com a soja no que se refere ao teor protéico a ser usado no arraçoamento (CONAB, 2009).

Nosso país é o único entre os maiores produtores mundiais de soja que tem capacidade de expandir sua área plantada e, conseqüentemente, aumentar sua produção podendo, desta forma, alcançar o primeiro lugar como produtor mundial.

O complexo soja é formado por soja em grãos, óleo de soja bruto, óleo de soja refinado, farelo de soja e demais óleos e derivados do óleo. Com uma cadeia produtiva organizada e eficiente distribuída por todo o país, a soja deve ser uma das principais opções de matéria-prima na produção de biodiesel. Esta planta fornece alimento para o homem, para os animais domésticos e matérias-primas para a indústria. Avaliando-se o agronegócio sojícola brasileiro, por trás de todo o caminho que percorre a produção do grão até chegar às mãos dos consumidores, há uma cadeia que gera empregos, pesquisa, movimenta economias locais e gera conhecimento global.

## **2.2 Doenças que ocorrem na soja**

A ampliação da sojicultura para novas fronteiras agrícolas com diferentes condições edafo-climáticas tem aumentado as demandas por tecnologias que dêem sustentação ao sistema de produção, como a resistência genética às doenças. Entre os principais fatores que limitam a obtenção de altos rendimentos estão as doenças. Aproximadamente 40 doenças que acometem a cultura da soja causada por fungos, bactérias, nematóides e vírus já foram identificadas no Brasil. Esse número continua aumentando com a expansão da soja para novas áreas e como conseqüência da monocultura. A importância econômica de cada doença varia de ano para ano e de região para região, dependendo das condições climáticas de cada safra. As perdas anuais de produção por doenças são estimadas em cerca de 15% a 20%, entretanto, algumas doenças podem ocasionar perdas de quase 100% se constituindo deste modo uma ameaça à produtividade e competitividade da soja nacional (EMBRAPA, 2008).

## **2.2.1 Ferrugem asiática da soja (*Phakopsora pachyrhizi*)**

### **2.2.1.1 Agente causador**

A soja é infectada por duas espécies de *Phakopsora* que causa a ferrugem: *Phakopsora meibomiae* (Arthur) Arthur, nativa do Continente Americano, ocorrendo desde Porto Rico, no Caribe, até o sul do Paraná, e a ferrugem mais agressiva *Phakopsora pachyrhizi* Sydow & Sydow, presente na maioria dos países asiáticos, na Austrália, na África (Zâmbia, Zimbábue e África do Sul) e ausente nas Américas até a safra 1999/00. A partir de 1992, após comparações com espécimes americana e asiática, a espécie *P. meibomiae* foi considerada pouco agressiva à soja e raramente provocando perdas, ocorrendo em condições de temperaturas amenas e umidade relativa elevada, diferente do fungo *P. pachyrhizi*, que está adaptado a temperaturas que variam de 15°C a mais de 30°C e que pode causar severas perdas na cultura de soja em todas as regiões onde ocorram períodos de molhamento de folha por mais de 10 horas. Atualmente a diferenciação pode ser realizada a partir de amostra de DNA através de estudos moleculares das sequências internas transcritas (*Internal Transcribed Spacer* - ITS) (FREDERICK et al., 2002).

### **2.2.1.2 Histórico da doença**

A ferrugem asiática da soja *P. pachyrhizi*, foi descrita pela primeira vez no Japão em 1902. Em 1914 surgiu em caráter epidêmico em vários países no sudoeste da Ásia e, em 1976, foi descrita em Porto Rico (VAKILI & BROMFIELD, 1976). Em janeiro de 1998 foi constatada em Uganda, Kenia e Ruanda, e em março de 2001 foi detectada na África do Sul, tendo atingido caráter epidêmico em 2002. No continente Sul-americano foi descrito pela primeira vez no Brasil em 1979, no município de Lavras (MG) (DESLANDES, 1979). No entanto, foi motivo de grande preocupação somente a partir da safra 2001/2002, onde no Paraguai causou danos de até 50%, em áreas não protegidas (MOREL PAIVA, 2001). Na safra 2001 também foram verificados focos no Brasil, contudo



as maiores perdas foram verificadas nas safras seguintes. Em 2002 a doença foi verificada na Argentina, na Bolívia em 2003, e no Uruguai, Colômbia e Estados Unidos em 2004. No Brasil, desde sua detecção em 2002, a doença atingiu dispersão em praticamente 100% da área de cultivo, provocando dano estimado em aproximadamente 10%, embora em diversas regiões tenha sido superior a 50%. Desde a primeira detecção, a importância da ferrugem asiática no Brasil tornou-se incontestável devido principalmente às perdas severas que tem causado na cultura da soja.

### **2.2.1.3 Epidemiologia**

Os uredósporos são facilmente disseminados pelo vento, para lavouras próximas ou a longas distâncias, porém, não são transmitidos pela semente. Supõe-se que esporos do fungo tenham atravessado o Oceano Atlântico ou o Oceano Pacífico, vindo dos países do Sul da África (Zimbábue e Zâmbia, desde 1998, ou África do Sul, em 2001), onde a doença tem causado severas perdas, ou da Austrália, onde a ferrugem ocorre há várias décadas (EMBRAPA, 2003).

O processo infeccioso inicia-se quando os uredósporos germinam e produzem um tubo germinativo que cresce através da superfície da folha até formar um apressório. A penetração ocorre diretamente através da epiderme, ao contrário das outras ferrugens que penetram através dos estômatos. As urédias podem se desenvolver de 5 a 10 dias após a infecção e os esporos dos fungos podem ser produzidos por até três semanas.

De modo geral, as ferrugens são parasitas obrigatórios (biotróficos), desenvolvendo estratégias eficientes para explorar células vivas como fontes de alimento. O ciclo de vida de *P. pachyrhizi* inicia-se com os uredósporos, oriundos das urédias, que atingem as folhas de soja, na face superior ou inferior, e germinam se a temperatura for favorável e se houver pelo menos seis horas de molhamento foliar. Dos uredósporos germinados forma-se um tubo germinativo, capaz de penetrar os tecidos foliares. Na infecção por *P. pachyrhizi*, a penetração ocorre diretamente pela epiderme intacta, podendo também ocorrer pelos estômatos (ZAMBOLIN, 2006).

Nas ferrugens em geral, o tubo germinativo forma um apressório, estrutura que facilita a penetração da hifa. No tecido foliar, a hifa de infecção entra em contato com uma célula do mesofilo formando a célula mãe do haustório, que realiza a penetração nas células hospedeiras e a diferenciação do haustório. Esta é uma estrutura altamente ramificada, delimitada pela membrana celular da célula hospedeira, denominada de membrana extra-haustorial, formada pela matriz extra-haustorial e pela parede celular do fungo. O haustório proporciona uma ampla superfície de contato com a célula hospedeira e através dele são adquiridas quantidades massivas de açúcares e aminoácidos por mecanismos de simporte a favor de gradiente de prótons. Propõe-se que a formação desta estrutura dependa de compostos voláteis, como o nonanal, decanal e acetato de hexenil, emitidos pelo hospedeiro (MENDGEN et al., 2006; PANSTRUGA, 2003).

#### **2.2.1.4 Sintomatologia**

Os sintomas da ferrugem podem aparecer em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, como em cotilédones, folhas e hastes, sendo mais característicos nas folhas. Os primeiros sintomas são caracterizados por minúsculos pontos mais escuros do que o tecido sadio da folha, de coloração esverdeada a cinza-esverdeada, com correspondente protuberância (urédia) na face inferior da folha. As urédias aparecem predominantemente na superfície inferior, mas podem, esporadicamente, aparecer na superfície superior das folhas (TECNOLOGIA..., 2008).

Progressivamente, as urédias adquirem cor castanho-clara a castanho-escura, abrem-se em um minúsculo poro, por onde são liberados os uredósporos. Os uredósporos, inicialmente de coloração hialina (cristalina), tornam-se bege e acumulam-se ao redor dos poros ou são carregados pelo vento. À medida que prossegue a esporulação, o tecido da folha ao redor das primeiras urédias adquire coloração castanho-clara (lesão do tipo TAN) a castanho-avermelhada (lesão do tipo *Reddish Brown* - RB), formando as lesões que são facilmente visíveis em ambas as faces da folha. As urédias que deixaram de esporular apresentam as pústulas, nitidamente, com os poros abertos, o

quê permite distinguir da pústula bacteriana, que frequentemente tem sido confundida com a ferrugem.

#### **2.2.1.5 Perdas**

No Brasil, na safra 2001/02, a ferrugem asiática ocasionou perdas de grãos estimadas em 569 mil toneladas, equivalente a US\$125,5 milhões. Na safra seguinte (2002/03), os prejuízos atingiram mais de US\$1,3 bilhões refletindo em um volume de perda de grãos, estimado em 758 milhões de dólares, e o gasto com o controle químico, avaliado em 592 milhões de dólares (YORINORI & LAZZAROTTO, 2004). Na safra 2003/2004, a perda em volume de grãos foi estimada em cerca de 4,6 mil toneladas e a doença foi observada no RS, SP, PR, MT, GO e BA. Além da seca ocorrida no período, a disseminação do patógeno no território brasileiro tem sido apontada como causa da redução de produtividade do grão. Os prejuízos neste período foram avaliados em aproximadamente US\$ 2,286 bilhões, refletindo um volume de perda de grãos de US\$ 1,225 bilhões, um gasto com controle químico de US\$860 milhões e uma redução na arrecadação de impostos para o governo de US\$201 milhões (YORINORI & LAZZAROTTO, 2004).

Na safra 2006/2007 as perdas foram ainda maiores. De acordo com o levantamento da Embrapa, o prejuízo causado pela ferrugem nesta safra foi de US\$ 2,19 bilhões só em perdas de grãos. Estima-se que os prejuízos pela redução da produção do grão causado pelo fungo da ferrugem asiática, na safra brasileira de 2007/2008, foram de 418,5 mil toneladas, representando 1% da produção nacional, e exibindo financeiramente um prejuízo de US\$204,5 milhões, que somado ao gasto para o controle da doença, resultou em um custo total de US\$1,97 bilhão. As perdas mais amenas da última safra, bastante favoráveis aos produtores, resultaram de práticas de manejo adotadas durante a mesma, como o “vazio sanitário” (período sem plantas de soja vivas no campo), de 60 a 90 dias, com o objetivo de reduzir a quantidade de inóculo da ferrugem nos cultivos da

safrinha, além da condição climática desfavorável à manutenção e multiplicação do fungo na entressafra de 2007 (EMBRAPA, 2008).

#### **2.2.1.6 Controle da doença**

A evolução desta doença na América do Sul provocou um esforço coletivo de diversas instituições com o objetivo de produzir uma das mais significativas alterações nos diversos conceitos relacionados ao manejo e controle de doenças foliares em cultivos anuais de grande escala. Produto deste esforço, diversos posicionamentos foram ajustados a uma realidade em que a grande escala é uma plena realidade e cujas respostas necessitaram ser adequadas tanto do ponto de vista operacional como logístico. Um enfoque multidisciplinar tem sido empregado ao manejo desta doença já que estudos sobre o manejo de nutrientes e genético vêm evidenciando através de resultados obtidos com um controle químico da ferrugem da soja.

A utilização de cultivares resistentes seria o método mais viável de controle. No entanto, até o momento, não estão disponíveis cultivares com resistência completa ao patógeno. Contudo, uma grande variação é observada entre cultivares no período de latência e na taxa de progresso da doença, parâmetros da resistência parcial. Esta característica, intrínseca a cada cultivar, pode ser aliada ao melhor gerenciamento do controle químico.

O fator de maior relevância para o controle químico é o momento da aplicação. Aplicações realizadas de forma preventiva têm propiciado maior eficiência de controle, além do período residual dos fungicidas ser preservado. As aplicações realizadas de forma curativa além de comprometer a eficácia de controle do fungicida, são realizadas após a planta já ter sofrido o estresse metabólico, devido à interação patógeno-hospedeiro, no sentido de impedir o progresso da doença. De qualquer maneira, problemas gerenciais têm se caracterizado pelo maior entrave à adoção das estratégias corretas de controle.

### 2.2.1.7 Genótipos resistentes

No patossistema soja-ferrugem asiática há relatos da existência de cinco genes dominantes controlando a resistência, denominados de *Rpp1*, *Rpp2*, *Rpp3*, *Rpp4* e *Rpp5*, identificados em introduções de plantas (CHENG & CHAN, 1968; HIDAYAT & SOMAATMADJA, 1977; BROMFIELD & HARTWIG, 1980; HARTWIG, 1986; GARCIA et al., 2008). No entanto, a estabilidade dessa resistência é preocupante, devido ao patógeno apresentar alta diversidade genética, dificultando o desenvolvimento de cultivares que sejam efetivas por longo período (HARTMAN et al., 1994). Vinte raças de ferrugem asiática foram identificadas em amostras coletadas em plantas de soja e hospedeiros selvagens no Japão (YAMAOKA et al., 2002), nove raças em 42 isolados em Taiwan e 59 raças em 69 isolados na Tailândia. No Brasil, embora não haja comprovação científica, devido à inexistência de trabalhos com hospedeiros diferenciadores de raças até o momento, admite-se que haja também inúmeras raças fisiológicas do patógeno em campos de soja. A resistência mediada pelos genes dominantes *Rpp* é monogênica e raça-específica, frequentemente explicada pela teoria gene-a-gene.

A resistência parcial ou a resistência que reduz a taxa de infecção foi também relatada para a ferrugem onde linhagens com resistência parcial em avaliações de campo foram classificadas como moderadamente resistentes, uma vez que poucas lesões se desenvolveram durante o ciclo da cultura. De acordo com HARTMAN et al. (1994), a identificação e a utilização da resistência parcial, em programas de melhoramento de soja, têm sido limitadas. Os métodos de avaliação consomem tempo e dificultam a incorporação em programas de melhoramento.

Dois tipos de resistência, a horizontal e a vertical, são observados entre os genótipos de soja (BROMFIELD & HARTWIG, 1980). A vertical é a mais utilizada devido à facilidade de ser trabalhada, mas tem sido quebrada com facilidade, indicando a presença de raças do fungo, como aconteceu com a resistência conferida pelos genes *Rpp1* e *Rpp3* que foi quebrada pela nova raça. Por isso, a obtenção de cultivares de soja resistente à ferrugem asiática é um grande desafio para a pesquisa.

Já a resistência horizontal envolve a redução na taxa de desenvolvimento da doença, sendo mais efetiva contra um número maior de raças do patógeno. Entretanto, a quantificação deste tipo de resistência é mais difícil, limitando sua utilização (TSCHANZ & WANG, 1985). Devido às limitações no emprego de estratégias para obtenção de genótipos apresentando ambos os tipos de resistência, outros métodos têm sido utilizados, com o objetivo de evitar reduções de produtividade devido à ocorrência da doença, dentre eles o estudo de tolerância de cultivares.

O mapeamento utilizando marcadores moleculares possibilitou até o presente momento a identificação e localização de genes de resistência à ferrugem. Um primeiro estudo foi realizado na cultivar FT2, onde foi mapeado o gene de resistência *RppFT2* no grupo de ligação C2 (BROGIN, 2005). No mesmo grupo de ligação, no genótipo japonês Hyuuga, este gene foi posicionado entre os marcadores Satt460 e Satt307 a 0,8cM e 2,4cM, respectivamente (MONTEROS et al., 2007). O gene da cultivar FT2 não está mais ativo no Brasil devido à alta diversidade e virulência do patógeno que teve sua resistência quebrada, permanecendo ativo somente o gene presente no genótipo Hyuuga. HYTEN (2006) relata que no grupo de ligação C2 da soja, na mesma posição onde está localizado o marcador Satt460, encontra-se posicionado o gene de resistência à ferrugem *Rpp3*, mapeados nos genótipos PI462312 e PI578457. O locus *Rpp1* mapeado no grupo de ligação G confere resposta imune ao isolado de ferrugem Índia-73-1, este locus *Rpp1* foi mapeado entre os marcadores Sct\_187 e Sat\_164, à uma distância de 0,4 cM de ambos os marcadores (HYTEN et al., 2007). SILVA et al. (2008) mapearam os genes *Rpp2* e *Rpp4* em regiões consideradas *hot spots* para genes de resistência. O locus *Rpp2* foi mapeado por volta de 25 cM de um cluster para genes de resistência no grupo de ligação J da soja. O locus *Rpp4* foi mapeado no grupo de ligação G. Locus de característica quantitativa (QTLs) para genes de resistência a várias doenças também tem sido reportados nessa região.

## **2.2.2 Oídio da soja (*Erysiphe diffusa* sin. *Microsphaera diffusa*)**

### **2.2.2.1 Agente causador**

Os oídios constituem um dos mais importantes e bem estudados grupos de fungos parasitas de plantas. O termo “oídios” tem sido usado para designar a doença como também a classe de fungos ascomicetos, pertencentes à ordem *Erysiphales*, família *Erysiphaceae*. Eles são facilmente reconhecidos por formarem colônias esbranquiçadas de aspecto pulverulento sobre as superfícies de partes aéreas de plantas vivas. Além de sua simplicidade, a expressão “oídios” detém a vantagem de descrever diretamente a forma dos esporos imperfeitos dessa doença (STADNIK & RIVERA, 2001). O oídio da soja tem sido causado pela fase anamorfa *Pseudoidium*, que é caracterizada por conidióforos produzindo apenas conídios e apressórios.

### **2.2.2.2 Morfologia**

As características de todas as estruturas dos oídios podem ser de grande valor taxonômico. Para os fungos de características anamórfica, o micélio primário é hialino e com paredes finas. As paredes das hifas, conídios e estruturas peridiais são estruturas muito uniformes (BRAUN, 1995). Os apressórios são estruturas protuberantes laterais das hifas, responsáveis pela fixação do micélio à superfície foliar e iniciação do haustório. Eles também ocorrem no final dos tubos germinativos de conídios. Os haustórios são formados dentro de células epidérmicas ou, raramente, em células de camadas mais profundas. Os haustórios aparecem como estruturas globosas a periformes.

A resistência do hospedeiro a oídios pode ser vista como a capacidade de planta evitar ou atrasar a penetração e/ou o subsequente desenvolvimento do fungo. Resumidamente as plantas podem reagir ao ataque fúngico pela formação de papilas, reações de hipersensibilidade, síntese de compostos antimicrobianos e/ou alterações metabólicas em seus tecidos. Porém, independentemente da resposta ao ataque, o

metabolismo dos vegetais infectados é afetado sensivelmente como consequência da interação entre o patógeno e o seu hospedeiro (STADNIK & MAZZAFERA, 2001).

### **2.2.2.3 Histórico**

O oídio da soja, causado pelo fungo ascomiceto (*E. diffusa*), é uma das doenças mais antigas dessa leguminosa, provocando perdas de até 40% no rendimento.

O oídio foi observado primeiramente na Alemanha em 1921 (WAHL, 1921). Na América seu primeiro relato foi em 1931, nos Estados Unidos (LEHMAN, 1931). Desde então a doença tem sido relatada em diversos países da América do Norte e Sul, como, Brasil, Canadá, Peru, Porto Rico, Venezuela, Bolívia, Paraguai e Argentina (PLOPER et al, 1999), Ásia (República Popular da China) e África (África do Sul).

O oídio foi inicialmente identificado em plantas de soja em casa de vegetação e a campo, em final de ciclo de cultivares tardias, sem causar danos significativos. Somente após vários anos é que a doença passou a causar redução de rendimentos. No Brasil, até a safra de 1995/96, o oídio era considerado uma doença secundária na economia agrícola. Era observada principalmente em casas de vegetação e a campo, em cultivares tardias, ao final da safra (abril-maio) na Região Sul, e nas regiões altas dos Cerrados, em altitudes acima de 800m e em cultivos de invernos sob irrigação com pivô central. Na safra de 1996/97, favorecida por um clima chuvoso e temperaturas amenas, uma epidemia de oídio atingiu as cultivares suscetíveis, envolvendo todas as áreas de produção de soja. Após essa epidemia, houve uma alteração do clima nas safras subsequentes com predominância de estiagem e altas temperaturas, restringindo as áreas mais afetadas às regiões Sul e dos Cerrados (SARTORATO & YORINORI, 2001).

### **2.2.2.4 Epidemiologia**

Um estudo detalhado do processo de germinação, de infecção e de reprodução de *E. diffusa* foi realizado por MIGNUCCI & CHAMBERLAIN (1978), utilizando a cultivar de



soja Harasoy. A germinação ocorreu sobre a folha após 3 horas de inoculação. Com oito horas o apêndice de infecção penetra nas células epidérmicas. O fungo penetra nas cutículas e forma os haustórios nas células epidermais, não infectando as células do mesofilo e não penetrando na câmara estomática. As colônias se formam à medida que as hifas se estendem e se ramificam. A formação de conídios inicia-se 108 horas após a inoculação. Com 144 horas da inoculação, a célula na extremidade do conidióforo apresenta um conídio bem definido com três a cinco células por conidióforo. O rápido crescimento do fungo resulta na distribuição de colônias e no surgimento de novas colônias, mas não causa sintoma visível. O aumento da infecção inibe significativamente a fotossíntese e, ao contrário de outros patógenos, a *E. diffusa* inibe substancialmente a transpiração.

