

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

**HERANÇA QUALI-QUANTITATIVA E MARCADORES  
MOLECULARES PARA SELEÇÃO ASSISTIDA DE  
GENÓTIPOS DE SOJA RESISTENTES À FERRUGEM  
ASIÁTICA**

**Marcelo Marchi Costa**

**Orientador: Prof. Dr. Antonio Orlando Di Mauro**

**Co-orientador: Prof. Dr. José Baldin Pinheiro**

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

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

Agosto de 2008

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**MARCELO MARCHI COSTA** – Nascido em 01 de novembro de 1978, na cidade de Ribeirão Preto – SP, é Engenheiro Agrônomo formado pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, câmpus de Jaboticabal, em janeiro de 2002. Obteve o título de Mestre em Agronomia, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, em junho de 2004, pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, câmpus de Jaboticabal. Entre julho e novembro de 2004 realizou estágio na University of Kentucky, na cidade de Lexington nos Estados Unidos. Em agosto de 2008 obteve o título de Doutor em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), também pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, câmpus de Jaboticabal.

## REFLEXÕES PARA A VIDA

“Há momentos difíceis na vida. Grandes ou pequenas, as dificuldades podem ser decisivas. Somente a firme determinação de enfrentar as adversidades leva o indivíduo a vencê-las verdadeiramente. Nessas horas cruciais, jamais hesite o mínimo.”

“A vida é uma longa batalha. Aqueles que continuam a lutar até o final, não importando o que aconteça no caminho, são os verdadeiros vitoriosos.”

“As pessoas possuidoras de genuína capacidade brilham com todo esplendor quando são treinadas e testadas pelos desafios da vida. Esta é uma fórmula imutável para o crescimento espiritual.”

“A fé não se define por algo superficial nem se mede por fatores externos. A fé é uma questão que diz respeito ao coração.”

“Há no budismo um caminho para viver com genuína humanidade e dignidade, e esse é o caminho da consideração e da gratidão.”

Daisaku Ikeda

*A meus pais Sidney e Elizabeth*

*Ao meu irmão Maurício*

*À minha tia Nilza*

*Dedico*

*A meu avô Antônio (in memoriam) e*

*A meu mestre Daisaky Ikeda*

*Ofereço*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Buda original Nitiren Daishonin e ao meu Mestre Dr. Daisaku Ikeda, por todas as orientações e a indicação do caminho correto da fé para alcançar a verdadeira felicidade e ultrapassar quaisquer obstáculos, em todas as etapas da minha vida.

À Universidade Estadual Paulista, câmpus de Jaboticabal, pelas oportunidades oferecidas, não apenas no Doutorado, mas durante toda minha vida acadêmica.

À FAPESP pelo auxílio financeiro.

Ao Prof. Dr. Antonio Orlando Di Mauro, nesses quase nove anos de convivência, pela orientação, amizade e confiança.

À Dra. Sandra Helena Unêda Trevisoli, pela co-orientação, amizade, atenção e esclarecimentos das dificuldades encontradas na execução do experimento.

Ao Prof. Dr. José Baldin Pinheiro, pela co-orientação, amizade e valorosas contribuições nos momentos imprescindíveis.

À empresa Tropical Melhoramento e Genética pela oportunidade de parceria.

A todos os professores da FCAV-UNESP pelos ensinamentos, companheirismo e grande sabedoria, em especial aos Professores Domingos Fornasieri Filho, Maria Aparecida Pessôa da Cruz Centurion, Janete Aparecida Desidério Sena, Rinaldo César de Paula, João Carlos de Oliveira e Leandro Borges Lemos.

Aos funcionários do Departamento de Produção Vegetal, Mauro, Rubens, Sebastião, Nice, Marisa, Mariângela, Luís, Gabi, Mônica, Osmar, e especialmente o Geraldo, por todo auxílio e amizade fundamentais nesses anos de convivência.

A pessoas eternas e especiais Débora Garcia (Capitu), Daniela Sarti, Melina Mancini, Nair Helena, Aguida Morales, Cláudia Demetrio (Portuga), Ivana Bárbaro (Xexênia), Franco Muniz, Daniela Abreu (Gaúcha), Juliana De Antonio (Lolita), Jacqueline Boldrin (Scopeta), Jaqueline Raymondi (Boza), Onã Freddi, Gustavo Silveira, Michele Miyazaki, Cristian Leonel, Amanda Corrado, Antonio Morceli Jr, Thaiza Galhardo, Daniel de Sordi (Nabu), Caroline Mateus, que sempre estiveram comigo no trabalho e no lazer, com momentos inesquecíveis pra vida toda.

A outros grandes e importantes amigos de diversos momentos nesses últimos anos: Lizandra Catelli, Irlan Leite Abreu, Roberto Marchi (Binho), Fernanda Salles, Adriana Ibrahim (Turka), Júlio Bortolossi, Alexandre (Boi), Paula Filippo, Claudinei Cruz (Koró), Fernanda, Danilo Grotta, Michelle Cruz (Mimi), Anderson, Rubens Tabile, Francine, Airton Romanini (Tirso), Bruno Vieira (Gaúcho), César Martorelli, Lílian Arantes, Camila Rosa (Pinta), Ronaldo Viana, Giselle Feliciani, Lilian Candido, Bruno Pavan, Júlio Quierati, Joani Bastos, Letícia Nociti, Ricardo Aratani, Stefânia, Disney Cazeta, Danielle Viotto, Paulo Emílio, Luciana Carrenho, Ines Cabral, Tatiana Jabur, Rodrigo Soares, Caio Ferrone e Guilherme Brunini; meus estagiários e novos amigos Silviane, Lucas, Rafael, Rodolfo, Ana Paula, Virgílio, Kauê e Bruno; e todos os outros que tenha esquecido de citar, mas que também merecem menção.

Aos não menos importantes e “antigos” amigos do peito Heloisa Ribeiro, Jonathan Slywitch, Kátia Harumi, Ivana Panosso, Aline Herrera, Jefferson Slywitch, Sandro Revolti, Valéria Torquato pelos anos de convivência e momentos de encontros.

A meus pais, meu irmão, tios e tias, primos e primas, e todos os meus familiares, por sempre estarem presentes nos momentos cruciais.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram com a realização deste trabalho, ou que, mesmo por um breve momento, participaram da minha vida.

## SUMÁRIO

	“Página”
RESUMO.....	ix
SUMMARY.....	x
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. A cultura da soja .....	3
2.2. Melhoramento genético da soja .....	4
2.3. Ferrugem asiática da soja .....	6
2.4. Seleção assistida por marcadores moleculares .....	9
3. REFERÊNCIAS .....	11
CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO QUALI-QUANTITATIVA DA RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS DE SOJA À FERRUGEM ASIÁTICA.....	15
RESUMO.....	15
1. Introdução.....	16
2. Material e Métodos .....	18
3. Resultados e Discussão .....	22
4. Conclusões .....	38
5. Referências.....	39
CAPÍTULO 3 – MARCADORES RAPD PARA RESISTÊNCIA À FERRUGEM ASIÁTICA EM SOJA .....	42
RESUMO.....	42
1. Introdução.....	43
2. Material e Métodos .....	45
3. Resultados e Discussão .....	47
4. Conclusões .....	53
5. Referências.....	54

CAPÍTULO 4 – DESENVOLVIMENTO DE MARCADOR MOLECULAR SCAR LIGADO A RESISTÊNCIA À FERRUGEM ASIÁTICA EM SOJA.....	57
RESUMO .....	57
1. Introdução.....	58
2. Material e Métodos .....	61
3. Resultados e Discussão .....	65
4. Conclusões .....	73
5. Referências.....	74



## HERANÇA QUALI-QUANTITATIVA E MARCADORES MOLECULARES PARA SELEÇÃO ASSISTIDA DE GENÓTIPOS DE SOJA RESISTENTES À FERRUGEM ASIÁTICA

**RESUMO** – A seleção assistida por marcadores moleculares têm contribuído com os estudos para o desenvolvimento de cultivares resistentes. Os ganhos mais evidentes podem ocorrer em doenças como a ferrugem asiática da soja, onde a alta variabilidade do patógeno e a busca por novas fontes de resistência têm dificultado o sucesso dos melhoristas. Assim, os objetivos deste trabalho foram estudar a herança da resistência à ferrugem em diferentes fontes e desenvolver marcadores SCAR ligados a um loco de resistência para seleção assistida. Populações F<sub>2</sub> oriundas dos cruzamentos PI 459025 x CD 208 (1), PI 200526 x CD 205 (2), PI 200456 x Conquista (3) e GC 84058-21-4 x IAC Foscarin 31 (4) foram submetidas à inoculação com a ferrugem e avaliadas quanto ao tipo de lesão (RB – resistente ou TAN – suscetível). O teste de Qui-quadrado indicou a presença de um gene dominante para os cruzamentos 1 e 2, enquanto no 3 e 4 observou-se a presença de um gene recessivo. A análise multivariada agrupou os genótipos mais similares, com base nos caracteres severidade da doença, número de vagens, número de sementes e ciclo, avaliados nos cruzamentos 2 a 4. Diferenças significativas foram encontradas em número de lesões e esporulação para genótipos RB e TAN. Dois bulks de DNA foram obtidos de plantas homocigotas resistentes e suscetíveis no cruzamento 1, para a análise de BSA. Dos 600 iniciadores RAPD testados, três foram discriminativos e localizam-se a 4,5, 6,2 e 10,2 cM do loco de resistência, em fase de repulsão. Um desses marcadores foi convertido a SCAR e se manteve discriminativo, podendo ser indicado para seleção assistida de genótipos resistentes com a mesma fonte.

**Palavras-chave:** análise de *bulks* segregantes, análise multivariada, escala diagramática, *Glycine max*, *Phakopsora pachyrhizi*, marcadores SCAR

## QUALI-QUANTITATIVE INHERITANCE AND MOLECULAR MARKERS FOR ASSISTED SELECTION OF SOYBEAN RUST RESISTANT GENOTYPES

**SUMMARY** – Assisted selection by molecular markers has contributed to development studies of resistant cultivars. The most evident gains may occur for diseases like the Asian soybean rust, where the high variability of pathogen and the search for new resistance sources has difficult the breeder success. Thus, the aims of this work were to study the rust resistance inheritance in different sources and develop SCAR markers linked to a rust resistance locus for assisted selection. F<sub>2</sub> populations from crosses PI 459025 x CD 208 (1), PI 200526 x CD 205 (2), PI 200456 x Conquista (3) and GC 84058-21-4 x IAC Foscarin 31 (4) were submitted to rust inoculation and evaluated by the lesion type reaction (RB – resistant or TAN – susceptible). Chi-square test indicated the presence of a single dominant gene for crosses 1 and 2, whereas the 3 and 4 crosses showed a single recessive gene. Multivariate analysis has grouped the most similar genotypes based on disease severity, number of pods, number of seeds and cycle for 2 to 4 crosses. Significant differences were observed in lesions number and sporulation rate for RB and TAN genotypes. Two DNA bulks were obtained, for BSA analysis, on cross 1, from resistant and susceptible homozygous plants. From the 600 tested RAPD primers, three of them were discriminative and located in repulsion phase at 4.5, 6.2 and 10.2 cM from the resistance *locus*. One of the RAPD markers was converted to SCAR and confirmed its discriminative nature. So it can be indicated for assisted selection of genotypes with the same resistance source.

**Keywords:** bulked segregant analysis, multivariate analysis, diagrammatic scale, *Glycine max*, *Phakopsora pachyrhizi*, SCAR markers

## CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

### 1. INTRODUÇÃO

Os avanços promovidos pelo melhoramento genético são de grande importância em qualquer cultura. Entretanto, particularmente para a soja, esses avanços são mais evidentes, principalmente no que diz respeito à ampliação da adaptação da cultura, possibilitando seu cultivo desde as altas latitudes do sul do Brasil até as baixas latitudes equatoriais e tropicais (SEDIYAMA et al., 2005).

Essa destacada expansão observada na soja colocou a cultura como o principal produto da pauta de exportações brasileiras. Contudo, junto com os benefícios da expansão, vêm os fatores impeditivos à obtenção de maiores rendimentos, como o crescente aumento da ocorrência de pragas e doenças. No caso das doenças, destaca-se a ferrugem asiática, um dos principais problemas da cultura da soja na atualidade.

A ferrugem asiática da soja é causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* Syd & P. Syd. e ocorre no hemisfério Leste desde 1903 (SINCLAIR & HARTMAN, 1999). Chegou ao continente americano na safra 2000/01, sendo relatada pela primeira vez no Brasil no final dessa safra, no oeste do estado do Paraná, disseminando-se rapidamente por todo o território nacional e ocasionando perdas acima de 80% em áreas mais infectadas (YORINORI et al., 2005).

A obtenção de cultivares resistentes ao patógeno como medida de controle tem sido um desafio. Embora cinco genes dominantes tenham sido descritos na literatura, denominados *Rpp1* a *Rpp5* (BROMFIELD & HARTWIG, 1980; McLEAN & BYTH, 1980; HARTWIG & BROMFIELD, 1983; HARTWIG, 1986; GARCIA et al., 2008), a elevada variabilidade do patógeno reduz a eficiência dessa resistência vertical. No Brasil, por exemplo, as 11 cultivares resistentes identificadas inicialmente pela Embrapa Soja (YORINORI et al., 2005) tiveram a resistência quebrada por novas estirpes do fungo provenientes do Mato Grosso, e apenas as fontes de resistência portadoras dos genes *Rpp2* e *Rpp4* ainda permanecem eficientes (ARIAS et al., 2004). Desse modo, ressalta-

se a necessidade da busca de novas fontes de resistência, além de melhor adequação das formas de avaliação e utilização das mesmas nos programas de melhoramento.

As técnicas convencionais de obtenção de genótipos resistentes são laboriosas, demandando tempo e mão-de-obra, podendo, às vezes, ajudar na disseminação do patógeno. Assim, o uso de técnicas moleculares, como a obtenção de marcadores ligados a genes de resistência, tem sido de grande utilidade, facilitando e agilizando o processo de obtenção de variedades resistentes nos programas de melhoramento.

Dentre os marcadores existentes, o RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*), que se baseia na amplificação de oligonucleotídeos de 10 bases de seqüência aleatória, destaca-se pela rapidez, praticidade, necessidade de menores quantidades de DNA e baixo custo. Essas características evidenciam a importância do RAPD na identificação de marcas ligadas a caracteres de interesse, como genes de resistência, pela técnica de BSA (*Bulked Segregant Analysis*) desenvolvida por MICHELMORE et al. (1991). Essa técnica consiste na detecção de polimorfismo entre dois *bulks* com quantidades equimolares de DNA de plantas resistentes e suscetíveis. Por outro lado, algumas limitações do RAPD como a natureza dominante e baixa especificidade, levam à necessidade de alternativas, como a conversão em marcadores SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*), mais específicos (PARAN & MICHELMORE, 1993; FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Marcadores SCAR ligados a genes de resistência de importantes patógenos foram obtidos para diversas culturas nos últimos anos, citando-se: resistência ao cancro da haste, à mancha olho-de-rã, ao nematóide de cisto e ao vírus do mosaico em soja (HEER et al., 1998; MARTINS FILHO et al., 2002; ZHENG et al., 2003; GAVIOLI et al., 2007), resistência ao mofo azul em tabaco (MILLA et al., 2005); resistência ao oídio no trigo (LIU et al., 1999) e resistência ao vírus do mosaico em tomate (DAX et al., 1998).

Com isso, os objetivos deste estudo foram: 1) avaliar e estudar a herança qualitativa da resistência ao patógeno causador da ferrugem asiática em cruzamentos com diferentes fontes de resistência; e 2) obter marcadores moleculares do tipo RAPD ligados ao gene de resistência presente em uma população com fonte de resistência à ferrugem asiática, com sua posterior conversão para marcadores SCAR.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. A cultura da soja

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill), pertencente à família Fabaceae, é a mais importante leguminosa cultivada em nível mundial, tanto do ponto de vista econômico, como no aspecto nutricional. Originária da China, a cultura é utilizada na alimentação dos chineses há mais de 5000 anos, mas somente a partir do final do século XV a soja foi trazida para o Ocidente, chegando à América no século XVIII. No Brasil, foi introduzida inicialmente, sem sucesso, em 1882 no estado da Bahia, chegando a adquirir importância econômica somente a partir da década de 1960, na região Sul do país, onde as condições climáticas de cultivo eram semelhantes às regiões tradicionais do restante do mundo (CARUSO, 1996; CÂMARA, 1998).

A crescente demanda por matéria-prima protéica nos países desenvolvidos, principalmente nas décadas de 1970 e 80, aliada aos altos preços internacionais praticados nesse período e os impulsos ocasionados pela sucessão trigo/soja, estimularam a expansão do cultivo no país. Nesse sentido, as pesquisas na área de melhoramento genético foram decisivas, ampliando a adaptação da cultura para as outras condições climáticas observadas no território brasileiro, destacando-se sua expansão para as áreas de cerrado da Região Centro-Oeste. Dessa forma, a soja atualmente pode ser cultivada desde as altas até as baixas latitudes de todo o Brasil, e em diversas condições edafoclimáticas (CÂMARA, 1998; SEDIYAMA et al., 2005).

Sob os aspectos morfológicos e agrônômicos, ressalta-se que a soja é uma planta herbácea, anual, ereta e de crescimento morfológico diversificado, podendo ser determinado, semideterminado e indeterminado. A espécie cultivada possui  $2n = 40$  cromossomos. A altura varia de 20 a 150 cm, podendo ser muito ou pouco ramificada. A altura média das cultivares comerciais situa-se entre 60 e 120 cm, contudo, alturas entre 50 e 80 cm são mais ideais para o processo de colheita mecanizada. Outra característica importante para a colheita mecanizada é a altura de inserção da primeira

vagem, que deve estar acima de 10 cm. Dependendo da cultivar e das condições ambientais, o ciclo da soja varia de 75 a 210 dias. Para o caráter número de vagens, uma planta pode produzir até 400 vagens, mas em média as cultivares nacionais desenvolvem 30 a 80 vagens por planta. Todos estes caracteres são importantes sob o ponto de vista de melhoramento genético da cultura (CÂMARA, 1998; SEDIYAMA et al. 2005).

No aspecto nutricional, ressaltam-se os elevados teores de proteína (40%) e sua alta qualidade, bem como seu teor de óleo (20%), além de quantias consideráveis de vitaminas como a tiamina e a riboflavina, e nutrientes como cálcio e ferro, destacando-se também seu uso industrial e farmacêutico. A cultura da soja é considerada hoje um dos componentes de maior potencial de crescimento na indústria de alimentos, com destaque de suas propriedades medicinais demonstradas por estudos que indicam benefícios na prevenção de doenças coronárias, alguns tipos de câncer, osteoporose, doenças renais, entre outros (BLACK, 2000; EMBRAPA, 2006).

Do ponto de vista econômico, a importância da soja fica mais evidente, principalmente no Brasil, onde ocupa lugar de destaque na pauta de exportações, movimentando US\$ 9,3 bilhões em 2006, correspondendo a cerca de 6,7% do total (EMBRAPA, 2007). Esses números posicionam o país como segundo maior produtor mundial, com cerca de 59,5 milhões de toneladas produzidas na safra 2007/08, numa área em torno de 21 milhões de hectares, atingindo uma produtividade média nacional de 2804 kg/há, sendo superado apenas pelos Estados Unidos (CONAB, 2008).

## **2.2. Melhoramento genético da soja**

O melhoramento genético é um processo contínuo de desenvolvimento de novos genótipos baseado em objetivos estabelecidos para a solução de problemas reais ou potenciais da espécie de interesse. A variabilidade genética é explorada por meio das hibridações, de forma a possibilitar as seleções para os caracteres desejados, através de métodos tradicionais de melhoramento de plantas. Variações ou combinações de métodos são utilizadas pelos melhoristas durante o processo de avanço das gerações

segregantes. Além disso, técnicas de biotecnologia e engenharia genética, como os marcadores moleculares e a transformação de plantas, constituem-se em importantes ferramentas nos processos de seleção e incremento da variabilidade genética, as quais vêm sendo muito utilizadas pelos melhoristas (ALMEIDA & KIIHL, 1998).

Os trabalhos de melhoramento com a cultura da soja no Brasil iniciaram-se no Rio Grande do Sul na década de 1930, originando a primeira cultivar melhorada por volta de 1960. Entretanto, o maior desenvolvimento dos programas de melhoramento de soja no Brasil, pelas instituições públicas e privadas de pesquisa, possibilitou o lançamento de novas cultivares somente durante as décadas de 1970, 80 e 90, contribuindo, inegavelmente, para a grande expansão do cultivo da soja nas regiões de menores latitudes como o Sudeste e o Centro-Oeste do país, principalmente nas áreas de cerrado, e nas regiões tropicais do Norte e Nordeste (SEDIYAMA et al., 2005).

Segundo ALMEIDA & KIIHL (1998), os principais aspectos visados nestes programas de melhoramento são: produtividade, precocidade, menor sensibilidade ao fotoperíodo (período juvenil longo), melhoria da qualidade da soja alimento, resistência a insetos (percevejos, lagarta da soja) e resistência a doenças (ferrugem asiática, nematóide de cisto, cancro da haste, oídio, entre outras).

Neste sentido, uma das maiores contribuições do melhoramento da soja é a obtenção de cultivares resistentes a doenças, já que o cultivo sucessivo tem contribuído com o aumento significativo de danos por diferentes patógenos no decorrer dos últimos anos. Na década de 1970, a pústula bacteriana era uma das principais doenças da soja; na década de 1980 a mancha olho-de-rã, e no início dos anos 90 o cancro da haste. Há alguns anos, o nematóide de cisto ganhou destaque, mas atualmente, a ferrugem asiática, causa perdas significativas, principalmente pela ausência de genótipos resistentes adaptados às condições brasileiras (SEDIYAMA et al., 2005).

O valor da resistência das plantas cultivadas no controle de suas doenças foi reconhecido a partir do início do século XX, com os progressos da genética e da fitopatologia, que proporcionaram ao melhoramento de plantas, condições para a criação de cultivares resistentes às doenças, capazes de evitar os prejuízos causados pelos patógenos, pela simples substituição das cultivares suscetíveis pelas resistentes.

Assim, o principal objetivo da maioria dos programas de melhoramento tem sido a criação de genótipos resistentes, por ser o método mais eficaz e econômico de controle das doenças, principalmente, se aliarmos a resistência aos parâmetros agrônômicos de interesse (PEREIRA et al., 1985).

Vale ressaltar que os programas de melhoramento genético já desenvolveram cultivares resistentes a várias doenças, podendo-se citar o oídio (*Erysiphe diffusa*), o cancro da haste (*Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*), a mancha olho-de-rã (*Cercospora sojina*), além de outras (SEDIYAMA et al., 2005), sendo esse um fator de muita importância, já que a resistência genética evita o uso indiscriminado do controle químico, diminuindo assim os danos ao meio ambiente. Entretanto, a obtenção de resultados satisfatórios num programa de melhoramento visando a resistência genética a uma determinada doença só ocorre mediante a junção de diversos aspectos como o conhecimento da complexidade da herança de resistência à mesma, das fontes de resistência disponíveis ao melhorista e das raças fisiológicas do patógeno existentes.

A obtenção de resultados promissores a longo prazo, torna-se difícil no caso de patógenos com alta variabilidade, onde há predominância de diferentes raças fisiológicas, para os quais a resistência vertical mais facilmente disponível nas variedades não apresenta alta eficiência duradoura, e onde as pesquisas na área do melhoramento devem estar sempre avançando.

### **2.3. Ferrugem asiática da soja**

A ferrugem asiática, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, foi detectada pela primeira vez no Japão em 1903, relatada como *Uredo sojae* (CARVALHO Jr. & FIGUEIREDO, 2000). No continente americano, foi constatada inicialmente no Paraguai, em março de 2001, chegando ao Brasil em maio do mesmo ano, no norte do Paraná. No ano agrícola seguinte (2001/02) já estava presente nos estados do Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás, com perdas no rendimento de grãos entre 30 e 70%, sendo a perda total nessa safra de US\$



125,5 milhões (YORINORI et al., 2002; YORINORI et al., 2004). A rápida e intensa disseminação do patógeno em todas as regiões produtoras pode ser observada pelas perdas ocasionadas na safra 2006/07, sendo de aproximadamente 4,5% da produção brasileira, equivalendo a cerca de US\$ 615,7 milhões, e que somados aos custos com operações de controle chegam a US\$ 2,19 bilhões (EMBRAPA, 2008).

O fungo é extremamente agressivo e dependente de umidade, necessitando de longos períodos de molhamento foliar, o que torna a doença mais severa e permanente em regiões com abundante formação de orvalho no verão. As temperaturas mais amenas são ideais, mas o patógeno pode se estabelecer entre 15 e 30°C. A ampla gama de hospedeiros, com cerca de 95 espécies de leguminosas, dificulta o controle, tornando o patógeno uma ameaça contínua (YORINORI et al., 2004).

