

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

**SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES
MOLECULARES MICROSSATÉLITES PARA RESISTÊNCIA
AO OÍDIO EM SOJA**

Paula dos Santos Demore
Engenheira Agrônoma

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

2008

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

**SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES
MOLECULARES MICROSSATÉLITES PARA RESISTÊNCIA
AO OÍDIO EM SOJA**

Paula dos Santos Demore

Orientador: Prof.Dr. Antonio Orlando Di Mauro

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

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

Jaboticabal - SP

Julho de 2008

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

PAULA DOS SANTOS DEMORE – nascida em 3 de agosto de 1981, em Jaboticabal – SP, é Engenheira Agrônoma formada pela Universidade Estadual Paulista campus de Jaboticabal, em dezembro de 2005. Finalizou sua monografia em novembro de 2005 no Departamento de Tecnologia, pelo Laboratório de Biologia Molecular, da Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – São Paulo. Obteve o título de Mestre em Agronomia (Programa de Genética e Melhoramento de Plantas) em 25 de julho de 2008, pela Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – São Paulo.

“Apague com um sorriso toda a tristeza que lhe invade a alma. Assim não dará aos que te odeiam a alegria de te ver chorando, mas dará aos que te amam a alegria de te ver sorrindo.”

Autor desconhecido.

Aos meus avós

Luís Segura dos Santos (in memorian)

Aparecida Leite dos Santos (in memorian)

Ricieire Demore (in memorian)

Assumpta Demore

DEDICO

Aos meus pais

Mauro e Maria Elizete

Aos meus irmãos

Bruno e Breno

Ao meu noivo

Márcio

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida e proteção.

À toda minha família, meus pais Mauro e Maria Elizete, meus irmãos Bruno e Breno, meu noivo Márcio, meus tios, tias e primos, minha avó Sunta, pelo carinho e apoio, me ajudando na conquista de mais uma etapa.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, pela oportunidade de aprendizado e estudo.

Ao Cnpq, pela bolsa concedida.

Ao Prof. Dr. Antonio Orlando Di Mauro, pela confiança e orientação.

À Profa. Dra. Sandra Helena Unêda-Trevisoli, pela amizade, ajuda e co-orientação.

À todos os professores da FCAV/UNESP, pelos ensinamentos proporcionados e companheirismo, em especial aos professores Janete Aparecida Desidério Sena, João Carlos de Oliveira, Manoel Vitor Franco Lemos.

Aos colegas de laboratório: Franco Muniz, Daniela Sarti, Melina Mancini, Marcelo Marchi, Antonio Morceli, pela amizade.

Às amigas-irmãs: Thaiza Morceli, Dayana Ramos, Juliana Rossi, Juliana dos Santos, Andressa Rhein, Rachel Motta, pela amizade e apoio de sempre.

Aos colegas do Departamento de Produção Vegetal, pela convivência.

A todos que de uma forma ou de outra contribuíram para este trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	viii
SUMMARY.....	ix
1.INTRODUÇÃO.....	1
2.REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1.Oídio da Soja.....	3
2.1.1. Herança da resistência à doença.....	6
2.2.Seleção de genótipos resistentes a doenças.....	8
2.2.1. Seleção assistida por marcadores moleculares.....	9
2.2.2. Marcadores moleculares microssatélites.....	11
2.2.3. Técnica de BSA.....	13
3.MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1.Material Genético.....	15
3.2.Atividades em campo e bancada.....	15
3.2.1.Plantio de populações F ₁	15
3.2.2. Avaliação de Populações F ₂	16
3.3.Coleta das amostras foliares para extração de DNA.....	17
3.4.Atividades em laboratório.....	18
3.4.1.Extração de DNA genômico.....	18
3.4.2. Seleção de marcadores microssatélites.....	20
3.4.3.Ampliação dos locos microssatélites e visualização dos fragmentos.....	22
3.4.4.Utilização da técnica de BSA.....	23
3.5. Análises estatístico – genéticas.....	24
4.RESULTADO E DISCUSSÃO.....	25
4.1. Avaliações fenotípicas.....	25
4.2. Avaliações moleculares.....	26
5.CONCLUSÕES.....	35
6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES MOLECULARES MICROSSATÉLITES PARA RESISTÊNCIA AO OÍDIO EM SOJA