Estudos sobre o efeito da temperatura no desenvolvimento do oídio mostraram que quanto mais baixa a temperatura, mais rápido e severo foi o desenvolvimento do fungo. A temperatura mais favorável é de 18°C, sob a qual, as reações de resistência e suscetibilidade entre as cultivares podem ser distinguidas (MIGNUCCI et al., 1977). Para a ocorrência de oídio, as condições mais favoráveis são a baixa umidade do ar (clima seco) e temperaturas amenas (18-22°C) (REIS, 2004). BALARDIN (2002) afirma que temperaturas superiores a 30°C inibem o desenvolvimento da doença. O molhamento foliar é um fator inibidor no estabelecimento do oídio. Esta é uma das razões pelas quais a doença apresenta uma severidade elevada durante os estádios vegetativos. Precipitação intensa e frequente pode se constituir em um fator inibidor ao desenvolvimento do oídio.

#### **2.2.2.5 Sintomas e desenvolvimento da doença**

Patógenos causadores de oídios são parasitas biotróficos obrigatórios de plantas, que para obtenção de nutrientes formam haustórios no interior das células do hospedeiro, sem, no entanto, matá-las. O fungo *E. diffusa* desenvolve-se em baixa umidade relativa do ar e em temperaturas amenas e seus sintomas são observados em toda parte aérea

da soja, incluindo folhas, hastes, pecíolos e vagens (YORINORI, 1986; SINCLAIR & HARTMAN, 1999; HUCKELHOVEN, 2005). Os sintomas apresentados pelo oídio podem variar de clorose, ilhas verdes, manchas ferruginosas, desfolha acentuada ou a combinação desses sintomas, dependendo da reação das cultivares. Manchas cloróticas e necrose nas nervuras indicam reação de hipersensibilidade (SINCLAIR & HARTMAN, 1999). Todavia, o sintoma mais evidente é a própria estrutura (sinal) branca e pulverulenta do fungo sobre as superfícies das partes infectadas. O fungo pode se desenvolver abundantemente sobre as partes infectadas sem apresentar sintomas visíveis. Com o passar dos dias, a coloração branca do fungo muda para castanho-acinzentado, dando aparência de uma cobertura de sujeira nas duas faces da folha. Embora raramente causem a morte da planta, eles exaurem as suas reservas nutricionais que poderiam ser utilizadas para fins produtivos, reduzindo a atividade fotossintética em até 50%, e perdas de rendimento de até 35% (DUNVLEAVY et al., 1978; MIGNUCCI & BOYER, 1979, PHILLIPS, 1984)

Tanto o patógeno, como o desenvolvimento dos sintomas parece ser afetado pela cultivar, idade e posição da folha e idade da planta no momento da inoculação. Em geral, as folhas inferiores de plantas mais jovens são mais suscetíveis do que folhas superiores (MIGNUCCI & LIM, 1980).

#### **2.2.2.6 Perdas**

Nos níveis de produção da soja, em várias regiões brasileiras, o oídio da soja a partir da safra 1996/1997, teve maior importância decorrente aos diversos surtos epidêmicos relatados desde a região Sul até as regiões Sudeste e Centro Oeste do Brasil, causando perdas de produção de até 25% (REIS et al., 1997; EMBRAPA, 2003), principalmente no Sul e nas chapadas altas dos Cerrados. A falta de resistência na maioria das cultivares e quebra da resistência nas cultivares que a apresentavam têm exigido um grande controle químico nessas regiões. O mesmo ocorre na Bolívia, onde a soja é cultivada no inverno (STADINIK & RIVERA, 2001)

### **2.2.2.7 Controle da doença**

O método mais eficiente de controle do oídio é através do uso de cultivares resistentes. Devem utilizar cultivares que sejam classificadas como resistentes a moderadamente resistentes ao fungo. Outra forma de evitar perdas do oídio é não semear cultivares suscetíveis nas épocas mais favoráveis à ocorrência da doença, tais como semeaduras tardias ou safrinha e cultivo sob irrigação no inverno. O controle químico, através da aplicação de fungicidas foliares, pode ser utilizado. Os fungicidas se constituem em uma medida adicional de controle de doenças foliares, principalmente quando ocorrem condições climáticas favoráveis, e quando as cultivares que possuem resistência genética não é recomendado para a região de cultivo ou não estão disponíveis para o plantio (EMBRAPA, 2008).

Nos Estados Unidos, além da ocorrência esporádica (GRAU, 1985), o oídio deixou de ser uma doença de importância econômica devido ao uso de cultivares resistentes e, portanto, não há recomendação de fungicidas (SINCLAIR & HARTMAN, 1999). No entanto, em países como Argentina, Brasil, Paraguai e Bolívia (cultivo de inverno), o uso de fungicidas ainda se faz necessário (SARTORATO & YORINORI, 2001).

### **2.2.2.8 Genótipos resistentes**

Cultivares resistentes tem tido a resistência quebrada devido aos processos de seleção de variantes presentes na população do patógeno, incapazes de serem reconhecidos pelo produto do gene R, indicando o aumento da variabilidade do patógeno, porém faltam estudos que confirmem a existência de raças fisiológicas. Estudos moleculares das sequências internas transcritas (ITS) do rDNA vem sendo utilizadas para identificar quais espécies de oídio estão presentes na soja (TAKAMATSU, et al., 2002; ALMEIDA et al., 2008). As observações sobre a variabilidade patogênica de *E. diffusa* tem sido circunstanciais e baseadas em variações das reações das cultivares em diferentes anos ou regiões produtoras de soja.

Estudos sobre herança da resistência em soja ao oídio demonstram que dois genes são responsáveis pela resistência. Um gene dominante, denominado *Rmd-c*, mantém a planta resistente durante todo o ciclo da soja (LOHNES & BERNARD, 1992). Outro gene, também dominante e denominado de *Rmd*, é responsável por conferir resistência de planta adulta (MIGNUCCI & LIM, 1980). Neste caso, as plantas apresentam suscetibilidade na fase inicial de desenvolvimento, porém, adquirem resistência à medida que vão atingindo a fase adulta. Sob condições menos favoráveis ao oídio da soja as plantas com o gene *Rmd* apresentam pouco ou nenhum oídio no campo. Aparentemente, a variabilidade patogênica do fungo tem superado a resistência de algumas cultivares, exigindo contínuo trabalho de melhoramento genético e estudos da diversidade de genes resistentes nos germoplasmas disponíveis.

A presença de genes maiores na herança de resistência ao oídio também é relatada por MIGNUCCI & LIM (1980). A resistência completa é controlada por um gene dominante *Rmd-c*, alélico ao gene que conferem resistência a planta adulta (*Rmd*). O gene *Rmd-c* é originário da cultivar CSN e está associado com o gene *Rps2* que confere resistência à podridão radicular de *Phytophthora* (*Phytophthora megasperma* var. *sojae*) (LOHNES & BERNARD 1992). No Brasil, estudos de herança também vêm sendo realizados e indicando a presença de um único gene controlando a resistência ao oídio da soja (GONÇALVES et al., 2002; UNÊDA-TREVISOLI et al., 2002; ARIAS et al., 2004).

O gene de resistência *Rmd*, presente na cultivar Minsoy, está ligado ao gene E3 que confere a característica de retardamento de floração quando o comprimento natural do dia é prolongado por 20 horas com uso de luz fluorescente (BUZZELL & PALMER, 1989). O gene *Rmd*, por sua vez está ligado ao gene *Rj2* que confere a característica de não-nodulação com certas estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* e ao gene *Rps2*, que confere resistência à podridão de *Phytophthora*. A ordem desses genes no mapa genético da soja é *Rj2RmdRps2* (LOHNES et al., 1993). Essa sequência foi confirmada com mapeamento no grupo de ligação J da soja, identificando assim genes ligados a resistência (*Resistance-Like Gene* - RLGs) e correlacionada com o mapa genético da soja obtido pelo USDA-ARS (POLZIN et al., 1994, GRAHM et al., 2002). Existe indicação de

que o mesmo gene *Rmd* está ligado com o locus para resistência à podridão parda da haste da soja (*Phialophora gregata*), sendo, portanto, recomendado que esses genes sejam utilizados como marcadores em programas de melhoramento de soja para resistência a essas doenças (LOHNES & NICKELL, 1994).

### **2.3 Mecanismos de agressão e defesa nas interações planta-patógeno**

A presença dos patógenos nos tecidos das plantas implica no contato entre eles e células vegetais vivas, contendo ou capazes de produzir substâncias tóxicas, sinalizadoras em respostas à atividade agressora. Assim sendo, para uma eficiente ação parasítica e também patogênica, pressupõe-se o sucesso da infecção da planta hospedeira, com a retirada de nutrientes para atender as necessidades metabólicas do parasita, à custa da neutralização dos mecanismos bioquímicos de defesa, presentes no tecido vegetal ou desencadeados em resposta a infecção (MISAGHI, 1983).

Alguns organismos dispõem de força mecânica para penetrar diretamente na cutícula e na parede das células da epiderme. Assim ocorre, por exemplo, em conídios de *Erysiphe*, *Colletotrichum*, *Alternaria* e com basidiósporos de fungos causadores de ferrugem, como as espécies de *Phakopsora*, *Puccinia* e outras, que germinam, fixam na superfície de suas hospedeiras por meio de apressório, a partir do qual cresce uma hifa fina e despontada, o tubo de penetração, que termina por perfurar a cutícula e adentrar a epiderme, podendo atingir o mesófilo (DEAN, 1997).

Muitas das enzimas produzidas por fitopatógenos têm como substratos os componentes da parede celular vegetal, e outras, os constituintes de seu protoplasma. A parede celular é uma importante barreira física a ser ultrapassada para que o fungo possa penetrar e ocorrer e colonizar a planta hospedeira. Portanto, a degradação ou a alteração do tecido vegetal poderá depender da atuação de enzimas sobre as principais camadas e componentes da parede celular, onde predominam várias substâncias complexas como cutina nas células epidérmicas de folhas e caules verdes, celulose e hemiceluloses, substâncias pécticas, lignina e proteínas. Em conjunto, as enzimas produzidas por

patógenos e envolvidas na degradação da parede celular são denominadas enzimas degradadoras de parede (MEDEIROS et al., 2003).

Na natureza, a resistência de plantas a doenças é uma regra ao passo que, a suscetibilidade é exceção (PASCHOLATTI & LEITE, 1995). Basta observar a infinidade de microrganismos aos quais as plantas estão expostas diariamente, para se comprovar que, apenas uma pequena parte destes é capaz de provocar doenças nas plantas. Esta defesa é garantida por mecanismos pré-formados, como a espessura da cutícula, o número e disposição de estômatos e de tricomas e ainda de mecanismos de respostas pós-formadas, como substâncias fungitóxicas e antiproteícas, atuantes nestes vegetais (PASCHOLATTI & LEITE 1995).

Fatores que afetam a pré-penetração do fungo podem servir como mecanismos de defesa para a planta. Cada fator resulta na redução da taxa de germinação, na formação incorreta do tubo germinativo na superfície da folha, impedindo o reconhecimento do estômato, ou na menor frequência na formação do apressório.

A variação na resistência ao patógeno muitas vezes é controlada pela segregação de genes de resistência (*Resistance* - R) e de seus produtos gênicos, que direta ou indiretamente interagem com “elicitores específicos” produzidos pelos patógenos e codificados por genes de avirulência (*avr*) (HAMMOND-KOSACK & JONES, 1997).

Estruturas constitutivas de diferentes órgãos da planta têm funções de defesa, pois, são portadores de estabilidade química e propriedades físicas capazes de evitar adesão e penetração de microrganismos. Por outro lado, certas estruturas podem ser formadas em resposta à agressão patogênica.

De modo geral, os mecanismos estruturais de defesa podem ser pré-formados (presente de modo constitutivo) ou induzidos (formados após o contato com o patógeno) pelo agente agressor. Está bem estabelecido que uma variedade de produtos fúngicos induza respostas elicitores defensivas em ambas as plantas hospedeiras e não-hospedeiras, e que, algumas respostas também podem ser acionadas por produtos vegetais liberados durante a degradação da parede celular.

## 2.4 Marcadores moleculares

O desenvolvimento de marcadores moleculares de DNA proporcionou um grande impulso para a determinação da variabilidade genética dentro e entre espécies de um mesmo gênero, para a determinação da conservação e ordem de genes em espécies de gêneros diferentes (sintenia) e em estudos genômicos mais elaborados identificando genes específicos.

A primeira técnica de visualização de fragmentos de DNA foi descrita por SOUTHERN (1975), derivando a técnica conhecida por Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*; BOTSTEIN et al., 1980). Mais tarde, surge uma nova técnica denominada Minissatélites ou locos de Sequências Adjacentes que se Repetem em Número Variável (VNTR - *Variable Number of Tandem Repeats*; JEFFREY et al., 1985).

Com o surgimento da técnica de Reação de Polimerase em Cadeia (*Polymerase Chain Reaction* - PCR; MULLIS & FALOONA, 1987), aliou-se o poder da informação gerada por marcadores moleculares à rapidez da técnica baseada em ciclos contínuos de desnaturação e amplificação das fitas de DNA mediados pela enzima DNA polimerase em pontos específicos do genoma, determinados pelo anelamento de primers (seqüência de nucleotídeos de tamanho pequeno, variando geralmente entre 20 a 30 bases) específicos de seqüências complementares a este ponto. Várias outras técnicas utilizam o princípio da técnica de PCR, tais como os marcadores do tipo: Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso (*Random Amplified Polymorphic DNA* – RAPD; WILLIAMS et al., 1990), Regiões Amplificadas Caracterizadas por Sequências (*Sequence Characterized Amplified Regions* - SCAR; PARAN & MICHELMORE, 1993), Microsatélites ou Sequência Simples Repetidas (*Simple Sequence Repeats* - SSR; LITT & LUTTY, 1989), Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados (*Amplified Fragment Length Polymorphism* - AFLP; VOS et al., 1995) e os Polimorfismos de Base Única (*Single Nucleotide Polymorphisms* - SNPs; COLLINS et al., 1998).

Os microssatélites são regiões no genoma eucarioto que possuem repetições em tandem de mono-, tri-, tetra-, penta ou até mesmo hexanucleotídeos, que se repetem de 10 a 60 vezes ou mais raramente até milhares de vezes. As sequências de DNA que flanqueiam os microssatélites são geralmente conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie, permitindo a confecção de primers específicos que as amplificam, via PCR (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Os genomas cloroplástico e mitocondrial também possuem microssatélites, mas em geral, trata-se de repetições mononucleotídicas (POWELL et al., 1996; FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Os primeiros marcadores microssatélites foram desenvolvidos em humanos e, mais recentemente, têm recebido grande atenção dos melhoristas e geneticistas de plantas. Vários estudos têm demonstrado que os microssatélites são amplamente distribuídos no genoma das plantas superiores (POWELL et al. 1996). No genoma vegetal, é encontrado um microssatélite a cada 6-7 kb (CARDLE et al., 2000).

Em plantas, esses marcadores já foram descritos em milho, soja, arroz, trigo, cevada e em feijão. No melhoramento vegetal, a utilidade dos microssatélites resulta de fatores importantes, tais como, o alto grau de informação contido em cada alelo, distribuição por todo genoma, codominantes e sua fácil genotipagem via PCR (POWELL et al., 1996). Quando os microssatélites são individualmente amplificados, usando um par de primers complementares às sequências únicas que os flanqueiam, eles quase que invariavelmente mostram extensivo polimorfismo para tamanho de bandas. A variação do tamanho dos produtos de PCR é consequência da ocorrência de diferentes números de unidades repetitivas dentro da estrutura do microssatélite. Esta variabilidade dos microssatélites pode ser originada de permuta desigual ou erro da DNA polimerase durante o processo de replicação, conhecida como pareamento desigual que ocorre devido a um fenômeno chamado de deslizamento ou *slippage* (CHARLESWORTH et al., 1994; TÓTH, et al., 2000).

Dessa maneira, cada microssatélite, independentemente do elemento repetitivo, constitui um loco genético altamente variável, multialélico e de grande conteúdo informativo. Assim, a variação no comprimento do produto gerado pela PCR é em função



do número de unidades de microssatélites. Cada segmento amplificado de tamanho diferente representa um alelo do mesmo loco. Dessa forma, os polimorfismos surgem quando há número diferente de repetições de um dado motivo. Tendo em vista as vantagens apresentadas pelos microssatélites, eles têm sido usados como marcadores genéticos por sua grande distribuição no genoma eucarioto e pelo seu alto polimorfismo, apresentam ainda a vantagem de serem codominantes. Têm sido utilizados em estudos evolutivos, para *fingerprinting*, teste de paternidade, mapas de ligação, e em estudos de genética de populações (PRIMMER et al., 1997).

Os SNPs representam uma fonte abundante de variação genética. Esses polimorfismos são gerados por substituição de uma única base ou pequenos eventos de inserção e deleção, ocorrendo em uma taxa muito baixa, de aproximadamente 10<sup>-7</sup> alterações por sítios por geração ou menos. A grande vantagem dos SNPs em comparação aos outros marcadores moleculares reside na abundância de polimorfismos entre alelos de determinado gene.

## **2.5 Mapas genéticos**

A partir da década de 80, com o advento dos marcadores de DNA, o mapeamento genético tornou-se, efetivamente, ilimitado a todas as espécies vegetais (BOSTEIN et al., 1980). Mapas genéticos que levaram décadas para serem desenvolvidos em virtude da restrita disponibilidade de marcadores morfológicos e isoenzimáticos foram amplamente saturados com o uso de marcas moleculares. Assim ocorreu em milho (HELENTJARIS et al., 1986), em arroz (MCCOUCH et al., 1988), em trigo (CHAO et al., 1989), em batata (GEBHARDT et al., 1989), em soja (CREGAN et al., 1999; SONG et al., 2004); e em tomate (TANKSLEY et al., 1992). Várias espécies para as quais os estudos de herança eram restritos, e tampouco havia sido descrita ligação gênica entre qualquer tipo de marcador, tiveram mapas genéticos rapidamente desenvolvidos, como o eucalipto (GRATTAPAGLIA & SEDEROFF, 1994), o kiwi (TESTOLIN et al., 2001) e o maracujá (CARNEIRO & VIEIRA, 2002).

O primeiro conceito de um mapa genético foi apresentado por Alfred H. STURTEVANT (1913), que ordenou cinco caracteres ligados ao sexo no cromossomo Y da *Drosophila melanogaster*. Este fenômeno foi interpretado como ligação gênica, que é a base do mapeamento genético (MORGAN et al., 1915).

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 agrônômico, até mesmo para aquelas de longo ciclo de vida, como as florestais e as frutíferas. A construção de mapas de ligação tem como base a análise de segregação de centenas de marcadores e, por isso, é computadorizada. Programas como "Mapmaker" (LANDER et al., 1987), "Linkage 1" (SUITER et al., 1983), "Gmendel" (LIU & KNAPP, 1992), "GQMol" (CRUZ & SCHUSTER, 2006) foram desenvolvidos e estão disponíveis na internet, para auxiliar na análise genética dos dados visando à construção de mapas genéticos.

Cada vez mais, mapas genéticos de ligação vêm sendo utilizados em várias espécies, principalmente após o desenvolvimento de diferentes classes de marcadores moleculares (CARNEIRO & VIEIRA, 2002). No entanto, os primeiros mapas genéticos baseavam-se em marcadores morfológicos e citológicos. Estes últimos eram obtidos a partir de alterações cromossômicas (aneuploidias, translocações, deleções e inversões), principalmente em culturas de fácil observação das alterações fenotípicas causadas por essas modificações, como milho, tomate e ervilha. No entanto, esses marcadores são restritos às espécies de amplo conhecimento citológico. A partir do desenvolvimento de marcadores bioquímicos (isoenzimas) e moleculares (DNA), o mapeamento genético passou a ser utilizado em várias espécies, até mesmo para aquelas as quais nem sequer havia ainda estudos de ligação a algum marcador.

Os mapas genéticos têm importante papel em muitas áreas da genética, como a análise de QTLs, clonagem baseada em posição no mapa, melhoramento por meio da seleção assistida por marcadores (SAM) e, mais recentemente, na genômica comparativa. A seleção indireta, por meio de marcadores genéticos, tem sido sugerida

para características de baixa herdabilidade, que requerem grandes populações para sua mensuração (FERREIRA, 1995).

Desse modo, um mapa genético saturado com marcadores passou a ser a base para estudos avançados de genética, incluindo a identificação e isolamento de genes e estudos da estrutura, expressão e função desses genes, como enfatizam OLIVEIRA et al. (2005) em seus trabalhos. Altas resoluções em regiões específicas isto é, próximas a genes de interesse, são fundamentais para a identificação, isolamento e clonagem de genes, que vem se tornando uma realidade em espécies com mapas genéticos bem definidos (ROOSE et al., 2000). Nos últimos anos, mapas integrados de muitas espécies têm sido publicados. Devido ao aumento na densidade dos locos e no decréscimo no número de intervalos, estes mapas consensos têm fornecido uma identificação mais precisa de genes principais e/ou QTLs de importância agrônômica. Adicionalmente eles têm auxiliado a conduzir a seleção assistida por marcadores e estudar a estrutura e organização do genoma, estudos de evolução e introgressão de genes.