Os sintomas da ferrugem correspondem a pequenas lesões, mais abundantes na superfície inferior das folhas, com minúsculas protuberâncias, correspondentes às urédias ou pústulas, que aumentam de tamanho gradualmente, tornando-se de coloração cinza a castanha, e abrindo-se um poro por onde são expelidos os uredosporos, carregados pelo vento. À medida que a esporulação prossegue, o tecido adquire coloração castanho-clara (lesão do tipo TAN) a castanho-avermelhada (lesão RB), sendo essa diferenciação utilizada para caracterizar a resistência (lesão RB) ou suscetibilidade (lesão TAN) da soja ao patógeno (ANDRADE & ANDRADA, 2002).

Conforme mencionado, a avaliação da reação dos genótipos à ferrugem asiática tem sido feita normalmente pelo tipo de lesão, na qual a lesão do tipo RB se refere à reação de resistência e a lesão TAN indica suscetibilidade. Isso ocorre porque, embora danos de mais de 80% sejam atribuídos à ferrugem, os estudos epidemiológicos da doença no Brasil ainda são escassos, por causa de sua recente introdução. Estes estudos requerem métodos de quantificação confiáveis, acurados e precisos, para a obtenção de resultados reproduzíveis. Com isso, a padronização dos métodos de avaliação da doença permite a comparação dos resultados obtidos em quaisquer experimentos (GODOY et al., 2006).

Segundo GAUNT (1995), quando a incidência (avaliada pelo número, taxa ou porcentagem de plantas ou partes de plantas em uma amostra ou população) não é a

variável mais conveniente na quantificação de doenças foliares, a severidade (avaliada pelo valor relativo, taxa ou porcentagem de área ou volume de tecido coberto com sintomas) é mais freqüentemente utilizada. Dessa forma, GODOY et al. (2006) sugeriram o uso de uma escala diagramática para quantificação da severidade da doença, possibilitando um estudo mais acurado da mesma.

A queda prematura de folhas ocasionada pela doença afeta consideravelmente a formação dos grãos, pela redução da taxa fotossintética da planta. Assim, quanto mais cedo ocorrerem a infecção e a desfolha, maiores serão as perdas em rendimento e qualidade dos grãos. Em casos severos, quando a doença causa desfolha nas fases vegetativa, floração, formação ou início de enchimento das vagens, pode causar aborto das flores e queda total das vagens (YORINORI et al., 2004).

Diversos estudos realizados possibilitaram determinar que a resistência à ferrugem asiática na soja era governada por quatro genes dominantes de ação independente, denominados *Rpp1*, *Rpp2*, *Rpp3* e *Rpp4*, identificados em introduções de plantas (PI's) e cultivares (BROMFIELD & HARTWIG, 1980; McLEAN & BYTH, 1980; HARTWIG & BROMFIELD, 1983; HARTWIG, 1986). Outros estudos demonstraram que o *Rpp1* seria o responsável pela resistência na PI 200492, Tainung 3 e Tainung 4, porém, devido à suscetibilidade das duas primeiras a uma nova raça do fungo, para a qual a Tainung 4 é resistente, sugeriu-se a existência de um ou mais genes adicionais neste genótipo (McLEAN & BYTH, 1980). Além disso, novos locos de resistência, como o *Rpp5*, têm sido descritos mais recentemente (GARCIA et al., 2008).

Ainda no início do surgimento da doença no Brasil, estudos realizados na Embrapa Soja, em Londrina (PR), possibilitaram a constatação de variedades que apresentavam as lesões do tipo resistente (RB), derivadas da variedade FT-2 e determinadas por um gene dominante (ARIAS et al., 2003). Entretanto, o surgimento de uma nova raça do fungo na safra 2002/03, ocasionou a quebra da resistência conferida pelos genes *Rpp1* e *Rpp3* presentes em FT-2 (ARIAS et al., 2004).

Além dessa variabilidade patogênica verificada pela quebra da resistência nas fontes até então detectadas no Brasil, o fungo tem se mostrado bastante variável quanto à sua adaptabilidade e virulência, fato comprovado pela ocorrência da doença

em áreas com temperaturas freqüentemente acima de 30°C, como as observadas na região Centro-Oeste, indicando que o patógeno pode causar danos importantes à soja, desde que as condições de umidade sejam adequadas (YORINORI et al., 2004).

Desse modo, a utilização de fontes exóticas de resistência, portadoras de outros genes ou combinações gênicas, ou o uso da resistência horizontal, pode ser a melhor estratégia para a obtenção de cultivares resistentes ou tolerantes ao patógeno, aliada a um manejo adequado com outras técnicas, com mais eficiência no controle da doença.

#### **2.4. Seleção assistida por marcadores moleculares**

A seleção de genótipos auxiliada por marcadores moleculares tem sido bastante utilizada em várias culturas, baseando-se na associação de marcadores moleculares, com caracteres herdáveis e de interesse agrônômico, principalmente os relacionados à resistência de pragas e doenças (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Assim, a seleção assistida constitui-se em um processo de seleção indireta, no qual o caráter em questão apresenta uma herdabilidade próxima a 100%, já que não possui influência ambiental. Este tipo de processo seletivo poderá incrementar a eficiência do melhoramento de plantas, reduzindo-se o número de progênies avaliadas e o número de gerações para a estabilização dos genótipos, pela possibilidade de seleção em gerações precoces (BARBOSA NETO, 1998; FEDERIZZI, 1998).

Dentre os marcadores moleculares existentes, destaca-se o RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*), baseado na amplificação de fragmentos de DNA utilizando iniciadores de seqüência aleatória, com 10 nucleotídeos, que se ligam a dois sítios, ao acaso, em seqüência complementar nas fitas opostas do DNA-molde. A técnica consiste de ciclos de desnaturação, pareamento e alongamento da seqüência pela enzima DNA polimerase. O RAPD apresenta como vantagens, em relação a outros marcadores, a rapidez e praticidade do método, necessidade de menores quantidades de DNA e o menor custo. Uma de suas limitações é a natureza dominante do marcador (WILLIAMS et al., 1990; FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Outra limitação dos marcadores RAPD refere-se à sua especificidade, já que várias marcas podem ser amplificadas usando-se apenas um iniciador, por causa de sua natureza aleatória. Como alternativa PARAN & MICHELMORE (1993) sugerem a conversão destes em marcadores SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*), que possuem a vantagem de aumentar a especificidade do marcador pela detecção de um único loco, sendo sua amplificação menos sensível às condições de reação, além da possibilidade de apresentar natureza co-dominante. Por definição, SCAR são fragmentos de DNA genômico, localizados em um loco definido, que são identificados por amplificação via PCR, utilizando um par de oligonucleotídeos específicos como iniciadores (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Para facilitar a identificação de marcadores moleculares ligados a genes de resistência a doenças, MICHELMORE et al. (1991) propuseram uma metodologia denominada de BSA (*Bulked Segregant Analysis*) que possibilita a identificação de marcadores ligados a genes utilizando-se uma população segregante de plantas F<sub>2</sub> para o caráter de interesse. A técnica baseia-se no uso de marcadores moleculares para detectar diferenças entre duas amostras de DNA oriundas de uma população segregante. Estas amostras são obtidas a partir de quantidades equimolares de DNA de indivíduos selecionados com base nas expressões fenotípicas extremas de um caráter, como reação a alguma doença (resistência ou suscetibilidade), para se ter um genótipo idêntico em uma região de interesse e genótipos ao acaso em regiões não ligadas à região alvo. Assim, as duas amostras de DNA tendem a diferir somente na região selecionada, sendo monomórficas nas demais.

Diversos estudos desenvolvidos com marcadores SCAR em várias culturas são citados na literatura, evidenciando a utilidade do método. Dentre eles, DAX et al. (1998) desenvolveram um marcador SCAR para resistência ao vírus do mosaico em tomate, ligado ao gene *Tm2*. LIU et al. (1999), desenvolveram marcadores SCAR ligados ao gene *Pm21*, que confere resistência ao oídio no trigo. Em tabaco, MILLA et al. (2005) desenvolveram dois marcadores SCAR flanqueando um QTL de resistência ao mofo azul. Na cultura da soja, HEER et al. (1998) identificaram um marcador SCAR ligado a um QTL para resistência ao nematóide de cisto (raças 1 e 3), MARTINS FILHO et al.

(2002) converteram em SCAR um fragmento de RAPD ligado à resistência à mancha olho-de-rã. Por sua vez, ZHENG et al. (2003) desenvolveram um SCAR ligado ao vírus do mosaico e GAVIOLI et al. (2007) desenvolveram um marcador SCAR ligado ao gene de resistência ao cancro da haste em soja.

### 3. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, L. A.; KIIHL, R. A. Melhoramento da soja no Brasil – desafios e perspectivas. In: CÂMARA, G. M. (Coord.) **Soja: tecnologia da produção**. Piracicaba: Publique, 1998. p. 40-54.
- ANDRADE, P. J. M.; ANDRADA, D. F. A. A. **Ferrugem asiática**: uma ameaça à sojicultura brasileira. Dourados: Embrapa Fundação Chapadão, 2002. 11p.
- ARIAS, C. A. A.; BROGIN, R. L.; YORINORI, J. T.; KIIHL, A. S.; TOLEDO, J. F. F. Um gene dominante determinando a resistência da cultivar FT-2 à ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2., 2003, Porto Seguro. **Resumos**. Londrina: SBMP, 2003.
- ARIAS, C. A. A.; RIBEIRO, A. S.; YORINORI, J. T.; BROGIN, R. L.; OLIVEIRA, M. F.; TOLEDO J. F. F. Inheritance of resistance of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Sidow). In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 7.; INTERNATIONAL SOYBEAN PROCESSING AND UTILIZATION CONFERENCE, 4.; CONGRESSO BRASILEIRO DA SOJA, 3., 2004, Foz do Iguaçu. **Proceedings**. Londrina: Embrapa Soja, 2004. p. 371.
- BARBOSA NETO, J.F. Seleção assistida por marcadores moleculares. In: MILACH, S.C.K., ed. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. p.75-80.
- BLACK, R.J. Complexo soja: Fundamentos, situação atual e perspectivas. In: CÂMARA, G.M.S. (Ed.). **Soja: tecnologia da produção II**. Piracicaba: Ed. ESALQ, 2000. p. 1-17.
- BROMFIELD, K. R.; HARTWIG, E. E. Resistance to soybean rust and mode of inheritance. **Crop Science**, Madison, v. 20, n. 2, p. 254-255, 1980.

- CÂMARA, G.M. de S. **SOJA: Tecnologia da produção**. USP, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Departamento de Agricultura – Piracicaba, 1998, 293p.
- CARUSO, R. **Soja: uma caminhada sem fim**. Campinas: Fundação Cargill, 95p. 1996.
- CARVALHO Jr, A. A.; FIGUEIREDO, M. B. A verdadeira identidade da ferrugem da soja no Brasil. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 26, n. 2, p. 197-200, 2000.
- CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira – Grãos, Safra 2007/08. Disponível em : [www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/estudo\\_safra.pdf](http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/estudo_safra.pdf). Acesso: 20/02/2008.
- DAX, E.; LIVNEH, O.; ALISKEVICIUS, E.; EDELBAUM, O.; KEDAR, N.; GAVISH, N.; MILO, J.; GEFFEN, F.; BLUMENTHAL, A.; RABINOWICH, H.D.; SELA, I. A SCAR marker linked to the ToMV resistance gene, *Tm2*, in tomato. **Euphytica**, Netherlands, v. 101, p. 73-77, 1998.
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa de Soja. **Tecnologia de produção de soja - região central do Brasil 2007**. Londrina: Embrapa Soja, 2006, 225 p.
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2007. **Soja em números (safra 2006/2007)**. Disponível em: <http://www.embrapa.br/>. Acesso em 20 dezembro 2007.
- EMBRAPA. **Prejuízo com ferrugem da soja se mantém estável nessa safra**. Disponível em: [www.cnpsa.embrapa.br/alerta/ver\\_alerta.php?cod\\_pagina\\_sa=175&cultura=1](http://www.cnpsa.embrapa.br/alerta/ver_alerta.php?cod_pagina_sa=175&cultura=1) Acesso: 22/02/2008.
- FEDERIZZI, L.C. Estrutura de um programa de melhoramento de plantas e possíveis aplicações de marcadores moleculares: visão do melhorista. In: MILACH, S.C.K., ed. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. p.3-15.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3 ed. Brasília : EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.
- GAVIOLI, E.A.; MAURO, A.O.; CENTURION, M.A.P.C.; MAURO, S.M.Z. Development of SCAR marker linked to stem canker resistance gene in soybean. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 7, p. 133-140, 2007.

- 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**. Disponível em: [www.springerlink.com/content/a657751v1l520810/fulltext.pdf](http://www.springerlink.com/content/a657751v1l520810/fulltext.pdf). Acesso: 03/06/2008.
- GAUNT, R.E. The relationship between plant disease severity and yield. **Annual Review of Phytopathology**, v. 33, p. 119-145. 1995.
- GODOY, C.V.; KOGA, L.J.; CANTERI, M.G. Diagrammatic scale for assessment of soybean rust severity. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 63-68. 2006.
- HARTWIG, E. E. Identification of a fourth major genes conferring to rust in soybean. **Crop Science**, Madison, v. 26, p. 1135-1136, 1986.
- HARTWIG, E.E.; BROMFIELD, K.R. Relationships among three genes conferring specific resistance to rust in soybeans. **Crop Science**, Madison, v. 23, p.237-39, 1983.
- HEER, J.A.; KNAP, H.T.; MAHALINGAM, R.; SHIPE, E.R.; ARELLI, P.R.; MATTHEWS, B.F. Molecular markers for resistance to *Heterodera glycines* in advanced soybean germplasm. **Molecular Breeding**, Netherlands, v. 4, p. 359-367, 1998.
- LIU, Z.; SUN, Q.; NI, Z.; YANG, T. Development of SCAR markers linked to the *Pm21* gene conferring resistance to powdery mildew in common wheat. **Plant Breeding**, Berlim, v. 118, p. 215-19, 1999.
- MARTINS FILHO, S.; SEDIYAMA, C.S.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. RAPD and SCAR markers linked to resistance to frog-eye leaf spot in soybean. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, n. 3, p. 317-321, 2002.
- McLEAN, R. J.; BYTH, D. E. Inheritance of resistance to rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in soybeans. **Australian Journal of Agricultural Research**, East Melbourne, v. 31, p. 951-956, 1980.
- MICHELMORE, R.W.; PARAN, I.; KESSELI, R.V. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregation populations. **Proceedings National Academy Science USA**, v.88, p.9828-9832, 1991.

- MILLA, S.R.; LEVIN, J.S.; LEWIS, R.S.; RUFTY, R.C. RAPD and SCAR markers linked to an introgressed gene conditioning resistance to *Peronospora tabacina* D.B. Adam. In tobacco. **Crop Science**, Madison, v. 45, p. 2346-2354, 2005.
- PARAN, I.; MICHELMORE, R.W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 85, p. 985-93, 1993.
- PEREIRA, A. A.; ZAMBOLIM, L.; CHAVES, G. M. Melhoramento visando a resistência a doenças. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 11, n. 122, p. 82-92, 1985.
- SEDIYAMA, T.; TEIXEIRA, R.C.; REIS, M.S. Melhoramento da Soja. In: BORÉM, A. (ed.) **Melhoramento de espécies cultivadas**. 2 Ed. Viçosa: Ed. UFV, 2005. p.553-603.
- SINCLAIR, J.B.; HARTMAN, G.L. Soybean rust. In: HARTMAN, G.L.; SINCLAIR, J.B.; RUPE, J.C. (Eds.) **Compendium of soybean diseases**. 4ed. St. Paul: American Phytopathological Society, 1999. p. 3-4.
- WILLIAMS, J.G.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, L.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.6531-6535. 1990.
- YORINORI, J.T.; PAIVA, W.M.; FREDERICK, R.D.; FERNANDEZ, P.F.T. Ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi*) no Brasil e no Paraguai nas safras 2000/01 e 2001/02. In: Congresso Brasileiro de Soja, 2, 2002, Foz do Iguaçu. **Resumos**. Londrina: Embrapa Soja, 2002, p.94.
- YORINORI, J. T.; NUNES JR., J.; LAZZAROTTO J.J. **Ferrugem “asiática” da soja no Brasil**: evolução, importância econômica e controle. Londrina: Embrapa Soja, 2004. 36p. (Documentos n.247).
- YORINORI, J.T.; PAIVA, W.M.; FREDERICK, R.D.; COSTAMILAN, L.M.; BERTAGNOLI, P.F.; HARTMAN, G.L.; GODOY, C.V.; NUNES, J.J. Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. **Plant Disease**, v. 89, p. 675-77, 2005.
- ZHENG, C.; CHANG, R.; QIU, L.; CHEN, P.; WU, X.; CHEN, S. Identification and characterization of a RAPD/SCAR marker linked to a resistance gene for soybean mosaic virus in soybean. **Euphytica**, Netherlands, v. 132, p. 199-210, 2003.



## **CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO QUALI-QUANTITATIVA DA RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS DE SOJA À FERRUGEM ASIÁTICA**

**RESUMO** – A ferrugem asiática da soja destaca-se atualmente como uma das principais causas de perdas significativas e aumento dos custos de produção da cultura. As poucas fontes de resistência constituem genótipos exóticos, que precisam ser introduzidos nos programas de melhoramento brasileiros. Assim, os objetivos do presente trabalho foram: 1) estudar a herança da resistência à ferrugem asiática em novas fontes exóticas; 2) quantificar os danos causados pelo patógeno de acordo com a severidade da doença, visando a seleção de genótipos resistentes e agronomicamente superiores. Populações oriundas de três cruzamentos foram submetidas à inoculação com o fungo causador da ferrugem, sendo posteriormente avaliadas quanto ao tipo de lesão (RB – resistente ou TAN – suscetível) e severidade da doença, além dos caracteres número de vagens (NV), número de sementes (NS) e ciclo de maturação. O teste de Qui-quadrado indicou a presença de um gene dominante ligado à resistência no cruzamento PI 200526 (Shira Nuhi) x CD 205, enquanto nos cruzamentos PI 200456 x MG/BR 46 (Conquista) e GC 84058-21-4 x IAC Foscarin 31, observou-se a presença de um gene recessivo. A análise multivariada agrupou eficientemente os genótipos mais similares em cada cruzamento com base nos quatro caracteres avaliados (severidade, NV, NS e ciclo). O teste de Tukey indicou diferença significativa de número de lesões e de esporulação entre os genótipos RB e TAN. Assim, genótipos superiores podem ser selecionados para a continuidade do processo de desenvolvimento de cultivares resistentes à ferrugem asiática e portadoras de bons atributos agronômicos.

**Palavras-Chave:** análise multivariada, escala diagramática, *Glycine max*, herança da resistência, *Phakopsora pachyrhizi*

## 1. Introdução

A ferrugem asiática, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, constitui-se num dos principais problemas da cultura da soja na atualidade, principalmente por sua ampla disseminação e incidência. No Brasil, desde sua constatação na safra 2000/01 o patógeno vem causando continuamente perdas significativas, sendo que somente na safra 2006/07 essas perdas atingiram cerca de 4,5% da produção total brasileira, equivalendo a US\$ 615,7 milhões, e que somados aos custos com operações de controle chegam a US\$ 2,19 bilhões (YORINORI et al., 2005; EMBRAPA, 2008).

Os sintomas da ferrugem são caracterizados por pequenas lesões, com minúsculas protuberâncias, as urédias, mais abundantes na superfície inferior das folhas. Essas lesões aumentam de tamanho gradualmente, tornando-se de coloração cinza a castanha, e abrindo-se um poro por onde são expelidos os uredosporos. À medida que a esporulação prossegue, o tecido adquire coloração castanho-clara (lesão do tipo TAN) a castanho-avermelhada (lesão RB), sendo essa diferenciação de lesão utilizada para caracterizar a reação de resistência ao patógeno. Além disso, a queda prematura de folhas ocasionada pela doença afeta consideravelmente a formação dos grãos, pela redução da taxa fotossintética da planta. Assim, quanto mais cedo ocorrer a infecção, maiores serão as perdas em rendimento e qualidade (ANDRADE & ANDRADA, 2002; YORINORI et al., 2004).

As lesões RB são típicas de genes dominantes ou de efeito principal da chamada resistência vertical ou qualitativa. Esse tipo de lesão, descrito como reação de hipersensibilidade, ocasiona morte celular na região infectada, limitando o desenvolvimento do patógeno, que necessita de células vivas para sobreviver e se multiplicar (BONDE et al., 2006; ZAMBENEDETTI et al., 2007).

A avaliação da reação de resistência dos genótipos à ferrugem asiática tem sido feita normalmente pelo tipo de lesão (RB – resistente e TAN – suscetível), conforme mencionado. Isso ocorre porque, embora danos de mais de 80% sejam atribuídos ao patógeno, os estudos epidemiológicos da doença ainda são escassos no Brasil, devido à sua recente introdução, necessitando de métodos de quantificação mais precisos

para a obtenção de resultados confiáveis. Com isso, a padronização dos métodos de avaliação da doença que têm sido propostos, permitirá a comparação dos resultados obtidos em quaisquer experimentos (GODOY et al., 2006).

Segundo GAUNT (1995), quando a incidência (número de plantas infectadas numa amostra) não é a variável mais conveniente na quantificação de doenças foliares, a avaliação da severidade (porcentagem de área de tecido coberto com sintomas) pode ser mais indicada. Dessa forma, GODOY et al. (2006) sugeriram o uso de uma escala diagramática para quantificação da severidade da doença, possibilitando um estudo mais acurado da incidência da mesma.

Embora a escala diagramática tenha se mostrado eficiente na quantificação da doença, as formas de se analisar estatisticamente seus resultados ainda não estão bem elucidadas, principalmente no caso dos programas de melhoramento genético, no qual se avalia um grande número de progênies, em gerações precoces, em ensaios sem repetição, aliando-se os resultados da resistência a outros caracteres agrônômicos. Assim, a análise multivariada pode ser uma alternativa para a interpretação dos resultados, por ser uma metodologia efetiva em estudos de classificação, permitindo o estabelecimento das relações de dependência entre as variáveis, e possibilitando o agrupamento dos indivíduos de acordo com sua similaridade (DIAS-FILHO et al., 1994).

O uso de cultivares resistentes como medida de controle tem sido um desafio. Diversos estudos possibilitaram determinar que a resistência à ferrugem asiática na soja era governada por quatro genes dominantes (*Rpp1* a *Rpp4*), identificados em introduções de plantas (PI's) e cultivares exóticas (BROMFIELD & HARTWIG, 1980; McLEAN & BYTH, 1980; HARTWIG & BROMFIELD, 1983; HARTWIG, 1986). Entretanto, o surgimento de uma nova raça do fungo na safra 2002/03 ocasionou a quebra da resistência conferida pelos genes *Rpp1* e *Rpp3*, presentes nas cultivares brasileiras consideradas resistentes até então. Mediante tais fatos, não há no mercado, até o momento, cultivares resistentes adaptadas às condições de cultivo brasileiras. Apenas as fontes portadoras dos genes *Rpp2* e *Rpp4* permanecem eficientes no Brasil (ARIAS et al., 2003; ARIAS et al., 2004), embora estudos recentes de GARCIA et al. (2008) tenham identificado um novo loco de resistência eficiente, denominado *Rpp5*.

Ainda com relação à herança do caráter resistência à ferrugem, estudos recentes têm sugerido a existência de arranjos complexos dos locos *Rpp*, com a possível ocorrência de alelismo múltiplo e/ou a combinação de genes com diferentes modos de ação gênica localizados muito próximos nos grupos de ligação (GARCIA et al., 2008). Desse modo, o conhecimento e utilização de fontes de resistência exóticas, portadoras de novos genes ou combinações gênicas, ou mesmo com uma resistência horizontal ou parcial e menor severidade da doença, pode ser a melhor estratégia para a obtenção dos genótipos desejados, a qual, combinada com um manejo adequado, permitirá um controle mais eficiente da doença.

A partir disso, os objetivos deste estudo foram: 1) estudar a herança da resistência ao patógeno causador da ferrugem asiática em cruzamentos com diferentes fontes de resistência; 2) quantificar e correlacionar a presença da doença nesses cruzamentos com possíveis alterações em ciclo e produção de sementes nas plantas infectadas, através da análise multivariada, auxiliando no direcionamento do processo seletivo de genótipos resistentes e agronomicamente superiores.

## **2. Material e Métodos**

O experimento foi conduzido em casa de vegetação climatizada, pertencente ao Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, câmpus de Jaboticabal, nos anos de 2005 a 2007, correspondendo à obtenção e avaliação de progênies desde a hibridação até a geração  $F_2$ .