RESUMO - O oídio em soja, trata-se de uma doença praticamente presente em todos os países produtores. Os marcadores moleculares microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeat*) têm sido amplamente utilizados no processo de seleção assistida de genótipos de soja. Assim, o objetivo deste estudo foi obter marcadores microssatélites próximos ao gene de resistência ao oídio em soja. O estudo foi realizado em duas populações F₂, oriundas de cruzamentos entre parentais contrastantes quanto à resistência ao oídio. Para o estudo, foram selecionados marcadores microssatélites a uma distância de até 42 cM ao redor do gene Rmd (resistência ao oídio). Utilizou-se o método de BSA (Bulked Segregant Analysis) na avaliação dos marcadores, para a comparação com a análise fenotípica das populações. Na análise foram utilizados dez iniciadores SSRs para as duas populações, sendo identificados quatro marcadores polimórficos para o cruzamento 1 (MGBR95-20937 x IAC-Foscarin 31) e três para o cruzamento 2 (MGBR 46/Conquista x EMBRAPA 48). Pela análise de Qui-quadrado da avaliação fenotípica, confirmou-se à segregação esperada (3:1) de um gene dominante condicionando a resistência. Os marcadores polimórficos também segregaram conforme o esperado (1:2:1) já que possuem natureza codominante. Para as populações 1 e 2, os melhores resultados foram obtidos com os marcadores Sat_366 e Sat_393, respectivamente, localizando-se a 9,41 e 12,45 cM de distância do gene, sendo considerados promissores na seleção assistida para resistência ao oídio em soja.

Palavras-Chaves: *Erysiphe diffusa*, *Glycine max*, Microssatélite, SAM.

ASSISTED SELECTION BY MICROSATELLITE MOLECULAR MARKERS FOR RESISTENCE TO POWDERY MILDEW IN SOYBEAN

SUMMARY - Powdery mildew in soybeans, it is a disease present in virtually all producing countries. The molecular markers microsatellites or SSR (Simple Sequence Repeat) have been widely used in the assisted selection of soybean genotypes. The objective of this study was to obtain microsatellites markers near the gene for resistance to powdery mildew in soybeans. The study was conducted in two populations F₂, from crosses between contrasting parents about the resistance to powdery mildew. For the study, were selected microsatellites markers at a distance of 42 cM around the gene Rmd (resistance to powdery mildew). It was used the method of BSA (Bulked Segregant Analysis) in the evaluation of markers, for comparison with the phenotypic analysis of populations. In the analysis were used in ten initiators SSRs for the two populations, and identified four polymorphic markers for the crossing 1 (MGBR95-20937 x-IAC Foscarin 31) and three for the crossing 2 (EMBRAPA MGBR 46/Conquista x 48). For the analysis of chi-square of the phenotypic evaluation, it is confirmed the segregation expected (3:1) of a dominant gene conditioning the resistance. The polymorphic markers also segregation as expected (1:2:1) that have already codominante nature. For the populations 1 and 2, the best results were obtained with the markers Sat_366 and Sat_393, respectively, finding itself to 9.41 and 12.45 cM distance of the gene and are considered promising in assisted selection for resistance to soybean in powdery mildew .

Keywords: , *Erysiphe diffusa*, *Glycine max*, microsatellite, powdery mildew

1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma planta autógama que pertence a família *Fabaceae*, subfamília *Papilionoideae*, uma espécie exótica, que possui a China como centro de origem. Consiste em uma das principais espécies graníferas e a mais importante oleaginosa cultivada em escala mundial. O óleo e o farelo constituem seus principais produtos diretos.