O mapeamento genético se tornou mais frequente, principalmente após o advento da tecnologia de sequenciamento de alta produção, que tem gerado informações abundantes sobre sequências de DNA para os genomas de muitas espécies de plantas. Isto inclui o sequenciamento de sequências genômicas completas para espécies modelo como *Arabidopsis thaliana*, soja, cevada, milho, eucalipto. Adicionalmente, às etiquetas de sequências expressas (*Expressed Sequence Tags* - ESTs) de outras importantes espécies cultivadas têm sido geradas, e ferramentas poderosas de bioinformática têm anotado milhares de sequências como genes funcionais putativos.

Neste contexto, marcadores moleculares representam a tarefa de relacionar estas informações geradas de sequências de DNA com fenótipos particulares. Consequentemente há uma forte demanda em melhorar técnicas de marcadores visando utilizar a informação de sequências disponíveis. Um mapa saturado é a base para estudos avançados de genética, incluindo a identificação, isolamento e estudos da estrutura, expressão e função dos genes. Neste contexto, a clonagem de genes se tornou uma realidade em espécies com mapas genéticos bem definidos. Entretanto, a

construção de mapas de alta resolução que permitam identificar marcadores moleculares próximos ou até mesmo completamente ligados ao gene é um pré-requisito para a clonagem de genes baseada em mapa.

A seleção da população para mapeamento envolve a escolha dos genitores e a determinação do tipo de cruzamento ( $F_2$ , retrocruzamento, e outros), sendo considerada uma etapa crítica para o sucesso da construção do mapa (STAUB et al., 1996). A escolha do tipo de população mais apropriada ao mapeamento está relacionada com o tipo de marcador empregado (TANKSLEY et al., 1988).

No entanto, independentemente dessa escolha, duas condições básicas devem ser atendidas: o máximo de polimorfismo entre os genitores, e que sejam produzidas gerações em que os locos estejam em desequilíbrio de ligação (TANKSLEY, 1993).

O desequilíbrio de ligação entre os locos segregantes é atribuído à ligação física entre os locos, que por sua vez resulta da redução da frequência de recombinação entre genes situados em regiões próximas ao longo de determinado cromossomo (WEIR, 1996; COELHO, 2000). O desequilíbrio de ligação, decorrente da ligação física entre os locos, atinge seu ponto máximo nas populações derivadas de cruzamentos controlados e, como consequência, a capacidade de detectar a ligação também é máxima (TANKSLEY, 1993; LIU, 1998). Cabe ressaltar que o desequilíbrio não deve ser causado por seleção ou deriva genética.

Marcadores moleculares, segundo HU & VICK (2003) e CHEN et al. (2006), realizam um importante papel na genômica estrutural e funcional de animais, plantas e espécies microbianas. A detecção de loco de características quantitativas (*Quantitative Loci Traits* - QTLs), principais em mapas de ligação genéticos baseada em marcadores moleculares, oferece uma refinada visão da arquitetura genética de caracteres quantitativos e uma ferramenta potencial para melhoramento efetivo por meio de seleção assistida por marcadores (YOSHIMARU et al., 1998; LING et al., 2000).

Para estabelecer a relação entre as distâncias genéticas entre dois locos no mapa e a frequência de gametas recombinantes criaram-se as funções de mapeamento (LYNCH & WALSH, 1998). Um grande número de funções de mapeamento tem sido

desenvolvido (HALDANE, 1919; KOSAMBI, 1944; RAO et al., 1977; FELSENSTEIN, 1979; KARLIN, 1982), sendo as funções de Haldane e Kosambi as mais utilizadas no mapeamento genético de vegetais (STAUB et al., 1996).

A função de Haldane admite que a ocorrência de permuta entre as cromátides não irmãs ocorra de maneira independente com ausência de interferência. Ao contrário, a função de Kosambi admite a ocorrência de permutas próximas como eventos não independentes (presença de interferência). Assim, esta função assume a interferência completa entre regiões arbitrariamente próximas, sendo decrescente para locos mais distantes, e iguais a zero para locos independentes (WEIR, 1996).

Outro aspecto importante, é que não existe correlação entre distância física (número de pares de bases) e distância de mapa, ou seja, existem regiões cromossômicas de apenas algumas dezenas de milhares de pares de bases (distância física pequena) em que a probabilidade de recombinação é alta (regiões-alvo de recombinação – *hot spots*). Ao mesmo tempo, há regiões de alguns milhões de pares de bases (distância física grande) onde a recombinação é praticamente suprimida e a distância entre os locos, mínima como nas regiões centroméricas e teloméricas (TANKSLEY et al., 1992; FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996; JIANG et al., 1997; SALIBA-COLOMBANI et al., 2000).

O método mais importante e comum de mapeamento utiliza a frequência de recombinação para determinar a distância relativa entre duas características ligadas. STURTEVANT (1913) estabeleceu que a frequência de quiasmas entre dois genes ligados é de certa forma proporcional à distância física entre ambos. Esse princípio é a base para o mapeamento genético. Uma unidade de centiMorgan equivale a aproximadamente 1% de recombinação quando os marcadores estão bastante próximos, ou podem diferir da porcentagem de recombinação quando estão mais distantes em vista da ocorrência de *crossing-over* duplo, triplo, etc. Diversas funções de mapeamento têm sido utilizadas na correção das distâncias calculadas em porcentagem de recombinação para a distância em centiMorgan (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996).

Os caracteres mapeados devem distribuir-se de acordo com um padrão de segregação mendeliana. Este padrão pode ser verificado através do teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ). De modo geral recomenda-se, preferencialmente, o descarte dos locos que apresentam distorções da segregação mendeliana para não comprometer a qualidade do mapa (BEARZOTI, 2000).

Nas análises baseadas em modelo, também chamadas de LOD score ou análise paramétrica, admite-se que todos os aspectos do modelo estatístico, exceto a taxa de recombinação, são conhecidos. A verossimilhança é a probabilidade de se observar um quadro da distribuição de genótipos em uma família, dada a existência da ligação com um valor  $q$  da recombinação versus a mesma probabilidade estimada para segregação independente. Um valor de LOD maior que 3 indica que a hipótese alternativa tem uma verossimilhança mil vezes maior que a hipótese nula, e é indicativo da existência da ligação entre o marcador e o fenótipo estudado. Valores de LOD score maiores que 1,5 e menores que três sugerem a existência de ligação, enquanto valores iguais ou menores que -2 indicam a inexistência de ligação.

### **3 OBJETIVOS**

Este estudo visa selecionar marcadores moleculares microssatélites que estejam fortemente ligados a genes que conferem resistência à ferrugem asiática e ao oídio da soja, possibilitando o mapeamento destes genes nos diferentes grupos de ligação da soja, dando deste modo subsídios ao programa de melhoramento da soja e por fim, a obtenção de cultivares com resistência/tolerância a esse patossistema (ferrugem asiática e oídio da soja). Os resultados obtidos aqui auxiliarão na solução dos problemas decorrentes da introdução desses patógenos e ainda na manutenção da competitividade e sustentabilidade do agronegócio da soja.

### **3.1 Objetivos Específicos**

Assim, para que ocorra uma interação e aceleração na busca destes novos genes, bem como o entendimento dos mecanismos de reação dos genótipos de soja a cada um destes patógenos, o presente estudo contempla os seguintes objetivos específicos:

- Estudar a herança de caracteres qualitativos e quantitativos nos genótipos de soja relacionados à resistência ao oídio e ferrugem asiática da soja e;
  
- Selecionar e identificar marcadores moleculares microssatélites fortemente ligados aos genes de resistência à ferrugem asiática e ao oídio da soja;

#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A. M. R. Doenças da soja (*Glycine max* L.). In: KIMATI, H. **Manual de fitopatologia (doenças das plantas cultivadas)**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1997. cap. 61. p. 642-664.

ALMEIDA, A. M.; BINNECK, E.; PIUGA, F. F.; MARIN, S. R. R.; RIBEIRO, V.; SILVEIRA, C. A. Characterization of powdery mildews strains from Soybean bean sunflower and weeds in Brazil using rDNA-ITS sequences. **Tropical Plant Pathology**, Brasilia, v.33, n.1, p.020-026, January-Febrero. 2008.

ARIAS, C. A. A.; RIBEIRO, A. S.; KIIHL, S. A single gene determining high level of resistance to powdery mildew in soybean In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 7., INTERNATIONAL SOYBEAN PROCESSING AND UTILIZATION CONFERENCE, 4., CONGRESSO MUNDIAL, 3., 2004, Foz do Iguaçu. **Abstract...** Foz do Iguaçu: Embrapa, Soja, 2004, p. 95.

BALARDIN, R.S. BASES PARA MANEJO DA FERRUGEM ASIÁTICA (*Phakopsora pachyrhizi*). In: BALARDIN, R.S. **Doenças da soja**. Santa Maria: UFSM, 2002.

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.

BOSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal Human Genetics**, Chicago, n. 3, v.32, p. 314-331, 1980.



BRAUN, U. The Powdery Mildews (Erysiphales) of Europe. **Gustav Fisher Verlag**, Jena, p.337, 1995

BRAUN, U.; TAKAMATSU, S. Phylogeny of Erysiphe Microsphaera Uncinula (Erysiphe) and Cystotheca Podosphaera Sphaerotheca (Cystothecaceae) inferred from rDNA ITS sequences some taxonomic consequences. **Schlechtendalia**, v.4, p. 1-33, 2000.

BROGIN, R. L. **Mapeamento de genes de resistência à ferrugem e de QTLs envolvidos na resistência à septoriose em soja**. 2005. 106 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

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

BUZZELL, R.I.; PALMER, R.G. *Rmd* and E3 linkage. **Soybean Genetics Newsletter**, v. 16, p. 29-3, April. 1989.

CARDLE, L.; RAMSAY, L.; MILBOURNE, D. MACAULAY, M.; MARSHALL, D.; WAUGH, R. Computation and experimental characterization of physically clustered simple sequence repeats in plants. **Genetics**, Baltimore, v. 156, n. 2, p. 847-854, Oct. 2000.

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

CHAO, S.; SHARP, P. J.; WORLAND, A. J.; WARHAM, E. J.; KOEBNER, R. M. D.; GALE, M. D. RFLP-based genetic maps of wheat homoeologous group 7 chromosomes. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, n. 4, v. 78, p. 495-504, Novembro, 1989.

CHARLESWORTH, B.; SNIÉGOWSKY, P.; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, London, n. 6494, v. 371, p. 215-220, Sept. 1994.

CHEN, C.; ZHOU, P.; CHOL, Y. A. HUANG, S.; GMITTER Jr. F. G. Mining and characterizing microsatellites from citrus ESTs. **Theoretical and Applied Genetics**, v.112, n.7, 2006.

CHENG, Y. W.; CHAN, K. L. The breeding of 'Tainung 3' soybean. **Journal of Taiwan Agricultural Research**. Taiwan, v. 17, p. 30-35, 1968.

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

COLLINS, F. S.; BROOKS, L. D.; CHAKRAVARTI, A. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. **Genome**, vol. 8, p. 1229-1231, 1998.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTOS. **Safra grãos 2007/2008**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 25 janeiro 2009.

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**, Madison, v. 39, n.5, p. 1464–1490, September-October 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>> Acesso em 01 out. 2008.

DEAN, R.A. Signal pathways and appressorium morphogenesis. **Annual Review Phytopathology**, v.35, p.211-234, 1997.

DELANNAY, X.; SPECHT, J. E.; CREGAN, P. B. A new integrated genetic linkage map of the soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 109, n. 1, p. 122-128, June. 2004.

DESLANDES, J. A. Ferrugem da soja e de outras leguminosas causadas por *Phakopsora pachyrhizi* no Estado de Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 4, n. 2, p. 337-339, jun. 1979.

DUNVLEAVY, J. M. A survey of powdery mildew of soybean in central Iowa. **Plant Disease Reporter**, v. 60, n. 8, p. 675-677, 1978.

EMBRAPA. **Ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi*): Identificação e controle**. In: Embrapa Soja. Documentos 204, (Eds) YORINORI, J.T.; PAIVA, W.M.; COSTAMILAN, L.M.; BERTAGNOLI, P.F. Londrina, 2003. 25p.

EMBRAPA. **Recomendações técnicas para a cultura da soja no Paraná 2000/01**. Londrina: Embrapa Soja, 2000.

EMBRAPA. **Embrapa Soja divulga balanço sobre a ferrugem na safra 2007/08**. Disponível em <[http://www.cnpso.embrapa.br/noticia/ver\\_noticia.php?cod\\_noticia=469](http://www.cnpso.embrapa.br/noticia/ver_noticia.php?cod_noticia=469)> Acesso em 05 ago. 2008.

FELSENSTEIN, J. A mathematical tractable family of genetic mapping functions with different amount of interference. **Genetics**, Baltimore, v. 91, n. 4, p. 769-775, April 1979.

FERREIRA, D. F. **Eficiência de métodos de mapeamento de locos quantitativos (QTLs) e da seleção assistida por marcadores moleculares**. 1995. 209 p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1995.

FERREIRA, M. E; GRATTAPAGLIA, D. 1998. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed., Brasília: Embrapa-Cenargen.

FREDERICK, R. D.; SNYDER, C. L.; PETERSON, G. L.; BONDE, M. R. Polymerase chain reaction assays for the detection and discrimination of the soybean rust pathogens *Phakopsora pachyrhizi* and *P. meibomiae*. **Phytopathology**, n. 92, p.217-227, 2002.

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**, New York, v. 117, n. 4, p. 545-553, August. 2008.

GEBHARDT, C.; RITTER, E.; DEBENER, T.; SCHACHTSCHABEL, U.; WALKEMEIER, B.; UHRIG, H.; SALAMINI, F. RFLP analysis and linkage mapping in *Solanum tuberosum*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 78, p. 65-75, 1989.

GONÇALVES, E. C. P.; DI MAURO, A. O.; CENTURION, M. A. P. C. Genetics of resistance to powdery mildew (*Microsphaera diffusa*) in Brazilian soybean populations. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, n. 3, p. 339-342, 2002.

GRAHAM, M. A.; MAREK, L. F.; SHOEMAKER, R. C. Organization expression and evolution of a disease resistance gene cluster in soybean. **Genetics**, Baltimore, v. 162, p. 1961–1977, December 2002.

GRATTAPAGLIA, D., SEDEROFF, R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD markers. **Genetics**, Baltimore, v.137, p. 1121-1137, 1994.

GRAU, C. R. **Powdery mildew, a sporadic but damaging disease of soybean**. In: SHIEBLES, R. (Ed). Proceedings of the III World Soybean Research Conference, Iowa, USA, Westview, p. 568-574, 1985.

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

HAMMONDH-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. G. **Plant Disease** resistance genes. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 575-607, Jun. 1997.

HARTMAN, G.; WANG, T. C.; SHANMUGASUNDARAM, S. Soybean rust research progress and future prospects. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 1994, Chang Mai, Thailand. **Proceedings...** Chang Mai: [s.n.], 1994. p. 180-186

HARTWIG, E. E. Identification of a fourth major gene conferring resistance to soybean rust. **Crop Science**, Madison, v. 26, n. 6, p. 1135-1136, 1986.

HELENTJARIS, T.; SLOCUM, M.; WRIGHT, S.; SHAEFER, A.; NIENHUIS, J. Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 72, p. 761-769, November 1986

HIDAYAT, O. O.; SOMAATMADJA, S. Screening of soybean breeding lines for resistance to soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow). **Soybean Rust Newsletter**, v. 1, p. 9-22, 1977.

HU, J.; VICK, B. A. Target Region Amplification Polymorphism: A Novel Marker Technique for Plant Genotyping. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 21, p. 289-294, September 2003.

HÜCKELHOVEN, R. Powdery mildew susceptibility and biotrophic infection strategies. **Microbiology Letters**, n. 1, v. 245, p. 9–17, Jan. 2005.

HYTEN, D. L. Mapping Soybean Rust Single Gene Resistance. In: National Soybean Rust Symposium, 2006, St. Louis. **Anais...** St. Louis: Beltsville Area / Soybean Genomics and Improvement LaboratoryUnited, 2006, p. 18.

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**, Madison, v. 47, p. 837-838, Mar.-Apr. 2007.

HYTEN, D.L.; SMITH, J.R.; FREDERICK, R.D.; TUCKER, M.L.; SONG, Q.; CREGAN, P.B. Bulk segregant analysis using the GoldenGate assay to locate the *Rpp3* locus that confers resistance to soybean rust in soybean. **Crop Science**, Madison, v. 49, p. 265-271, 2009.

JEFFREY, A. J.; WILSON, V.; THEIN, S. L. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. **Nature**, London, v. 314, p. 67-73, March 1985.

JIANG, C.; LEWIS, M.E.; SINK, K. C. Combined RAPD and RFLP molecular linkage map of asparagus. **Genome**, Ottawa, n. 1, v. 40, p. 69-76, Feb. 1997.

KARLIN, S. **Theoretical aspects of genetic map functions in recombination processes.** In: CHAKRAVARTI, A. (Ed.). Human population Genetics: the Pittsburgh symposium. New York: van Nostrand Reinhold, 1982. p.245-286

KOSAMBI, D. D. The estimation of map distance from recombination values. **Annuaire of Eugenetics**, 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**, San Diego, v. 1, n. 2, p. 174-181, Oct. 1987.

LEHMAN, S.G. Powdery mildew of soybean. **Journal of Elisha Mitchell Science Society**, v. 46, p.190-195, 1931.

LING, P.; DUNCAN, L. W.; DENG, Z.; DUNN, D.; HU, X.; HUANG, S.; GMITTER Jr., F. G. Inheritance of citrus nematode resistance and its linkage with molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, n. 7, v. 100, p. 1010-1017, May 2000.

LITT, M.; LUTY, J. A. A hipervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetic**, Chicago, n. 3, v. 44, p. 398-401, Mar. 1989.

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**, Cary, v. 81, n. 5, p. 407-418, Sep. 1990.

LOHNES, D. G. BERNARD, R. L. Inheritance of resistance to powdery mildew in soybeans. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 76, n. 9, p. 964-965, April. 1992.

LOHNES, D. G.; NICKELL, C. D. Effects of powdery mildew alleles *Rmd-c Rmd* and *Rmd* on yield and other characteristics in soybean. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 78, n. 3, p. 299-301, December. 1994.

LOHNES, D. G.; WAGNER, R. E.; BERNARD RL. Soybeans genes *Rj2 Rmd-c* and *Rps2* in linkage group 19. **Journal of Heredity**, v. 84, p.109-111, 1993.

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

McCOUCH, S. R.; KOCHERT, G.; YU, Z. H.; WANG, Z. Y.; KHUSH, G. S.; COFFMAN; W. R.; TANKSLEY, S. D. Molecular mapping of rice chromosomes. **Theoretical Applied and Genetics**, New York, n. 6, v. 76, p. 815-829, December 1988.

MEDEIROS, B. R.; FERREIRA, M. A. S. V.; DIANESE, J. C. **Mecanismos de agressão e defesa nas interações planta-patógeno**. Ed. Universidade de Brasília, Brasília, 2003, 209 p.

MENDGEN, K.; KRIEG, P. A.; REBAGLIATI, M. R.; MANIATIS, T.; ZINN, K.; GREEN, M. R. Volatiles modulate the development of plant pathogenic rust fungi. **Planta**, Berlin, n. 6, v. 224, p. 1353-1361, Nov. 2006.

MIGNUCCI, J. C.; LIM, S. M.; HEPPELRY, P. R. Effects of temperature on reactions of soybean seedlings to powdery mildew. **Plant Disease Reporter**, v. 61, n. 2, p. 122-124, 1977.



MIGNUCCI, J. S. BOYER, S. J. Inhibition of photosynthesis and transpiration in soybean infected by *Microsphaera diffusa*. **Phytopathology**, v. 69, p. 227–230, 1979.

MIGNUCCI, J. S., CHAMBERLAIN, D. W. Interactions of *Microsphaera diffusa* with soybeans and other legumes. **Phytopathology**, v. 68, n. 2, p. 169-173, 1978.

MIGNUCCI, J.S.; LIM, S.M. Powdery mildew (*Microsphaera diffusa*) development on soybeans with adult-plant resistance. **Phytopathology**, v. 70, p. 919-921, 1980.

MISAGHI, I. J. Physiology and biochemistry of plant-pathogen interactions. **Plenum**, New York, 201p. 1983.

MONTEROS, M. J.; MISSAOUI, A. M.; PHILLIPS, D. V.; WALKER, D. R.; BOERMA, H. R. Mapping and Confirmation of the 'Hyuuga' Red-Brown Lesion Resistance Gene for Asian Soybean Rust. **Crop Science**, Madison, v. 47, p. 829-834, Mar.-Apr. 2007.

MOREL PAIVA, W. **Roya de la soja**. Itapúa: Ministério de Agricultura y Ganaderia, Subsecretaria de Agricultura, Dirección de Investigación Agrícola: Centro Regional de Investigación Agrícola – CRIA, 2001. (Comunicado Técnico – Reporter Oficial, Série Fitopatología, 1).