As populações foram obtidas de cruzamentos efetuados entre genótipos exóticos resistentes à ferrugem asiática e cultivares comerciais brasileiras, conforme pode ser observado na Tabela 1. As diversas plantas  $F_1$  obtidas em cada cruzamento foram identificadas e semeadas, em casa de vegetação, em vasos de 5 L contendo solo devidamente preparado (com terra, areia e vermiculita), para avanço de geração.

Todos os genótipos  $F_2$  obtidos dos três cruzamentos indicados na Tabela 1 foram então semeados e conduzidos também em vasos na casa de vegetação, conforme

descrito anteriormente. As plantas foram devidamente identificadas e quando atingiram o estágio R1 (FEHR & CAVINESS, 1977), foram submetidas à inoculação com o fungo *Phakopsora pachyrhizi*, causador da ferrugem asiática, para avaliação e classificação da reação de cada indivíduo quanto à resistência ao patógeno.

**Tabela 1.** Cruzamentos entre genótipos resistentes e suscetíveis à ferrugem asiática, efetuados no ano agrícola 2005/06, incluindo suas genealogias, o número de plantas F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> obtidas.

Genealogia			Plantas F <sub>1</sub>	Plantas F <sub>2</sub>
PI 200526 (Shira Nuhi)	x	CD 205	9	257
PI 200456	x	MG/BR 46 (Conquista)	3	80
GC 84058-21-4	x	IAC Foscarin 31	2	63

O inóculo utilizado no presente estudo foi oriundo de folhas coletadas em plantas suscetíveis cultivadas em casa de vegetação e naturalmente infectadas, fornecidas pela empresa Tropical Melhoramento e Genética de Cambé – PR. A retirada dos esporos na superfície abaxial das folhas foi feita com o auxílio de pincéis, sendo as folhas lavadas em solução de água + 0,05% do espalhante adesivo Tween 20. Esta suspensão foi submetida à contagem de esporos utilizando-se um hemocitômetro, ou “câmara de Neubauer”, sendo feita a calibração para cerca de 10<sup>4</sup> uredosporos/mL.

De posse da suspensão pronta, as plantas foram pulverizadas no final da tarde, devido à temperatura mais amena, utilizando-se um pulverizador manual com capacidade de 1,5 L, tomando-se o cuidado de molhar bem as superfícies superior e inferior das folhas. As plantas foram mantidas sob câmara úmida por cerca de 16 horas, utilizando-se sacos de plástico pretos umedecidos e presos com fita adesiva. A partir de então, as plantas foram pulverizadas diariamente com água, por uma semana, para manutenção do “molhamento” foliar, facilitando a penetração do fungo.

Cerca de 10 dias após a inoculação, surgiram os primeiros sintomas da doença. Uma semana após o aparecimento das primeiras lesões foi realizada a primeira avaliação, seguindo-se mais duas avaliações em intervalos de 10 dias entre as mesmas. Nessas três avaliações foi feita a classificação de todas as plantas pelo tipo de lesão (Figura 1), para identificação dos genótipos resistentes (RB) e suscetíveis (TAN) em cada população de cada cruzamento.



**Figura 1.** Sintomas de suscetibilidade (lesão TAN) e de resistência (lesão RB) à ferrugem asiática em soja.

Nas mesmas três épocas de avaliação, também foi feita a estimativa do nível de infecção ou severidade (%) da doença em cada planta, utilizando a escala diagramática de GODOY et al. (2006). Nesse caso, foi observado um trifólio ao acaso de cada terço da planta (superior, médio e inferior) em cada avaliação, estimando-se a porcentagem do nível de severidade para cada trifólio. As avaliações dos referidos trifólios em todas as plantas foram efetuadas por duas pessoas, sendo calculada, posteriormente, uma média entre os dois avaliadores, de modo a reduzir a subjetividade do caráter avaliado. A partir dessas três notas dos terços das plantas obtidas em cada época de avaliação, foi calculada uma média geral de severidade da doença para cada planta.

Com os resultados de classificação dos genótipos pelo tipo de lesão (RB ou TAN), procedeu-se à análise de Qui-quadrado para o estudo da herança da resistência nos três cruzamentos, baseando-se em hipóteses de segregação mendelianas.

Os resultados da média de severidade da doença foram confrontados com as avaliações de número de vagens (NV), número de sementes (NS) e ciclo de maturação (ciclo), dos genótipos em cada cruzamento, por meio da análise multivariada, para

possibilitar a verificação do efeito da doença sobre caracteres ligados à produtividade e à precocidade. Nesse caso, foram aplicados dois métodos estatísticos multivariados para classificação dos genótipos em grupos: análise de agrupamentos hierárquica e análise de agrupamentos não-hierárquica *k-means* (SNEATH & SOKAL, 1973).

A análise de agrupamentos hierárquica foi realizada a partir da matriz da distância euclidiana entre os acessos (genótipos), para os quatro caracteres avaliados, usando-se o algoritmo de Ward para agrupar os acessos mais similares. O resultado apresentado na forma gráfica (dendrograma) auxiliou na identificação dos grupos. Além disso, a identificação dos acessos nos grupos também foi feita pelo procedimento *k-means*, que pertence à classe dos métodos de agrupamento não-hierárquicos e não supervisionados, e minimiza a variância dos acessos dentro de cada grupo (SNEATH & SOKAL, 1973). Todas as análises multivariadas foram realizadas após a padronização das variáveis, deixando-as com média 0 e variância 1.

Adicionalmente, foram feitas avaliações do número de lesões e de esporos, assim como da relação esporos/lesão, em discos foliares de 9 cm<sup>2</sup> retirados de oito folhas coletadas ao acaso para cada tipo de lesão: RB, TAN e um terceiro tipo encontrado de lesões RB com esporulação, denominadas aqui de RB[?]. Cada disco foliar foi imerso em 5 ml de solução água + Tween 20, obtendo-se uma suspensão de esporos a partir desse procedimento. Nessas suspensões oriundas de cada genótipo, foram feitas as avaliações do número médio de esporos por mL de suspensão, estimando-se o número total de esporos naquele volume de 5 mL, além do número médio de esporos por lesão, que foi possibilitado pela contagem prévia do número de lesões em cada disco foliar. As leituras do número médio de esporos por ml também foram feitas com o auxílio da “câmara de Neubauer”. A partir dessas avaliações procedeu-se ao teste de Tukey (5%) para comparação das médias entre os três tipos de lesões para cada característica.

As análises de Qui-quadrado e o teste de Tukey das avaliações de esporos e lesões foram efetuados com o auxílio do Programa Genes versão 2008 (CRUZ, 2001). Já a análise multivariada, com o agrupamento de Ward e o procedimento *k-means*, foi realizada no software STATISTICA versão 7.0 (STATSOFT, 2004).

### 3. Resultados e Discussão

As avaliações da reação de resistência dos genótipos de cada cruzamento pelo tipo de lesão (RB ou TAN) resultaram em diferentes hipóteses de segregação, que foram testadas pelo Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) para determinação da herança do caráter em questão, conforme pode ser observado nas Tabelas 2 a 4.

No cruzamento PI 200526 (Shira Nuhi) x CD 205 (Tabela 2), podem ser verificados os resultados não-significativos do teste de  $\chi^2$ , indicando a aceitação da hipótese de segregação 3:1 (resistente: suscetível) em todas as populações avaliadas, ou seja, o caráter de resistência à ferrugem asiática neste cruzamento, é condicionado por um gene de ação dominante. Além disso, a confiabilidade desses resultados pode ser constatada pelo teste de heterogeneidade não-significativo (P = 88,34%) apresentado na mesma Tabela, indicando que não há diferença entre as hipóteses de segregação testadas nas diversas populações do referido cruzamento.

**Tabela 2.** Número de plantas classificadas como resistentes (R) e suscetíveis (S) em todas as populações do cruzamento PI 200526 (Shira Nuhi) x CD 205 e resultados do teste de  $\chi^2$  e de heterogeneidade aplicados para as avaliações de resistência à ferrugem asiática em soja.

Populações	Plantas R	Plantas S	Total	GL	$\chi^2$	P (%)
1/13	8	3	11	1	0,030 <sup>ns</sup>	86,18
1/19	15	6	21	1	0,143 <sup>ns</sup>	70,55
1/27	19	8	27	1	0,309 <sup>ns</sup>	57,85
1/28	24	5	29	1	0,931 <sup>ns</sup>	33,46
1/28a	22	5	27	1	0,605 <sup>ns</sup>	43,67
1/29	20	7	27	1	0,012 <sup>ns</sup>	91,15
1/35	23	10	33	1	0,495 <sup>ns</sup>	48,17
1/40	27	12	39	1	0,692 <sup>ns</sup>	40,54
1/46	35	9	44	1	0,485 <sup>ns</sup>	48,62
Total				9	3,702 <sup>ns</sup>	92,99
Desvio				1	0,005 <sup>ns</sup>	94,27
Heterogeneidade				8	3,697 <sup>ns</sup>	88,34

P = probabilidade (%) obtida no teste de  $\chi^2$

<sup>ns</sup> = valores não significativos ao nível de 5% de probabilidade



Já nos cruzamentos PI 200456 x Conquista (Tabela 3) e GC 84058-21-4 x IAC Foscarin 31 (Tabela 4), nota-se a probabilidade da hipótese de segregação 1:3 (resistente: suscetível) com indícios do caráter de resistência ser condicionado por um gene recessivo, também com resultados não-significativos do teste de  $\chi^2$  em todas as populações dos dois cruzamentos. Nesses casos, os testes de heterogeneidade não-significativos ( $P = 31,79\%$  e  $P = 61,75\%$ , respectivamente) também confirmam a confiabilidade dos resultados obtidos da presença do gene recessivo nas diferentes populações originárias dos dois cruzamentos.

**Tabela 3.** Número de plantas classificadas como resistentes (R) e suscetíveis (S) em todas as populações do cruzamento PI 200456 x MG/BR 46 (Conquista) e resultados do teste de  $\chi^2$  e de heterogeneidade aplicados para as avaliações de resistência à ferrugem asiática em soja.

Populações	Plantas R	Plantas S	Total	GL	$\chi^2$	P (%)
2/10	3	8	11	1	0,030 <sup>ns</sup>	86,18
2/25	4	19	23	1	0,710 <sup>ns</sup>	39,94
2/48	16	31	47	1	2,050 <sup>ns</sup>	15,22
Total				2	2,790 <sup>ns</sup>	42,51
Desvio				1	0,498 <sup>ns</sup>	48,04
Heterogeneidade				1	2,292 <sup>ns</sup>	31,79

P = probabilidade (%) obtida no teste de  $\chi^2$

<sup>ns</sup> = valores não significativos ao nível de 5% de probabilidade

**Tabela 4.** Número de plantas classificadas como resistentes (R) e suscetíveis (S) em todas as populações do cruzamento GC 84058-21-4 x IAC Foscarin 31 e resultados do teste de  $\chi^2$  e de heterogeneidade aplicados para as avaliações de resistência à ferrugem asiática em soja.

Populações	Plantas R	Plantas S	Total	GL	$\chi^2$	P (%)
3/31	7	26	33	1	0,252 <sup>ns</sup>	61,53
3/37	8	22	30	1	0,044 <sup>ns</sup>	83,30
Total				2	0,297 <sup>ns</sup>	86,20
Desvio				1	0,048 <sup>ns</sup>	82,73
Heterogeneidade				1	0,249 <sup>ns</sup>	61,75

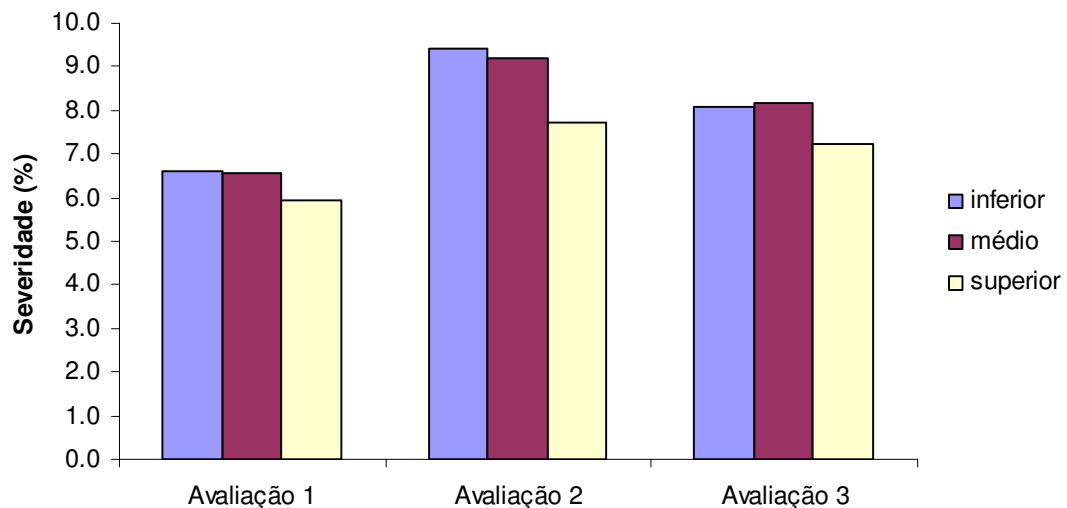
P = probabilidade (%) obtida no teste de  $\chi^2$

<sup>ns</sup> = valores não significativos ao nível de 5% de probabilidade

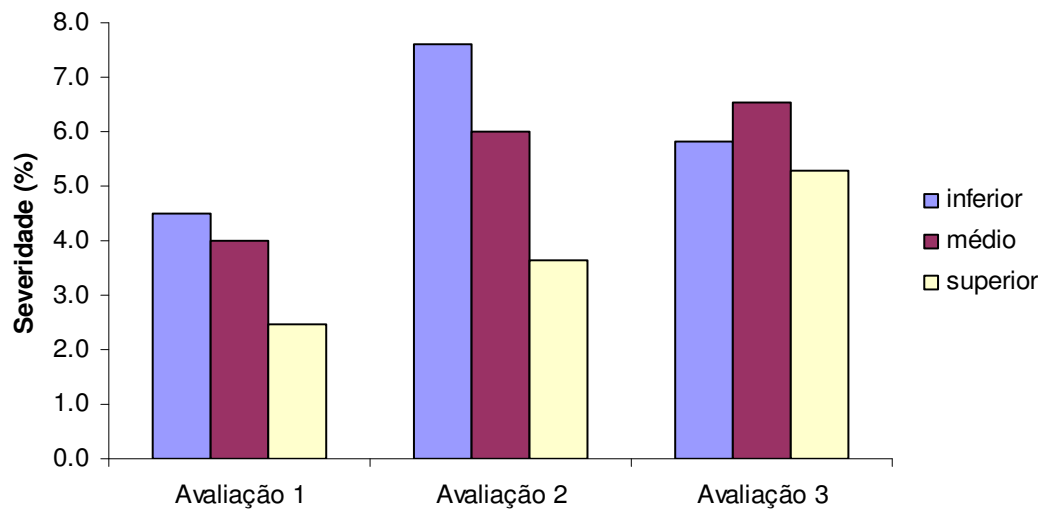
A consistência do teste de segregação realizado ainda pode ser confirmada pelos resultados encontrados na literatura em dois dos cruzamentos avaliados no presente estudo. Nesse ponto, GARCIA et al. (2008) também observaram a presença

de um gene de ação dominante sendo responsável pela resistência à ferrugem na PI 200526 (Shira Nuhi), assim como a ação de um gene recessivo para resistência na PI 200456. Por outro lado, PIEROZZI et al. (2008), apontaram indícios de dois genes interagindo no controle da resistência à ferrugem na PI 200526, embora em algumas de suas populações a hipótese de um gene dominante tenha sido sugerida. Esse fato reforça a necessidade de manutenção das pesquisas, visando a detecção e utilização de novos genes ou interações gênicas nos programas de melhoramento, para obtenção de cultivares mais eficientes contra esse patógeno da cultura da soja.

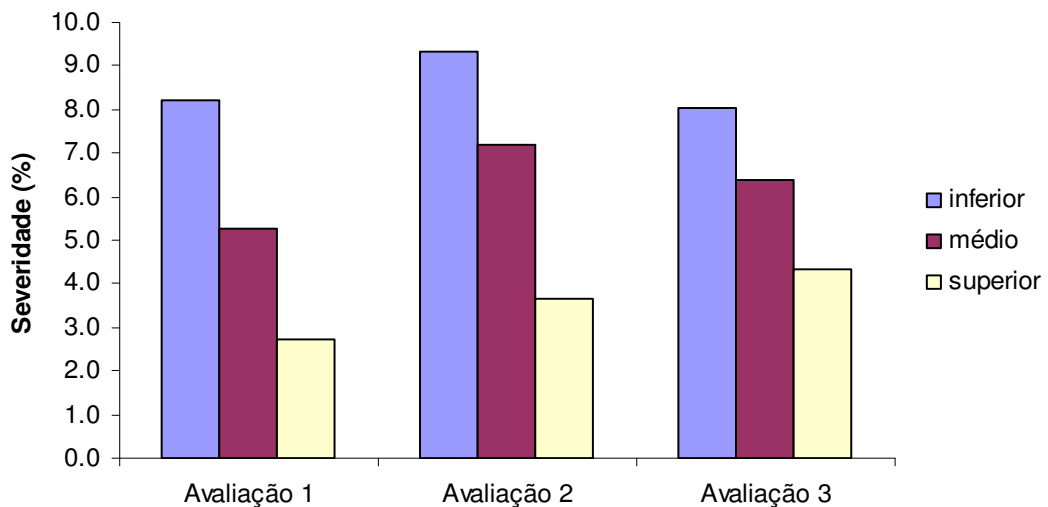
No que diz respeito à avaliação da severidade da doença, de modo geral, observa-se nos três cruzamentos (Figuras 2 a 4, respectivamente), um evidente progresso da doença entre a primeira e a segunda épocas de avaliação, em todos os terços das plantas avaliadas. Entretanto, uma redução da severidade pode ser notada em algumas situações entre a segunda e a terceira avaliações, principalmente nos terços inferior e médio. Esse fato se deve provavelmente à pronunciada queda de folhas ocorrida entre essas duas avaliações, pela precocidade de alguns genótipos e pelo próprio acréscimo da presença do patógeno.



**Figura 2.** Médias de severidade da ferrugem asiática nos terços superior, médio e inferior, nas três épocas de avaliação, observadas nos genótipos  $F_2$  do cruzamento PI 200526 (Shira Nuhi) x CD 205. Jaboticabal/SP, 2007.



**Figura 3.** Médias de severidade da ferrugem asiática nos terços superior, médio e inferior, nas três épocas de avaliação, observadas nos genótipos F<sub>2</sub> do cruzamento PI 200456 x MG/BR 46 (Conquista). Jaboticabal/SP, 2007.

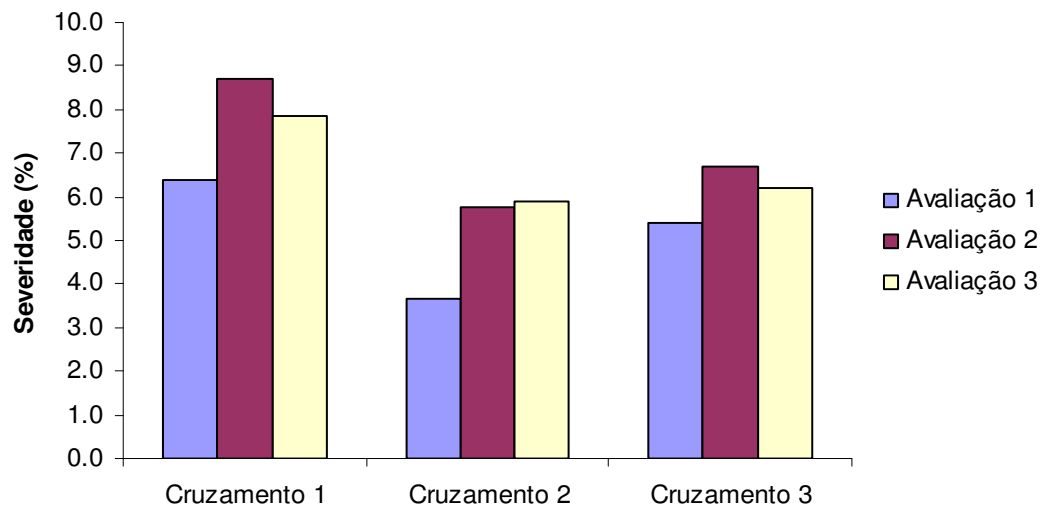


**Figura 4.** Médias de severidade da ferrugem asiática nos terços superior, médio e inferior, nas três épocas de avaliação, observadas nos genótipos F<sub>2</sub> do cruzamento GC 84058-21-4 x IAC Foscarin 31. Jaboticabal/SP, 2007.

Ainda nas Figuras 2 a 4, contata-se a maior severidade da doença no terço inferior das plantas para os três cruzamentos, seguindo-se dos terços médio e superior, este último, em alguns casos, apresentando menos da metade de área foliar infectada

em relação aos trifólios inferiores (Figura 4), fato explicado pelo micro-clima mais favorável ao desenvolvimento do patógeno na porção inferior das plantas, além de ser a região que recebe constantemente os esporos produzidos nos terços superiores, conforme observado também por ZAMBENEDETTI et al. (2007).

Já na Figura 5, nota-se uma comparação da doença entre os três cruzamentos, nas três avaliações. Nesse caso, fica evidente a maior severidade do patógeno no cruzamento 1 (Shira Nuhi x CD 205), onde também ocorreu o aumento mais pronunciado no decorrer das épocas de avaliação, em detrimento dos outros dois cruzamentos, embora o mesmo tenha apresentado o maior número de plantas resistentes (RB). Vale reforçar a redução na média da porcentagem de infecção na terceira avaliação, explicada pela queda de folhas ocasionada pela alta incidência da doença, fato também constatado por outros autores (GODOY et al., 2006; RIBEIRO et al., 2007), com seu efeito potencializado pela precocidade das cultivares parentais. Nesse caso, destaca-se que, a cultivar IAC Foscarin 31 apresenta ciclo precoce (até 120 dias) para o Estado de São Paulo, enquanto CD 205 é semi-precoce (121 a 130 dias) e a MG/BR 46 (Conquista) é de ciclo médio (131 a 140 dias) (EMBRAPA, 2006).

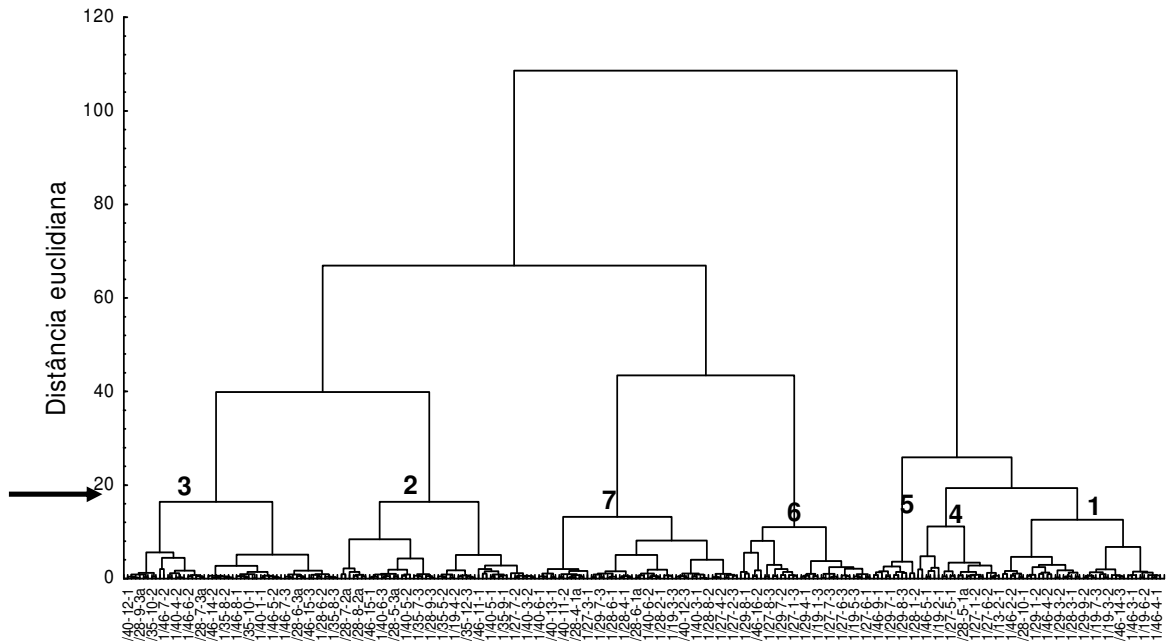


**Figura 5.** Médias de severidade da ferrugem asiática nas três épocas de avaliação, observadas nos genótipos F<sub>2</sub> dos cruzamentos 1 (Shira Nuhi x CD 205), 2 (PI 200456 x Conquista) e 3 (GC 84058-21-4 x IAC Foscarin 31). Jaboticabal/SP, 2007.