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja. Na safra 2007/08, a cultura ocupou uma área de 21,220 milhões de hectares, o que totalizou uma produção de 59,85 milhões de toneladas. Os Estados Unidos, maior produtor mundial do grão, responderam pela produção de 70,7 milhões de toneladas de soja. A produtividade média da soja brasileira é de 2819 kg/ha, chegando a alcançar cerca de 3136 kg/ha no estado de Mato Grosso, o maior produtor brasileiro de soja. As boas condições climáticas aliadas ao alto nível tecnológico foram os principais responsáveis pelo aumento de produção, quando comparada com a safra 2006/07. Esta leguminosa é cultivada em quase toda a extensão do Brasil, com maiores áreas de cultivo e de produção, em ordem decrescente, nas regiões Centro-Oeste, Sul e Sudeste. Mais recentemente houve expansão de seu cultivo para as regiões Norte e principalmente para o Nordeste. Tal fato é decorrente do sucesso produtivo e adaptativo as cultivares melhorados, visando diversos aspectos da cultura (EMBRAPA SOJA, 2001; CONAB, 2008).

Considerando que o aumento da produção e a expansão da cultura são devidos, principalmente, ao melhoramento genético, pelo desenvolvimento de cultivares adaptadas às condições brasileiras, fica fácil notar a responsabilidade dos programas de melhoramento para futuros ganhos de produtividade e qualidade (KIIHL & ALMEIDA, 2000).

Atualmente, a ocorrência de doenças merece grande atenção dos melhoristas em função das grandes perdas de produção que estas ocasionam, além dos danos na qualidade do produto e na contaminação de áreas importantes de cultivo, em se tratando de doenças que sobrevivem em restos culturais. Entre as doenças de importância para a cultura da soja, pode-se citar o oídio, que, na safra 1996/97 provocou perdas entre 30 e 40% na produção de vários cultivares, e desde então está entre as principais doenças da cultura. Esta doença possui dispersão facilitada pelo vento, sendo que a existência de cultivares com resistência genética ao oídio forneceria maior segurança e, conseqüentemente, menores riscos de cultivo para os produtores de soja (EMBRAPA, 1998). O perigo potencial representado por esta doença para a cultura da soja, justifica estudos que permitam conhecer a epidemiologia do patógeno no Brasil.

O processo de seleção de genótipos resistentes pelas técnicas convencionais é relativamente demorado e de execução laboriosa, além de não possuir muita garantia devido à dependência de condições ambientais adequadas. Técnicas biotecnológicas, como os marcadores moleculares são de grande utilidade, principalmente no processo de caracterização e seleção de genótipos resistentes. Além disso, a seleção assistida por marcadores moleculares é rápida e segura, sendo na atualidade, de fundamental importância para o processo de desenvolvimento de novos cultivares.

Para o desenvolvimento de genótipos resistentes ao oídio e obtenção de melhores resultados no processo seletivo, faz-se necessário o conhecimento prévio do mecanismo de resistência atuante na herança do caráter, o qual pode ser realizado através do estudo de populações segregantes oriundas de parentais contrastantes para a reação de resistência à doença.

Assim, o objetivo do presente trabalho foi identificar marcadores moleculares microssatélites polimórficos e discriminativos para a reação de resistência ao oídio em soja. Tais marcadores serão utilizados no processo de seleção assistida visando identificar genótipos resistentes e suscetíveis ao patógeno em populações segregantes pertencentes a programas de melhoramento de soja. Como este tipo de

marcador molecular permite intercâmbio, os resultados poderão auxiliar programas de melhoramento de soja de várias instituições de pesquisa diferentes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Oídio da soja

Oídios são doenças de plantas causadas por fungos altamente evoluídos, sendo todos parasitas obrigatórios. Eles se situam entre os principais fitopatógenos, ocorrendo em todas as regiões do globo e na maioria das espécies vegetais cultivadas. Embora raramente causem a morte da planta, eles exaurem as suas reservas nutricionais, que poderiam ser utilizadas para fins produtivos. Além de diminuir drasticamente o potencial produtivo das plantas, os oídios podem afetar a qualidade do produto colhido (STADNICK & RIVERA, 2001).