MORGAN, T. H.; STURTEVANT, A.H.; MULLER, H. J.; BRIDGES, C. (1915). **The Mechanism of Mendelian Heredity**. Ed. Henry Holt and Company, New York, 1915.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v. 55, p. 335-350, 1987.

OLIVEIRA, R. P.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M. A. Integrated genetic map of citrus base on RAPD markers. **Fruits**, v. 60, p. 187-193, 2005.

PANSTRUGA, R. Establishing compatibility between plants and obligate biotrophic pathogens. **Current Opinion in Plant Biology**, n. 4, v. 6, p. 320-326, Aug. 2003.

PARAN, I.; MICHELMORE, R.W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.85, p.985-993, 1993.

PASCHOLATTI, S. F.; LEITE B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: Bergamin FILHO, A., KIMATI, H., AMORIN, L. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. Piracicaba. Editora Ceres, v.1, p.415-453. 1995.

PHILLIPS, D. V. Stability of *Microsphaera diffusa* and the effect of powdery mildew on yield of soybean [Georgia]. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 68, n. 11, p. 953-956, 1984

PLOPER, L. D.; GONZALEZ, V.; ZARZOZA, I.; GALZEZ, R. Detección de la mancha ojo de rana y el Oídio en cultivo de soja de Tucuman durante la campana 1997/98. **Avance Agroindustrial**, n. 76, v. 19, p. 29-32, 1999.

POLZIN, K. M.; LOHNES, D. G.; NICKELL, C. D.; SHOEMAKER, R. C. Integration of *Rps2 Rmd* and *Rj2* Into Linkage Group-J of the Soybean Molecular Map. **Journal of Heredity**, Cary, n. 4, v. 85, p. 300-303, July. 1994.

POWELL, W.; MACHRAY, G.C.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends in Plant Science**, v.1, p.215-222, 1996.

PRIMMER, C. R.; RAUDSEPP, T.; CHOWDHARRY, B. P.; MOLLER, A. P.; ELLEGREN H. Low frequency of microsatellites in the avian Genome. **Genome Research**, Plainview, v. 7, n. 5, p. 471-482, May 1997.

RAO, D. C.; MORTON, N. E.; LINDSTEN, J.; HULTEN, M.; YEE, S. A mapping function for man. **Human Heredity**, Basel, v.27, n.2, p.99-104, 1977.

REIS, E. M., MEDEIROS, C. A.; CASA, R. T. Epidemia de oídio da soja, causada por *Microsphaera diffusa*, na safra 1996/97, no RS. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, p. 300-301, 1997.

REIS, E.M. **Doenças na Cultura da Soja**. Passo Fundo: Aldeia Norte Editora, 2004.

RITTER, E.; GEBHARDT, C.; SALAMINI, F. Estimation of recombination frequencies and construction of RFLP linkage maps in plants from crosses between heterozygous parents. **Genetics**, Baltimore, v. 125, p. 645-654, July 1990.

ROOSE, M. L.; CHENG, T.; KUPPER, F. Mapping the Citrus Genome. **Acta Horticulturae**, v. 535, p. 25-32, 2000.

SALIBA-COLOMBANI, V.; CAUSSE, M.; GERVAIS, L.; PHILOUZE, J. Efficiency of RFLP, RAPD, and AFLP markers for the construction of an intraspecific map of the tomato Genome. **Genome**, Ottawa, v. 43, n. 1, p. 29-40, Feb. 2000.

SARTORATO, A.; YORINORI, J.T. Oídios de Leguminosas: Feijoeiro e Soja. In: SADNIK, MJ; RIVERA, MC. **Oídios**. Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente, p.484, 2001.

SHOEMAKER, R.C., SPECHT, J.E. Integration of the soybean molecular and classical genetic linkage groups. **Crop Science**, v. 35, p436–446, 1995.

SILVA, D. C. G.; YAMANAKA, N.; BROGIN, R. L.; ARIAS, C. A. A; NEPOMUCENO, A. L.; DI MAURO, A. O.; PEREIRA, S. S.; NOGUEIRA, L. M.; PASSIONOTTO, A. L.;

ABDELNOOR, R. V. Molecular mapping of two loci that confer resistance to Asian rust in soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.117, n.1, p.57-63, June 2008.

SINCLAIR, J. B.; HARTMAN, G. L. Soybean rust. In: HARTMAN, G. L.; SINCLAIR, J. B.; RUPE, J. C. (Eds.). **Compendium of soybean diseases**. 4. ed. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1999.

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

SOUTHERN, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, n. 5, v. 98, p. 503-517, Nov. 1975.

STADNIK, M.J.; RIVERA, M.C. (2001) Oídios de Leguminosas: Feijoeiro e Soja. In: SADNIK, M.J.; RIVERA, M.C. **Oídios**. Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente, 484p.

STADNIK, M.J; MAZZAFERA (2001). Interações oídios-hospedeiro. In: SADNIK, M.J.; RIVERA, M.C. **Oídios**. Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente, 484p

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

STURTEVANT, A.H. The linear arrangement of six sex-linked factors in *Drosophila*, as shown by their mode of association. **Journal of Experimental Zoology**, v.14, p.43–59, 1913.

SUITER, K. A.; WENDEL, J. F.; CASE, J. S. Linkage-1: a PASCAL computer program

for the detection and analysis of genetic linkage. **The Journal of Heredity**, v. 74, n. 3, p. 203-204, 1983.

TAKAMATSU, S.; SHIN, H. D.; PAKSIRI, U.; LIMKAISANG, S.; TAGUCHU, Y.; BINH, N. Two *Erysiphe* species associated with recent outbreak of soybean powdery mildew: Results of molecular phylogenetic analysis based on nuclear rDNA sequences. **Mycoscience**, v. 43, n. 4, p. 333-341, August. 2002.

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

TANKSLEY, S. D.; GANAL, M. W.; PRINCE, J. P.; S.; MARTIN, G. B.; MESSEGUER, R.; MILLER, J. C.; MILLER, L.; PATERSON, A. H.; PINEDA, O.; M.S.; WING, R. A.; WU, W.; YOUNG, N. D. High density molecular linkage maps of the tomato and potato Genomes. **Genetics**, Baltimore, v. 132, n. 4, p. 1141-1160, 1992.

TANKSLEY, S. D.; MILLER, J.; PATERSON, A.; BERNATSKY, R. **Molecular mapping of plant chromosomes**. In: GUSTAFSON, J.P.; APPELS, R. (Eds.). New York: Plenum Press, 1988, p.157-173.

**Tecnologias de Produção de Soja Região Central do Brasil 2009 e 2001**. Sistema de Produção, 1 Versão eletrônica out/2008

TESTOLIN, R.; HUANG, W.G.; LAIN, O.; MESSINA, R.; VECCHIONE, A.; CIPRIANI, G. A kiwifruit (*Actinidia* spp.) linkage map based on microsatellites and integrated with AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.103, p.30-36, 2001.

TSCHANZ, A.T.; WANG, T.C. Interrelationship between soybean development, resistance, and *Phakopsora pachyrhizi*. **Anais**, Fifth International Congress of the Society for the Advanced of Breeding Research in Asia and Oceania, Bangkok, Thailand. p.14-20, 1985

TÓTH, G.; GÁSPÁRI, Z.; JURKA, J. Microsatellite in different eukaryotic **Genome** survey and analysis. **Genome Research**, Plainview, v. 10, n. 7, p. 967-981, July 2000.

UNÊDA-TREVISOLI, S. H.; MAURO, A. O. DI.; COSTA, M. M.; CASTRO, N. H. A.; CAPELOTO, A.; BÁRBARO, I. M.; MUNIZ, F. R. M. (2002) Avaliação da herança de resistência ao oídio (*Microsphaera diffusa*) e do potencial agrônômico em populações de soja. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v. 6, v. 3, p. 627-634, Set-Dez. 2002.

United States Department of Agriculture - **USDA**, 2008. Disponível em <<http://www.fas.usda.gov/> Acesso 01 Nov. 2008.

VAKILI, N. G.; BROMFIELD, K. R. Phakopsora rust on soybean and other legumes in Puerto Rico. **Plant Disease**, v. 60, p.995-999, 1976.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, 1995.

WAHL, C.V. Schädlinge an der Sojabhne. **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten**, v31, p.194-196.

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

WILLIAMS, K. A.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers re useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, p.6531-6535, Nov. 1990.

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**, [S.l.], v. 68, n. 1, p. 52-56, Feb. 2002.

YORINORI, J. T. **Doenças da soja no Brasil**. In: FUNDAÇÃO CARGILL. Soja no Brasil Central. 3. ed. Campinas: Fundação Cargill, 1986. p. 301-363.

YORINORI, J. T. **Soja [*Glycine max* (L.) Merrill] - Controle de doenças**. In: VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L. (Ed.). Controle de doenças de plantas: grandes culturas, v. 2. Viçosa: Editora da Universidade Federal de Viçosa; Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1997, cap. 21. p. 953-1024.

YORINORI, J. T.; KIIHL, R. A. S.; ARIAS, C. A. A.; ALMEIDA, L. A.; YORINORI, M. A.; GODOY, C. V. **Reações de cultivares de soja a ferrugem "asiática" (*Phakopsora pachyrhizi*)**. In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 24, 2002, São Pedro, SP. Resumos... São Pedro: USP, 2002. p. 149.

YORINORI, J. T.; PAIVA, W. M. **Ferrugem da soja: *Phakopsora pachyrhizi* Sydow**. Londrina: Embrapa soja, 2002. Folder.

YORINORI, J. T.; LAZZAROTTO, J. J. **Situação da ferrugem asiática da soja no Brasil e na América do Sul**. Londrina: Embrapa Soja, 2004. 30 p. (Documentos, 236).

YORINORI, J.T.; NUNES, JUNIOR, J.; LAZZAROTTO, J.J. **Ferrugem asiática da**

**soja no Brasil: evolução, importância econômica e controle.** Londrina: Embrapa Soja, 2004, p.36. (Embrapa Soja. Documentos, 247).

YORINORI, J. T. **Controle da ferrugem asiática da soja na safra 2006/07.** Disponível em: <<http://www.agrolink.com.br/ferrugem>>. Acesso em: 20 dez. 2006.

YOSHIMARU, H.; OHBA, K.; TURUMI, K.; TOMARU, N.; MURAI, M.; MUKAI, Y.  
Detection of quantitative trait loci for juvenile growth, flower bearing and rooting ability base don a linkage map of sugi (*Cryptomeria japonica* D. Don). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 97, p. 45-50, 1998.

ZAMBOLIN, I. **Manejo integrado da ferrugem asiática da soja.** In: ZAMBOLIN, L. (Ed.). *Ferrugem asiática da soja.* Viçosa MG: Suprema, 139p, 2006.



## CAPÍTULO 2 - RESISTÊNCIA À FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA: HERANÇA DE CARACTERES QUALITATIVOS E QUANTITATIVOS E MAPEAMENTO GENÉTICO

**RESUMO** - A ferrugem asiática da soja, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* Sydow & Sydow vem causando grandes perdas nas áreas sojícolas de muitos países. O objetivo principal desse trabalho foi estudar a herança de caracteres qualitativos e quantitativos e mapear genes de resistência a esta doença, utilizando uma população de plantas  $F_2$  e  $F_{2:3}$  derivada do cruzamento entre os genótipos resistentes PI 200487 (Kinoshita) e PI 200526 (Shira Nui) com o genótipo suscetível BRI98-641. As populações de mapeamento e os genótipos parentais foram inoculados com esporos de *P. pachyrhizi*, sendo avaliadas quanto ao tipo de lesão como resistentes (lesões RB) ou suscetíveis (lesões TAN), índice de severidade e número de urédias. Modelos genéticos de média e de variância também foram ajustados para os caracteres quantitativos. Um total de 214 marcadores microssatélites foram testados para os genitores dos cruzamentos, sendo os polimórficos utilizados para genotipar as plantas da geração  $F_2$ , que foram inoculadas e avaliadas para resistência/suscetibilidade à ferrugem. As duas populações apresentaram um gene dominante para o caráter, os quais foram mapeados no mesmo grupo de ligação, o GL-N da soja. Nas análises quantitativas, o modelo aditivo-dominante foi suficiente para explicar a herança dos dois caracteres. Foi detectada a presença de genes que contribuem para aumento ou redução da severidade de doença nos dois parentais resistentes e também na testadora suscetível envolvida nos dois cruzamentos. Para o caráter número de urédias os genes podem estar concentrados apenas nos parentais resistentes. A seleção para número de urédias é mais eficiente que para severidade, pois é menos influenciada pelas variações ambientais. Apesar disso, o caráter severidade continua sendo extremamente interessante para processos seletivos por permitir ganhos com seleção e ser mais fácil de ser avaliado.

Palavras-chave: *Glycine max*, microssatélites, *Phakopsora pachyrhizi*, resistência a doença

## Introdução

A ferrugem asiática da soja, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, tem sido relatada em todo mundo, exibindo financeiramente um prejuízo no Brasil de US\$ 204,5 milhões que, somado ao gasto para o controle da doença, resultou em um custo total de US\$ 1,97 bilhão (EMBRAPA, 2008).

Enquanto cultivares com resistência à ferrugem asiática da soja não estão disponíveis, são necessárias várias aplicações de fungicidas foliares, que se constitui na ferramenta viável para minimizar os danos causados, onerando os custos da produção para o agricultor.

O patógeno apresenta uma alta diversidade genética, dificultando o desenvolvimento de cultivares que sejam efetivas por um longo período. Vinte raças de ferrugem asiática foram identificadas em amostras coletadas em plantas de soja e hospedeiros selvagens no Japão, nove raças em 42 isolados em Taiwan e 59 raças em 69 isolados na Tailândia. No Brasil, embora não haja comprovação científica, devido à inexistência de trabalhos com hospedeiros diferenciadores de raças até o momento, admite-se que haja também inúmeras raças fisiológicas do patógeno em campos de soja. A resistência mediada pelos genes dominantes *Rpp* é monogênica e raça-específica, frequentemente explicada pela teoria gene-a-gene.

Devido à alta especificidade desta interação planta-patógeno no reconhecimento entre moléculas elicitoras do fungo e o produto dos genes R da planta, essa resistência frequentemente é quebrada pelo patógeno, o que normalmente causa elevados danos à cultura.

Até o momento os esforços de pesquisas buscando identificar genótipos de soja resistentes resultou na identificação de cinco genes dominantes de resistência à ferrugem asiática dominantes, descritos e nomeados *Rpp1*, *Rpp2*, *Rpp3*, *Rpp4* e *Rpp5*, identificados nas introduções das plantas (PIs), PI 200692, PI 230970, PI 462312 (Ankur), PI 459025 e PI 200526, respectivamente (CHENG & CHAN, 1968; HIDAYAT & SOMAATMADJA, 1977; BROMFIELD & HARTWIG, 1980; HARTWIG, 1986; GARCIA et

al., 2008). Outras fontes de resistência à ferrugem asiática da soja vêm sendo extensivamente estudada em instituições públicas e privadas em muitos países. O surgimento de novas raças do patógeno tem sido capaz de quebrar a resistência de alguns genótipos, como aconteceu recentemente com *Rpp1* e *Rpp3* (GODOY, 2005).

Pesquisas biotecnológicas com marcadores moleculares microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) vêm sendo desenvolvidas para mapear os genes de resistência à ferrugem asiática no mapa genético da soja. Seis destes genes de resistência já foram identificados e mapeados, nomeados *Rpp1* no GL-G (HYTEN et al., 2007), *Rpp-FT 2* (BROGIN 2005) e *Rpp-Hyuuga* (MONTEROS et al., 2007) no GL-C2, *Rpp2* no GL-J e *Rpp4* no GL-G (SILVA et al., 2008), *Rpp5* no GL-N (GARCIA et al., 2008) e *Rpp3* (HYTEN et al., 2009).

Testes de alelismo identificaram que os genótipos PI 200487 (Kinoshita) e PI 200526 (Shira Nui) possuem um gene *Rpp* independente em relação aos locos *Rpp2* e *Rpp4* e ativo contra o isolado brasileiro que quebrou a resistência dos genes *Rpp1* e *Rpp3* (LAPERUTA et al.2008; GARCIA et al.2008; RACHID, 2008).

Assim, os objetivos deste trabalho foram estudar a herança de caracteres qualitativos e quantitativos e confirmar o mapeamento dos genes maiores que conferem resistência à ferrugem presentes nos genótipos PI 200487 (Kinoshita) e PI 200526 (Shira Nui).

## **Material e Métodos**

### **Material Genético**

Duas populações distintas foram utilizadas para análises fenotípicas e mapeamento molecular, obtidas a partir dos cruzamentos PI 200487 (Kinoshita) x BRI98-641 e PI 200526 (Shira Nui) x BRI98-641 (daqui por diante referidas como populações KBR e SBR, respectivamente). Essas populações consistiram de 117 e 115 indivíduos,

respectivamente, e foram desenvolvidas na Embrapa Soja, Londrina, Paraná, Brasil, durante as safras 2006/07 e 2008.

As duas populações de mapeamento  $F_{2:3}$  e os genitores foram cultivados em casa-de-vegetação para a avaliação da resistência à ferrugem e para a coleta de folhas. Os tecidos foliares foram estocados a  $-80^{\circ}\text{C}$  para a extração de DNA. As sementes dos genótipos em estudo foram cedidas pelo Banco Ativo de Germoplasma de Soja (BAGs) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Soja).

### **Instalação e delineamento do experimento**

O experimento foi instalado em casa-de-vegetação com temperatura controlada, variando de 20 a  $28^{\circ}\text{C}$ . Quinze indivíduos de cada genótipo parental e de cada  $F_{2:3}$  para cada cruzamento foram cultivadas em vasos com 20 cm de diâmetro e 25 cm de altura, contendo cerca de 4,5kg de uma mistura de solo, areia e esterco bovino, distribuídos sob delineamento em blocos ao acaso, sendo cada parcela representada por uma planta.

### **Inoculação e Avaliação**

Como o agente causador da ferrugem da soja é um parasita obrigatório, a população do patógeno foi mantida em plantas suscetíveis de soja em casa-de-vegetação. O inóculo consistiu de uma população fúngica coletada em campos comerciais no estado do Mato Grosso e mantida na cultivar BRSMS Bacuri em condições de casa-de-vegetação. Os urediniosporos foram coletados batendo-se as folhas infectadas sobre uma bandeja plástica e diluídos em água destilada com 0,05% (v/v) de "Tween 20" (Uniqema) para uma concentração final de aproximadamente 150.000 esporos/ml. As plantas foram inoculadas quando atingiram o estágio de desenvolvimento V3-V4 de acordo com a escala proposta por FEHR & CAVINES (1977). A inoculação das plantas, utilizando-se pulverizador manual, foi realizada ao anoitecer para evitar a inviabilização

dos uredósporos pela falta de água livre na folhas e baixa umidade do ambiente, causados pelas temperaturas mais altas na casa-de-vegetação durante os horários de maior insolação.

Doze dias após a inoculação, os genitores e as famílias  $F_{2:3}$ , foram analisados qualitativa e quantitativamente para os seguintes caracteres: tipo de lesão, número de urédias e nível de infecção. A classificação para o tipo de lesão foi visual, caracterizando os tipos de lesões como resistentes ou suscetíveis. Lesões de resistência ou RB (*Reddish Brown*) caracterizam-se pela cor castanho-avermelhada, com pouca ou nenhuma esporulação, enquanto as lesões de suscetibilidade ou TAN caracterizam-se pela cor castanho-claro com alta esporulação de urédias. A contagem do número médio de urédias por lesão foi realizada com o auxílio de uma lupa com capacidade de aumento de 20x. O nível de infecção ou a severidade foi avaliado com base na escala diagramática descrita por MARTINS et al. (2004). Na primeira avaliação, foi tomado o trifólio mais infectado (normalmente o terceiro), o qual foi identificado para que as próximas avaliações fossem realizadas sempre no mesmo trifólio. Os caracteres qualitativos e quantitativos foram avaliados três vezes, ao longo de três semanas consecutivas.

### **Extração de DNA e Estratégia de Mapeamento**

Amostras de tecido foliar das plantas  $F_2$  dos dois cruzamentos foram coletadas e mantidas em ultra freezer (-80°C) até o momento da extração de DNA. A extração de DNA dos genótipos parentais e dos indivíduos da geração  $F_2$  foi realizada com base no procedimento descrito por KEIM et al. (1988), com algumas modificações. O DNA foi então quantificado por análise espectrofotométrica e diluído para uma concentração de 10ng/ $\mu$ l.

O polimorfismo entre os genótipos parentais foi verificado com o teste de marcadores de microssatélites distribuídos nos vinte grupos de ligação da soja desenvolvidos pelo Centro de Pesquisa Agrícola de Beltsville – BARC/ARS (CREGAN et al., 1999; SONG et al., 2004). A informação de sequências dos iniciadores para todos os

marcadores microssatélites utilizados está disponível no site “Soybase” (<http://soybase.agron.iastate.edu/resources/ssr.php>; SOYBASE, 2008). Para garantir uma cobertura suficiente de todo o genoma da soja, pelo menos um marcador polimórfico em cada 30 cM foi utilizado, em cada um dos 20 grupos de ligação da soja.