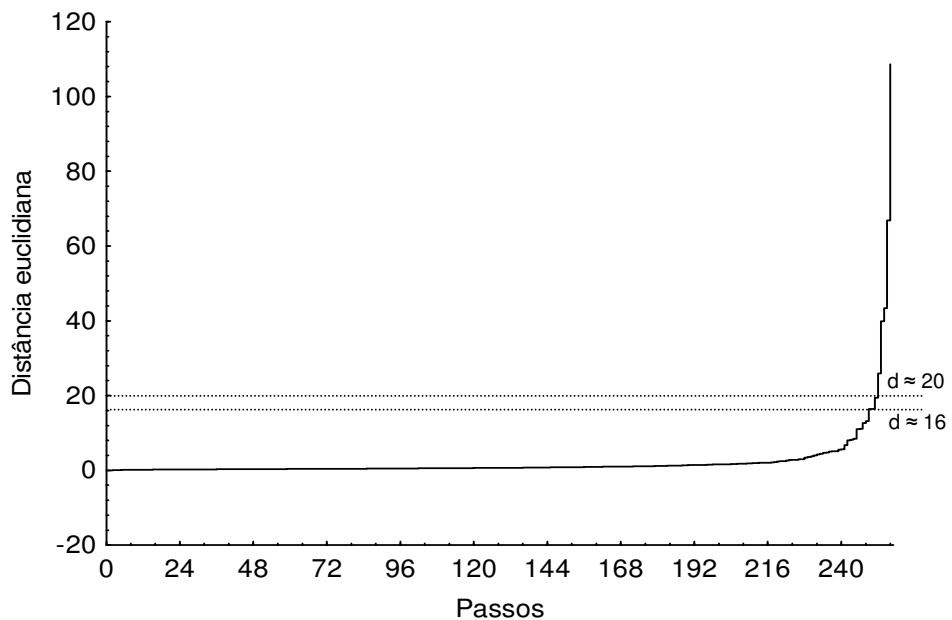
As avaliações de severidade da doença também foram estudadas pela análise multivariada, sendo confrontadas com as avaliações dos caracteres número de vagens (NV), número de sementes (NS) e ciclo de maturação (ciclo) para todos os indivíduos dos três cruzamentos, objetivando-se a detecção do efeito dos diferentes graus de incidência do patógeno, e permitindo o agrupamento dos indivíduos com características mais similares. Para isso, apesar da diferença de severidade da doença observada entre os três terços da planta, foi estimado um valor médio da doença em cada planta para a utilização dos dados na análise multivariada, de modo a padronizar os resultados e evitar possíveis interferências devido à queda prematura de folhas.

A formação de grupos obtida na análise hierárquica pelo método de Ward pode ser observada nos dendrogramas dos três cruzamentos (Figuras 6, 8 e 10). Nesse caso, como não existem métodos definitivos para determinar o número exato de grupos formados, os valores da distância euclidiana podem ser plotados num gráfico contendo os sucessivos passos de agrupamento dos acessos. Nesse gráfico, a ocorrência de um platô nos valores da distância euclidiana indica que muitos grupos foram formados nessa distância, e este pode ser um ponto de corte ótimo para determinação do número de grupos adequado, significando que houve uma mudança expressiva naquele ponto (DIAS-FILHO et al., 1994). No presente estudo, os referidos gráficos podem ser observado nas Figuras 7, 9 e 11, constatando-se que foram escolhidas as regiões de platô de variação expressiva de 16,0 a 20,0 no cruzamento 1 (Figura 7), de 9,0 a 14,0 no cruzamento 2 (Figura 9) e de 6,5 a 12,0 no cruzamento 3 (Figura 11), que permitiram uma boa divisão de grupos nos três cruzamentos.

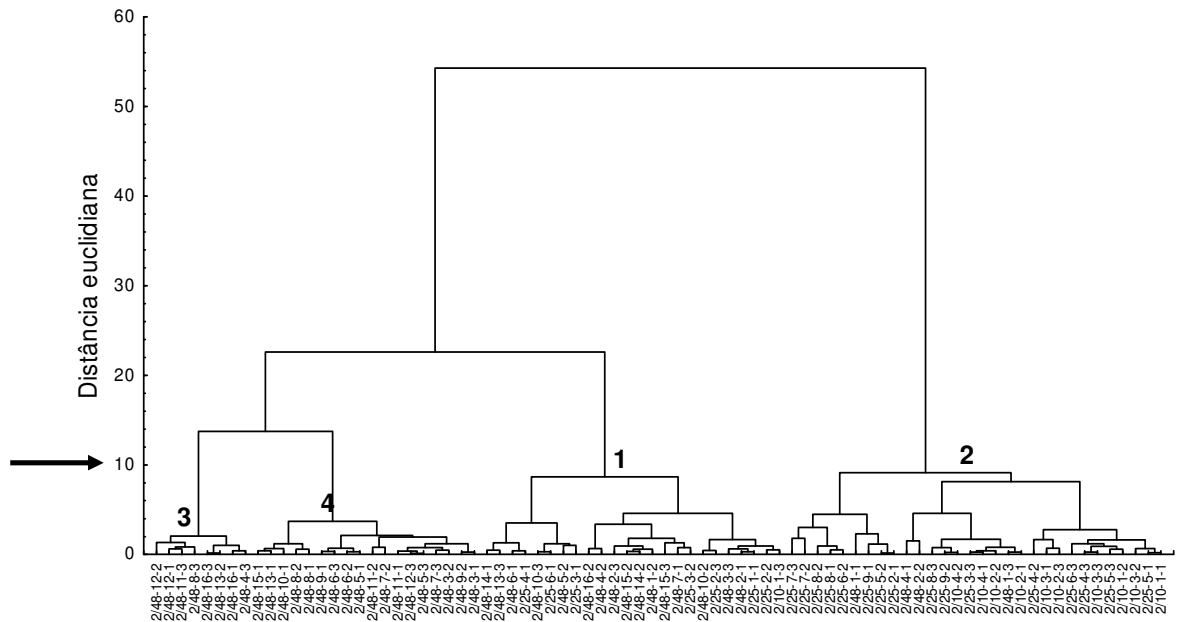
Conforme pode ser notado na Figura 6, para o cruzamento Shira Nuhi x CD 205, a referida região de corte admitiu a formação de sete grupos de genótipos com base nos caracteres estudados. Na Figura 8, para o cruzamento PI 200456 x Conquista, pode-se conferir a formação de quatro grupos na região de salto da variação da distância euclidiana escolhida, assim como ocorrido para o cruzamento GC 84058-21-4 x IAC Foscarin 31 (Figura 10), também com formação de quatro grupos.



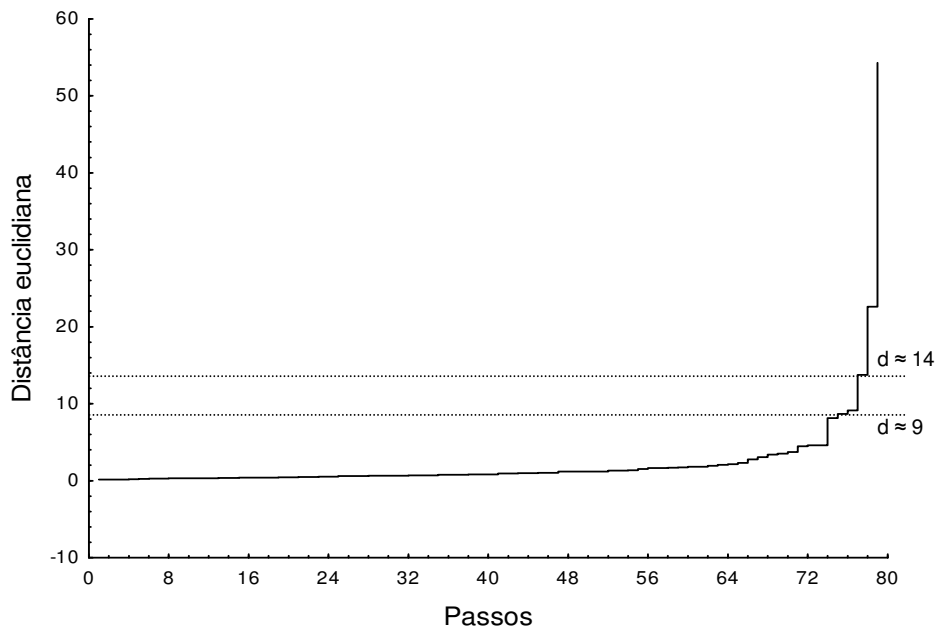
**Figura 6.** Dendrograma resultante do agrupamento pelo método de Ward, para o cruzamento Shira Nuhi x CD 205, indicando a formação de grupos segundo a severidade, número de vagens, número de sementes e ciclo nos 257 genótipos  $F_2$  de soja. Os grupos são identificados pelos números (1 a 7), enquanto a seta indica o ponto de corte.



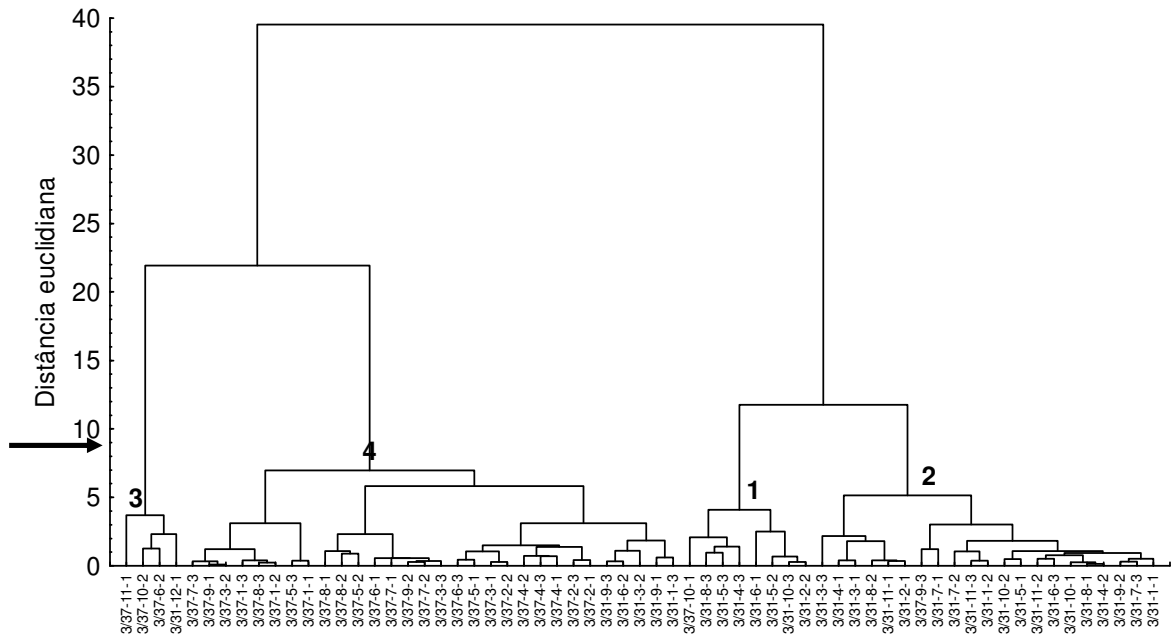
**Figura 7.** Representação gráfica da variação expressiva da distância euclidiana entre as variáveis, que permitiu a formação dos grupos de genótipos  $F_2$  de soja para o cruzamento Shira Nuhi x CD 205. As linhas indicam a região escolhida.



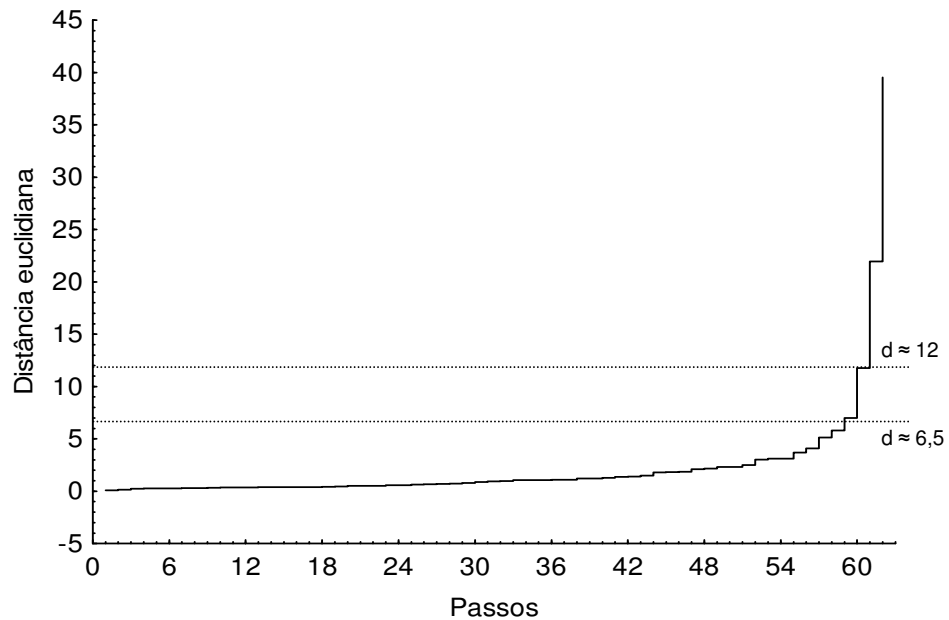
**Figura 8.** Dendrograma resultante do agrupamento pelo método de Ward, para o cruzamento PI 200456 x Conquista, mostrando a formação de grupos segundo a severidade, número de vagens, número de sementes e ciclo nos 80 genótipos F<sub>2</sub> de soja. Os grupos são identificados pelos números (1 a 4), enquanto a seta indica o ponto de corte.



**Figura 9.** Representação gráfica da variação expressiva da distância euclidiana entre as variáveis, que permitiu a formação dos grupos de genótipos F<sub>2</sub> de soja para o cruzamento PI 200456 x Conquista. As linhas indicam a região escolhida.



**Figura 10.** Dendrograma resultante do agrupamento pelo método de Ward, para o cruzamento GC 84058-21-4 x IAC Foscarin 31, mostrando a formação de grupos segundo a severidade, número de vagens, número de sementes e ciclo nos 63 genótipos  $F_2$  de soja. Os grupos são identificados pelos números (1 a 4), enquanto a seta indica o ponto de corte.

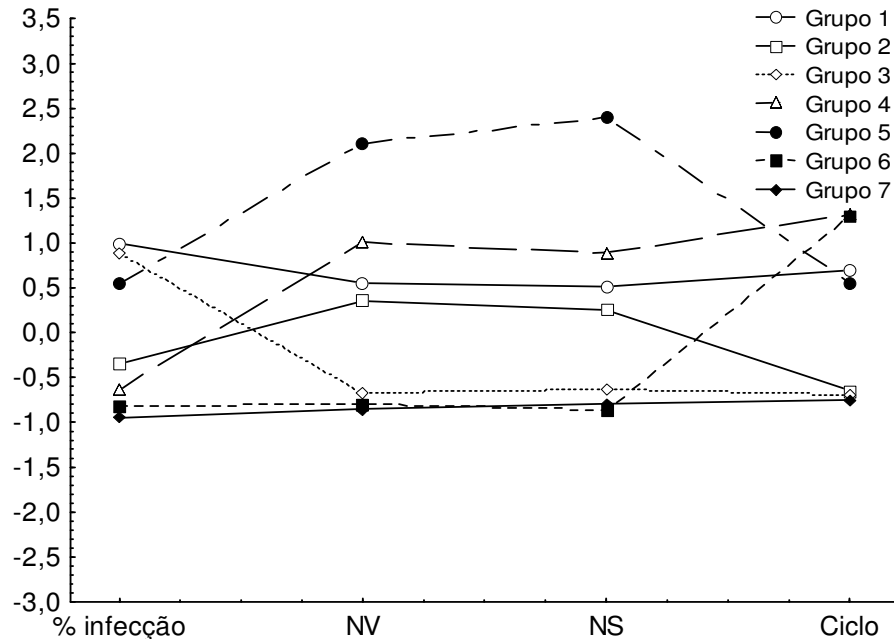


**Figura 11.** Representação gráfica da variação expressiva da distância euclidiana entre as variáveis, que permitiu a formação dos grupos de genótipos  $F_2$  de soja para o cruzamento GC 84058-21-4 x IAC Foscarin 31. As linhas indicam a região escolhida.



A partir dos resultados dos dendrogramas na análise hierárquica (Figuras 6, 8 e 10), com base nos referidos pontos de corte (Figuras 7, 9 e 11), procedeu-se à análise de agrupamento não-hierárquica *k-means*, utilizando o número de grupos pré-definido na análise hierárquica. Nesse caso, destaca-se que os resultados do agrupamento *k-means* foram quase totalmente compatíveis com o método de Ward, podendo o seu comportamento ser estudado nas Figuras 12 a 14, onde foram plotadas as médias dos diferentes grupos para cada carácter.

Para o cruzamento 1 (Shira Nuhi x CD 205), confirmou-se a classificação dos 257 genótipos em sete grupos (Figura 12). O primeiro grupo, com 36 indivíduos, caracterizado por indivíduos com alta severidade da ferrugem, mas com ciclo, número de vagens (NV) e número de sementes (NS) intermediários. O segundo grupo é composto por 50 indivíduos com ciclo mais precoce que, talvez por esse motivo, apresentaram uma severidade da doença intermediária, assim como os números de vagens e sementes. Já o grupo 3, é caracterizado pelos 58 genótipos mais sensíveis que, com uma alta incidência da doença, foram inferiores no número de vagens e sementes, e apresentaram ciclo precoce, provavelmente pela queda prematura de folhas. O grupo 4 é composto de 23 genótipos que, mesmo com ciclo mais tardio, tiveram uma severidade menor de doença, e produção de vagens e sementes de média para alta. O quinto grupo, com 18 indivíduos, merece destaque pela menor sensibilidade dos genótipos ao patógeno, pois, apesar da alta severidade da ferrugem apresentada, constituem-se nos genótipos mais produtivos do cruzamento, tanto para número de vagens como de sementes, e apresentaram ciclo intermediário. Os grupos 6 e 7, com 30 e 42 indivíduos respectivamente, podem ser considerados em conjunto por sua menor severidade, número de vagens e número de sementes, sendo diferenciados apenas quanto ao ciclo, onde o sexto grupo é tardio e o sétimo é precoce. Todas as diferenciações dos caracteres entre os grupos, discutidas aqui, foram reforçadas pelo teste de Tukey (5% de probabilidade) calculado entre as médias dos grupos (Tabela 5), sendo possível constatar, a partir desses resultados, a resposta quantitativa diferencial dos genótipos pertencentes a um mesmo cruzamento frente à ocorrência do patógeno.



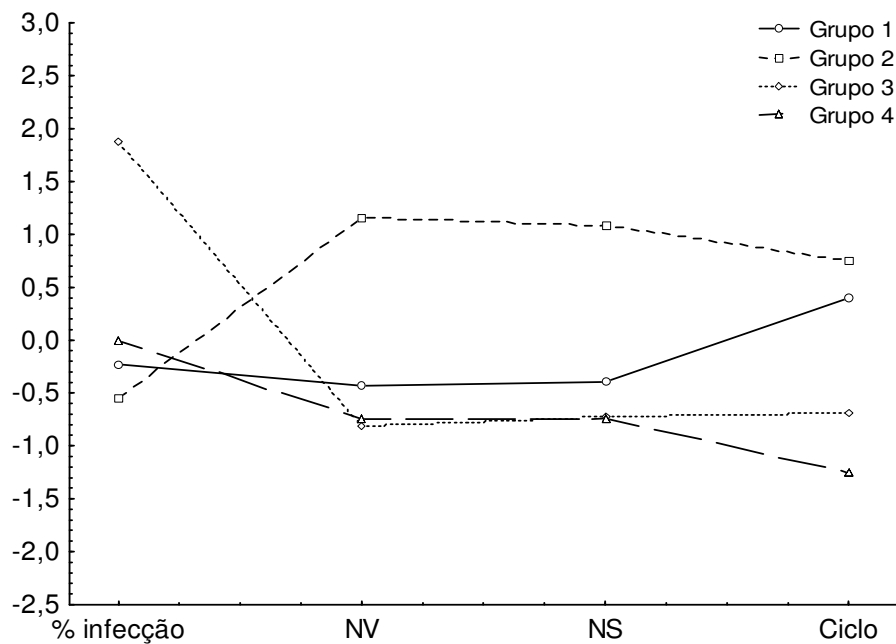
**Figura 12.** Representação gráfica das médias padronizadas dos caracteres severidade da ferrugem (% infecção), número de vagens (NV), número de sementes (NS) e ciclo de maturação (Ciclo) para os genótipos  $F_2$  de soja do cruzamento PI 200526 (Shira Nuhi) x CD 205, agrupados segundo a análise não-hierárquica *k-means*.

**Tabela 5.** Médias dos caracteres severidade (% infecção), número de vagens (NV), número de sementes (NS) e ciclo de maturação (Ciclo), dos grupos de genótipos  $F_2$  de soja com fonte de resistência à ferrugem asiática, agrupados pela análise *k-means*.

Cruzamento	Grupo	Severidade (%)	NV	NS	Ciclo
Shira Nuhi x CD 205	1	10,70 a	15,83 c	30,03 c	130,17 b
	2	6,57 b	14,68 c	26,68 c	110,32 c
	3	10,35 a	8,72 d	15,29 d	109,47 c
	4	5,68 bc	18,48 b	34,87 b	139,39 a
	5	9,32 a	24,78 a	54,56 a	128,06 b
	6	5,13 c	8,00 d	12,20 d	139,13 a
	7	4,70 c	7,69 d	13,10 d	108,69 c
PI 200456 x Conquista	1	4,64 bc	14,30 b	23,78 b	129,70 a
	2	3,87 c	30,82 a	54,86 a	134,64 a
	3	9,81 a	10,36 b	17,00 b	114,82 b
	4	5,18 b	11,00 b	16,61 b	106,89 b
GC 84058-21-4 x	1	9,42 a	9,96 c	14,22 c	110,22 b
	2	7,55 ab	18,75 b	31,75 b	132,13 a
IAC Foscarin 31	3	4,72 bc	36,75 a	65,25 a	137,50 a
	4	3,29 c	11,11 c	16,21 c	136,07 a

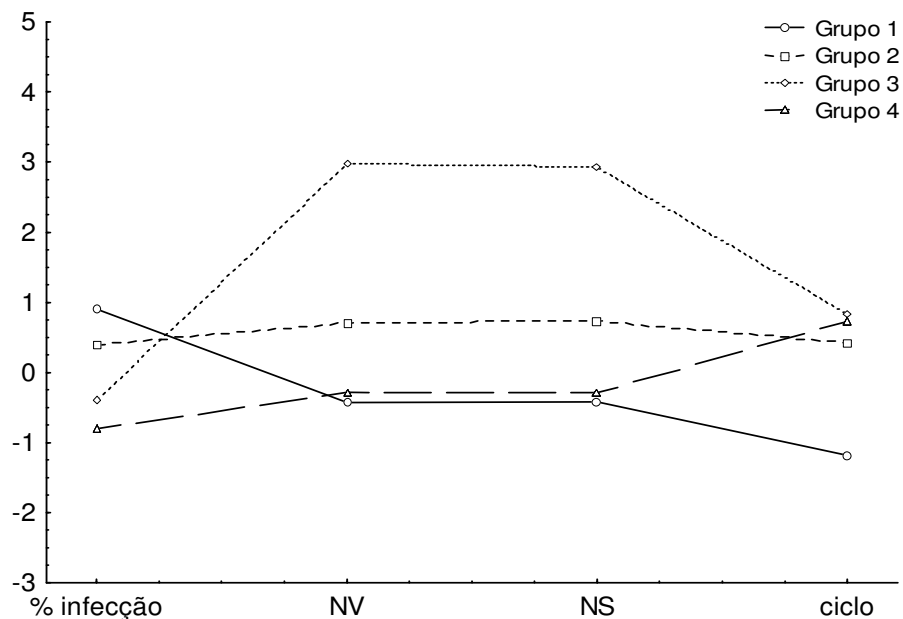
\* Médias seguidas de mesma letra nas colunas, para cada cruzamento, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Já para o cruzamento 2 (PI 200456 x Conquista), os 80 indivíduos foram classificados em quatro grupos (Figura 13). O primeiro deles, com 23 acessos, caracteriza-se pela baixa incidência da ferrugem, com número de vagens e sementes baixo, e ciclo tardio. O grupo 2, com 28 genótipos, constitui-se no grupo mais produtivo que, mesmo com ciclo tardio, apresentou baixa severidade do patógeno, talvez por esse motivo tenha se destacado no número de vagens e sementes, consistindo no grupo de genótipos com maior tolerância à doença. O terceiro grupo de 11 acessos, é composto pelos indivíduos mais afetados pelo patógeno, apresentando alta severidade da doença, com baixa produção de vagens e sementes, e de ciclo precoce, provavelmente pela presença acentuada da ferrugem, com queda prematura de folhas. O grupo quatro é composto por 18 indivíduos que apresentavam severidade da doença de média para baixa, foram precoces, e pouco produtivos. Os resultados do teste de médias da Tabela 5 reforçam a diferenciação dos grupos nesse cruzamento.