O oídio da soja, causado pelo fungo *Erysiphe diffusa* (Cooke & Peck) U. Braun & S.Takamatsu, é uma das doenças mais antigas desta leguminosa. É de distribuição mundial, estando presente em todos os países produtores. Essa doença foi inicialmente relatada na Alemanha em 1921 (GRAU, 1985). Nos Estados Unidos foi relatado pela primeira vez em 1931 (LEHMAN, 1931), desde então, foi também observado no Brasil, Canadá, China, Índia, Porto Rico, África do Sul e Estados Unidos (SINCLAIR, 1999).

O oídio foi inicialmente identificado em plantas de soja em casa-de-vegetação e em condições de campo, em final de ciclo, sem causar danos significativos. Somente após vários anos é que a doença passou a causar redução de rendimento. Nos Estados Unidos, após o primeiro registro da doença em casa-de-vegetação na Carolina do Norte, em 1931 (LEHMAN, 1931), a constatação em campo só ocorreu em 1945 (LEHMAN, 1947).

No Brasil, até a safra de 1995/96, o oídio era considerado uma doença sem importância econômica na soja. Era observada principalmente em casa-de-vegetação e em campo, apenas em cultivares tardias, ao final da safra (final de abril/maio) na Região Sul, e nas regiões altas dos Cerrados, em altitudes acima de 800 metros e em cultivos de inverno sob irrigação com pivô central (TANAKA et al., 1993; GAZZONI & YORINORI, 1995; YORINORI, 1997; TANAKA et al, 1999). De acordo com LOHNES & BERNARD (1992), o oídio é muitas vezes uma doença preocupante em condições de casa-de-vegetação, pois é talvez o único patógeno incidente em folhas que pode ser disseminado e infectar plantas nestas condições.

O oídio ocorreu de forma generalizada e surpreendente na safra 1996/97, favorecida por um clima chuvoso e temperaturas amenas. A epidemia atingiu as cultivares suscetíveis, envolvendo todas as áreas de produção de soja dos cerrados do Brasil central ao Rio Grande do Sul. As perdas médias estimadas variaram de 15 a 20 % com extremos variando de 50 a 60% (YORINORI & HIROMOTO, 1998).

Os relatos na identificação do fungo causador do oídio na soja consistem em informações às vezes discordantes na literatura. Os primeiros relatos desta doença citam *Erysiphe polygoni* DC; entretanto relatos posteriores identificam como *Microsphaera diffusa* como o patógeno causador (JOHNSON & CHAMBERLAIN, 1954; DEMSKI & PHILLIPS, 1974; PAXTON & ROGERS, 1974). Através de realização de análise filogenética molecular de estrutura miceliana encontrada sobre a superfície foliar de soja propôs-se uma nova classificação do agente causal do oídio da soja. Os resultados da análise concluíram que trata-se de *Erysiphe* em [*Glycine max* (L) Merrill], sendo o estágio perfeito provavelmente de *E. diffusa* (Sinônimo, *Microsphaera diffusa*) (TAKAMATSU et al., 1998).

O fungo *Erysiphe diffusa* é um parasita obrigatório que se desenvolve na parte aérea da soja, incluindo folhas, hastes, pecíolos e raramente nas vagens. Os sintomas apresentados pelo oídio podem variar de clorose, manchas ferruginosas, ilhas verdes, desfolha acentuada ou combinação destes sintomas, dependendo da reação das cultivares. Todavia, o mais evidente é a própria estrutura branca e pulverulenta do fungo sob a superfície das partes infectadas. Com o passar dos dias

podem evoluir de pequenos pontos brancos, para a cobertura total das partes infectadas. Nas folhas, a coloração branca do fungo pode se alterar para castanho-acinzentada. Em condições de infecção severa, a cobertura do micélio e a frutificação do fungo, impedem a fotossíntese e as folhas então secam e caem precocemente. Em cultivares altamente suscetíveis, as hastes podem sofrer rachaduras e cicatrizes superficiais. A doença pode incidir em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, sendo mais visível no início da floração. Quanto mais cedo as incidências, maiores os danos provocados sobre o rendimento (EMBRAPA, 1998). A antecipação da desfolha afeta o rendimento, reduzindo o tamanho e o peso dos grãos.