Foram utilizados também marcadores microssatélites ligados a genes de resistência a várias outras doenças já mapeadas em soja, como resistência a *Phakopsora pachyrhizi* (SILVA et al., 2008; MONTEROS et al., 2007; BROGIN, 2005), *Phytophthora* (SANDHU, 2005; DEMIRBAS et al., 2001), *Microsphaera diffusa* (POLZIN et al., 1994), *Meloidogyne javanica* (FUGANTI et al., 2004), *Fusarium solanum* f. sp. *glycines* (FRONZA, 2003), *Heterodera glycines* (BENEVENTI et al., 2004; SCHUSTER et al., 2001), *Phialophora gregata* (KLOS et al., 2000; BACHMAN et al., 2001), uma vez que os genes de resistência a doenças podem encontrar-se agrupados.

Com objetivo de acelerar a identificação de marcadores ligados a resistência a ferrugem foi utilizada a estratégia de análises de agrupamentos segregantes (*Bulked Segregant Analysis* – BSA; MICHELMORE et al., 1991), com algumas modificações. Foram formados dois grupos, o primeiro consistindo de 10 indivíduos da população F<sub>2</sub> caracterizados como resistentes e 10 indivíduos caracterizados como suscetíveis. Esses grupos foram obtidos a partir dos resultados das avaliações fenotípicas à ferrugem asiática da soja na população segregante F<sub>2</sub>, permitindo a seleção de somente plantas homocigotas para cada fenótipo diferente, trabalho similar ao realizado por BROGIN (2005). As amostras de DNA dos genitores e dois agrupamentos, para cada cruzamento, foram usados para a análise de microssatélites. Para confirmar uma possível ligação, marcadores polimórficos encontrados entre os agrupamentos com diferenças alélicas foram usados para genotipar os indivíduos de toda a população F<sub>2</sub>.

A amplificação dos locos microssatélites foi realizada de acordo com a metodologia descrita por AKKAYA et al. (1995), com modificações. A eletroforese para verificar os fragmentos amplificados foi realizada em géis de poliacrilamida 10%.

## Análise dos Dados

### Análises quantitativas

Os caracteres nível de infecção, avaliado através da severidade da área foliar infectada pelo patógeno, e número de urédias, foram obtidos a partir de 12 dias da inoculação, ao longo de três semanas consecutivas. Os dados foram analisados através de médias e variâncias das diferentes gerações (parentais e F<sub>2:3</sub>) utilizando os programas computacionais GENFIT e Sistema de Genética e Quantitativa-SGQ (MATHER & JINKS, 1982). Os modelos genéticos aplicados sobre médias relacionadas às linhas puras e gerações derivadas de cruzamentos entre elas são (MATHER & JINKS, 1982):

$$\begin{aligned}\bar{P}_1 &= m + [d] + [i] \\ \bar{P}_2 &= m - [d] + [i] \\ \bar{F}_3 &= m + \frac{1}{4} [h] + \frac{1}{16} [l]\end{aligned}$$

onde:

m é o efeito genético e ambiental comum no cruzamento;

[d] é o efeito genético aditivo;

[h] é o efeito genético de dominância;

[i] é o efeito genético da interação aditiva x aditiva;

[l] é o efeito genético da interação dominante x dominante.

Os modelos genéticos aplicados sobre as variâncias das gerações estudadas foram:

$$VP1 = E;$$

$$VP2 = E;$$

$V1F_3$  (entre famílias) =  $1/2 D + 1/16 H + (1/n) V2F_3$ , e

$V2F_3$  (dentro de famílias) =  $1/4 D + 1/8 H + E$ .

onde:

VP1, VP2, V1F<sub>3</sub> e V2F<sub>3</sub> são, respectivamente, as variâncias do parental 1, parental 2, geração F<sub>3</sub>, entre e dentro de famílias;

D é a variância genética aditiva;

H é a variância genética de dominância;

E é a variância ambiental aditiva, e

n é o número de indivíduos dentro das famílias F<sub>3</sub>.

### **Análises moleculares**

Obtidos os resultados das avaliações da reação das famílias F<sub>2:3</sub> à ferrugem que caracterizaram as plantas F<sub>2</sub> em homozigotas resistentes, heterozigotas e homozigotas suscetíveis, foi aplicado o teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) para verificar se a segregação observada para as três classes formadas corresponde à proporção esperada de um gene dominante.

Todos os marcadores foram avaliados como codominantes. A reação à ferrugem foi avaliada como um caráter qualitativo codominante, utilizando os resultados da avaliação das progênes F<sub>2:3</sub>. A razão de segregação para os marcadores microssatélites também foi submetida ao teste de aderência ao modelo com um único loco utilizando o teste do Qui-quadrado ( $P > 0,05$ ). A análise de ligação e a construção do mapa foram realizadas com o programa Mapmaker/EXP (LANDER et al., 1987) utilizando a função de mapeamento de Kosambi (KOSAMBI, 1944). O critério de ligação foi um LOD score 3,0 e uma distância máxima de 37,2 cM.

Após a construção do mapa genético, procedeu-se ao mapeamento dos QTLs por



meio do programa Mapmaker/QTL versão 1.1b, com um LOD score 2,0. Os QTLs foram analisados por mapeamento por intervalo simples em populações  $F_{2:3}$  derivadas do cruzamento SBR e KBR, utilizando marcadores codominantes e médias dos caracteres, índice de severidade em diferentes tempos (1, 2 e 3) e número de urédias (1, 2 e 3) submetida à análise para identificar a ligação entre o marcador e o caráter.

## **Resultados**

As primeiras lesões causadas pelo patógeno nas folhas, com urédias em plena esporulação, foram observadas doze dias após a inoculação. Os genótipos Kinoshita e Shira Nui apresentaram lesões do tipo RB, características de genótipos resistentes à ferrugem e a linhagem BRI98-641, altamente suscetível, apresentou somente lesões do tipo TAN.

## **Dados quantitativos**

Nas análises quantitativas, as médias, as variâncias e os graus de liberdade das gerações parentais e  $F_{2:3}$ , utilizados para a obtenção dos parâmetros genéticos de média e variância dos caracteres severidade e número de urédias em reação à ferrugem asiática, encontram-se na Tabela 1. Na tabela 2, estão resumidos os modelos de média e variância ajustados para os dois caracteres quantitativos.

Tabela 1. Graus de liberdade (n), médias (x) e variâncias (Var.) conjuntas dos dois experimentos, para o caráter severidade (1, 2 e 3) e número de urédias (1, 2 e 3), das gerações parentais e F<sub>2:3</sub>.

Geração	Severidade 1			Severidade 2			Severidade 3		
	n	x	Var.	n	x	Var.	n	x	Var.
PI200487 (R)	14	10,64	47,32	14	60,00	348,92	15	68,40	271,54
BRI98-641 (S)	15	11,44	56,30	15	56,60	532,11	15	68,40	271,54
PI200487 vs BRI98-641	1638	12,42	72,74	1540	47,71	630,76	1578	63,99	427,11
PI200526 (R)	14	3,43	5,49	14	8,71	41,76	14	16,43	15,96
BRI98-641 (S)	15	3,57	6,42	15	8,44	28,42	15	27,47	402,41
PI200526 vs BRI98-641	1666	3,26	6,61	1657	8,30	42,48	1644	19,37	199,89

Geração	Urédia 1			Urédia 2			Urédia 3		
	n	x	Var.	n	x	Var.	n	x	Var.
PI200487 (R)	14	1,50	0,27	8	2,00	0,001	4	1,00	0,001
BRI98-641 (S)	15	5,40	1,54	9	6,11	1,11	4	5,50	1,00
PI200487 vs BRI98-641	1640	3,12	1,95	1224	2,93	2,11	617	2,92	2,35
PI200526 (R)	14	2,64	0,4	14	2,50	0,27	14	2,21	0,18
BRI98-641 (S)	15	4,87	0,27	15	4,73	0,50	15	4,93	0,35
PI200526 vs BRI98-641	1660	3,15	0,95	1656	3,14	0,84	1638	3,22	0,67

\*(R) e (S): respectivamente, resistente e suscetível a ferrugem asiática da soja.

Nas análises genéticas com base no fenótipo, os efeitos aditivos [d] foram significativos para número de urédias em todas as avaliações para os dois cruzamentos e para severidade 1 e severidade 3 no cruzamento SBR (Tabela 2).

A dominância [h] foi significativa apenas para severidade 2 no cruzamento KBR e para o número de urédias em todas as avaliações do cruzamento SBR e para urédia 2 do cruzamento KBR. A dominância sempre foi direcionada para resistência ou redução da severidade e do número de urédias (Tabela 2).

Nos modelos de variância, a variância aditiva (D) foi significativa em todas as avaliações nos dois cruzamentos, enquanto a variância de dominância (H) participou apenas no modelo para o caráter urédia 1 no cruzamento SBR. A interação genótipo x microambiente (E1 e E2) esteve presente principalmente para o caráter número de urédias no cruzamento KBR (Tabela 2).

Tabela 2. Modelos genéticos de médias e variância, efeito genético aditivo ([d]), dominância ([h]), qui-quadrado ( $\chi^2$ ), graus de liberdade (g.l), probabilidade (P), efeito de variância genética aditiva (D), variância ambiental aditiva (E), efeito microambiente (E1 e E2), herdabilidade ( $h^2$ ), ajustados nos caracteres severidade (1, 2 e 3) e urédias (1, 2 e 3), avaliados para os dois cruzamentos.

Parâmetros genéticos	PI200526	PI200487	PI200526	PI200487	PI200526	PI200487
	x BRI98-641	x BRI98-641	x BRI98-641	x BRI98-641	x BRI98-641	x BRI98-641
	<b>Severidade 1</b>		<b>Severidade 2</b>		<b>Severidade 3</b>	
m	3,26±0,065	12,38±0,21	8,3±0,16	58,18±3,83	19,42±0,35	64,13±0,52
[d]	0,78±0,47	-	-	-	3,20±1,1	-
[h]	-	-	-	-49,90±15,53	-	-
$\chi^2$	0,25	1,16	0,016	0,32	0,93	2,08
g.l	1	2	2	1	1	2
P	0,61	0,56	1	0,57	0,33	0,35
D	1,07±0,26	5,17±1,97	3,38±1,26	63,31±19,50	31,26±7,99	46,15±13,61
E	6,33±0,25	71,08±2,73	41,51±1,60	611,46±24,52	-	412,61±16,39
E1	-	-	-	-	368,63±16,61	-
E2	-	-	-	-	15,89±6,22	-
$\chi^2$	0,099	1,04	0,70	1,33	0,06	1,67
gl	2	2	2	2	1	2
P	0,95	0,59	0,70	0,51	0,8	0,43
$h^2$	54,05	31,01	36,05	37,45	53,0	40,0
	<b>Urédia 1</b>		<b>Urédia 2</b>		<b>Urédia 3</b>	
m	3,75±0,11	3,13±0,43	3,61±0,11	4,05±0,17	3,57±0,095	2,95±0,80
[d]	1,11±0,10	1,73±0,13	1,11±0,11	2,05±0,17	1,36±0,095	1,95±0,81
[h]	-2,42±0,45	-	-1,9±0,47	-4,5±0,73	-1,40±0,40	-
$\chi^2$	-	3,17	-	-	-	1,56
g.l	-	1	-	-	-	1
P	-	0,07	-	-	-	0,21
D	0,80±0,27	2,18±0,31	1,69±0,21	1,78±0,26	1,67±0,18	1,02±0,26
H	3,32±1,14	-	-	-	-	-
E	0,33±0,090	-	0,41±0,058	-	0,25±0,046	-
E1	-	0,28±0,11	-	0,001±0,00053	-	0,001±0,00081
E2	-	2,50±0,23	-	3,30±0,22	-	4,16±0,31
$\chi^2$	0,51	1,10	1,1	1,79	1,62	0,87
g.l	1	1	2	1	2	1
P	0,47	0,29	0,57	0,18	0,44	0,35
$h^2$	32,0	91,0	97,0	83,0	98,0	47,35

\* Nas análises de média no caráter urédia para o cruzamento SRB, não sobraram graus de liberdade para testar o modelo pelo qui-quadrado

A dominância [h] foi significativa apenas para severidade 2 no cruzamento KBR e para o número de urédias em todas as avaliações do cruzamento SBR e para urédia 2 do cruzamento KBR. A dominância sempre foi direcionada para resistência ou redução da

severidade e do número de urédias (Tabela 2). Nos modelos de variância, a variância aditiva (D) foi significativa em todas as avaliações nos dois cruzamentos, enquanto a variância de dominância (H) participou apenas no modelo para o caráter urédia 1 no cruzamento SBR. A interação genótipo x microambiente (E1 e E2) esteve presente principalmente para o caráter número de urédias no cruzamento KBR (Tabela 2).

### Dados qualitativos

Em ambas as populações, a proporção de plantas resistentes e suscetíveis na população F<sub>2</sub> foi de 3:1, indicando a presença de um único gene dominante (*Rpp*) conferindo resistência em Shira Nui e Kinoshita (Tabela 3). Este resultado foi confirmado na geração F<sub>3</sub>, onde se observou a segregação de 1:2:1 envolvendo homocigotos resistentes, heterocigotos e homocigotos suscetíveis das famílias F<sub>2:3</sub> (Tabela 3).

Tabela 3. Resultado das análises de segregação e teste de Qui-quadrado da segregação fenotípica quanto à resistência a ferrugem asiática da soja (geração F<sub>2:3</sub>) e para os marcadores moleculares microssatélites (geração F<sub>2</sub>), na população de mapeamento.

Marcador/caráter	Proporção observada <sup>a</sup>			Proporção esperada <sup>a</sup>			Qui-quadrado <sup>b</sup>	Probabilidade <sup>c</sup> (%)
	A	B	C	A	B	C		
<b>Rpp(Shiranui)F2</b>	96			88,50	29,50		2.542 <sup>ns</sup>	11.08
<b>Rpp(Shiranui)F2:3</b>	27	65	23	29,50	59,0	29,50	2.231 <sup>ns</sup>	32.71
<b>Satt152</b>	28	65	22	29,50	59,0	29,50	2.58 <sup>ns</sup>	27.49
<b>Satt675</b>	28	64	22	29,50	59,0	29,50	2.35 <sup>ns</sup>	30.87
<b>Satt080</b>	30	63	21	29,50	59,0	29,50	2.68 <sup>ns</sup>	26.13
<b>Satt624</b>	28	64	21	29,50	59,0	29,50	2.86 <sup>ns</sup>	23.95
<b>Satt631</b>	27	60	27	29,50	59,0	29,50	0.31 <sup>ns</sup>	83.39
<b>Rpp(Kinoshita)F2</b>	84			33			0.81 <sup>ns</sup>	42.83
<b>Rpp(Kinoshita)F2:3</b>	23	71	23	29,75	59,5	29,75	5.34 <sup>ns</sup>	6.91
<b>Satt080</b>	21	82	13	29,75	59,5	29,75	20.96 <sup>ns</sup>	0.0028
<b>Satt152</b>	28	55	33	29,75	59,5	29,75	0.74 <sup>ns</sup>	69.02
<b>Satt675</b>	24	68	25	29,75	59,5	29,75	3.1 <sup>ns</sup>	21.20
<b>Satt530</b>	24	63	26	29,75	59,5	29,75	1.56 <sup>ns</sup>	45.69
<b>Satt084</b>	31	58	28	29,75	59,5	29,75	0.16 <sup>ns</sup>	92.20

<sup>a</sup> A, B e C representa: genótipo homocigoto equivalente ao da linhagem parental resistente, genótipo heterocigoto e genótipo homocigoto equivalente ao da suscetível, respectivamente.

<sup>b</sup> ns : não significativo ao nível de significância de 5% .

<sup>c</sup> Probabilidade

Foram testados 87 marcadores microssatélites para o cruzamento SBR, sendo 28 marcadores polimórficos, e para o cruzamento KBR foram testados 127 marcadores microssatélites, sendo 39 polimórficos e testados para determinação da ligação com o gene de resistência, ou seja, uma eficiência de 32% e 31%, para cada cruzamento, respectivamente.

Realizada a genotipagem dos indivíduos da geração  $F_2$  com base na avaliação fenotípica das famílias  $F_{2:3}$ , verificaram-se a ligação putativa de cinco deles, ao loco *Rpp* (Kinoshita) pertencentes ao grupo de ligação N, relacionados ao caráter: Satt080, Satt675, Satt530, Satt152 e Satt084. Para o loco *Rpp* (Shira Nui) também se verificou a ligação de cinco marcadores microssatélites no grupo de ligação N, relacionados com o caráter de resistência: Satt631, Satt152, Satt675, Satt624 e Satt080. Esses marcadores foram utilizados para a genotipagem da população de mapeamento  $F_2$ .

A análise de ligação, utilizando o programa computacional Mapmaker, resultou no mapeamento do gene de resistência à ferrugem asiática da soja (*Rpp*) no grupo de ligação N do genoma da soja. Para o *Rpp* (Kinoshita) a distância entre eles são 20,00cM do Satt080, a 13,31cM do Satt675, a 5,51cM do Satt530, a 17,69cM do Satt152 e a 34,96cM do Sat\_084, os quais estão flanqueando o gene de resistência. Para o loco *Rpp* (Shira Nui) a distância entre eles são 7,86cM do Satt080, a 6,94cM do Satt624, a 6,54cM do Satt675, a 8,78cM do Satt152, e a 6,44cM do marcador Satt631, os quais estão flanqueando o gene de resistência (Figura 1). Não houve distorção de segregação significativa para nenhum dos locos de microssatélites analisados de acordo com o teste do  $\chi^2$  ( $P > 0,05$ ) (Tabela 3).

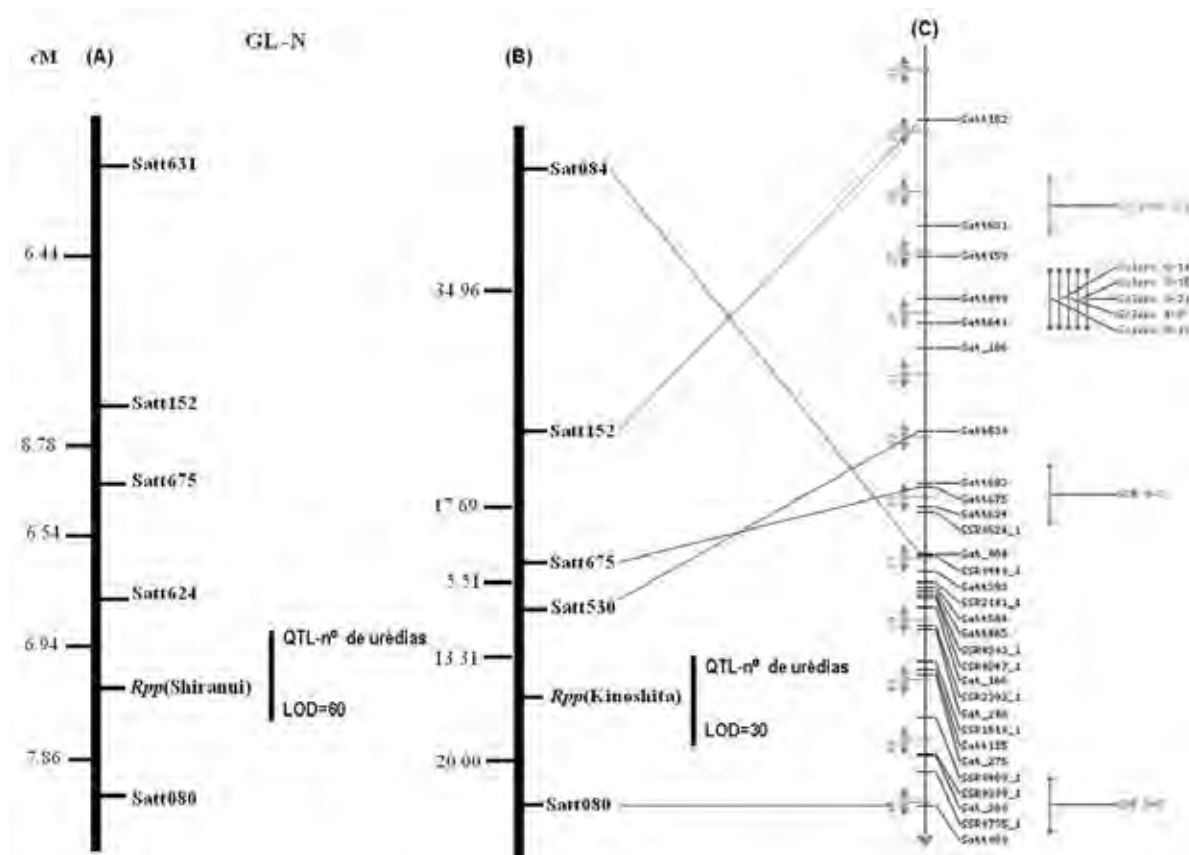


Figura 1. Mapas de ligação da região genômica do *Rpp* Shira Nui (A), *Rpp* Kinoshita (B) e o mapa consenso da soja (C). No lado esquerdo da figura (A e B) é mostrado o mapa genético gerado neste estudo e no lado direito é mostrada parte do grupo de ligação do mapa consenso N. (A) e (B), mostrando os marcadores mapeados na região com distâncias cumulativas em cM. No lado direito do grupo de ligação consenso são mostrados QTLs para locos de resistência mapeados nesta região (SCN - *Soybean Cist Nematode* ou Nematóide de Cisto; SDS - *Sudden death syndrome* ou Síndrome da morte súbita; Lf - Leaf area ou Área foliar; Sclero-Sclerotinia). Estas porções do mapa de ligação consenso foram geradas na página da web do Soybase (mapa físico da cultivar Williams; SOYBASE, 2008). Na porção final de cada mapa, QTLs identificados para número de urédias em associação aos locos de microssatélites nas duas populações.