**Figura 13.** Representação gráfica das médias padronizadas dos caracteres severidade da ferrugem (% infecção), número de vagens (NV), número de sementes (NS) e ciclo de maturação (Ciclo) para genótipos  $F_2$  de soja do cruzamento PI 200456 x MG/BR-46 (Conquista), agrupados pela análise não-hierárquica *k-means*.

O agrupamento dos 63 genótipos do cruzamento 3 (GC 84058-21-4 x IAC Foscarin 31) também foi confirmada pelo procedimento *k-means* (Figura 14). Dentre esses, o primeiro grupo de 23 indivíduos, é caracterizado pela sensibilidade à doença, com a maior severidade de ferrugem, baixo número de vagens e sementes e precocidade, pela queda prematura de folhas ocasionada pelo patógeno. O segundo grupo de 8 acessos, com severidade da doença intermediária e ciclo mais tardio, também apresentou-se como intermediário na produção de vagens e sementes. O grupo 3, apesar de ser composto por apenas 4 genótipos, constitui-se no grupo mais interessante ao melhoramento pois, mesmo com ciclo mais tardio, apresentou uma incidência de ferrugem de média para baixa, sendo os mais produtivos (vagens e sementes), com melhor nível de tolerância. O grupo 4, com 28 indivíduos, é composto por genótipos que, mesmo com baixa severidade da doença e ciclo tardio, mostraram baixo número de vagens e sementes. Vale ressaltar a confirmação da diferença entre os grupos pelo teste de Tukey, presente na Tabela 5.



**Figura 14.** Representação gráfica das médias padronizadas dos caracteres severidade da ferrugem (% infecção), número de vagens (NV), número de sementes (NS) e ciclo de maturação (Ciclo) para os genótipos  $F_2$  de soja do cruzamento GC 84058-21-4 x IAC Foscarin 31, agrupados pela análise não-hierárquica *k-means*.

Adicionalmente, destaca-se a importância de todas as variáveis na ordenação, como pode ser observado pelos resultados significativos do teste F na Tabela 6.

**Tabela 6.** Análise de variância dos grupos formados pela análise não-hierárquica de agrupamento *k-means* para as variáveis % de infecção, número de vagens (NV), número de sementes (NS) e ciclo de maturação (Ciclo), em genótipos F<sub>2</sub> de soja.

Cruzamento	Variável	SQE <sup>1/</sup>	GL	SQD <sup>1/</sup>	GL	F <sup>2/</sup>	Probabilidade
Shira Nuhi x CD 205	% Infecção	158,58	6	97,42	250	67,83**	< 0,0001
	NV	196,13	6	59,87	250	136,48**	< 0,0001
	NS	206,82	6	49,18	250	175,23**	< 0,0001
	Ciclo	186,42	6	69,58	250	111,62**	< 0,0001
PI 200456 x Conquista	% Infecção	48,37	3	30,63	76	40,00**	< 0,0001
	NV	58,37	3	20,63	76	71,70**	< 0,0001
	NS	52,44	3	26,56	76	50,01**	< 0,0001
	Ciclo	53,20	3	25,80	76	52,24**	< 0,0001
GC 84058-21-4 x IAC Foscarin 31	% Infecção	38,97	3	23,03	59	33,28**	< 0,0001
	NV	46,00	3	16,00	59	56,55**	< 0,0001
	NS	44,99	3	17,01	59	52,02**	< 0,0001
	Ciclo	51,12	3	10,88	59	92,40**	< 0,0001

<sup>1/</sup> SQE = soma de quadrados entre grupos; SQD = soma de quadrados dentro dos grupos; GL = graus de liberdade. <sup>2/</sup> \*\*=significativo pelo teste F ao nível de 1% de probabilidade.

Embora os estudos referentes à avaliação da severidade da doença sejam analisados de outras formas (MILES et al., 2006; MARTINS et al., 2007; RIBEIRO et al., 2007; ZAMBENEDETTI et al., 2007), os resultados da análise multivariada permitiram constatar que os genótipos foram eficientemente agrupados, nos três cruzamentos, de acordo com seu comportamento para os quatro caracteres avaliados. Vale destacar a formação de grupos de genótipos claramente mais tolerantes à presença da ferrugem, que mesmo em alta severidade, mantiveram-se produtivos, enquanto outros são extremamente sensíveis, com redução drástica na produção de vagens e sementes pela ocorrência da doença. Além disso, em alguns casos, pode ser considerada a eficiência da precocidade das plantas (efeito “escape”), pela baixa severidade da doença, onde, de acordo com OLIVEIRA et al. (2005), o fungo tem menos tempo para causar redução de produtividade, pelo fato destas plantas se encontrarem em estádios mais avançados de desenvolvimento na época em que a ferrugem apresenta os maiores níveis de severidade.

Todos esses pontos são de grande importância no processo de melhoramento, pois, mesmo uma planta com lesões RB, considerada resistente, apresenta redução fotossintética pela presença de lesões, que reduzem a área foliar, devendo este aspecto também ser levado em conta durante o processo seletivo. Além disso, destaca-se que acessos com baixa severidade da doença são importantes para o melhoramento como fontes de resistência parcial, pois, mesmo apresentando reações do tipo TAN, a infecção e o desenvolvimento de lesões são limitados (MILES et al., 2006).

Os resultados das avaliações de esporos e lesões feitas em cada tipo de reação (TAN, RB e RB[?]) podem ser constatados na Tabela 7. Inicialmente pode ser notado, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, que as folhas com lesão do tipo TAN apresentam um número médio de esporos significativamente superior aos tipos RB e RB[?]; o mesmo acontecendo com relação ao número de lesões presentes em uma área conhecida. Entretanto, um outro resultado bastante interessante diz respeito à relação do número médio de esporos por lesão, no qual as plantas RB[?] apresentaram um resultado intermediário, não diferindo significativamente da RB e nem da TAN, embora as duas tenham sido diferentes entre si pelo teste de Tukey. Esse fato sugere que este poderia ser um tipo de reação intermediária entre os dois tipos padrão, e que possivelmente pudesse ser classificado como moderadamente resistente, já que o progresso da doença não é tão intenso como nas plantas suscetíveis com lesão TAN, mas ocorre uma significativa produção de esporos que pode ocasionar a disseminação do patógeno mesmo em plantas com lesão RB, consideradas resistentes. Essa diferenciação do número de lesões e esporulação conforme o tipo de lesão também foi observada por ZAMBENEDETTI et al. (2007), que compararam cultivares com os dois tipos de reação (RB e TAN).

**Tabela 7.** Número médio de esporos, número de lesões e relação esporos por lesão em 24 genótipos do ensaio de resistência à ferrugem asiática escolhidos ao acaso e separados de acordo com o tipo de lesão (RB, RB[?] e TAN); teste de Tukey dos três tipos de lesão para os três caracteres. Jaboticabal/SP, 2007.

Genótipo	Tipo de Lesão <sup>1/</sup>	Número médio de esporos (x 10 <sup>4</sup> esporos/mL) <sup>2/</sup>	Número de Lesões	Relação esporos/lesão (x 10 <sup>4</sup> )
1/13-3-2	RB	1,688	55	0,153
1/27-7-3	RB	1,125	45	0,125
1/27-8-2	RB	0,438	33	0,066
1/28-1-3	RB	0,938	60	0,078
1/28-10-2	RB	0,688	59	0,058
1/29-2-2	RB	1,313	47	0,140
1/35-3-2	RB	1,438	51	0,141
1/35-8-1	RB	0,563	50	0,056
1/19-3-2	RB?	1,813	58	0,156
1/28-5-3	RB?	3,313	49	0,338
1/29-2-1	RB?	2,500	54	0,231
1/29-3-3	RB?	2,625	73	0,180
1/35-6-1	RB?	2,438	72	0,169
1/40-10-3	RB?	2,125	39	0,272
1/48-12-1	RB?	1,750	49	0,179
2/48-10-3	RB?	1,375	71	0,097
1/28-5-1	TAN	4,875	63	0,387
1/29-5-3	TAN	4,313	91	0,237
1/40-3-2	TAN	4,000	55	0,364
3/31-2-2	TAN	2,250	102	0,110
3/31-4-2	TAN	7,500	72	0,521
3/31-10-2	TAN	4,625	128	0,181
3/37-4-3	TAN	3,938	69	0,285
3/37-8-1	TAN	7,375	68	0,542
Média RB*		1,024 b	50,000 b	0,102 b
Média RB?		2,242 b	58,125 b	0,203 ab
Média TAN		4,860 a	81,000 a	0,328 a

<sup>1/</sup> Lesões: RB = resistente; RB? = resistente com esporulação; e TAN = suscetível.

<sup>2/</sup> Média de 16 leituras feitas na câmara de Neubauer para cada genótipo.

\* Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade.

Diante do exposto, pode-se considerar que todos os resultados aqui apresentados possuem grande importância do ponto de vista do melhoramento genético da soja visando a resistência à ferrugem. Isso porque, pôde-se aliar a alta eficiência dos genes de resistência vertical, de caráter qualitativo, confirmada em diversos estudos (BONDE et al., 2006; HYTEN et al., 2007; GARCIA et al., 2008; PIEROZZI et al., 2008; SILVA et al., 2008), com a resistência parcial, quantitativa, observada na menor severidade da doença em alguns indivíduos, evidenciada em

outras pesquisas (GODOY et al., 2006; MILES et al., 2006; MARTINS et al., 2007; RIBEIRO et al., 2007, ZAMBENEDETTI et al., 2007). Além disso, a evidente diferenciação de esporulação entre os dois tipos de reação (RB e TAN) certamente interfere no progresso da doença, podendo ser mais uma ferramenta a serviço do melhorista. Dessa forma, a seleção de genótipos com menor severidade e incidência da doença e portadores de genes qualitativos de resistência, poderá auxiliar ainda mais na redução de custos decorrentes do controle da ferrugem, além do menor impacto ambiental causado, aliando-se aos caracteres de produtividade, que são de extrema importância no desenvolvimento de genótipos agronomicamente superiores e economicamente viáveis.

#### **4. Conclusões**

1. A resistência à ferrugem asiática é condicionada por um gene dominante na PI 200526 e por um gene recessivo na PI 200456 e na GC 84058-21-4.
2. A análise multivariada é eficiente no agrupamento de indivíduos similares do ponto de vista de severidade da doença e de seus efeitos sobre caracteres correlacionados à produtividade.
3. A seleção de genótipos resistentes à ferrugem asiática baseada nos caracteres qualitativos e quantitativos avaliados neste estudo, pode aumentar a eficiência dos programas de melhoramento na obtenção de indivíduos superiores.



## 5. Referências

- ANDRADE, P. J. M.; ANDRADA, D. F. A. A. **Ferrugem asiática**: uma ameaça à sojicultura brasileira. Dourados: Embrapa Fundação Chapadão, 2002. 11p.
- ARIAS, C. A. A.; BROGIN, R. L.; YORINORI, J. T.; KIIHL, A. S.; TOLEDO, J. F. F. Um gene dominante determinando a resistência da cultivar FT-2 à ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2., 2003, Porto Seguro. **Resumos**. Londrina: SBMP, 2003.
- ARIAS, C. A. A.; RIBEIRO, A. S.; YORINORI, J. T.; BROGIN, R. L.; OLIVEIRA, M. F.; TOLEDO J. F. F. Inheritance of resistance of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Sidow). In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 7.; INTERNATIONAL SOYBEAN PROCESSING AND UTILIZATION CONFERENCE, 4.; CONGRESSO BRASILEIRO DA SOJA, 3., 2004, Foz do Iguaçu. **Proceedings**. Londrina: Embrapa Soja, 2004. p. 371.
- BONDE, M.R.; NESTER, S.E.; AUSTIN, C.N.; STONE, C.L.; FREDERICK, R.D. Evaluation of virulence of *Phakopsora pachyrhizi* and *P. meibomia*e isolates. **Plant Disease**, St. Paul, v. 90, n. 6, p. 708-716, 2006.
- BROMFIELD, K. R.; HARTWIG, E. E. Resistance to soybean rust and mode of inheritance. **Crop Science**, Madison, v. 20, n. 2, p. 254-255, 1980.
- CRUZ, C. D. **Programa Genes**: versão Windows; aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: Ed. UFV, 2001. 648p.
- DIAS-FILHO, M.B.; SIMÃO NETO, M.; SERRÃO, E.A.S. Cluster analysis for assessing the agronomic adaptation of *Panicum maximum* Jacq. accessions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 10, p. 1509-1516, 1994.
- EMBRAPA. **Tecnologia de produção de soja** – região central do Brasil 2007. Londrina: Embrapa Soja: Embrapa Cerrados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2006. 225p.
- EMBRAPA. **Prejuízo com ferrugem da soja se mantém estável nessa safra**. Disponível em:

[www.cnpso.embrapa.br/alerta/ver\\_alerta.php?cod\\_pagina\\_sa=175&cultura=1](http://www.cnpso.embrapa.br/alerta/ver_alerta.php?cod_pagina_sa=175&cultura=1) Acesso: 22/02/2008.

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

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**. Disponível em: [www.springerlink.com/content/a657751v1l520810/fulltext.pdf](http://www.springerlink.com/content/a657751v1l520810/fulltext.pdf). Acesso: 03/06/2008.

GAUNT, R.E. The relationship between plant disease severity and yield. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 33, p. 119-145. 1995.

GODOY, C.V.; KOGA, L.J.; CANTERI, M.G. Diagrammatic scale for assessment of soybean rust severity. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 1, p. 63-68. 2006.

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

HARTWIG, E.E.; BROMFIELD, K.R. Relationships among three genes conferring specific resistance to rust in soybeans. **Crop Science**, Madison, v. 23, p.237-39, 1983.

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. 837-840, 2007.

MARTINS, J.A.S.; JULIATTI, F.C.; SANTOS, V.A.; POLIZEL, A.C.; JULIATTI, F.C. Período latente e uso da análise de componentes principais para caracterizar a resistência parcial a ferrugem da soja. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 4, p. 364-371, 2007.

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

MILES, M.R; FREDERICK, R.D.; HARTMAN, G.L. Evaluation of soybean germplasm for resistance to *Phakopsora pachyrhizi*. **Plant Management Network**. Disponível em: [www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/research/2006/germplasm/](http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/research/2006/germplasm/). Acesso: julho de 2008.

- OLIVEIRA, A.C.B.; GODOY, C.V.; MARTINS, M.C. Avaliação da tolerância de cultivares de soja à ferrugem asiática no oeste da Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 6, p. 658-662, 2005.
- 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. New soybean (*Glycine max* Fabales, Fabaceae) sources of qualitative genetic resistance to Asian, soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* (Uredinales, Phakopsoraceae). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 31, p. 505-511, 2008.
- RIBEIRO, A.S.; MOREIRA, J.U.V.; PIEROZZI, P.H.B.; RACHID, B.F.; TOLEDO, J.F.F.; ARIAS, C.A.A.; SOARES, R.M.; GODOY, C.V. Genetic control of Asian rust in soybean. **Euphytica**, Heidelberg, v. 157, n.1, p. 15-25, 2007.
- SILVA, D.C.G.; YAMANAKA, N.; BROGIN, R.L.; ARIAS, C.A.A.; NEPOMUCENO, A.L.; MAURO, A.O.; PEREIRA, S.S.; NOGUEIRA, L.M.; PASSIANOTTO, A.L.L.; ABDELNOOR, R.V. Molecular mapping of two loci that confer resistance to Asian rust in soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 117, n. 1, p. 57-63, 2008.
- SNEATH, PH.; SOKAL, R.R. **Numerical taxonomy**: The principles and practice of numerical classification. San Francisco: W.H. Freeman, 1973. 573p.
- STATSOFT, Inc. **STATISTICA** (data analysis software system), version 7. Disponível em: [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com). Acesso: julho/2008.
- YORINORI, J. T.; NUNES JR., J.; LAZZAROTTO J.J. **Ferrugem “asiática” da soja no Brasil**: evolução, importância econômica e controle. Londrina: Embrapa Soja, 2004. 36p. (Documentos n.247).
- YORINORI, J.T.; PAIVA, W.M.; FREDERICK, R.D.; COSTAMILAN, L.M.; BERTAGNOLI, P.F.; HARTMAN, G.L.; GODOY, C.V.; NUNES, J.J. Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. **Plant Disease**, St. Paul, v. 89, p. 675-77, 2005.
- ZAMBENEDETTI, E.B.; ALVES, E.; POZZA, E.A.; ARAÚJO, D.V.; GODOY, C.V. Avaliação de parâmetros monocíclicos e da intensidade da ferrugem (*Phakopsora pachyrhizi*) em diferentes genótipos de soja e posições de copa. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 2, p. 178-181, 2007.

### **CAPÍTULO 3 – MARCADORES RAPD PARA RESISTÊNCIA À FERRUGEM ASIÁTICA EM SOJA**

**RESUMO** – A obtenção de marcadores moleculares ligados a genes de resistência a doenças possui grande importância se associarmos a estes o processo de seleção assistida. Assim, o presente estudo objetivou a obtenção de marcadores RAPD ligados a um loco de resistência à ferrugem asiática da soja. Duas populações oriundas do cruzamento entre os genitores contrastantes PI 459025 x CD 208 foram obtidas. Nas gerações F<sub>2</sub> e F<sub>3</sub>, essas populações foram artificialmente inoculadas e avaliadas quanto à sua reação ao fungo *Phakopsora pachyrhizi*, pelo tipo de lesão (RB – resistente e TAN – suscetível). Com os resultados da avaliação fenotípica, dois bulks com DNA de plantas homozigóticas resistentes e suscetíveis, respectivamente, foram obtidos para a Análise de Bulks Segregantes. Foi analisado um total de 600 iniciadores RAPD aleatórios, identificando-se três com fragmentos polimórficos entre os bulks e parentais contrastantes para a resistência. Pela análise de Qui-quadrado, confirmou-se a herança monogênica com dominância completa para a resistência ao patógeno e a segregação 3:1 para a presença de banda dos três marcadores. As três marcas encontram-se ligadas respectivamente a 4,5, 6,2 e 10,2 cM de distância do loco de resistência, em fase de repulsão, e são bastante promissoras na seleção assistida para resistência ao patógeno causador da ferrugem asiática da soja.

**Palavras-Chave:** *Glycine max*, marcadores moleculares, *Phakopsora pachyrhizi*, seleção assistida

## 1. Introdução

A expansão do cultivo da soja observada desde sua introdução comercial no Brasil, na década de 70, pode ser atribuída em grande parte ao melhoramento genético, que possibilitou o plantio em quase todo o território nacional, colocando a soja como a principal cultura da pauta de exportações brasileiras. Entretanto, junto com o avanço, surgem fatores limitantes à obtenção de maiores produtividades, como o crescente aumento de pragas e doenças. Com relação às doenças, destaca-se a ferrugem asiática, um dos principais problemas da soja atualmente.

A ferrugem é causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* Syd & P. Syd. e ocorre no hemisfério Leste desde 1902 (SINCLAIR & HARTMAN, 1999). Foi relatada pela primeira vez no Brasil no final da safra 2000/01, no Paraná, disseminando-se rapidamente por todo o país, ocasionando perdas superiores a 80% em áreas mais infectadas (YORINORI et al., 2005).

A obtenção de cultivares resistentes ao patógeno tem sido um desafio. Quatro genes dominantes foram inicialmente descritos na literatura, denominados *Rpp1*, *Rpp2*, *Rpp3* e *Rpp4* (BROMFIELD & HARTWIG, 1980; McLEAN & BYTH, 1980; HARTWIG & BROMFIELD, 1983; HARTWIG, 1986); recentemente um novo loco de resistência (*Rpp5*) foi descrito por GARCIA et al. (2008). Entretanto, a elevada variabilidade do patógeno, reduz a eficiência da resistência vertical. No Brasil, por exemplo, as 11 cultivares resistentes identificadas inicialmente tiveram a resistência quebrada por novas estirpes do fungo provenientes do Mato Grosso, e apenas as fontes de resistência dos locos *Rpp2* e *Rpp4* permanecem eficientes (YORINORI et al., 2005).

O processo de seleção de genótipos resistentes pelas técnicas convencionais é relativamente demorado, além de laborioso e dependente de condições ambientais adequadas. Assim, a seleção assistida por marcadores moleculares é de grande utilidade, principalmente no processo de caracterização e seleção de genótipos resistentes, destacando-se por ser um processo rápido e seguro para o desenvolvimento de novas cultivares superiores.

Dentre os marcadores existentes, destaca-se o RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*), baseado na amplificação de oligonucleotídeos de 10 bases de seqüência aleatória, que apresenta como vantagens a rapidez e praticidade do método, necessidade de menores quantidades de DNA e baixo custo (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Essas características tornam o RAPD bastante interessante para identificação de marcas moleculares ligadas a caracteres de interesse, como genes de resistência, utilizando a técnica de BSA (*Bulked Segregant Analysis*), descrita por MICHELMORE et al. (1991). Essa técnica consiste na amplificação por PCR (*Polimerase Chain Reaction*) de dois conjuntos de indivíduos (*bulks*) com quantidades equimolares de DNA de plantas resistentes e suscetíveis, para detecção de marcadores polimórficos entre os mesmos. Entretanto, algumas limitações do RAPD como sua natureza dominante e a baixa especificidade podem levar à necessidade de alternativas, como a conversão em marcadores SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*) (PARAN & MICHELMORE, 1993; FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Diversos estudos identificaram marcadores RAPD ligados a genes de resistência a patógenos em várias culturas, entre eles: resistência ao nematóide de cisto, à mancha olho-de-rã, ao míldio e ao cancro da haste em soja (HEER et al., 1998; CARVALHO et al., 2002; CHOWDHURY et al., 2002; MARTINS FILHO et al., 2002; GAVIOLI et al., 2007); resistência à mancha angular em feijoeiro (FERREIRA et al., 1999); resistência à brusone em arroz (ARAÚJO et al., 2004). Com relação à ferrugem asiática, HYTEN et al. (2007) identificaram dois marcadores microssatélites ligados ao gene *Rpp1*, o Sct\_187 e o Sat\_064. Por sua vez, SILVA et al. (2008) detectaram os iniciadores Sat\_255 e Satt620 próximos ao gene *Rpp2*, e o Satt288 e o AF162283 próximos ao gene *Rpp4*.

Assim, os objetivos do presente estudo foram: confirmar a herança da resistência da PI 459025 ao patógeno causador da ferrugem asiática e identificar marcadores moleculares do tipo RAPD ligados a este gene de resistência em populações de soja.

## 2. Material e Métodos

O presente ensaio foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Melhoramento de Plantas do Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, campus de Jaboticabal – SP, e na Empresa Tropical Melhoramento e Genética (TMG), localizada em Cambé – PR.

Dois populações originárias do cruzamento PI 459025 (Bing Nam) x CD 208, com 102 indivíduos cada, oriundas de duas plantas  $F_1$  diferentes, foram obtidas na empresa TMG. A PI Bing Nam foi utilizada como fonte de resistência à ferrugem asiática, enquanto a cultivar CD 208 constituiu o material genético suscetível adaptado às condições brasileiras.

Nos anos de 2005 e 2006, respectivamente, as plantas das gerações  $F_2$  e  $F_3$  dessas populações foram inoculadas e avaliadas em casa de vegetação na TMG, quanto à sua resistência ao patógeno causador da ferrugem, conforme descrito por GARCIA et al. (2008).

Para a semeadura, foram utilizados vasos de sete litros contendo solo devidamente preparado, cultivando-se três plantas em cada vaso, e mantendo-se a correspondência de número utilizada nas duas gerações, de forma a possibilitar a identificação da presença ou ausência de segregação das progênies oriundas de cada planta  $F_2$ , pela observação do comportamento do patógeno nas progênies  $F_3$ .

Para a avaliação fenotípica da reação ao patógeno, foram realizadas inoculações com uma suspensão de esporos de *P. pachyrhizi*. O inóculo foi preparado a partir de folhas com pústulas em esporulação, as quais foram lavadas, com auxílio de um pincel, em solução de água com 0,05% do espalhante adesivo Tween 20, visando a retirada dos esporos da superfície abaxial. As plantas foram pulverizadas com a suspensão ajustada para  $10^4$  uredosporos/ml, com o auxílio de um hemocítmetro. A primeira inoculação foi realizada quando as plantas atingiram o estágio  $V_2$  da escala de FEHR & CAVINESS (1977), sendo feitas posteriormente mais sete inoculações.