Foram identificados marcadores em associação com QTLs, envolvidos na resistência à ferrugem asiática da soja avaliadas nas progênies  $F_{2:3}$  para os cruzamentos SBR e KBR. O número médio de urédias foi significativamente associado aos locos dos marcadores microssatélites (Figura 1), enquanto o nível de infecção não foi associado e não integrado ao mapa de ligação.

## **Discussão**

### **Herança dos genes maiores**

Neste estudo, os padrões de segregação observados nos cruzamentos entre essas duas fontes com o genótipo suscetível, demonstraram que as fontes Shira Nui e Kinoshita têm sua resistência determinada por um gene dominante. Uma das fontes de resistência estudadas neste trabalho, a PI 200487 (Kinoshita), está entre as fontes identificadas por LAPERUTA et al. (2008), por apresentar um gene de resistência ativo contra o isolado do fungo que quebrou a resistência conferida pelos genes *Rpp1* e *Rpp3* e por estar em loco diferente em relação aos locos *Rpp2* e *Rpp4*. Nos estudos de alelismo envolvendo cruzamentos dessa fonte com os testadores (*Rpp2* e *Rpp4*) realizados por esses autores, o padrão de segregação foi compatível à presença de dois genes de resistência, um em cada parental.

As fontes PI 200487 e a PI200526, também, foram observadas por PIEROZZI et al. (2008) em estudos de herança com testadores suscetíveis e por RACHID (2008) em estudos de alelismo envolvendo outras fontes de resistência. Esses autores também observaram padrões de segregação compatíveis com a presença de um gene dominante nesses materiais, confirmando os resultados deste trabalho.

## **Herança dos caracteres quantitativos**

A presença da variância genética aditiva (D) significativa em todas as avaliações realizadas para os caracteres severidade e número de urédias nos dois cruzamentos, mostra que existem diferenças genéticas que podem ser exploradas através de seleção nos programas de melhoramento de soja. No caso do caráter severidade, a presença de D na ausência de [d] indica que os genes que controlam o caráter estão dispersos nos dois parentais e, portanto, existem genes desejáveis para redução da severidade não só no parental resistente como também no parental considerado suscetível à doença. Esse fato ocorreu principalmente para o cruzamento KBR e mostra que existem diferenças entre essas duas fontes estudadas, o que se confirma tanto pela presença mais frequente de [d] no cruzamento SBR como pelas diferenças observadas nos valores da média (m) entre cruzamentos.

A dominância esteve presente principalmente nos modelos de médias para o caráter número de urédias do cruzamento SBR, mostrando que, embora a fonte Shira Nui tenha um gene maior mapeando no mesmo GL de Kinoshita, existem outros genes afetando esse caráter que são divergentes nessas duas fontes.

A interação genótipo x microambiente expressa pela presença de E1 e E2 nos modelos de variância principalmente para o caráter número de urédias no cruzamento KBR, indica que alguns genótipos estão reagindo diferencialmente às variações microambientais, o que pode ser um fator complicador nas avaliações e para processos seletivos realizados pelos programas de melhoramento. A presença da interação predominantemente no cruzamento envolvendo a fonte Kinoshita é outro fato que a diferencia da fonte Shira Nui.

As herdabilidades variaram de 31% a 54% para severidade e 32% a 98% para o número de urédias (Tabela 2). Para severidade, o cruzamento SBR se destacou apresentando as maiores herdabilidades na primeira e na última avaliação. Para o número de urédias as herdabilidades foram mais elevadas para a maioria das avaliações



nos dois cruzamentos. No cruzamento KBR, a herdabilidade começou alta na primeira avaliação e foram diminuindo nas demais avaliações.

De um modo geral, o modelo genético aditivo-dominante foi suficiente para explicar os resultados para os dois caracteres quantitativos avaliados nas diferentes épocas, não havendo nenhum indício da presença de efeitos epistáticos ou de interação não alélica afetando a severidade ou o número de urédias. Como a linhagem testadora utilizada nos dois cruzamentos foi a mesma, pode-se concluir que existem genes que contribuem para aumento ou redução da severidade de doença nas folhas nos dois parentais resistentes e também na testadora suscetível envolvidos nos dois cruzamentos. A mesma conclusão não pode ser expandida para o caráter número de urédias, já que houve divergência entre os parentais nos dois cruzamentos ao longo de todas as avaliações e, portanto, os genes que afetam esse caráter podem estar concentrados apenas nos parentais resistentes.

A seleção para o caráter número de urédias é mais eficiente que para o caráter severidade, pois é menos influenciada pelas variações ambientais. Apesar disso, o caráter severidade continua sendo extremamente interessante para processos seletivos, pois ainda permite ganhos com seleção e é mais fácil de ser avaliado.

### **Mapeamento molecular**

Nas duas populações segregantes resistentes à ferrugem asiática da soja o gene *Rpp* foi precisamente mapeado na região central do grupo de ligação N através de marcadores moleculares microssatélites. No cruzamento KBR, os marcadores que flanqueiam o gene são os Satt530 e o Satt080 e para SBR os marcadores que flanqueiam o gene são Satt624 e Satt080 (Figura 1).

O mapeamento molecular resultou na identificação de um novo gene de resistência à ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* posicionado no grupo de ligação N, chamado nesse trabalho de genes *Rpp* (Kinoshita) e *Rpp* (Shira Nui). A identificação de novos genes de resistência à ferrugem asiática da soja é de grande importância para o

melhoramento de plantas aumentando a eficiência do processo de desenvolvimento de cultivares resistentes.

O loco *Rpp* (Kinoshita) foi mapeado entre o Satt080 e o Satt530. Outros marcadores localizados na mesma região (Figura 1B) não foram polimórficos na população utilizada neste estudo. Situação similar ocorreu no loco *Rpp* (Shira Nui). Entretanto, para obter um mapa saturado desta região, esforços adicionais de mapeamento envolvendo diferentes populações e outros tipos de marcadores moleculares são necessários.

O mapa de ligação gerado neste estudo mostrou que a ordem dos marcadores moleculares tem consistência com o mapa de ligação consenso (SONG et al., 2004), com apenas algumas inversões e diferenças mínimas entre as distâncias (Figura 1). As diferenças na posição do mapa são esperadas nas análises de ligação onde as populações geradas para o mapeamento são distintas. Estes mapas podem ser úteis na seleção de marcadores adequados para a seleção assistida por marcadores em programas de melhoramento, visando resistência a este patógeno. Embora alguns dos marcadores mapeados nestas populações não estejam estreitamente ligados aos locos de resistência, outros marcadores localizados na mesma região podem ser úteis em germoplasmas diferentes.

Este estudo também possibilitou evidenciar a presença de QTL relacionado ao caráter urédia para os cruzamentos SBR e KBR com alta variação fenotípica. Esta variação foi explicada pelos marcadores associado ao QTL que se encontram no grupo de ligação N da soja, onde foi mapeado o gene *Rpp* (Kinoshita e Shiranui) (Figura 1). Os marcadores microssatélites que flanquearam o QTL no cruzamento SBR foram os Satt080 e Satt624, como variação de 92% e 91%, respectivamente, confirmando o flanqueamento observado na Figura 1 (A). Para o cruzamento KBR os marcadores microssatélites que flanqueiam o QTL foram os Satt 080 e Satt530 com variações de 84% a 92%, respectivamente, também evidenciado na Figura 2 (B). Estes resultados da associação dos marcadores ao QTLs envolvidos na determinação de urédia estão sendo

determinados pelos efeitos aditivos-dominantes na característica de urédia. O pico do LOD foi acima de 2,0 para todos os tempos avaliados e para todos os marcadores envolvidos no mapa de ligação apresentados na Figura 1 (A-B). A precisão pode ser maior com a inclusão de mais marcadores moleculares aproximando do gene *Rpp* (Kinoshita)

Estes dados são bem semelhantes aos resultados obtidos nos modelos genéticos aditivo-dominante (Tabela 2), onde permite observar estes efeitos atuando sobre o caráter de urédia. Assim, este estudo pode confirmar a presença de QTLs entre os marcadores que flanqueiam os genes *Rpp* (Kinoshita) e *Rpp* (Shiranui), apresentados pelo alto valor da variação fenotípica.

Sabe-se que as plantas possuem um grande número de genes de resistência e, em muitos casos, estes genes estão agrupados em regiões do genoma. Vários genes de resistência a doenças em soja têm sido encontrados agrupados no genoma, especialmente nos grupos de ligação F, G, J e N (LOHNES & SCHMMITTHENNER, 1997) e genes de resistência a nematóides ou QTL são encontrados nos grupos de ligação A2, F, G e O (TAMULONIS et al., 1997; MUDGE et al., 1997). Genes análogos de resistentes (RGA) foram mapeados em soja em alguns grupos de ligação e na proximidade de genes de resistência a doenças e a nematóides (KANAZIN et al., 1996; YU et al., 1996). QTLs para resistência ao fungo patogênico *Sclerotinia sclerotiorum* foram encontrados nos grupos de ligação F, G, J e N (ARAHANA et al., 2001), onde existem concentrações de genes de resistência para outros fungos patogênicos, como o *Fusarium* (SDS), *Phytophthora* (*Rps*) e oídio (*Rmd*) (POLZIN et al., 1994; DEMIRBAS et al., 2001; NITJI et al., 2001). Além disso, no grupo de ligação N, os marcadores Satt009 e Satt387 foram associadas à redução no tamanho da lesão para *Sclerotinia*, com o alelo favorável proveniente do genótipo Williams 82 (ARAHANA et al., 2001). Williams 82 possui o alelo *Rps1<sup>k</sup>* que confere resistência à podridão radicular *Phytophthora* (causada por *Phytophthora sojae* MJ & JW GERDEMANN Kaufmann), que se encontra na mesma região dos dois marcadores (DIERS et al., 1992). Um QTL para resistência à SDS foi localizado próximo ao marcador Satt080 no grupo de ligação N, o marcador Satt 387

também foi fortemente associado com a incidência de doença (SHOEMAKER & SPECHT, 1995; NJITI et al., 2001).

Atualmente, novos marcadores microssatélites baseados no sequenciamento de extremidades de bibliotecas BAC (*Bacterial Artificial Chromosome* ou Cromossomo Artificial Bacteriano) estão sendo desenvolvidos pela Universidade do Sul de Illinois (SCHULTZ et al., 2006). Adicional a estes marcadores, CHOI et al. (2007) adicionaram ao mapa da soja novas sequências únicas de nucleotídeos (*Single Nucleotide Polymorphism* - SNPs). Na região em que os genes *Rpp* (Kinoshita e Shira Nui) estão posicionados encontram-se alguns SNPs disponíveis, o que facilita os estudos de mapeamento com esses marcadores, aumentando a precisão em função da redução das distâncias no mapeamento.

Esforços vêm sendo extensivamente realizados para identificação de genes *Rpp* no genoma da soja. Um primeiro estudo foi obtido na cultivar FT2 em que foi mapeado o gene de resistência *RppFT2* no grupo de ligação C2 (BROGIN, 2005). Nessa mesma região o gene de resistência proveniente do genótipo japonês Hyuuga também foi mapeado entre os marcadores Satt460 e Satt307 (MONTEROS et al., 2007). O gene mapeado na cultivar FT2 não está mais ativo no Brasil devido a alta diversidade e virulência do patógeno, permanecendo ativo somente o gene presente no genótipo Hyuuga. HYTEN (2006) relata, também, que no grupo de ligação C2, na mesma posição onde está localizado o marcador Satt460, encontra-se posicionado o gene de resistência à ferrugem *Rpp3*, mapeados nos genótipos PI 462312 e PI 578457. O loco *Rpp1*, mapeado no grupo de ligação G confere resposta imune ao isolado de ferrugem Índia-73-1, usado no experimento de mapeamento. O locus *Rpp1* foi mapeado entre os marcadores Sct\_187 e Sat\_164, à distância de 0,4 cM de ambos os marcadores (HYTEN et al., 2007). SILVA et al. (2008) mapearam os genes *Rpp2* e *Rpp4* em regiões consideradas hot spots para genes de resistência. O locus *Rpp2* foi mapeado por volta de 25 cM de um *cluster* para genes de resistência no grupo de ligação J, enquanto o locus *Rpp4* foi mapeado no grupo de ligação G, próximo a QTLs para genes de resistência a várias doenças. Dos cinco genes mapeados até o momento, apenas os genes *Rpp2*,

*Rpp4* e *Rpp5* conferem resistência à raça de ferrugem asiática descoberta em 2003 no Brasil (ARIAS et al., 2004; RACHID, 2008).

Estes novos marcadores podem ser úteis para aumentar a densidade de marcadores nestas regiões. Os marcadores microssatélites ligados ao *Rpp* (Kinoshita) e *Rpp* (Shira Nui), descritos neste trabalho, serão de grande utilidade para assistir a introgressão de múltiplos locos em uma única cultivar e terão grande valor como um ponto de início em direção à clonagem destes genes de resistência.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKKAYA, M. S.; SHOEMAKER, R. C.; SPECHT, J. E.; BHAGWAT, A. A.; CREGAN, P. B. Integration of simple sequence repeat markers into a soybean linkage map. **Crop Science**, Madison, v. 35, n. 5, p. 1439–1445, 1995.

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

ARIAS, C. A. A.; RIBEIRO, A. S.; KIIHL, S. (2004) A single gene determining high level of resistance to powdery mildew in soybean In: VII World Soybean Research Conference IV International Soybean Processing and Utilization Conference III Congresso Mundial de Soja, 2004, Iguasu Falls. **Abstracts**... Iguasu Falls: Embrapa, 2004, p. 95.

BACHMAN, M. S.; TAMULONIS, J. P.; NICKELL, C. D.; BENT, A. F. Molecular markers linked to brown stem rot resistance genes Rbs<sub>1</sub> and Rbs<sub>2</sub> in soybean. **Crop Science**, Madison, v.41, n. 2, p.527-53, March-April 2001.

BENEVENTI, M. A.; FUGANTI, R.; SILVA, J. F. V.; ARIAS, C. A. A.; MARIN, S. R. R.; BINNECK, E.; LIMA, C. G.; NEPOMUCENO, A. L. Microsatellite molecular markers associated with selection process of soybean resistant genotypes to Meloidogyne javanica and Heterodera glycines. In: VII World Soybean Research Conference IV International Soybean Processing and Utilization Conference III Congresso Mundial De Soja, 2004, Iguasu Falls. **Abstracts**... Iguasu Falls: Embrapa, 2004, p. 32.

BROGIN, R. L. **Mapeamento de genes de resistência à ferrugem e de QTLs envolvidos na resistência à septoriose em soja**. 2005. 106 p. Tese (Doutorado em

Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”  
Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

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

CHENG, Y. W.; CHAN, K. L. The breeding of ‘Tainung 3’ soybean. **Journal of Taiwan Agricultural Research, Taiwan**, v. 17, p. 30-35, 1968.

CHOI, I. Y.; HYTEN, D. L.; MATUKUMALLI, L. K.; SONG, Q. L.; CHAKY, J. M.; QUIGLE, Y. C. V.; CHASE, K.; LARK, K. G.; REITER, R. S.; YOON, M. S.; HWANG, E. Y.; YI, S. I.; YOUNG, N. D.; SHOEMAKER, R. C.; VAN TASSELL, C. P.; SPECHT, J. E.; CREGAN, P. B. A soybean transcript map: Gene distribution haplotype and single-nucleotide polymorphism analysis. **Genetics**, Baltimore, v.176, n.1, p.685-696, May 2007. DOI: 10.1534/**Genetics**.107.070821

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**, Madison, v. 39, n.5, p. 1464–1490, Set.-Oct. 1999.

DEMIRBAS, A.; RECTOR, B. G.; LOHNES, D. G.; FIORITTO, R. J.; GRAEF, G. L.; CREGAN, P. B.; SHOEMAKER, R. C.; SPECHT, J. E. Simple sequence repeat markers linked to the soybean *Rps* genes for phytophthora resistance. **Crop Science**, Madison, v. 41, n. 4, p. 1220-1227, July-Aug. 2001.

DIERS, B. W. L.; MANSUR, J. IMSANDE, AND R.C. SHOEMAKER. Mapping Phytophthora resistance loci in soybean with restriction length polymorphism markers. **Crop Science**, Madison, v. 32, n.2, p. 377–383, 1992.

EMBRAPA. **Embrapa Soja divulga balanço sobre a ferrugem na safra de 2007/08.**

Disponível em <[http://www.cnpso.embrapa.br/noticia/ver\\_noticia.php?cod\\_noticia=469](http://www.cnpso.embrapa.br/noticia/ver_noticia.php?cod_noticia=469)>  
Acesso em 05 ago. 2008.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stages of soybean development: Special Report 80.**  
Ames: ISU, 1977.

FRONZA, V. **Genética da reação da soja a *Fusarium solani* f sp *glycines*.** 2003. 154 p.  
Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de  
Agricultura "Luiz de Queiroz" Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

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

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**, New York, v.  
117, n. 4, p. 545-553, August 2008.

GODOY, C.V. 2005. **Asian Soybean Rust: Anti-Rust Consortium. 1 Jan.–4 Feb. 2005.**  
Embrapa-Soja, Londrina

HARTWIG, E. E. Identification of a fourth major gene conferring resistance to soybean  
rust. **Crop Science**, Madison, n. 6, v. 26, p. 1135-1136, 1986.



HIDAYAT, O. O.; SOMAATMADJA, S. Screening of soybean breeding lines for resistance to soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow). **Soybean Rust Newsletter**, v. 1, p. 9-22, 1977.

HNETKOVSKY, N.; CHANG, S .C.; DOUBLER, T. W.; GIBSON, P. T.; LIGHTFOOT, D. A. Genetic mapping of loci underlying field resistance to soybean sudden death syndrome (SDS). **Crop Science**, Madison, n. 2, v. 36, p.393-400, 1996.

HYTEN, D.L. Mapping Soybean Rust Single Gene Resistance. In: National Soybean Rust Symposium, 2006, St. Louis. **Anais...** St. Louis: Beltsville Area / Soybean Genomics and Improvement LaboratoryUnited, 2006, p. 18.

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**, Madison, v. 47, p. 837-838, Mar.-Apr. 2007.

HYTEN, D.L; SMITH, J.R.; FREDERICK, R.D.; TUCKER, M.L.; SONG, Q.; CREGAN, P.B. Bulk segregant analysis using the GoldenGate assay to locate the *Rpp3* locus that confers resistance to soybean rust in soybean. **Crop Science**, Madison, v. 49, p. 265-271, 2009.

KANAZIN, V.; MAREK, L. F.; SHOEMAKER, R. C. Resistance Gene Analogs are conserved and clustered in soybean. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, n. 21, p. 11746-11750, Oct. 1996.

KEIM, P.; OLSON, T. C.; SHOEMAKER, R. C. A rapid protocol for isolating DNA. **Soybean Genetics Newsletter**, Baltimore, v.15, n. 2-3, p.150-152, April 1988.

KLOS, K. L. E.; PAZ, M. M.; FREDERICK-MAREK, L.; CREGAN, P. B.; SHOEMAKER, R. C. Molecular markers useful for detecting resistance to brown stem rot in soybean. **Crop Science**, Madison , v. 40, n. 5,p. 1445-1452, September 2000.

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

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

LAPERUTA, L. D. I. C.; ARIAS, C. A. A.; RIBEIRO, A. S; RACHID, B. F.; PIEROZZI, P. H. B, TOLEDO, J. F. F.; PÍPOLO, A. E.; CARNEIRO, G. E. S. New genes conferring resistance to Asian soybean rust: allelic testing for the *Rpp2* and *Rpp4* loci. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, n.12, p.1741-1747, Dez. 2008.

LOHNES, D.G.; SCHMMITTHENNER, A.F. Position of the Phytophthora resistance gene *Rps7* on the soybean molecular map. **Crop Science**, Madison, v.37, p.555–556, 1997.

MARTINS, M. C.; GUERZONI, R. A.; CÂMARA, G. M. S.; MATTIAZZI, P.; LOURENÇO, S. A.; AMORIN, L. Escala Diagramática para a Quantificação do complexo de Doenças Foliares de Final de Ciclo em Soja. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p.179 -184, 2004.

MATHER, K.; JINKS, J. L. **Biometrical Genetics**. 3rd Edition, London: Chapman and Hall.

MICHELMORE, R. W.; PARAN, I.; KESSELI, R. V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis - a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proceedings of the**

**National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.88, n.21, p.9828-9832, November 1991.

MONTEROS, M. J.; MISSAOUI, A. M.; PHILLIPS, D. V.; WALKER, D. R.; BOERMA, A. H. R. Mapping and Confirmation of the 'Hyyuga' Red-Brown Lesion Resistance Gene for Asian Soybean Rust. **Crop Science**, Madison, v.47, n.2, p.829-834, Mar.-April 2007.

MUDGE, J. P.B. CREGAN, J.P. KENWORTHY, W.J. KENWORTHY, J.H. ORF, N.D. YOUNG. Two microsatellite markers that flank the major soybean cyst nematode resistance locus. **Crop Science**, Madison, v.37, p.1611–1615, 1997.

NJITI, V. N.; MEKSEM, K.; IQBAL, M. J.; JOHNSON, J. E.; KASSEM, M. A.; ZOBRIST, K. F.; KILO, V. Y.; LIGHTFOOT, D. A. Common loci underlie field resistance to soybean sudden death syndrome in Forrest, Pyramid, Essex, and Douglas. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.104, n.2, p.294-300, February 2001.

PIEROZZI, P. H. B.; RIBEIRO, A. S.; MOREIRA, J. U. V.; LAPERUTA, L. C.; RACHID, B. F.; LIMA, W. F.; ARIAS, C. A. A.; OLIVEIRA, M. F.; TOLEDO, J. F. F. de. New soybean (*Glycine max*, Fabaceae) sources of qualitative genetic resistance to Asian soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* (Uredinales, Phakopsoraceae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 2, p. 505- 511, September 2008.

POLZIN, K. M.; LOHNES, D. G.; NICKELL, C. D.; SHOEMAKER, R. C. Integration of *Rps2 Rmd* and *Rj2* Into Linkage Group-J of the Soybean Molecular Map. **Journal of Heredity**, Cary, v. 85, n. 4, p. 300-303, July 1994.

RACHID, B. **Identificação de novos locos de resistência à ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) em soja (*Glycine max*)**. 2008. 88p. Dissertação (Mestrado em

Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

SANDHU D.; SCHALLOCK K.G.; RAIVERA-VELEZ N.; LUNDEEN P.; CIANZIO S.; BHATTACHARY M.; K. Soybean Phytophthora resistance gene *Rps8* maps closely to the *Rps3* region. **Journal of Heredity**, Cary, v. 96, n. 5, p. 536–541, June 2005.

SCHULTZ, J. L.; KURUNAM, D.; SHOPINSKI, K.; IQBAL, M. J.; KAZI, S.; ZOBRIK, K.; BASHIR, R.; YAEGASHI, S.; LAVU, N.; AFZAL, A. J.; YESUDAS, C. R.; KASSEM, M. A.; WU, C. C.; ZHANG, H. B.; TOWN, C. D.; MEKSEM, K.; LIGHTFOOT, D. A. The soybean **Genome** database (SoyGd): a browser for display of duplicated, polyploid, regions and sequence tagged sites on the integrated physical and genetic maps of *Glycine max*. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 34, supplement 1, p. 758-765, Jan. 2006.

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

SILVA, D. C. G.; YAMANAKA, N.; BROGIN, R. L.; ARIAS, C. A. A.; NEPOMUCENO, A. L.; DI MAURO, A. O.; PEREIRA, S. S.; NOGUEIRA, L. M.; PASSIONOTTO, A. L.; ABDELNOOR, R. V. Molecular mapping of two loci that confer resistance to Asian rust in soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.117, n.1, p.57-63, June 2008.

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

SOYBASE. **Soybase and the soybean breeder's toolbox**. Ames, IA. Disponível em <<http://soybase.org/>>. Acesso 11 Outubro 2008.

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

YU, Y. G.; BUSS, G. R.; SAGHAI-MAROOF, M. A. Isolation of a superfamily of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, n. 21, p. 11751–11756, October 1996.

### **CAPITULO 3 - MAPEAMENTO MOLECULAR DE UM NOVO GENE DE RESISTÊNCIA AO OÍDIO DA SOJA**

**RESUMO** - O oídio da soja, *Erysiphe diffusa*, desde a safra de 1996/97, passou a provocar perdas no rendimento de até 40% no Brasil. Dentre as principais alternativas para o combate do patógeno está o uso de cultivares resistentes. O principal objetivo deste trabalho foi estudar a herança e mapear um novo gene de resistência ao oídio da soja e para tal uma população F<sub>2:3</sub>, derivada do cruzamento BR01-22106 (resistente) e PI 200487 (suscetível), foi utilizada. A presença ou ausência da doença foi avaliada sobre a população e sobre os parentais, naturalmente infectados pelo fungo em condições de casa-de-vegetação, sendo os indivíduos classificados como resistentes (sem sintomas) ou suscetíveis (com sintomas). A população de mapeamento foi avaliada com marcadores microssatélites, realizando-se previamente uma análise de 10 indivíduos resistentes e 10 indivíduos suscetíveis, para identificação de marcadores ligados. O caráter resistência ao oídio nesta população foi determinado por um único gene dominante e o estudo permitiu o mapeamento de um loco red no grupo de ligação C2 da soja. Os marcadores associados terão grande valor no processo de seleção assistida para este caráter, auxiliando na manutenção da competitividade e sustentabilidade do agronegócio brasileiro da soja.

Palavras-Chave: *Glycine max*, microssatélites, *Erysiphe diffusa*

## Introdução

A crescente expansão da cultura da soja para novas fronteiras agrícolas brasileiras com diferentes condições edafo-climáticas tem aumentado as demandas por tecnologias que dêem sustentação ao sistema de produção, como a resistência genética a doenças.

O oídio da soja *Erysiphe diffusa* [(Cooke & Peck); BRAUN & TAKAMATSU, 2000], era considerado uma doença secundária no Brasil e, a partir da safra de 1996/97, passou a ocorrer de forma generalizada em várias regiões sojícolas, provocando perdas no rendimento de até 40% e tornando-se uma das doenças mais importantes dessa leguminosa.

Cultivares resistentes tem-se tornado suscetíveis indicando a variabilidade do patógeno, porém faltam estudos que confirmem a existência de raças fisiológicas. Estudos moleculares das regiões espaçadoras internas transcritas (*Internal Transcribed Spacer* - ITS) do rDNA vem sendo utilizadas para identificar quais espécies de oídio estão presentes em soja (*Glycine max*) (ALMEIDA et al., 2008). As observações sobre a variabilidade patogênica de *E. diffusa* tem sido circunstanciais e baseadas em variações das reações das cultivares em diferentes anos ou regiões produtoras de soja.

Estudos sobre herança da resistência ao oídio em soja demonstram que existem pelo menos dois genes responsáveis pela resistência. Um gene dominante, denominado *Rmd-c*, mantém a planta resistente durante todo o ciclo da soja (LOHNES & BERNARD, 1992). Outro gene, também dominante e denominado de *Rmd*, é responsável por conferir resistência de planta adulta (MIGNUCCI & LIM, 1980). No caso, as plantas apresentam suscetibilidade na fase inicial de desenvolvimento, porém, adquirem resistência à medida que vão atingindo a fase adulta. Sob condições menos favoráveis ao oídio da soja as plantas com o gene *Rmd* apresentam pouco ou nenhum oídio no campo. Aparentemente, a variabilidade patogênica do fungo tem superado a resistência de algumas cultivares, exigindo contínuo trabalho de melhoramento genético de soja e estudo da diversidade de genes resistentes nos germoplasmas disponíveis.

Marcadores microssatélites são uma excelente ferramenta molecular para o posicionamento de características agronômicas nos cromossomos, com as vantagens de serem eficientes, codominantes, estáveis e abundantes, e baseados em reação de polimerase em cadeia (*Polymerase Chain Reaction* – PCR). Até hoje, vários microssatélites foram identificados e distribuídos ao longo dos cromossomos pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (*United States Department of Agriculture* - USDA-ARS), proporcionando uma excelente cobertura do genoma da soja. (SONG et al., 2004). Marcadores microssatélites tem também sido amplamente utilizados para detecção de diversidade genética, identificação genética de cultivares, genotipagem e seleção assistida por marcadores em soja.

Este trabalho visou estudar a herança e mapear um novo gene de resistência ao oídio da soja, dando subsídios a programas de melhoramento da soja para resistência/tolerância a esse patossistema, auxiliando na manutenção da competitividade e sustentabilidade do agronegócio brasileiro da soja.

## **Material e Métodos**

O presente trabalho foi realizado utilizando a estrutura (casa-de-vegetação e Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Bioinformática) do Centro Nacional de Pesquisa de Soja. A população de mapeamento foi constituída de 109 indivíduos  $F_2$  e respectivas famílias  $F_{2:3}$ , originadas do cruzamento da linhagem BRI01-22106, resistente, e o genótipo PI 200487, suscetível ao oídio. As sementes dos parentais foram obtidas da coleção do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Soja (Londrina, Paraná, Brasil). A linhagem BRI01-22106 foi desenvolvida pelo programa de melhoramento da Embrapa Soja, por possuir características agronômicas desejáveis de resistência à doenças e pragas. ARIAS et al. (2004), através de estudos de herança constataram na linhagem BR01-22106 apenas um gene dominante de resistência ao oídio da soja.



Em condições de casa-de-vegetação, principalmente no inverno, é comum o aparecimento da doença sem necessidade de inoculação. Para garantir a presença do patógeno foram mantidas plantas suscetíveis em fase anterior à instalação do experimento, considerando-se que se trata de um parasita obrigatório. A infecção das plantas no experimento ocorreu naturalmente, sem a necessidade de inoculação. Não houve necessidade de nebulização com água, já que o fungo se desenvolve sobre folhas secas.

O experimento foi instalado em casa-de-vegetação em maio de 2006, com temperatura controlada, variando de 18 a 25°C. A população  $F_2$  foi avaliada qualitativamente, sob um delineamento em blocos casualizados. Em março de 2007, foram avaliados 15 indivíduos de cada genótipo parental (BRI01-22106 e PI 200487) e de cada uma das 109 famílias  $F_{2:3}$ . O experimento foi conduzido sob um delineamento em blocos ao acaso, sendo cada parcela constituída de uma planta. A semeadura foi realizada em vasos de 4,5 kg, contendo uma mistura de solo, areia e esterco.

Os parentais, a população  $F_2$  e as famílias  $F_{2:3}$  foram avaliadas qualitativamente, após o florescimento classificando as plantas como resistentes (ausência de sintoma) ou suscetíveis (presença de sintoma). Cada família  $F_{2:3}$ , constituída de 15 plantas, foi independentemente avaliada durante três semanas consecutivas, o que permitiu a classificação de cada uma das 109 famílias  $F_{2:3}$  como homozigota resistente, heterozigota resistente ou homozigota suscetível.

As amostras de tecido foliar dos parentais e da população  $F_2$ , constituídas de três folhas recém expandidas (estádio V2), foram coletadas e armazenadas no ultra freezer (-80°C). O DNA das amostras foi purificado de acordo com o protocolo descrito por KEIM et al. (1988), com algumas modificações. O DNA foi então quantificado por análise espectrofotométrica, através da leitura de absorbância a 260nm e 280nm, e a integridade foi verificada em gel de agarose 0,8%.

Foi verificado inicialmente polimorfismos entre os parentais BRI01-22106 e PI200487 através dos marcadores microssatélites, que foram previamente desenvolvidos (SONG et al., 2004). Os marcadores microssatélites testados foram escolhidos para se

conseguir uma cobertura a cada 30 cM nos 20 grupos de ligação da soja (SONG et al., 2004). Para facilitar a busca de possíveis marcadores ligados aos genes de resistência ao oídio da soja, foi utilizada uma estratégia baseada na análise de agrupamentos segregantes (*Bulked Segregant Analysis* - BSA; MICHELMORE et al., 1991), com modificações. Foram formados dois grupos, o primeiro consistindo de 10 indivíduos caracterizados como resistentes e 10 indivíduos caracterizados como suscetíveis, escolhidos com base nas avaliações fenotípicas das famílias F<sub>2:3</sub>, permitindo a seleção de somente plantas homozigotas para cada fenótipo diferente. As amostras de DNA dos genitores e dos dois agrupamentos, para cada cruzamento, foram usadas para a análise de microssatélites. Para confirmar uma possível ligação, marcadores polimórficos encontrados entre os agrupamentos com diferenças alélicas foram usados para genotipar os indivíduos de toda a população F<sub>2</sub>.

Para que os resultados tivessem ainda uma maior eficiência para encontrar uma possível ligação, buscaram-se também marcadores microssatélites ligados a genes de resistência a patógenos, como resistência a *Phakopsora pachyrhizi* (BROGIN, 2005; MONTEROS et al.; HYTEN et al., 2007; SILVA et al., 2008), *Phytophthora* (SANDHU, 2005), *Microsphaera diffusa* (POLZIN et al., 1994), *Meloydogine javanica* (FUGANTI et al., 2004), *Fusarium solani* f. sp. *glycines* (FRONZA, 2003) *Heterodera glycines* (SCHUSTER et al., 2001;), *Phialophora gregata* (BACHMAN et al., 2001), entre outros.

As amplificações foram feitas através da técnica de PCR, de acordo com a metodologia descrita por AKKAYA et al. (1995), com modificações. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, por aproximadamente 4 horas. Para estimar o tamanho dos fragmentos foram utilizados marcadores com fragmentos de DNA padrão com escala de 100 pares de bases (pb). Os fragmentos obtidos foram corados com brometo de etídio e a aquisição da imagem foi realizada através do sistema digital Kodak DC 290.

Todos os marcadores microssatélites foram testados para associação de significância com a resistência ao oídio usando teste de aderência ao modelo de um locus co-dominante utilizando o teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) ( $P > 0,05$ ), utilizando o programa

Mapmaker/EXP (LANDER et al., 1987). Para as análises genéticas, a resistência ao oídio da soja foi tratada como caráter qualitativo, através dos resultados das progênes  $F_{2:3}$ . Para a análise de ligação o mesmo padrão de codificação foi utilizado tanto para caracterizar a reação fenotípica ao oídio como para genotipagem dos marcadores microssatélites nos indivíduos da geração  $F_2$ , ou seja, a reação fenotípica foi codificada como um marcador molecular e mapeada como uma característica qualitativa. O programa (Mapmaker/EXP) foi utilizado para a realização da análise de ligação com o valor de LOD score mínimo de 3,0 e opção de função de mapeamento de Kosambi (KOSAMBI, 1944), com distância máxima de 37,2 centiMorgan (cM).

## **Resultados e Discussão**

As plantas com sintomas de oídio foram visualizadas já nos primeiros estágios foliares de crescimento, enquanto as avaliações das populações  $F_2$  e  $F_{2:3}$  foram iniciadas no estágio  $V_2$ . A linhagem BR01-22106 não apresentou sintoma de oídio, confirmando sua resistência, enquanto o genótipo PI200487, suscetível, dado a presença de sintomas de oídio.

Nas avaliações fenotípicas da população  $F_{2:3}$  observou-se que as plantas tiveram comportamento de resistência parcial e resistência completa, pois ao longo das avaliações plantas consideradas suscetíveis, tiveram os sintomas diminuídos até o completo desaparecimento. AZEVEDO et al. (2005), observando a estabilidade nos genótipos de soja em relação à infecção ao oídio, classificou como resistentes, moderadamente resistentes, suscetíveis e moderadamente suscetíveis. Essas variações encontradas na resistência podem ser resultantes da existência de variabilidade do patógeno (raças fisiológicas), ou da influência de alguns genes presentes no parental suscetível que estão controlando a característica de resistência e suscetibilidade na população. Embora pouco se saiba sobre a base genética desse fenômeno, maior resistência de plantas adultas ao oídio tem sido observada neste trabalho.

Das 109 famílias  $F_{2:3}$ , 31 foram caracterizadas como homozigotas resistentes, 60 heterozigotas resistentes e 18 homozigotas suscetíveis, considerando que das plantas  $F_2$  que deram origem a essas progênes, 86 foram resistentes e 23 foram suscetíveis. A diminuição de indivíduos suscetíveis nas famílias  $F_{2:3}$  estão relacionados com o aumento de indivíduos heterozigotos nesta população, uma vez que se tem uma representação maior de cada indivíduo. Essa proporção observada foi testada para verificar a conformidade com a proporção mendeliana esperada de 3:1, se adequando satisfatoriamente aos dados (Tabela 1), confirmando o trabalho de ARIAS et al. (2004) em que a resistência oriunda da BR01-22106 é condicionada por um gene único dominante.

Tabela 1. Dados referentes a análises de segregação e teste de Qui-quadrado da segregação fenotípica quanto à resistência a *Erysiphe diffusa* (geração  $F_{2:3}$ ) e para os marcadores moleculares microssatélites (geração  $F_2$ ), na população de mapeamento.

Marcador/caráter	Proporção observada <sup>a</sup>			Proporção esperada <sup>a</sup>			Qui-quadrado <sup>b</sup>	Probabilidade <sup>c</sup> (%)
	A	B	C	A	B	C		
<b>Red (<math>F_2</math>)</b>	86	23		81,75	27,25		0,884 <sup>ns</sup>	34.71
<b>Red (<math>F_{2:3}</math>)</b>	31	60	18	27,25	54,5	27,25	4,211 <sup>ns</sup>	12.17
<b>Satt277</b>	29	62	18	27,25	54,5	27,25	4,284 <sup>ns</sup>	11.73
<b>Satt460</b>	27	61	21	27,25	54,5	27,25	2,211 <sup>ns</sup>	33.10
<b>Satt263</b>	30	56	23	27,25	54,5	27,25	0,982 <sup>ns</sup>	61.21
<b>Satt307</b>	25	64	20	27,25	54,5	27,25	3,771 <sup>ns</sup>	15.17
<b>Satt316</b>	24	63	22	27,25	54,5	27,25	2,725 <sup>ns</sup>	25.60
<b>Satt357</b>	23	62	24	27,25	54,5	27,25	2,083 <sup>ns</sup>	35.30
<b>Satt708</b>	86	21		81,75	27,25		1,648 <sup>ns</sup>	19.92

<sup>a</sup> A, B e C representa: genótipo homozigoto equivalente ao da linhagem parental resistente, genótipo heterozigoto e genótipo homozigoto equivalente ao da suscetível, respectivamente.

<sup>b</sup> ns : não significativo ao nível de significância de 5% .

<sup>c</sup> Probabilidade a 5% de significância

Com o uso de marcadores moleculares foi possível localizar o gene de resistência a oídio no genoma da soja. Foram testados 83 marcadores microssatélites para verificar polimorfismo entre os genótipos parentais BR01-22106 e PI 200487. Um total de 53 marcadores microssatélites apresentou polimorfismo (aproximadamente 64%) e foram

utilizados no mapeamento. Em outros trabalhos de mapeamento na soja, níveis de polimorfismo foram encontrados, variando de 43% a 37% (SILVA et al., 2008).

Para a identificação dos marcadores ligados a resistência ao oídio, inicialmente 10 plantas F<sub>2</sub> homocigotas resistentes e 10 homocigotos suscetíveis que foram selecionadas com base na avaliação da população F<sub>2:3</sub>, foram analisadas com os marcadores polimórficos. Verificou-se a ligação putativa de sete deles com o caráter de resistência: Satt277, Satt460, Satt307, Satt316, Satt357, Satt708 e Sat\_263. Esses marcadores, que pertencem ao grupo de ligação C2, foram utilizados para a genotipagem da população de mapeamento F<sub>2</sub>. Todos apresentaram herança mendeliana e não houve distorção de segregação significativa para quaisquer locos de microssatélites analisados, de acordo com o teste do  $\chi^2$  ( $P > 0,05$ ) (Tabela 1), e apenas um marcador microssatélite teve padrão de dominância.

O mapeamento molecular utilizando marcadores microssatélites resultou na identificação de um novo gene de resistência ao oídio da soja Erishype diffusa, chamado nesse trabalho de gene *Red*, que foi posicionado no grupo de ligação C2, flanqueado pelos marcadores Satt307 e Sat\_263 (Figura 1). Essa região do grupo de ligação C2 tem sido associada com resistência a doenças fúngicas, nematóides e insetos, como genes relacionados à resistência a ferrugem, morte súbita e nematóide de cisto da soja.