Após o aparecimento das pústulas, os genótipos foram avaliados e classificados quanto à sua reação ao patógeno pelo tipo de lesão apresentada, onde as plantas

resistentes apresentaram a lesão do tipo RB, enquanto as suscetíveis apresentaram a lesão tipo TAN. Após a classificação de todos os indivíduos, os dados foram submetidos ao teste de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) para verificação da segregação e determinação do tipo de herança do caráter.

Os mesmos genótipos foram ainda avaliados na geração F<sub>3</sub>, no ano seguinte, para confirmação das reações de resistência e diferenciação entre os genótipos homozigotos e heterozigotos, observando-se a segregação do tipo de reação na progênie originária de cada indivíduo.

Antes da inoculação do fungo, na geração F<sub>2</sub>, foram coletados trifólios de todos os indivíduos, que foram armazenados a -80 °C, para posterior extração de DNA e utilização nas análises moleculares.

A extração de DNA de todas as plantas F<sub>2</sub> do referido cruzamento foi realizada pelo método CTAB (brometo de cetil-trimetilamônio), conforme protocolo descrito em FERREIRA & GRATTAPAGLIA (1998). As amostras de DNA foram quantificadas em Biofotômetro, verificando-se a quantidade de DNA presente na amostra, assim como a sua qualidade, obtida pela relação entre as leituras a 260 e 280 nm, com DNA de boa qualidade indicado pela relação entre 1,8 e 2,0 (SAMBROOK & RUSSELL, 2001). A partir da quantificação, foram feitas as soluções de trabalho de DNA (30 ng/ $\mu$ l) de todas as plantas.

De posse dos resultados das avaliações de resistência ao patógeno na geração F<sub>2</sub>, foram selecionados 10 indivíduos resistentes e 10 suscetíveis, todos comprovadamente homozigotos, conforme os resultados das avaliações da geração F<sub>3</sub>. Quantidades equimolares de DNA desses indivíduos foram então utilizadas para montagem dos *bulks* a serem utilizados nas reações de PCR-RAPD, conforme a metodologia da análise de BSA de MICHELMORE et al. (1991).

Para as reações de PCR com os iniciadores RAPD, foi utilizado um aparelho termociclador *Mastercycler Gradient* da marca *Eppendorf*, com um programa de amplificação constituído de 42 ciclos de um minuto a 92 °C para desnaturação do DNA, um minuto a 35 °C para pareamento dos iniciadores e dois minutos a 72 °C para extensão pela polimerase, finalizando com 10 minutos a 72 °C e estabilizando a 4 °C.



As reações de amplificação com os RAPDs foram conduzidas conforme a metodologia de WILLIAMS et al. (1990), usando 600 iniciadores da Operon Technologies (Alameda, CA, EUA). As reações com volume final de 25 µl consistiram de: Tampão PCR 1X (10 mM Tris-HCl pH 8,3 e 50 mM KCl), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTP's, 45 ng do iniciador, 120 ng de DNA genômico, 1 U de DNA Polimerase e Água Milli-Q. Os fragmentos amplificados foram então analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v), corado com brometo de etídeo, procedendo-se a 100 V por cerca de uma hora, em tampão TBE pH 8,0 (0,09 M de Tris; 0,09 M de Ácido Bórico e 2 mM de EDTA). Os géis foram visualizados sob luz UV e fotografados e armazenados com o sistema de fotodocumentação Kodak EDAS 290.

O teste de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) para a análise da segregação e determinação do tipo de herança da resistência, assim como a análise do co-segregação de cada marcador com o loco de resistência, foram feitos para as duas populações, através do Programa Genes versão 2008 (CRUZ, 2001). As frequências de recombinação e estimativa das distâncias entre os marcadores identificados e o loco de resistência foram efetuadas no Programa GQMOL versão 2007.0.0 (CRUZ & SCHUSTER, 2008), usando a distância de Kosambi, LOD score >3.0 e distância máxima de 30 cM, conforme metodologia descrita em SCHUSTER & CRUZ (2004).

Com os resultados de estimativa das distâncias para todos os marcadores e o loco de resistência nas duas populações, procedeu-se à construção de um mapa de ligação hipotético consenso entre estas populações, com as melhores estimativas de ordenamento e distâncias, considerando os três marcadores RAPD e o loco de resistência.

### **3. Resultados e Discussão**

Com os resultados da F<sub>2</sub>, foram observadas, na população I, 22 plantas com lesão do tipo TAN (suscetível) e 78 com lesão tipo RB (resistente). Na população II, foram observadas 21 plantas suscetíveis (lesão tipo TAN) e 80 plantas resistentes

(lesão tipo RB). Em três plantas, considerando-se as duas populações, o tipo de lesão não foi identificado com segurança.

Com os resultados das avaliações fenotípicas da reação a *P. pachyrhizi* realizadas na geração F<sub>3</sub>, foi possível a confirmação das reações observadas na geração anterior e ainda a identificação dos indivíduos homocigotos e heterocigotos da geração F<sub>2</sub>, utilizando-se esses resultados para testar a hipótese de segregação 1:2:1 (homocigoto resistente : heterocigoto : homocigoto suscetível), nas duas populações, e conseqüentemente confirmar a herança monogênica com dominância completa na geração F<sub>2</sub>. Pode ser observado na Tabela 1, que a hipótese de segregação foi aceita nas duas populações, com probabilidades de 84,07 e 34,45%, respectivamente. Na mesma Tabela, encontram-se os resultados do teste de heterogeneidade que indica, com uma probabilidade de 81,79%, que os resultados do teste de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) foram consistentes para as duas populações estudadas, confirmando a segregação esperada, com a presença de um gene dominante condicionando a resistência estudada.

**Tabela 1.** Número de plantas classificadas como homocigotas resistentes (HR), heterocigotas (HE) e homocigotas suscetíveis (HS) e resultados do teste de  $\chi^2$  e de heterogeneidade nas duas populações avaliadas quanto à resistência ao patógeno causador da ferrugem asiática em soja, na geração F<sub>2</sub>.

Populações	HR	HE	HS	GL	$\chi^2$	P <sup>(1)</sup>
I	24	47	27	2	0,3469 <sup>ns</sup>	84,07
II	22	46	31	2	2,1313 <sup>ns</sup>	34,45
Total				4	2,4783 <sup>ns</sup>	64,85
Desvio				2	2,0761 <sup>ns</sup>	35,41
Heterogeneidade				2	0,4021 <sup>ns</sup>	81,79

<sup>ns</sup> = valores não significativos ao nível de 5% de probabilidade.

<sup>(1)</sup> P = probabilidade (%) obtida no teste de  $\chi^2$ .

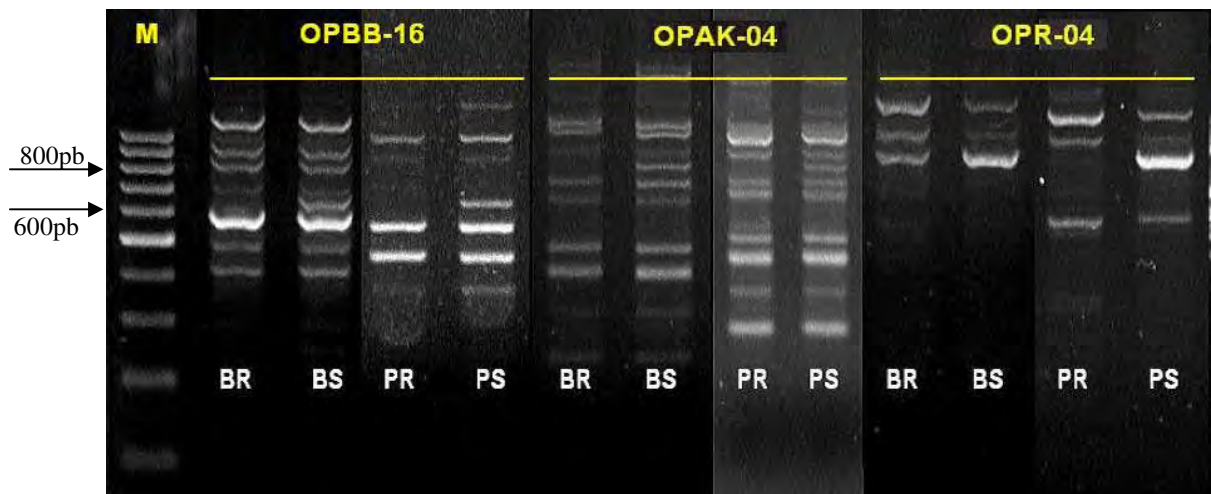
Outros estudos também confirmaram a presença de um gene dominante conferindo resistência à ferrugem asiática em diferentes populações de soja oriundas de diversas fontes. HYTEN et al. (2007) observaram a herança monogênica com dominância completa para o gene *Rpp1* na PI 200492. SILVA et al. (2008) também detectaram a presença de um gene dominante (*Rpp2*) condicionando a resistência à

ferrugem na PI 230970, o que também ocorreu para o *Rpp4* na PI 459025, a mesma fonte de resistência do presente estudo, confirmando o resultado obtido. Além dos trabalhos clássicos de descrição dos genes de BROMFIELD & HARTWIG (1980), McLEAN & BYTH (1980), HARTWIG & BROMFIELD (1983) e HARTWIG (1986).

Os resultados da reação dos genótipos  $F_2$  e  $F_3$  ao patógeno possibilitaram a composição dos *bulks* resistente e suscetível para a análise de BSA, procedendo-se às reações de PCR com iniciadores RAPD para detecção de polimorfismo. A grande maioria dos 600 iniciadores testados se apresentou monomórfico e não informativo na diferenciação dos *bulks*, sendo que apenas 15 apresentaram polimorfismo entre os *bulks*. Dos 15 iniciadores polimórficos, somente três (OPBB-16, OPAK-04 e OPR-04) apresentaram confirmação do polimorfismo nas análises de plantas individuais dentro de cada *bulk*, e foram então testados em todos os indivíduos das duas populações.

Os três iniciadores identificados foram discriminativos, apresentando suas respectivas marcas ligadas ao alelo recessivo de suscetibilidade, conforme observado na Figura 1. O iniciador OPBB-16 detectou um fragmento polimórfico de aproximadamente 650 pares de bases presente no DNA do *bulk* suscetível, no parental suscetível (CD 208) e em todos os indivíduos pertencentes ao *bulk* suscetível, estando ausente em todos os resistentes. O iniciador OPAK-04 detectou um fragmento polimórfico de cerca de 800 pares de bases, também presente no *bulk* suscetível, na CD 208 e em todos os indivíduos do *bulk* suscetível, e ausente nos resistentes. A mesma situação ocorreu para o iniciador OPR-04, o qual apresentou um fragmento polimórfico de cerca de 850 pares de bases, com o mesmo comportamento dos dois marcadores citados anteriormente.

O teste de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) confirmou a segregação dos iniciadores polimórficos de 3:1 (presença da banda: ausência da banda), já que o marcador utilizado possui natureza dominante, devendo segregar conforme esperado na herança mendeliana. Na Tabela 2 podem ser observados os resultados do  $\chi^2$  para os três iniciadores detectados (OPBB-16, OPAK-04 e OPR-04), sendo que a hipótese de segregação testada foi confirmada para todos eles, com os testes de heterogeneidade entre as populações indicando a consistência dos dados.



**Figura 1.** Marcadores RAPD com fragmentos polimórficos discriminativos para resistência a *Phakopsora pachyrhizi* em soja. Na seqüência, encontram-se o marcador de tamanho de bandas (M) e as reações do *bulk* resistente (BR), do *bulk* suscetível (BS), do parental resistente (PR) e do parental suscetível (PS) para cada iniciador.

**Tabela 2.** Número de plantas com presença e ausência de bandas nas reações de amplificação dos iniciadores OPBB-16, OPR-04 e OPAK-04, e resultados dos testes de  $\chi^2$  e de heterogeneidade nas duas populações avaliadas na geração F<sub>2</sub>.

Populações	Presença	Ausência	GL	$\chi^2$	P <sup>(1)</sup>
<b>OPBB-16</b>					
I	70	27	1	0,4158 <sup>ns</sup>	51,90
II	73	26	1	0,0842 <sup>ns</sup>	77,17
Total			2	0,5000 <sup>ns</sup>	77,88
Desvio			1	0,4354 <sup>ns</sup>	50,94
Heterogeneidade			1	0,0646 <sup>ns</sup>	79,94
<b>OPAK-04</b>					
I	75	26	1	0,0297 <sup>ns</sup>	86,32
II	70	26	1	0,2222 <sup>ns</sup>	63,74
Total			2	0,2519 <sup>ns</sup>	88,16
Desvio			1	0,2047 <sup>ns</sup>	65,09
Heterogeneidade			1	0,0472 <sup>ns</sup>	82,80
<b>OPR-04</b>					
I	79	20	1	1,2155 <sup>ns</sup>	27,02
II	70	30	1	1,3333 <sup>ns</sup>	24,82
Total			2	2,5488 <sup>ns</sup>	27,96
Desvio			1	0,0017 <sup>ns</sup>	96,74
Heterogeneidade			1	2,5471 <sup>ns</sup>	11,05

<sup>ns</sup> = valores não significativos ao nível de 5% de probabilidade.

<sup>(1)</sup> P = probabilidade (%) obtida no teste de  $\chi^2$ .

Com relação ao teste de co-segregação de cada marcador com o loco de resistência, foram obtidos, para o marcador OPBB-16, os valores de  $\chi^2$  de 87,9 e 88,6 para as populações I e II, respectivamente, sendo altamente significativos ( $P < 0,00001$ ). Para o marcador OPAK-04, os testes de  $\chi^2$  resultaram nos valores 76,4 e 84,0 para as populações I e II, respectivamente, também altamente significativos ( $P < 0,00001$ ). Finalmente para o OPR-04, foram obtidos 41,5 e 51,3, respectivamente, para as populações I e II, pelo teste de  $\chi^2$  ( $P < 0,0001$ ). Todos os resultados significativos da segregação conjunta para os três iniciadores indicam que não ocorre segregação independente entre cada marcador e o loco, havendo assim grande probabilidade de que os mesmos estejam ligados.

Todos esses resultados promissores evidenciaram a utilização dos três marcadores RAPD polimórficos obtidos para as estimativas da frequência de recombinação, que indicam a distância entre duas marcas (ou genes) quaisquer num determinado mapa de ligação.

As análises de ligação indicaram que, para o caso do OPBB-16, a distância entre o marcador e o loco de resistência, estimada a partir do fragmento polimórfico observado, foi de  $4,2 \pm 2,1$  cM com LOD score de 17,42 para a população I, e de  $6,0 \pm 2,5$  cM com LOD score de 15,81 para a população II. Para o OPAK-04, as estimativas foram de  $6,2 \pm 2,5$  cM com LOD score de 15,43 para a população I, e  $6,3 \pm 2,6$  cM com LOD score de 15,09 para a população II. Já para o iniciador OPR-04, as distâncias estimadas foram de  $13,6 \pm 3,7$  cM com LOD score de 8,48 para a população I, e de  $14,8 \pm 3,9$  cM com LOD score de 9,48 para a população II. Todos esses resultados de LOD score calculados acima de 3,0 indicam a confiabilidade da hipótese de ligação entre os marcadores e o gene em estudo. De posse dos resultados, procedeu-se à construção do mapa consenso, conforme observado na Figura 2.

Marcadores moleculares RAPD ligados a várias doenças têm sido identificados na cultura da soja. Dentre esses, CARVALHO et al. (2002) identificaram o marcador OPAB-19 como co-dominante e localizado a 4,7 cM de um gene de resistência ao cancro da haste. CHOWDHURY et al. (2002) identificaram dois marcadores ligados ao gene *Rpmx* de resistência ao míldio, denominados OPH-02<sub>1250</sub> e OPP-10<sub>831</sub>,

localizados, respectivamente, a 4,9 e 23,1 cM do referido gene. Já GAVIOLI et al. (2007), detectaram um fragmento obtido pelo iniciador OPAB-04, localizado a 7,4 cM de um gene de resistência ao cancro da haste.



**Figura 2.** Mapa de ligação consenso, com o melhor ordenamento e as distâncias estimadas (em cM) entre os marcadores RAPD (OPBB-16, OPAK-04 e OPR-04) e o loco de resistência à ferrugem asiática da soja (Gene R Ferrugem).

Com relação à ferrugem asiática, SILVA et al. (2008) identificaram marcadores SSR ligados a genes de resistência, destacando-se o Satt288 e o AF162283, localizados a 1,9 e 12,8 cM do gene *Rpp4*, respectivamente; e o Sat\_255 e o Satt320, respectivamente a 7,3 e 5,6 cM do *Rpp2*. Já HYTEN et al. (2007), localizaram o Sct\_187 e o Sat\_064 flanqueando o gene *Rpp1* a 4 cM.

Os resultados obtidos no presente estudo indicam a possibilidade de utilização dos marcadores RAPD OPBB-16, OPAK-04 e OPR-04 para a seleção assistida de genótipos resistentes ao fungo *P. pachyrhizi*, causador da ferrugem asiática, portadores da mesma fonte de resistência para os quais eles foram identificados, devendo ser validados na tentativa de uso para outras populações.

Ainda com relação a esses marcadores, deve-se considerar o fato das marcas para os três iniciadores estarem ligadas ao loco de resistência em fase de repulsão, de tal forma que o alelo dominante do marcador (presença da banda) está ligado ao alelo recessivo do gene (suscetibilidade) e o alelo dominante do gene (resistência) está ligado ao alelo recessivo do marcador (ausência da banda). Isso impossibilita a separação entre os indivíduos suscetíveis e os resistentes heterozigotos, de forma que apenas os resistentes homozigotos podem ser diretamente selecionados, pela ausência das marcas. Nesse caso, pode ser sugerida a utilização da seleção assistida em duas gerações consecutivas, de modo que possam ser separados os heterozigotos pela segregação da última geração.

#### **4. Conclusões**

1. A resistência à ferrugem asiática da soja é governada por um gene de ação dominante no genótipo PI 459025.
2. Os iniciadores RAPD OPBB-16, OPAK-04 e OPR-04 são indicados para seleção assistida para genótipos de soja com a mesma fonte de resistência do presente estudo.

## 5. Referências

- ARAÚJO, L.G.; PRABHU, A.S.; PEREIRA, P.A.A. RAPD marker linked to a gene conferring resistance to race IB-9 of *Pyricularia grisea* in a somaclone of the rice cultivar Araguaia. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 78, p. 151-58, 2004.
- BROMFIELD, K. R.; HARTWIG, E. E. Resistance to soybean rust and mode of inheritance. **Crop Science**, v. 20, p. 254-255, 1980.
- CARVALHO, G.A.; SEDIYAMA, T.; ALZATE-MARIN, A.L.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Identificação de marcadores RAPD ligados a um gene de resistência ao cancro da haste da soja. **Fitopatologia brasileira**, v. 27, p. 474-78, 2002.
- CHOWDHURY, A.K.; SRINIVES, P.; SAKSOONG, P.; TONGPAMNAK, P. RAPD markers linked to resistance to downy mildew disease in soybean. **Euphytica**, v. 128, p. 55-60, 2002.
- CRUZ, C. D. **Programa Genes**: versão Windows; aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: Ed. UFV, 2001. 648p.
- CRUZ, C.D.; SCHUSTER, I. **GQMOL**: aplicativo computacional para análise de dados moleculares e de suas associações com caracteres quantitativos, Versão 2008. Disponível em: <http://www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm>. Acesso em: 14/04/2008.
- FEHR, W. R.; CAVINESS, J. A. **Stages of soybean development**. Ames: Iowa State University, 1977. 11p. (Special Report, 80).
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3 ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.
- FERREIRA, C.F.; BORÉM, A.; CARVALHO, G.A.; NIETSCHÉ, S.; PAULA JÚNIOR, T.J.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Identificação de marcador RAPD ligado ao gene de resistência à raça 63.39 da mancha-angular do feijoeiro. **Bragantia**, v. 58, p. 247-52, 1999.
- 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**. Disponível em: [www.springerlink.com/content/a657751v11520810/fulltext.pdf](http://www.springerlink.com/content/a657751v11520810/fulltext.pdf). Acesso: 03/06/2008.
- GAVIOLI, E.A.; MAURO, A.O.; CENTURION, M.A.P.C.; MAURO, S.M.Z. Development of SCAR marker linked to stem canker resistance gene in soybean. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 7, p. 133-40, 2007.
- HARTWIG, E.E.; BROMFIELD, K.R. Relationships among three genes conferring specific resistance to rust in soybeans. **Crop Science**, v. 23, p.237-39, 1983.
- HARTWIG, E.E. Identification of a fourth major genes conferring to rust in soybean. **Crop Science**, v. 26, p. 1135-1136, 1986.
- HEER, J.A.; KNAP, H.T.; MAHALINGAM, R.; SHIPE, E.R.; ARELLI, P.R.; MATTHEWS, B.F. Molecular markers for resistance to *Heterodera glycines* in advanced soybean germplasm. **Molecular Breeding**, v. 4, p. 359-67, 1998.
- HYTEN, D.L.; HARTMAN, G.L.; NELSON, R.L.; FREDERICK, R.D.; CONCIBIDO, V.C.; NARVEL, J.M.; CREGAN, P.B. Map location of the *Rpp1* locus that confers resistance to soybean rust in soybean. **Crop Science**, v. 47, p. 837-40, 2007.
- MARTINS FILHO, S.; SEDIYAMA, C.S.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. RAPD and SCAR markers linked to resistance to frog-eye leaf spot in soybean. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, p. 317-21, 2002.
- McLEAN, R. J.; BYTH, D. E. Inheritance of resistance to rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in soybeans. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 31, p. 951-956, 1980.
- MICHELMORE, R.W.; PARAN, I.; KESSELI, R.V. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregation populations. **Proceedings National Academy Science USA**, v.88, p.9828-9832, 1991.
- PARAN, I.; MICHELMORE, R.W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 85, p. 985-93, 1993.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York. 2001.

- SCHUSTER, I.; CRUZ, C.D. **Estatística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados**. Viçosa: Editora UFV, 2004. 568p.
- SILVA, D.C.G.; YAMANAKA, N.; BROGIN, R.L.; ARIAS, C.A.A.; NEPOMUCENO, A.L.; MAURO, A.O.; PEREIRA, S.S.; NOGUEIRA, L.M.; PASSIANOTTO, A.L.L.; ABDELNOOR, R.V. Molecular mapping of two loci that confer resistance to Asian rust in soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v.117, n.1, p. 57-63, 2008.
- SINCLAIR, J.B.; HARTMAN, G.L. Soybean rust. In: HARTMAN, G.L.; SINCLAIR, J.B.; RUPE, J.C. (Eds.) **Compendium of soybean diseases**. 4ed. St. Paul: American Phytopathological Society, 1999. p. 3-4.
- WILLIAMS, J.G.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, L.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.6531-6535. 1990.
- YORINORI, J.T.; PAIVA, W.M.; FREDERICK, R.D.; COSTAMILAN, L.M.; BERTAGNOLI, P.F.; HARTMAN, G.L.; GODOY, C.V.; NUNES, J.J. Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. **Plant Disease**, v. 89, p. 675-77, 2005.

## **CAPÍTULO 4 – DESENVOLVIMENTO DE MARCADOR MOLECULAR SCAR LIGADO A RESISTÊNCIA À FERRUGEM ASIÁTICA EM SOJA**

**RESUMO** – A obtenção de marcadores moleculares específicos para seleção assistida de determinadas doenças, constitui-se num dos principais avanços na área molecular do melhoramento genético. Com isso, o presente estudo objetivou o desenvolvimento de um marcador molecular SCAR ligado a um loco de resistência à ferrugem asiática da soja. Duas populações do cruzamento PI 459025 (Bing Nam) x CD 208 foram submetidas à inoculação artificial com o patógeno causador da ferrugem asiática e avaliadas quanto à sua reação pelo tipo de lesão (RB – resistente e TAN – suscetível), nas gerações F<sub>2</sub> e F<sub>3</sub>. O teste de Qui-quadrado indicou a presença de um gene dominante condicionando a resistência no referido cruzamento. Além disso, a partir dos resultados fenotípicos, procedeu-se à obtenção de dois *bulks* contrastantes de DNA de plantas homozigóticas resistentes e suscetíveis, respectivamente, para a análise de *bulks* segregantes. Um total de 600 iniciadores RAPD aleatórios foi testado, identificando-se apenas três marcadores discriminativos. As três marcas encontram-se ligadas ao loco de resistência em fase de repulsão no grupo de ligação G, sendo que uma delas (OPR-04) foi convertida eficientemente para marcador SCAR. O processo de conversão envolveu purificação do fragmento polimórfico, clonagem em vetor T, transformação e seqüenciamento do inserto, sendo obtido um par de iniciadores específicos para a amplificação da região seqüenciada. O marcador SCAR co-segregou eficientemente com a resistência, apresentando-se muito promissor na seleção assistida para ferrugem asiática da soja.