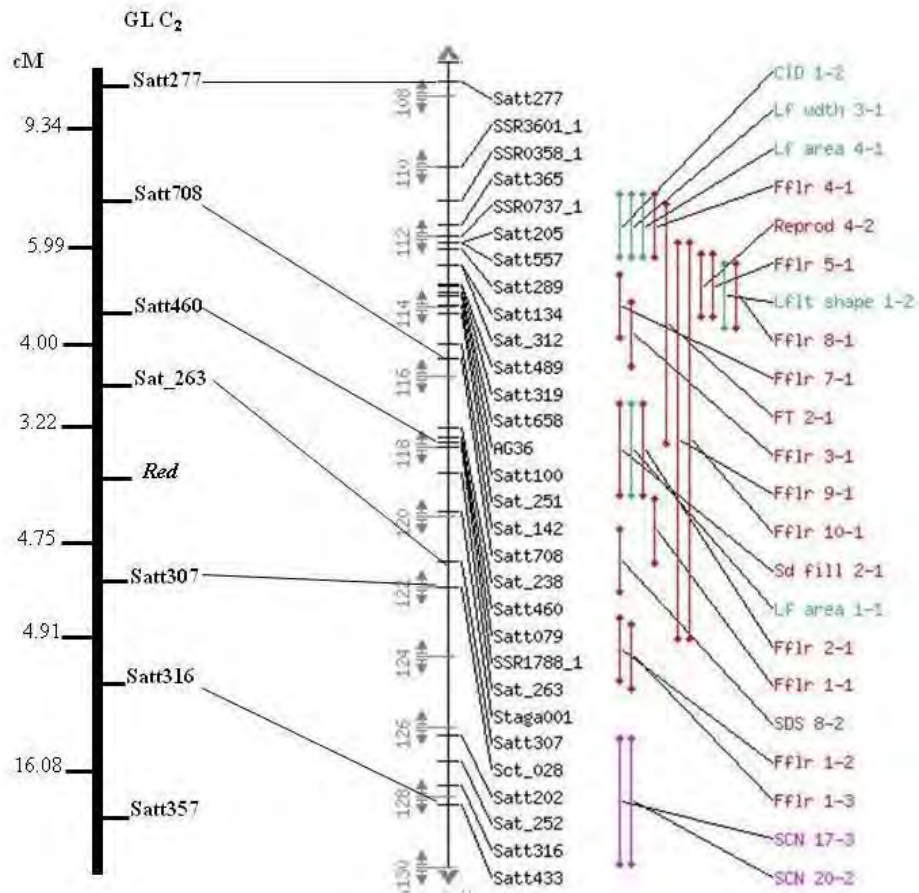


Figura 1. Mapa de ligação da região genômica do gene *Red*. No lado esquerdo é apresentado o mapa genético gerado neste estudo e no lado direito é mostrada parte dos grupos de ligação consenso C2, indicando os marcadores mapeados na região com distâncias cumulativas em cM. No lado direito do grupo de ligação consenso são mostrados QTLs para locos de resistência mapeados nesta região (SCN - *Soybean Cist Nematode* ou Nematóide de Cisto; SDS - *Sudden death syndrome* ou Síndrome da morte súbita; Reprod - *Reproductive period* ou Período Reprodutivo; Lf - *Leaf area* ou Área foliar; Lf width-*Leaf width* ou Largura da folha; Lflr shape - *Leaflet Shape* ou Formato da folha; Fflr - *First flower* ou Início do florescimento; Sd fill - *Seed filling* ou Enchimento de grãos; CID - *Carbon isotope discrimination* ou discriminação isotópica do carbono). Estas porções do mapa de ligação consenso foram geradas na página da web do Soybase (mapa físico da cultivar Williams; Soybase, 2008).

A identificação de novos genes de resistência ao oídio da soja é de grande importância para o melhoramento de plantas aumentando a eficiência do processo de desenvolvimento de cultivares resistentes.

Os genes de resistência a ferrugem oriundos da cultivar FT-2 e Hyugga foram mapeados no mesmo intervalo do gene *Red* (BROGIN, 2005; MONTEROS et al., 2007), entre os marcadores Satt307 e Satt460. No entanto, ainda não se têm dados confirmando se são dois genes de resistência independentes ou se são alelos do mesmo loco, considerando que a resistência da cultivar FT-2 foi quebrada, permanecendo ativa apenas a fonte de resistência 'Hyuuga'. HYTEN (2006) relata, também, que nessa mesma posição, próximo ao marcador Satt460, encontra-se posicionado o gene de resistência à ferrugem *Rpp3*, mapeados nos genótipos, PI 462312 e PI 578457. A distância entre os genes de resistência à ferrugem ('Hyuuga', PI 462312 e PI 578457) é menor que 2,3cM de distância do gene de resistência *Red*, mostrando uma possível existência de um agrupamento de genes de resistência nessa região. Um QTL de resistência a SDS foi identificado próximo ao marcador Satt307 no cruzamento Pyramid x Douglas (NJITI et al., 2002), enquanto que um QTL para resistência a nematóide de cisto em soja (*Heterodera glycines Ichinobe*) foi localizado próximo a Satt100, no grupo de ligação C2 (WANG et al., 2001).

Agrupamentos de genes de resistência não são incomuns, tendo sido registrados em várias espécies de plantas (MILCHELMORE et al., 1998), inclusive em soja. KANAZIN et al. (1996) mapeou em oito diferentes grupos de ligação da soja (D1, H, J, L, M, N e P) classes de análogos de genes de resistência (*Resistance Gene Analogs* – RGAs), sendo encontrados individualmente e agrupados. Genes de resistência a doenças em soja como *Rps1*, *Rmd*, *Rps2* e *Rj2* e genes que conferem resistência a nematóide de cisto foram mapeados agrupados no grupo de ligação J (LHONES et al., 1993). Em *Arabidopsis*, tem se evidenciado que pelo menos 21 loci de doenças diferentes estão associados com RGAs (AARTS et al., 1998).

A ligação existente entre o gene *Red* e outros genes de resistência pode ser bastante útil no desenvolvimento de linhagens de soja com resistência a múltiplos

patógenos. Como o oídio pode ser facilmente avaliado em casa-de-vegetação, o gene *Red* pode ser útil como marcador para seleção indireta para resistência a ferrugem e outras doenças. Como esses genes estão em associação, mas em plantas diferentes, uma estratégia seria agrupar os genes em um único genótipo, aumentando assim a precisão da utilização de marcadores. Estratégia semelhante foi relatada por LHONES & NICKELL (1994) com o gene *Rmd* com relação ao gene *Rps2* que confere resistência a *Phytophthora* durante a transferência dos alelos de resistência a cultivares elite.

Os marcadores mapeados nesse trabalho foram comparados com o mapa consenso de SONG et al. (2004), sendo observado que não houve inversão na posição dos marcadores, e as distâncias dadas em cM em relação ao mapa consenso apresentaram diferenças mínimas.

Outro gene de resistência ao oídio (*Microsphaera diffusa-Rmd*) foi anteriormente mapeado no grupo de ligação J (POLZIN et al., 1994), mostrando que a linhagem BRI01-22106 apresenta um novo gene de resistência. Deste modo, os marcadores Sat\_263 e Satt307, que flanqueiam o gene *Red*, posicionados em uma distância de 3,22 e 4,74cM, respectivamente, serão importantes para auxiliar na seleção assistida de genótipos homocigotos contendo esse gene e facilitando a introgressão de locos de resistência ao oídio da soja em cultivares elites. Saturação de novos marcadores moleculares nessa região e clonagem de genes de resistência em plantas facilitará o entendimento de mecanismos moleculares e evolução de resistência para o oídio da soja e permitirá seleção assistida de marcadores em programas de melhoramento. CHOI et al. (2007), adicionaram ao mapa de ligação da soja novas sequências únicas de nucleotídeos (SNP's). Na região em que o gene está posicionado encontram-se alguns SNP's disponíveis, o que facilita os estudos de mapeamento com esses marcadores, aumentando a precisão em função da redução das distâncias no mapeamento. GRIMMER et al. (2007) mapearam cinco genes dominantes de resistência ao oídio em beterraba utilizando marcadores RFLP, ancorados com marcadores SNP's.

A identificação de novos genes de resistência ao oídio da soja é de grande importância para o melhoramento de plantas aumentando a eficiência do processo de



desenvolvimento de cultivares resistentes através da seleção assistida por marcadores. Além disso, o uso de marcadores mais próximos possibilitaria a exploração de bibliotecas genômicas de soja, com a identificação de clones BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*) contendo o gene de resistência ao oídio da soja, o que poderia levar a clonagem desse gene. Dessa forma sua seqüência seria conhecida e marcadores específicos poderiam ser desenvolvidos, permitindo inclusive a comparação com outros genes de resistência a doenças já clonados. No entanto, estudos adicionais são necessários para confirmar essas hipóteses e explorar melhor essa região onde o gene de resistência ao oídio está localizado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKKAYA, M.S.; SHOEMAKER, R.C.; SPECHT, J.E.; BHAGWAT, A.A.; CREGAN, P.B. Integration of simple sequence repeat DNA markers into a soybean linkage map. **Crop Science**, Madison, v. 35, p. 1439-1445, 1995.

AARTS, M. G.; HEKKERT, B. L.; HOLUB, E. B.; BEYNON, J. L.; STIEKEMA, W. J.; PEREIRA, A. Identification of R-gene homologous DNA fragments genetically linked to disease resistance loci in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant-Microbe Interact**, Saint Paul, v.11, n.4, p.251-258, April 1998.

ALMEIDA, A. M.; BINNECK, E.; PIUGA, F. F.; MARIN, S. R. R.; RIBEIRO, V.; SILVEIRA, C. A. Characterization of powdery mildews strains from Soybean bean sunflower and weeds in Brazil using rDNA-ITS sequences. **Tropical Plant Pathology**, v.33, n.1, p.020-026, January-Febrero 2008.

ARIAS, C. A. A.; RIBEIRO, A. S.; KIIHL, S. A single gene determining high level of resistance to powdery mildew in soybean In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 7., INTERNATIONAL SOYBEAN PROCESSING AND UTILIZATION CONFERENCE, 4., CONGRESSO MUNDIAL, 3., 2004, Foz do Iguaçu. **Abstract...** Foz do Iguassu: Embrapa Soja, 2004. 95p.

AZEVEDO, P. H.; AZEVEDO, V. H.; SEDIYAMA, T.; REIS, M. S.; TEIXEIRA, R. C.; CECON, P.R. Estabilidade de genótipos de soja quanto ao oídio (*Microsphaera diffusa*). **Bioscience Journal**, v.1, n.1, p.27-34, January-February 2005.

BACHMAN, M. S.; TAMULONIS, J. P.; NICKELL, C. D.; BENT, A. F. Molecular markers linked to brown stem rot resistance genes *Rbs*<sub>1</sub> and *Rbs*<sub>2</sub> in soybean. **Crop Science**, Madison, v.41, n.2, p.527-53, March-April 2001.

BRAUN, U.; TAKAMATSU, S. Phylogeny of Erysiphe Microsphaera Uncinula (Erysiphe) and Cystotheca Podosphaera Sphaerotheca (Cystothecaceae) inferred from rDNA ITS sequences some taxonomic consequences. **Schlechtendalia**, v.4, p.1-33, 2000.

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

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**, Madison, v.39, n.5, p.1464–1490, September-October 1999.

CHOI, I. Y.; HYTEN, D. L.; MATUKUMALLI, L. K.; SONG, Q. L.; CHAKY, J. M.; QUIGLE, Y. C. V.; CHASE, K.; LARK, K. G.; REITER, R. S.; YOON, M. S.; HWANG, E. Y.; YI, S. I.; YOUNG, N. D.; SHOEMAKER, R. C.; VAN TASSELL, C. P.; SPECHT, J. E.; CREGAN, P. B. A soybean transcript map: Gene distribution haplotype and single-nucleotide polymorphism analysis. **Genetics**, Baltimore, v.176, n.1, p.685-696, May 2007.

DEMIRBAS, A.; RECTOR, B. G.; LOHNES, D. G.; FIORITTO, R. J.; GRAFF, G. L.; CREGAN, P. B.; SHOEMAKER, R. C.; SPECHT, J. E. Simple sequence repeat markers linked to the soybean *Rps* genes for *Phytophthora* resistance. **Crop Science**, Madison, v.41, n.4, p.1220-1227, July-August 2001.

FRONZA, V. **Genética da reação da soja a *Fusarium solani* f sp *glycines***. 2003. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Universidade de São Paulo, Piracicaba.

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

GRAHAM, M. A.; MAREK, L. F.; LOHNES, D.; CREGAN, P.; SHOEMAKER, R. C. Expression and Genome organization of resistance gene analogs in soybean. **Genome**, Ottawa, v.43, n.1, p.86–93, February 2000.

GRIMMER, M. K.; BEAN, K. M. R.; ASHER, M. J. C. Mapping of Wve resistance genes to sugar-beet powdery mildew using AFLP and anchored SNP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.115, n.1, p.67–75, June 2007.

HNETKOVSKY, N.; CHANG, S. C.; DOUBLER, T. W.; GIBSON, P. T.; LIGHTFOOT, D. A. Genetic mapping of loci underlying field resistance to soybean sudden death syndrome (SDS). **Crop Science**, Madison, v.36, n.2, p.393-400, 1996.

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**, Madison, v. 47, p. 837-838, Mar.-Apr. 2007.

IQBAL, M. J.; MEKSEM, K.; NJITI, V. N.; KASSEM, M. A.; LIGHTFOOT, D. A. Microsatellite markers identify three additional quantitative trait loci for resistance to soybean suddendeath syndrome (SDS) in Essex x Forrest RILs. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.102, n.2-3, p.187–192, February 2001.

KEIM, P.; OLSON, T. C.; SHOEMAKER, R. C. A rapid protocol for isolating soybean DNA. Soybean **Genetics Newsletter**, Baltimore, v.15, p.150-152, April 1988.

KANAZIN, V.; MAREK, L. F.; SHOEMAKER, R. C. Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.93, n.21, p.11746-11750, October 1996.

KLOS, K. L. E.; PAZ, M. M.; FREDERICK-MAREK, L.; CREGAN, P. B.; SHOEMAKER, R. C. Molecular markers useful for detecting resistance to brown stem rot in soybean. **Crop Science**, Madison, v.40, n.5, p.1445-1452, September 2000.

KOSAMBI, D. D. The estimation of map distance from recombination values. **Annuaire of Eugenetics**, 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**, San Diego, v. 1, n. 2, p. 174-181, Oct. 1987.

LOHNES, D. G. BERNARD, R. L. Inheritance of resistance to powdery mildew in soybeans. **Plant Disease**, Saint Paul, v.76, n.9, p.964-965, April 1992.

LOHNES, D.G.; WAGNER, R.E.; BERNARD, R.L. Soybeans genes *Rj2 Rmd-c* and *Rps2* in linkage group 19. **Journal of Heredity**, Cary, v.84, p.109-111, 1993.

LOHNES, D. G.; NICKELL, C. D. Effects of powdery mildew alleles *Rmd-c Rmd* and *Rmd* on yield and other characteristics in soybean. **Plant Disease**, Saint Paul, v.78, n.3, p.299-301, December 1994.

MICHELMORE, R. W.; PARAN, I.; KESSELI, R. V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis - a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.88, n.21, p.9828-9832, November 1991.

MIGNUCCI, J. S.; LIM, S. M. Powdery mildew (*Microspheera diffusa*) development on soybeans with adult-plant resistance. **Phytopathology**, v.70, n.9, p.919-921, March 1980.

MONTEROS, M. J.; MISSAOUI, A. M.; PHILLIPS, D. V.; WALKER, D. R.; BOERMA, A. H. R. Mapping and Confirmation of the 'Hyuuga' Red-Brown Lesion Resistance Gene for Asian Soybean Rust. **Crop Science**, Madison, v.47, n.2, p.829-834, Mar.-April 2007.

NJITI, V. N.; MEKSEM, K.; IQBAL, M. J.; JOHNSON, J. E.; KASSEM, M. A.; ZOBRIK, K. F.; KILO, V. Y.; LIGHTFOOT, D. A. Common loci underlie field resistance to soybean sudden death syndrome in Forrest, Pyramid, Essex, and Douglas. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.104, n.2-3, p.294-300, February 2002.

POLZIN, K. M.; LOHNES, D. G.; NICKELL, C. D.; SHOEMAKER, R. C. Integration of *Rps2*, *Rmd* and *Rj2* Into Linkage Group-J of the Soybean Molecular Map. **Journal of Heredity**, Cary, v.85, n.4, p.300-303, July 1994.

SANDHU, D.; SCHALLOCK, K. G.; RAIVERA-VELEZ, N.; LUNDEEN, P.; CIANZIO, S.; BHATTACHARY, M. K. Soybean Phytophthora resistance gene *Rps8* maps closely to the *Rps3* region. **Journal of Heredity**, Cary, v.96, n.5, p.536-541, June 2005.

SCHUSTER, I.; ABDELNOOR, R. V.; MARIN, S. R. R.; CARVALHO, V. P.; KIIHL, R. A. S.; SILVA, J. F. V.; SEDIYAMA, C. S.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Identification of a new major QTL associated with resistance to soybean cyst nematode (*Heterodera*

*glycines*). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.102, n.1, p.91-96, January 2001.

SHOEMAKER, R. C.; SPECHT, J. E. Integration of the soybean molecular and classical genetic linkage groups. **Crop Science**, Madison, v.35, n.2, p.436–446, 1995.

SILVA, D. C. G.; YAMANAKA, N.; BROGIN, R. L.; ARIAS, C. A. A; NEPOMUCENO, A. L.; DI MAURO, A. O.; PEREIRA, S. S.; NOGUEIRA, L. M.; PASSIONOTTO, A. L.; ABDELNOOR, R. V. Molecular mapping of two loci that confer resistance to Asian rust in soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.117, n.1, p.57-63, June 2008.

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

SOYBASE. **Soybase and the soybean breeder's toolbox**. Ames, IA. Disponível em <<http://soybase.org/>>. Acesso 11 Outubro 2008.

SPEULMAN, E.; BOUCHEZ, D.; HOLUB, E. B.; BEYNON, J. L. Disease resistance gene homologs correlate with disease resistance loci of *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v.14, n.4, p.467-74, May 1998.

TAKAMATSU, S.; SHIN, H. D.; PAKSIRI, U.; LIMKAISANG, S.; TAGUCHU, Y.; BINH, N. Two *Erysiphe* species associated with recent outbreak of soybean powdery mildew: Results of molecular phylogenetic analysis based on nuclear rDNA sequences. **Mycoscience**, v.43, n.4, p.333-341, August 2002.

WANG, D.; ARELLI, P. R.; SHOEMAKER, R. C.; DIERS, B. W. Loci underlying resistance to Race 3 of soybean cyst nematode in *Glycine soja*. Plant Introduction 468916.

**Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.103, n.4, p.561–566, September 2001.

YAMANAKA, N.; NINOMIYA, S. I.; HOSHI, M.; TSUBOKURA, Y.; YANO, M.; NAGAMURA, Y.; SASAKI, T.; HARADA, K. An Informative Linkage Map of Soybean Reveals QTLs for Flowering Time Leaflet Morphology and Regions of Segregation Distortion DNA.

**Research**, v.8, n.2, p.61-72, 2001.



## CAPÍTULO 4 - CONCLUSÕES

1. O estudo possibilitou o mapeamento genético dos genes de resistência para ambas as doenças, ferrugem asiática e oídio da soja.
2. Para ferrugem, nos dois cruzamentos (SBR e KBR) os genes de resistência foram mapeados no mesmo grupo de ligação N da soja.
3. No grupo de ligação N, foi detectado QTL que explicou uma grande porcentagem da variação fenotípica do caráter número de urédia, predominando os efeitos aditivos e de dominância para os dois cruzamentos.
4. Houve correspondência significativa entre os QTLs identificados nas gerações segregantes  $F_{2:3}$  e os marcadores que flanqueiam o gene *Rpp*.
5. A seleção para o caráter número de urédias revelou-se mais eficiente, quando comparadas com a seleção para o caráter severidade, pois é menos influenciada pelas variações ambientais.
6. O modelo genético aditivo-dominante foi suficiente para explicar os resultados para os dois caracteres quantitativos, não havendo nenhum indício da presença de efeitos epistáticos ou de interação não alélica afetando a severidade ou o número de urédias.
7. É provável a existência de fatores modificadores que contribuem para aumento ou redução da severidade de doença nas folhas nos dois parentais resistentes e também na testadora suscetível envolvidos nos dois cruzamentos. A mesma eficiência não poder ser associada ao caráter número de urédias, já que houve divergência entre os parentais nos

dois cruzamentos ao longo de todas as avaliações, sugerindo que os genes associados a esse caráter podem estar concentrados nos parentais resistentes.

8. A linhagem BRI01-22106 apresentou resistência completa ao fungo *Erysiphe diffusa*.

9. O mapeamento molecular utilizando marcadores microssatélites resultou na identificação de um novo gene de resistência ao oídio da soja *Erysiphe diffusa*, chamado nesse trabalho de gene Red. Este gene foi mapeado no grupo de ligação C2 da soja, flanqueado pelos marcadores Satt307 e Sat\_263

10. Não foi constatado inversão na posição dos marcadores, e as distâncias, dadas em cM, apresentaram diferenças mínimas em relação ao mapa consenso.

11. Os resultados obtidos evidenciaram que novos marcadores devem ser adicionados nos mapas gerados para as duas doenças ampliando a cobertura do genoma da soja, visando ampliar o entendimento das bases genéticas desses patossistemas.

12. Marcadores mais próximos possibilitariam a exploração de bibliotecas genômicas de soja, com a identificação de clones BAC contendo o gene de resistência a essas doenças o que poderia levar a clonagem desses genes.

13. A identificação de novos genes de resistência a doenças é de grande importância para o melhoramento de plantas aumentando a eficiência do processo de desenvolvimento de cultivares resistentes através da seleção assistida por marcadores