**Palavras-Chave:** *Glycine max*, *Phakopsora pachyrhizi*, seleção assistida, Sequence Characterized Amplified Regions.

## 1. Introdução

No melhoramento genético de plantas, a busca pela seleção assistida por marcadores moleculares é cada vez maior, visando aumentar a eficiência da transferência dos caracteres de importância nas populações em estudo. Dessa forma, a obtenção de marcadores ligados a diferentes caracteres superiores nas culturas, permite a seleção indireta de genótipos desejáveis em gerações segregantes precocemente, com redução do tempo, custo e mão-de-obra, necessários para o desenvolvimento de grandes populações (CAIXETA et al., 2006).

Na seleção assistida por marcadores moleculares, deve-se considerar a prévia identificação do gene de interesse e existência de marcadores que permitam monitorar a presença dos alelos favoráveis. Além disso, devem ser levados em conta aspectos como a natureza genética da característica (quantitativa ou qualitativa), o modo de ação gênica (aditividade, dominância ou recessividade), o efeito do gene na expressão do fenótipo e a eficiência do marcador na discriminação do caráter (MORRIS et al., 2003).

Nesse ponto, destaca-se a seleção assistida para resistência a doenças como uma das principais aplicações no melhoramento molecular. Esse fato decorre do grande tempo exigido e da natureza laboriosa das técnicas convencionais para seleção de genótipos resistentes, além da dependência de condições ambientais adequadas para o patógeno. Muitas vezes, a obtenção e manutenção do fungo para os procedimentos de inoculação são dificultadas pela característica de alguns patógenos, que necessitam de células vivas para seu desenvolvimento (CAMARGO, 1995).

Esse é o caso do fungo *Phakopsora pachyrhizi*, causador da ferrugem asiática da soja, que só se desenvolve na presença do hospedeiro, dificultando as pesquisas para a obtenção de variedades resistentes. Apesar disso, a ferrugem é um dos principais problemas da soja na atualidade já que a cultura, seu principal hospedeiro, se distribui por todo o território brasileiro, e junto com a elevada variabilidade do fungo e as mais de 95 espécies de hospedeiros alternativos, contribuem para o incremento de sua ação danosa (YORINORI et al., 2004). Desde sua primeira constatação no Brasil, na safra 2000/01, o patógeno se disseminou rapidamente, e hoje se encontra em todas as

regiões produtoras do território nacional, com perdas superiores a 80% nas áreas mais infectadas, incrementando os custos de produção e os danos ambientais, ambos provocados pelo aumento no uso de defensivos (YORINORI et al., 2005).

O controle químico é o método mais eficiente já que a obtenção de cultivares resistentes ao patógeno tem sido um desafio. Quatro genes dominantes, denominados *Rpp1* a *Rpp4*, foram inicialmente descritos (BROMFIELD & HARTWIG, 1980; McLEAN & BYTH, 1980; HARTWIG & BROMFIELD, 1983; HARTWIG, 1986), sendo que mais recentemente um novo loco de resistência (*Rpp5*) foi descrito por GARCIA et al. (2008). Entretanto, a elevada variabilidade do fungo reduz a eficiência da resistência vertical. Como exemplo, as 11 cultivares brasileiras resistentes identificadas inicialmente, portadores dos locos *Rpp1* e *Rpp3*, tiveram a resistência quebrada por novas raças do fungo provenientes do Mato Grosso, dois anos após a introdução do patógeno no Brasil, sendo que apenas as fontes dos locos *Rpp2* e *Rpp4* permanecem eficientes (YORINORI et al., 2005).

Dessa forma, a seleção assistida por marcadores moleculares pode ser considerada a grande ferramenta dos programas de melhoramento, principalmente no processo de caracterização e seleção de genótipos resistentes, destacando-se por ser um processo rápido e seguro para o desenvolvimento de cultivares superiores. Além disso, sua utilização facilitará a piramidação dos diferentes locos, resultando numa resistência à ferrugem asiática mais estável, capaz de superar os fracassos históricos de heranças monogênicas de resistência. Nesse caso, a maior dificuldade deste processo é selecionar as plantas portadoras de mais de um loco por métodos convencionais. Assim, as técnicas que podem assistir a introgressão de múltiplos locos devem ser muito úteis neste processo (NIKS & RUBIALES, 2002; SILVA et al., 2008).

Na classe dos marcadores moleculares baseados em PCR (*Polimerase Chain Reaction*), destaca-se o RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*), técnica que utiliza oligonucleotídeos de 10 bases e de seqüência arbitrária para amplificação de fragmentos de DNA distribuídos ao acaso no genoma, sem a necessidade do conhecimento prévio de sua seqüência. As grandes vantagens do RAPD são: simplicidade de execução, rapidez na obtenção de dados, custo relativamente reduzido,

e aplicabilidade imediata a qualquer organismo, além da necessidade de pequenas quantidades de DNA (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998; CAIXETA et al., 2006).

Essas características tornam o RAPD bastante interessante para identificação de marcas moleculares ligadas a caracteres de interesse, como genes de resistência, utilizando a técnica de BSA (*Bulked Segregant Analysis*), descrita por MICHELMORE et al. (1991). Essa técnica consiste na amplificação de dois conjuntos de indivíduos com quantidades equimolares de DNA de genótipos selecionados com base na expressão fenotípica do caráter, para detecção de polimorfismos ligados à região alvo entre os mesmos. Essa evidência preliminar de ligação entre o marcador e o loco alvo é então confirmada pela análise de segregação da população completa, estimando-se a frequência de recombinação entre ambos (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Por outro lado, algumas limitações do RAPD como a baixa especificidade e difícil interpretação podem limitar sua utilização em determinadas situações, levando à necessidade de alternativas, como a conversão em marcadores SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*), para adequação do uso na seleção assistida. A técnica consiste no isolamento e clonagem do fragmento polimórfico de interesse, seguido do seqüenciamento e desenho dos iniciadores específicos, com posterior teste de validação (PARAN & MICHELMORE, 1993; FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Diversos estudos de obtenção de marcadores SCAR ligados à resistência a doenças das culturas podem ser observados na literatura, destacando-se, na soja, resistência ao nematóide de cisto (HEER et al., 1998), mancha olho-de-rã (MARTINS FILHO et al., 2002), vírus do mosaico (ZHENG et al., 2003) e cancro da haste (CARVALHO et al., 2002; GAVIOLI et al., 2007). Além dessas, resistência ao vírus do mosaico no tomateiro (DAX et al., 1998), ao oídio no trigo (LIU et al., 1999) e ao mofo azul no tabaco (MILLA et al., 2005). Para a ferrugem asiática, apenas marcadores microssatélites foram identificados em mapeamentos dos genes de resistência (HYTEN et al., 2007; MONTEROS et al., 2007; GARCIA et al., 2008; SILVA et al., 2008).

Assim, o objetivo do presente estudo foi o desenvolvimento de um marcador molecular do tipo SCAR ligado a um loco de resistência à ferrugem asiática, para utilização na seleção assistida em programas de melhoramento da soja.

## 2. Material e Métodos

O presente estudo foi conduzido nos Laboratórios de Biotecnologia Aplicada ao Melhoramento de Plantas do Departamento de Produção Vegetal e de Genética de Bactérias do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, ambos da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, campus de Jaboticabal - SP.

Duas populações de plantas  $F_2$  oriundas do cruzamento PI 459025 (Bing Nam) x CD 208, com 102 indivíduos cada, foram previamente obtidas na empresa TMG (Tropical Melhoramento e Genética), onde as mesmas foram submetidas à inoculação e avaliação da resistência à ferrugem asiática, sob condições controladas, em casa de vegetação. Vale destacar que a PI Bing Nam foi utilizada como fonte de resistência à ferrugem, enquanto a cultivar CD 208 constituiu-se no genótipo suscetível adaptado às condições brasileiras.

Conforme descrito por GARCIA et al. (2008), as plantas foram semeadas em vasos de sete litros com solo devidamente preparado, cultivando-se três plantas por vaso, sendo cada genótipo identificado nas duas gerações ( $F_2$  e  $F_3$ ), mantendo-se a correspondência entre elas para possibilitar a identificação da segregação nas progênies oriundas de indivíduos  $F_2$  heterozigotos.

A suspensão de esporos utilizada nas inoculações foi obtida a partir de folhas infectadas, com esporulação, lavadas com pincel em solução de água + 0,05% do espalhante adesivo Tween 20, visando a retirada dos esporos da superfície abaxial. As plantas foram pulverizadas com a suspensão ajustada para  $10^4$  uredosporos/ml a partir do estágio  $V_2$  da escala de FEHR & CAVINESS (1977).

Após o aparecimento dos sintomas, os genótipos foram avaliados e classificados quanto à sua reação ao patógeno pelo tipo de lesão apresentada, onde as plantas resistentes apresentaram a lesão do tipo RB, enquanto as suscetíveis apresentaram a lesão tipo TAN. Os mesmos genótipos foram ainda avaliados na geração  $F_3$ , no ano seguinte, para confirmação das reações de resistência e diferenciação entre os genótipos homozigotos e heterozigotos, observando-se a segregação do tipo de reação na progênie originária de cada indivíduo. Com os resultados das avaliações fenotípicas

das duas gerações, procedeu-se ao estudo da herança da resistência pelo teste de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ), utilizando o programa Genes versão 2008 (CRUZ, 2001).

Todos os indivíduos da geração F<sub>2</sub> foram submetidos à coleta de trifólios, que foram armazenados a -80 °C para posterior extração de DNA e utilização nas análises moleculares. A extração de DNA foi realizada pelo método CTAB (brometo de cetil-trimetilamônio), conforme protocolo descrito em FERREIRA & GRATTAPAGLIA (1998). As amostras de DNA foram quantificadas em Biofotômetro, verificando-se a quantidade de DNA presente na amostra, assim como a sua qualidade, obtida pela relação entre as leituras a 260 e 280 nm, com DNA de boa qualidade indicado pela relação entre 1,8 e 2,0 (SAMBROOK & RUSSELL, 2001). A partir da quantificação, foram feitas as soluções de trabalho de DNA (30 ng/ $\mu$ l) de todas as plantas.

De posse dos resultados das avaliações de resistência ao patógeno na geração F<sub>2</sub>, foram selecionados 10 indivíduos resistentes e 10 suscetíveis, todos comprovadamente homocigotos, conforme os resultados das avaliações da geração F<sub>3</sub>. Quantidades equimolares de DNA desses indivíduos foram então utilizadas para montagem dos *bulks* a serem utilizados nas reações de PCR-RAPD, conforme a metodologia do BSA descrita por MICHELMORE et al. (1991).

Para as reações de PCR com os iniciadores RAPD, foi utilizado um aparelho termociclador Mastercycler Gradient da marca Eppendorf, com um programa de amplificação constituído de 42 ciclos de um minuto a 92 °C para desnaturação do DNA, um minuto a 35 °C para pareamento dos iniciadores e dois minutos a 72 °C para a extensão pela polimerase, finalizando com 10 minutos a 72 °C e estabilizando a 4 °C. As reações de amplificação com os RAPDs foram conduzidas conforme a metodologia de WILLIAMS et al. (1990), usando 600 iniciadores da Operon Technologies (Alameda, CA, EUA). As reações com volume final de 25  $\mu$ l consistiram de: Tampão PCR 1X (10 mM Tris-HCl pH 8,3 e 50 mM KCl), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTP's, 45 ng do iniciador, 120 ng de DNA genômico, 1 U de DNA Polimerase e Água Milli-Q. Os fragmentos amplificados foram então analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v), corado com brometo de etídeo, procedendo-se a 100 V por cerca de uma hora, em tampão TBE pH 8,0 (0,09 M de Tris; 0,09 M de Ácido Bórico e 2 mM de



EDTA). Os géis foram visualizados sob luz UV e fotografados e armazenados com o sistema de fotodocumentação Kodak EDAS 290.

Os iniciadores polimórficos encontrados nas reações RAPD entre os *bulks* foram testados nas populações, de modo a confirmar o polimorfismo e possibilitar a estimativa das freqüências de recombinação e distâncias entre os marcadores e o loco de resistência. Para posicionamento dos marcadores RAPD nos grupos de ligação do mapa físico do genoma da soja (CREGAN et al., 1999; SONG et al, 2004) foi utilizado o marcador microssatélite Satt288 (SILVA et al., 2008). As freqüências de recombinação e estimativa das distâncias entre os marcadores identificados e o loco de resistência foram efetuadas no Programa GQMOL versão 2007.0.0 (CRUZ & SCHUSTER, 2008), usando a distância de Kosambi, LOD score >3.0 e distância máxima de 30 cM, conforme metodologia descrita em SCHUSTER & CRUZ (2004).

Apenas os iniciadores que se mostraram efetivos e próximos ao loco de resistência seguiram para a etapa de conversão em marcadores SCAR. Nessa etapa, inicialmente, novas reações de PCR-RAPD com os iniciadores selecionados foram realizadas, da mesma forma descrita acima, porém agora utilizando apenas os parentais (Bing Nam e CD 208) em volume de 50 µl, para obtenção de maior quantidade de DNA nas bandas. Os fragmentos polimórficos de cada iniciador foram então isolados do gel de agarose corado com brometo de etídeo, e purificados utilizando o kit SNAP<sup>TM</sup> (Invitrogen), conforme protocolo descrito pelo fabricante. Os fragmentos purificados foram então ligados no vetor T do kit pCR<sup>®</sup> 4-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante, num microtubo contendo o DNA isolado, solução salina, vetor e água Milli-Q, permanecendo a reação por 10 minutos à temperatura ambiente.

Os plasmídeos recombinantes obtidos na reação de ligação foram então transformados quimicamente para células de *Escherichia coli* competentes (DH10B), fornecidas pelo Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada da FCAV/UNESP. Nesse caso, para cada fragmento, o volume total da ligação (6 µl) foi adicionado a 50 µl de células competentes em um microtubo, mantido em gelo por 10 minutos, em seguida colocado em banho-maria a 42 °C por 1 minuto e imediatamente

recolocados em gelo por 5 minutos. Essa suspensão foi incubada em microtubo contendo 250 µl do meio SOC (20 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura, 0,5 g/L de NaCl, 0,19 g/L de KCl, 2% de glicose 1 M e 1% MgCl<sub>2</sub> 1 M, pH 7,0) por 1 h a 37 °C, com agitação de 200 rpm em agitador orbital.

Após a incubação, 50 µl da cultura foram espalhadas em cada placa de Petri com meio LB (10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura; 10 g/L de NaCl; 10 g/L de agar, pH 7) contendo ampicilina (50 µg/ml) e X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside), com o auxílio de uma alça de Drigalski esterilizada. As placas foram incubadas a 37 °C por 16 h e, após este período, foi realizada a seleção das colônias brancas (células transformadas).

Os clones selecionados de cada fragmento foram coletados com palitos esterilizados, e cultivados em microplacas de 96 poços com 100 µl de meio LB líquido contendo ampicilina (50 mg/ml) durante 22 h, a 37 °C. Após esse período, adicionou-se, a cada clone cultivado, 70 µl de glicerol 40% para estoque e armazenamento no freezer a -80 °C. A seguir, uma amostra de cada clone foi então submetida a nova incubação e ao posterior protocolo de miniprep (SAMBROOK & RUSSEL, 2001) para isolamento dos DNAs plasmidiais de cada fragmento, sendo a presença do inserto confirmada em alguns deles por digestão com a enzima de restrição EcoRI, após eletroforese em gel de agarose 1,5%.

Com a confirmação dos fragmentos, passou-se às reações de seqüenciamento usando, para cada fragmento, 2,5 µl *DNA Sequencing-Big Dye Terminator Cycle Sequencing-Ready ABI Prism (Version 3)*; 4,0 pmols *M13 Primer Forward* ou *Reverse*; 100 ng do DNA plasmidial, 2,0 µl de tampão (400mM Tris-HCl, pH 9; 10mM MgCl<sub>2</sub>); e água Milli-Q para um volume de 10 µl. As reações foram incubadas no termociclador *Mastercycler Gradient (Eppendorf)*, com um programa de amplificação de 25 ciclos a 96°C por 30 segundos (desnaturação), 50°C por 15 segundos (pareamento) e 68°C por 2 min (extensão), com um passo adicional de 68°C por 7 min e estabilizando a 4°C até a retirada das amostras. Os amplicons foram seqüenciados no seqüenciador capilar modelo ABI 3100 (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA).

Para verificação da qualidade das seqüências geradas foi utilizado o programa BioEdit versão 7.0.9.0 (HALL, 1999) que gerou os eletroferogramas. Posteriormente, as seqüências foram submetidas à consulta de similaridade de nucleotídeos, com as seqüências depositadas no banco de dados do GenBank acessado através do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). O programa utilizado para a consulta foi o Blast (*Basic Local Alignment Search Tools*) (ALTSCHUL et al., 1997). As seqüências foram então alinhadas pelo software CLUSTAW versão 1.81 (THOMPSON et al., 1997).

Após análise das seqüências, o programa Gene Runner (disponível em: [www.generunner.com](http://www.generunner.com)) foi utilizado para montagem de um par de iniciadores (*Forward e Reverse*) para cada fragmento. A otimização da reação com os iniciadores do SCAR foi efetuada pela análise no gradiente da temperatura de pareamento usando o termociclador *Mastercycler Gradient Eppendorf*, com o DNA dos parentais na reação de amplificação. Após a determinação da temperatura de pareamento ótima, procedeu-se à utilização dos indivíduos componentes dos *bulks* para confirmação da segregação observada no RAPD, entre indivíduos resistentes e suscetíveis à ferrugem asiática.

### 3. Resultados e Discussão

Os resultados das avaliações fenotípicas da reação a *P. pachyrhizi* realizadas nas gerações F<sub>2</sub> e F<sub>3</sub> foram utilizadas para confirmar a hipótese de segregação 1:2:1 (homozigoto resistente: heterozigoto: homozigoto suscetível) nas duas populações do cruzamento Bing Nam x CD 208 pelo teste de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ), conforme pode ser verificado na Tabela 1. Os valores não significativos obtidos, com as probabilidades de 84,07 e 34,45%, respectivamente, indicam a presença de um gene dominante no controle da resistência à ferrugem asiática nesse cruzamento. A não-significância observada no teste de heterogeneidade confirma a consistência dos resultados do  $\chi^2$  (P = 81,79%). Resultado semelhante foi observado por SILVA et al. (2008), onde também foi confirmada a herança monogênica com dominância completa na PI 459025, indicando ser este o loco *Rpp4*.

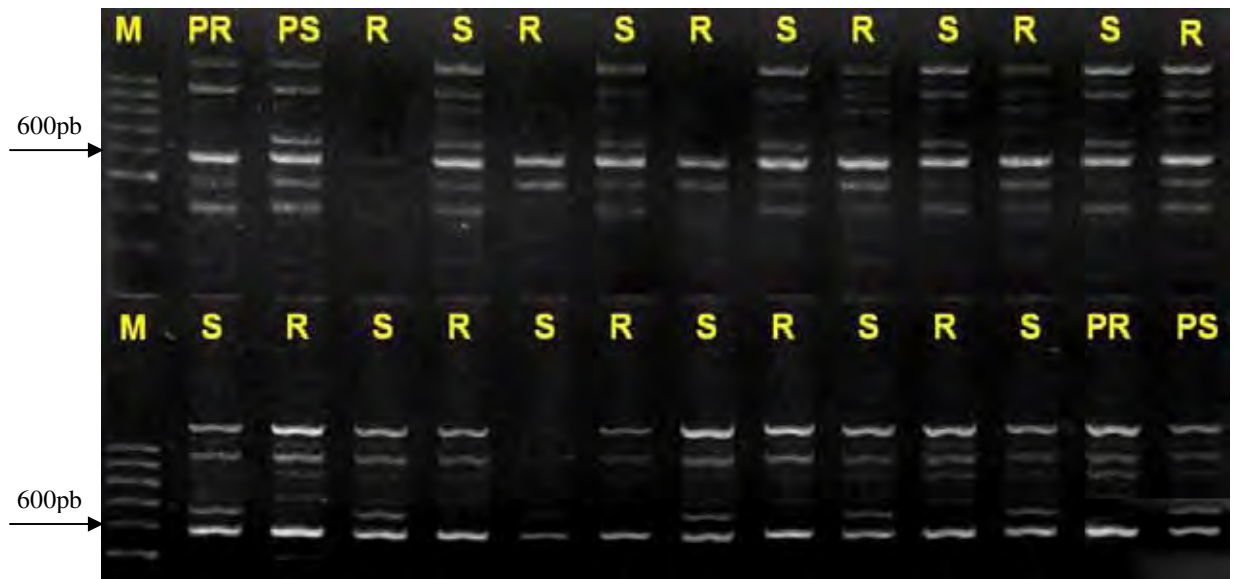
**Tabela 1.** Número de plantas classificadas como homozigotas resistentes (HR), heterozigotas (HE) e homozigotas suscetíveis (HS) e resultados do teste de  $\chi^2$  e de heterogeneidade nas duas populações avaliadas quanto à resistência ao patógeno causador da ferrugem asiática em genótipos F<sub>2</sub> de soja, oriundos do cruzamento Bing Nam x CD 208.

Populações	HR	HE	HS	GL	$\chi^2$	P
I	24	47	27	2	0,3469 <sup>ns</sup>	84,07
II	22	46	31	2	2,1313 <sup>ns</sup>	34,45
Total				4	2,4783 <sup>ns</sup>	64,85
Desvio				2	2,0761 <sup>ns</sup>	35,41
Heterogeneidade				2	0,4021 <sup>ns</sup>	81,79

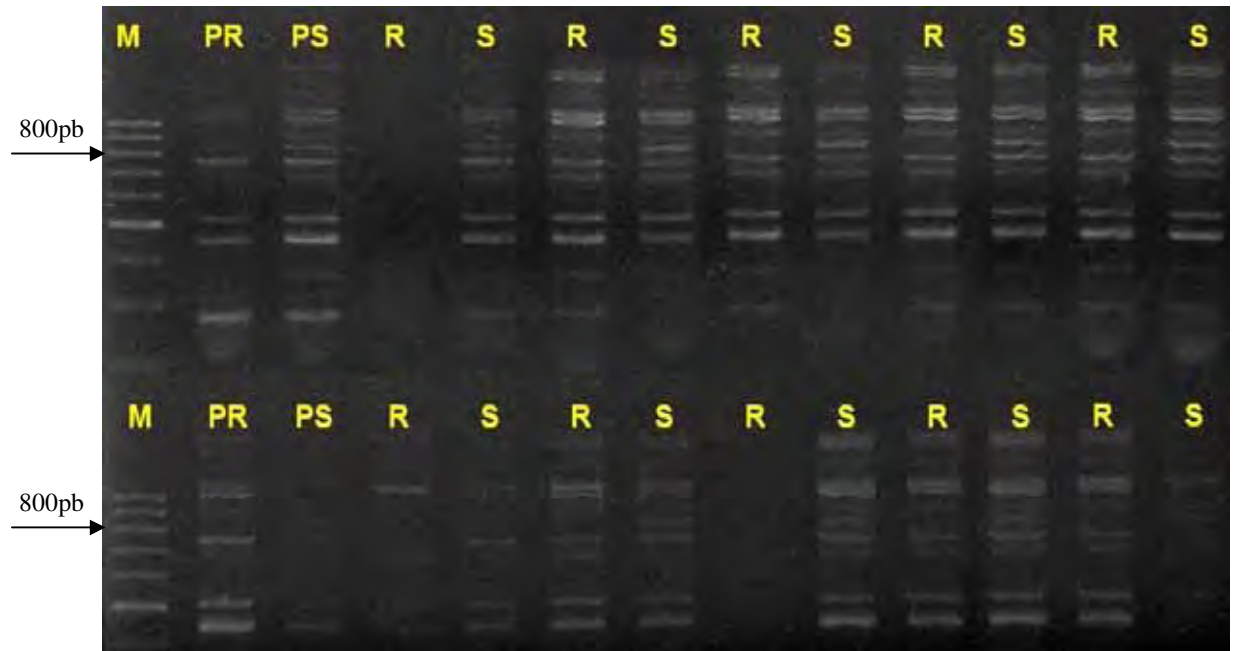
<sup>ns</sup> = valores não significativos ao nível de 5% de probabilidade.

A avaliação dos genótipos na geração F<sub>3</sub> possibilitou a verificação da segregação na descendência dos indivíduos resistentes da geração F<sub>2</sub>, separando os homozigotos dos heterozigotos. A partir disso, foi feita a composição dos *bulks* de DNA resistente e suscetível, contendo apenas indivíduos homozigotos, para a análise de BSA (MICHELMORE et al., 1991), passando-se às reações de PCR com os iniciadores RAPD para detecção de polimorfismo. Dos 600 iniciadores testados, a grande maioria foi monomórfico e não informativo, e dentre os 15 que apresentaram polimorfismo entre os *bulks*, apenas três (OPBB-16, OPAK-04 e OPR-04) confirmaram essa condição nas análises de plantas individuais dentro dos *bulks*, sendo indicados para análise de todos os indivíduos das duas populações.

Os três iniciadores identificados foram discriminativos, apresentando suas respectivas marcas ligadas ao alelo recessivo de suscetibilidade, como pode ser visto nas Figuras 1 a 3. O iniciador OPBB-16 (Figura 1) detectou um fragmento polimórfico de aproximadamente 650 pares de bases presente no DNA do *bulk* suscetível, no parental suscetível (CD 208) e em todos os indivíduos pertencentes ao *bulk* suscetível, estando ausente em todos os resistentes. O iniciador OPAK-04 (Figura 2) detectou um fragmento polimórfico de cerca de 800 pares de bases, também presente no *bulk* suscetível, na CD 208 e em todos os indivíduos do *bulk* suscetível, e ausente nos resistentes. A mesma situação ocorreu para o iniciador OPR-04 (Figura 3), o qual apresentou um fragmento polimórfico de cerca de 850 pares de bases, com o mesmo comportamento dos dois marcadores citados anteriormente.



**Figura 1.** Reações do iniciador OPBB-16 com fragmentos polimórficos discriminativos para resistência à ferrugem em soja. Na seqüência, o marcador de tamanho de bandas (M) e as reações do parental resistente (PR), do parental suscetível (PS) e de genótipos  $F_2$  resistentes (R) e suscetíveis (S) do cruzamento Bing Nam x CD 208.



**Figura 2.** Reações do iniciador OPAK-04 com fragmentos polimórficos discriminativos para resistência à ferrugem em soja. Na seqüência, o marcador de tamanho de bandas (M) e as reações do parental resistente (PR), do parental suscetível (PS) e de genótipos  $F_2$  resistentes (R) e suscetíveis (S) do cruzamento Bing Nam x CD 208.



**Figura 3.** Reações do iniciador OPR-04 com fragmentos polimórficos discriminativos para resistência à ferrugem em soja. Na seqüência, o marcador de tamanho de bandas (M) e as reações do parental resistente (PR), do parental suscetível (PS) e de genótipos  $F_2$  resistentes (R) e suscetíveis (S) do cruzamento Bing Nam x CD 208.

Com esses resultados positivos obtidos para os indivíduos pertencentes aos *bulks*, procedeu-se às avaliações de todas as plantas das duas populações com os três marcadores. Isso possibilitou, inicialmente, o teste de co-segregação de cada marcador com o loco de resistência, conforme pode ser observado na Tabela 2. Nesse caso, os valores significativos ( $P < 0,0001$ ) de  $\chi^2$  observados nas duas populações para os três marcadores RAPD identificados indicaram a rejeição da hipótese de segregação independente para todos eles, havendo assim grande probabilidade de que o loco e os marcadores estejam localizados no mesmo cromossomo. Vale ressaltar ainda a inclusão do marcador microssatélite Satt288 nas análises, para o qual também foi testada a co-segregação. Embora o mesmo já tenha sido confirmado por SILVA et al. (2008) como estando ligado ao loco de resistência presente na PI 459025 (Bing Nam), que provavelmente se refere ao *Rpp4*, as estimativas foram feitas para posicioná-lo frente aos indivíduos do cruzamento do presente estudo. Destacam-se ainda as freqüências esperadas do  $\chi^2$  no rodapé da Tabela 2 que indicam a comparação entre características dominantes (RAPD) e co-dominantes (resistência e microssatélite).

**Tabela 2.** Análise de co-segregação entre o loco de resistência à ferrugem asiática e os marcadores RAPD (OPBB-16, OPAK-04 e OPR-04) e microssatélite (Satt288), em populações F<sub>2</sub> de soja derivadas do cruzamento Bing Nam x CD 208.

População	Loco testado	Freqüência observada	$\chi^2$	P
10	<i>Rpp4</i> / OPBB-16	24:41:2:0:2:24	87.90	< 0.0001
	<i>Rpp4</i> / OPAK-04	24:44:4:0:2:23	79.82	< 0.0001
	<i>Rpp4</i> / OPR-04	24:42:10:0:2:17	42.41	< 0.0001
	<i>Rpp4</i> / Satt288	22:1:0:1:42:2:0:4:21	143.90	< 0.0001
11	<i>Rpp4</i> / OPBB-16	20:45:6:0:0:25	91.59	< 0.0001
	<i>Rpp4</i> / OPAK-04	21:42:6:0:0:24	84.03	< 0.0001
	<i>Rpp4</i> / OPR-04	21:39:9:0:6:22	58.91	< 0.0001
	<i>Rpp4</i> / Satt288	15:6:1:0:41:2:0:4:25	128.53	< 0.0001

<sup>1/</sup> Proporção esperada para aceitação da hipótese de independência no RAPD foi 3:6:3:1:2:1 (suscetível com banda: heterozigoto com banda: homozigoto resistente com banda: suscetível sem banda: heterozigoto sem banda: homozigoto resistente sem banda).

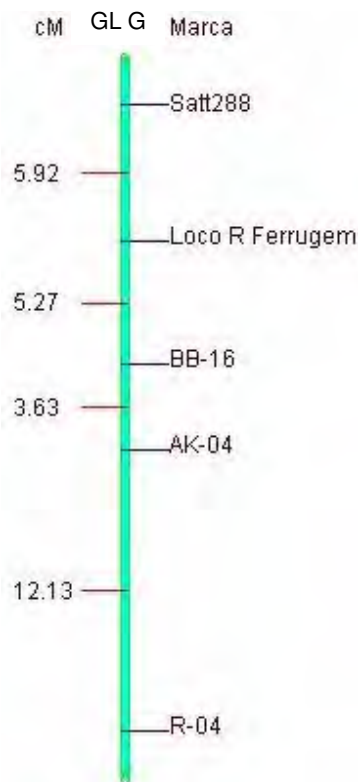
<sup>2/</sup> Proporção esperada para aceitação da hipótese de independência no Satt288 foi 1:2:2:4:1:2:1:2:1 (homozigoto resistente com a banda 1: homozigoto resistente com as duas bandas: heterozigoto com a banda 1: heterozigoto com as duas bandas: homozigoto resistente com a banda 2: heterozigoto com a banda 2: suscetível com a banda 1: suscetível com as duas bandas: suscetível com a banda 2).

Todos esses resultados promissores evidenciaram a utilização dos três marcadores RAPD polimórficos obtidos para as estimativas da freqüência de recombinação, que indicam a distância entre duas marcas (ou genes) quaisquer num determinado mapa de ligação. Dessa forma, na Tabela 3, constam os valores das distâncias, em centiMorgans entre cada marcador e o loco de resistência, além do desvio-padrão das estimativas e o valor do LOD score, para as duas populações do cruzamento estudado. Ressalta-se, mais uma vez, a inclusão do Satt288 nas análises.

**Tabela 3.** Distância genética, desvio-padrão e LOD score estimados entre o loco de resistência à ferrugem (*Rpp4*) e os marcadores RAPD (OPBB-16, OPAK-04 e OPR-04) e microssatélite (Satt288), em populações F<sub>2</sub> de soja derivadas do cruzamento Bing Nam x CD 208.

População	Loco testado	Distância genética (cM)	Desvio-padrão	LOD score
10	<i>Rpp4</i> / OPBB-16	4.2	± 2.1	17.42
	<i>Rpp4</i> / OPAK-04	6.2	± 2.5	15.43
	<i>Rpp4</i> / OPR-04	13.6	± 3.7	8.48
	<i>Rpp4</i> / Satt288	4.4	± 1.5	29.06
11	<i>Rpp4</i> / OPBB-16	6.0	± 2.5	15.81
	<i>Rpp4</i> / OPAK-04	6.3	± 2.6	15.09
	<i>Rpp4</i> / OPR-04	14.8	± 3.9	9.48
	<i>Rpp4</i> / Satt288	7.8	± 2.0	22.73

As análises de ligação indicaram que o OPBB-16 é o marcador mais próximo ao loco de resistência nas duas populações estudadas (4,2 e 6,0 cM, respectivamente), embora todos os marcadores estudados tenham sido eficientes na discriminação dos genótipos. Além disso, todos os valores de LOD score estimados (bem superiores a 3,0), indicam a confiabilidade da hipótese de ligação entre os marcadores e o gene em estudo. De posse desses resultados, procedeu-se à construção de um mapa genético consenso com as estimativas de distâncias obtidas nas duas populações, conforme observado na Figura 4.



**Figura 4.** Mapa de ligação consenso do grupo de ligação G (GL G), com ordenamento e distâncias estimadas (em cM) entre o loco de resistência (R) à ferrugem asiática e os marcadores RAPD (OPBB-16, OPAK-04 e OPR-04) e microssatélite (Satt288), obtidos a partir de populações  $F_2$  de soja do cruzamento Bing Nam x CD 208.

A presença do Satt288 fornece maior confiabilidade aos resultados das estimativas do RAPD, uma vez que a ligação do mesmo com o loco *Rpp4* presente na Bing Nam (PI 459025) já foi confirmada por SILVA et al. (2008). Além disso, esse



resultado permite o posicionamento desses marcadores no mapa de ligação da soja (CREGAN et al., 1999; SONG et al., 2004), mais precisamente no grupo de ligação G, onde se encontra posicionado o Satt288.

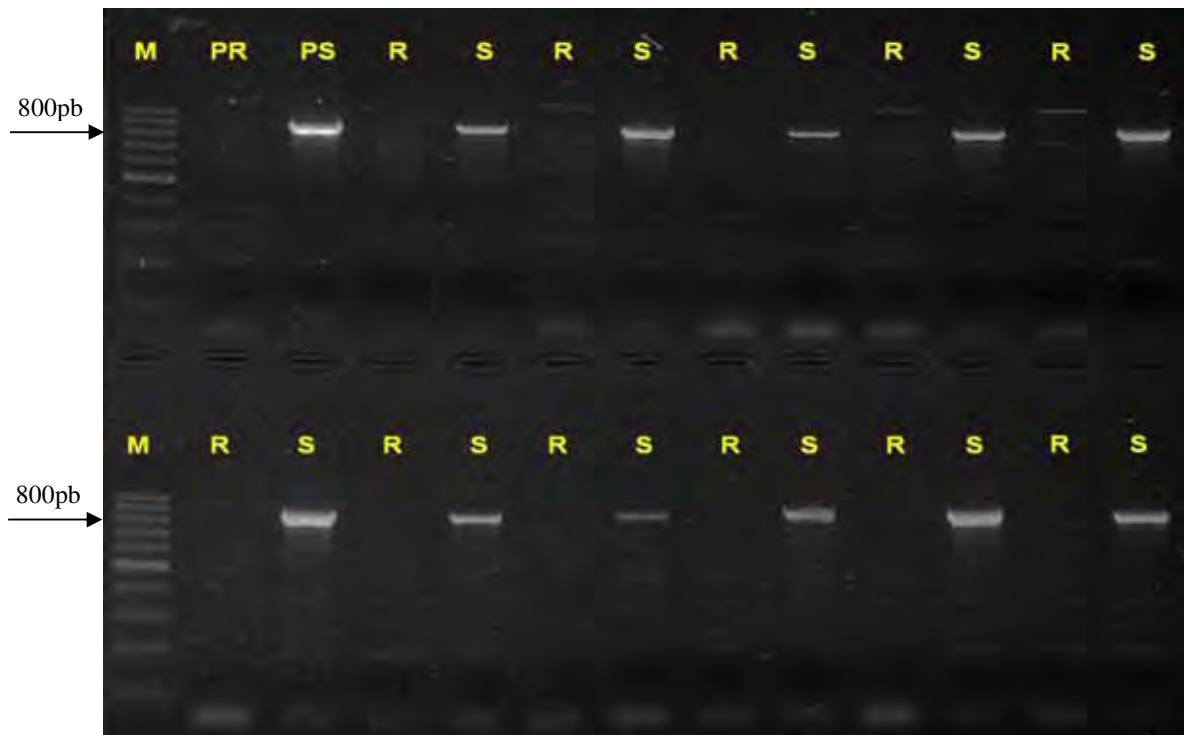
Diversos estudos na literatura observaram a ligação de marcadores moleculares RAPD a várias doenças na cultura da soja. Para o míldio, CHOWDHURY et al. (2002) localizaram os marcadores OPH-02<sub>1250</sub> e OPP-10<sub>831</sub>, respectivamente, a 4,9 e 23,1 cM do gene *Rpmx*. Com relação ao cancro da haste, CARVALHO et al. (2002) e GAVIOLI et al. (2007) identificaram os marcadores OPAB-19 e OPAB-04, respectivamente, localizados a 4,7 e 7,4 cM de um gene de resistência, sem confirmação de que possa ser o mesmo. Além desses, MARTINS-FILHO et al. (2002) localizaram três marcadores RAPD ligados à resistência à mancha olho-de-rã; e ZHENG et al. (2003) encontraram um RAPD co-dominante para resistência ao vírus do mosaico.

Alguns desses estudos citados seguiram, após a identificação dos marcadores RAPD discriminativos, para a etapa de conversão em marcadores SCAR (MARTINS-FILHO et al., 2002; ZHENG et al., 2003; GAVIOLI et al., 2007). Os marcadores SCAR são bastante vantajosos, pois minimizam as grandes limitações dos RAPDs, aumentando significativamente sua reprodutibilidade e especificidade, já que apenas o fragmento polimórfico presente no padrão de amplificação do RAPD é isolado e seqüenciado para conversão em SCAR, com iniciadores desenhados especificamente para a referida região.

No presente estudo, os três marcadores RAPD foram selecionados para a etapa de conversão em SCAR, entretanto, o fragmento isolado do OPBB-16 não concluiu o processo, por problemas nas etapas de ligação e transformação. Assim, apenas os fragmentos do OPAK-04 e do OPR-04 foram clonados, seqüenciados e analisados, confirmando-se a presença das seqüências de 10 bases dos iniciadores RAPDs nas bordas de seus respectivos fragmentos. Após essa etapa, dois iniciadores (*Forward* e *Reverse*) foram “desenhados” para cada iniciador, possibilitando a obtenção dos fragmentos de 832 pares de bases para o OPAK-04 e de aproximadamente 800 pares de bases para o OPR-04. No caso do OPR-04, não foi possível precisar o tamanho do fragmento já que o seqüenciamento realizado nas direções opostas (*Forward* e

Reverse) não possibilitou o alinhamento correto das seqüências, sendo obtidos dois fragmentos (de 380 e 348 pb, respectivamente), com iniciadores específicos para cada um deles.

A partir da obtenção dos iniciadores, as reações do SCAR para os dois fragmentos tiveram que ser otimizadas. Dessa forma, temperaturas de pareamento entre 44 e 58 °C foram testadas em gradientes, assim como modificações no tempo de pareamento e na velocidade de aquecimento e resfriamento do termociclador (“rampa de termociclagem”). Nesse caso, mesmo com a utilização de combinações, evidenciou-se a perda de polimorfismo no fragmento de OPAK-04. Por outro lado, o passo de pareamento por 1 minuto a 52 °C confirmou a eficiência do SCAR para o fragmento oriundo do OPR-04, apresentando o mesmo polimorfismo observado no RAPD, com a banda de cerca de 800 pb presente nos genótipos suscetíveis e ausente nos resistentes, conforme pode ser observado na Figura 5.



**Figura 5.** Marcador SCAR-R04<sub>800</sub> discriminativo para resistência a ferrugem asiática da soja. Na seqüência, encontram-se o marcador de tamanho de bandas (M) e as reações do parental resistente (PR), do parental suscetível (PS) e de genótipos F<sub>2</sub> resistentes (R) e suscetíveis (S) do cruzamento Bing Nam x CD 208.

Os resultados obtidos no presente estudo indicam a clara possibilidade de utilização do marcador SCAR-R04<sub>800</sub>, desenvolvido a partir do RAPD OPR-04 para a seleção assistida de genótipos resistentes ao fungo *P. pachyrhizi*, causador da ferrugem asiática, portadores da mesma fonte de resistência para os quais eles foram identificados, devendo ser validados na tentativa de uso para outras populações. A confiabilidade desse marcador pode ser confirmada por se tratar de um fragmento seqüenciado e pela sua inserção no grupo de ligação G, graças à incorporação do Satt288 nas análises moleculares.

Vale ressaltar os resultados de alinhamento da seqüência do fragmento do SCAR com seqüências conhecidas do banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), onde não foi encontrada similaridade significativa com nenhuma seqüência disponível, podendo ser um indício de descrição de um novo gene.

Ainda merece consideração o fato da marca para o referido iniciador estar ligada ao loco de resistência em fase de repulsão, de tal forma que a presença da banda (alelo dominante) está ligada à suscetibilidade (alelo recessivo do gene) e o alelo de resistência (dominante no gene) está ligado à ausência de banda (caráter recessivo do marcador). Isso impossibilita a separação entre os indivíduos suscetíveis e heterozigotos, de forma que apenas os resistentes homozigotos podem ser diretamente selecionados pela ausência das marcas, que na realidade são os mais interessantes do ponto de vista do melhoramento visando a resistência. Entretanto, nesse caso, pode ser sugerida a utilização da seleção assistida em duas gerações consecutivas, de modo que possam ser separados os heterozigotos pela segregação na última geração.

#### **4. Conclusões**

1. Os marcadores RAPD OPBB-16, OPAK-04 e OPR-04 encontram-se ligados ao loco de resistência da PI 459025 e ao microsatélite Satt288, localizando-se no grupo de ligação G do mapa físico da soja.
2. O marcador SCAR-R04<sub>800</sub> oriundo do RAPD OPR-04 é indicado para seleção assistida de genótipos de soja com a mesma fonte de resistência do presente estudo.

## 5. Referências

- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search Programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- BROMFIELD, K. R.; HARTWIG, E. E. Resistance to soybean rust and mode of inheritance. **Crop Science**, v. 20, p. 254-255, 1980.
- CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYAMA, N.S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. Viçosa: Ed. UFV, 2006. p. 9-78.
- CAMARGO, L.E.A. Análise genética da resistência e da patogenicidade. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Ceres, 1995. p. 470-491.
- CARVALHO, G.A.; SEDIYAMA, T.; ALZATE-MARIN, A.L.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Identificação de marcadores RAPD ligados a um gene de resistência ao cancro da haste da soja. **Fitopatologia brasileira**, v. 27, p. 474-78, 2002.
- CHOWDHURY, A.K.; SRINIVES, P.; SAKSOONG, P.; TONGPAMNAK, P. RAPD markers linked to resistance to downy mildew disease in soybean. **Euphytica**, v. 128, p. 55-60, 2002.
- CREGAN, P.B.; JARVIK, T.; BUSH, A.L.; SHOEMAKER, R.C.; LARK, K.G.; KAHLER, A.L.; KAYA, N.; VANTOAI, T.T.; LOHNES, D.G.; CHUNG, L.; SPECHT, J.E. An integrated genetic linkage map of the soybean genome. **Crop Science**, v. 39, p. 1464-1490, 1999.
- CRUZ, C. D. **Programa Genes**: versão Windows; aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: Ed. UFV, 2001. 648p.
- CRUZ, C.D.; SCHUSTER, I. **GQMOL**: aplicativo computacional para análise de dados moleculares e de suas associações com caracteres quantitativos, Versão 2008. Disponível em: <http://www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm>. Acesso em: 14/04/2008.
- DAX, E.; LIVNEH, O.; ALISKEVICIUS, E.; EDELBAUM, O.; KEDAR, N.; GAVISH, N.; MILO, J.; GEFFEN, F.; BLUMENTHAL, A.; RABINOWICH, H.D.; SELA, I. A SCAR

- marker linked to the ToMV resistance gene, *Tm2*, in tomato. **Euphytica**, Netherlands, v. 101, p. 73-77, 1998.
- FEHR, W. R.; CAVINESS, J. A. **Stages of soybean development**. Ames: Iowa State University, 1977. 11p. (Special Report, 80).
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3 ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.
- 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**. Disponível em: [www.springerlink.com/content/a657751v1l520810/fulltext.pdf](http://www.springerlink.com/content/a657751v1l520810/fulltext.pdf). Acesso: junho/2008.
- GAVIOLI, E.A.; MAURO, A.O.; CENTURION, M.A.P.C.; MAURO, S.M.Z. Development of SCAR marker linked to stem canker resistance gene in soybean. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 7, p. 133-40, 2007.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.
- HARTWIG, E.E.; BROMFIELD, K.R. Relationships among three genes conferring specific resistance to rust in soybeans. **Crop Science**, v. 23, p.237-39, 1983.
- HARTWIG, E.E. Identification of a fourth major genes conferring to rust in soybean. **Crop Science**, v. 26, p. 1135-1136, 1986.
- HEER, J.A.; KNAP, H.T.; MAHALINGAM, R.; SHIPE, E.R.; ARELLI, P.R.; MATTHEWS, B.F. Molecular markers for resistance to *Heterodera glycines* in advanced soybean germplasm. **Molecular Breeding**, v. 4, p. 359-67, 1998.
- HYTEN, D.L.; HARTMAN, G.L.; NELSON, R.L.; FREDERICK, R.D.; CONCIBIDO, V.C.; NARVEL, J.M.; CREGAN, P.B. Map location of the *Rpp1* locus that confers resistance to soybean rust in soybean. **Crop Science**, v. 47, p. 837-40, 2007.
- LIU, Z.; SUN, Q.; NI, Z.; YANG, T. Development of SCAR markers linked to the *Pm21* gene conferring resistance to powdery mildew in common wheat. **Plant Breeding**, Berlin, v. 118, p. 215-19, 1999.

- MARTINS FILHO, S.; SEDIYAMA, C.S.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. RAPD and SCAR markers linked to resistance to frogeye leaf spot in soybean. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, p. 317-21, 2002.
- McLEAN, R. J.; BYTH, D. E. Inheritance of resistance to rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in soybeans. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 31, p. 951-956, 1980.
- MICHELMORE, R.W.; PARAN, I.; KESSELI, R.V. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregation populations. **Proceedings National Academy Science USA**, v.88, p.9828-9832, 1991.
- MILLA, S.R.; LEVIN, J.S.; LEWIS, R.S.; RUFTY, R.C. RAPD and SCAR markers linked to an introgressed gene conditioning resistance to *Peronospora tabacina* D.B. Adam. In tobacco. **Crop Science**, Madison, v. 45, p. 2346-2354, 2005.
- MONTEROS, M.J.; MISSAOUI, A.M.; PHILIPS, D.V.; WALKER, D.R.; BOERMA, H.R. Mapping and confirmation of the 'Hyuuga' red-brown lesion resistance gene for Asian soybean rust. **Crop Science**, v. 47, p. 829-834, 2007.
- MORRIS, M.; DREHER, K.; RIBAUT, J.M.; KHAIRALLAH, M. Money matters (II): cost of maize inbred line conversion schemes at CIMMYT using conventional and marker-assisted selection. **Molecular Breeding**, v. 11, p. 235-247, 2003.
- NIKS, R.E.; RUBIALES, D. Potentially durable resistance mechanisms in plants to specialized fungal pathogens. **Euphytica**, v. 124, p. 201-216, 2002).
- PARAN, I.; MICHELMORE, R.W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 85, p. 985-93, 1993.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York. 2001.
- SCHUSTER, I.; CRUZ, C.D. **Estatística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados**. Viçosa: Editora UFV, 2004. 568p.
- SILVA, D.C.G.; YAMANAKA, N.; BROGIN, R.L.; ARIAS, C.A.A.; NEPOMUCENO, A.L.; MAURO, A.O.; PEREIRA, S.S.; NOGUEIRA, L.M.; PASSIANOTTO, A.L.L.;

- ABDELNOOR, R.V. Molecular mapping of two loci that confer resistance to Asian rust in soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v.117, n.1, p. 57-63, 2008.
- SONG, Q.J.; MAREK, L.F.; SHOEMAKER, R.C.; LARK, K.G.; CONCIVIDO, V.C.; DELANAY, X.; SPECHT, J.E.; CREGAN, P.B. A new integrated genetic linkage map of the soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 109, p. 122-128, 2004.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. ClustaW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680, 1997.
- WILLIAMS, J.G.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, L.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.6531-6535. 1990.
- YORINORI, J. T.; NUNES JR., J.; LAZZAROTTO J.J. **Ferrugem “asiática” da soja no Brasil: evolução, importância econômica e controle**. Londrina: Embrapa Soja, 2004. 36p. (Documentos n.247).
- YORINORI, J.T.; PAIVA, W.M.; FREDERICK, R.D.; COSTAMILAN, L.M.; BERTAGNOLI, P.F.; HARTMAN, G.L.; GODOY, C.V.; NUNES, J.J. Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. **Plant Disease**, v. 89, p. 675-77, 2005.
- ZHENG, C.; CHANG, R.; QIU, L.; CHEN, P.; WU, X.; CHEN, S. Identification and characterization of a RAPD/SCAR marker linked to a resistance gene for soybean mosaic virus in soybean. **Euphytica**, Netherlands, v. 132, p. 199-210, 2003.