O fungo é um Ascomiceto da ordem Erysiphales, família Erysiphaceae. É um fungo biotrófico obrigatório de plantas, que para obtenção de nutrientes formam haustórios no interior das células do hospedeiro, sem, no entanto matá-las. O conídio (esporo assexual) ou o ascósporo (esporo sexual) do fungo, em contato com a superfície foliar, germina dentro de seis horas após a inoculação e produz uma teia de micélio (conjunto de hifas) que se espalha pela superfície da planta. As hifas penetram nas células epidérmicas e, por meio dos haustórios intracelulares, nutre-se do conteúdo das células (ALMEIDA et al., 1997; YORINORI, 1997).

O desenvolvimento da doença é favorecido por temperaturas em torno de 20°C (MCGEE, 1992), média a alta umidade relativa do ar (50-90%), baixa incidência e intensidade de precipitação e quando as plantas encontram-se entre os estágios R1 (início da floração) e R6 (formação completa de sementes). Cada ciclo desta doença, sob condições favoráveis à mesma, dura cerca de sete a dez dias (PICININI & FERNANDES, 1998). No campo, existem evidências de que o desenvolvimento da doença é mais rápido quando a temperatura do ar é inferior a 30°C, quando a soja se encontra nos estágios de desenvolvimento entre início da floração e pleno enchimento das vagens (GRAU & LAURENCE, 1975, LEATH & CARROL, 1982).

Estudos sobre o efeito da temperatura no desenvolvimento do oídio realizados em casa-de-vegetação a 18, 24 e 30°C, indicaram que quanto mais baixa a temperatura, mais rápido e severo foi o desenvolvimento do oídio. A temperatura

mais favorável foi 18°C, sob o qual, as reações de resistência e suscetibilidade entre cultivares podem ser distinguidas aos sete dias da inoculação (MIGNUCCI et al., 1977).

A disseminação da doença ocorre principalmente pelo vento, o qual lança os conídios a grandes distâncias. Além do vento, os respingos de água espalham os conídios para plantas vizinhas. Quando ocorre formação de um filme de água na superfície foliar não há germinação dos conídios, embora os mesmos necessitem de um alto teor de umidade relativa do ar, ou seja, cerca de 95% (BEDENDO, 1995).

O desenvolvimento da doença pode apresentar diferenças no nível de infecção de oídio, em diferentes estádios de desenvolvimento da planta. No geral, o fungo se desenvolve mais em folhas que se encontram nos primeiros estádios de desenvolvimento. Sabe-se que, tanto o patógeno quanto o aparecimento dos sintomas são influenciados pela cultivar, posição da folha e idade da planta no momento da inoculação da doença (MIGNUCCI & LIM, 1980).

O método mais eficiente e econômico de controle da doença é o uso de cultivares resistentes, principalmente em épocas mais favoráveis à sua ocorrência. As informações sobre as reações das cultivares recomendadas para cultivo comercial no Brasil são atualizadas e publicadas anualmente (YORINORI, 1997; EMBRAPA, 2000).

2.1.1. Herança da Resistência a Doença

O emprego de resistência genética no controle de doenças de plantas representa um dos mais significativos avanços tecnológicos da agricultura. A utilização de cultivares resistentes é o melhor método de controle, por ser o mais econômico e o de mais fácil utilização (MASCARENHAS & ITO, 1998).

Em condições de campo, pode-se observar basicamente, três tipos de reações ao oídio: suscetibilidade, resistência de planta adulta e resistência completa.

Cultivares de resistência de planta adulta podem apresentar níveis de suscetibilidade nos primeiros dois trifólios, quando inoculadas em casa-de-vegetação, porém não são infectadas em condições de campo (DUNLEAVY, 1978; MIGNICCI & LIM, 1980; LOHNES & BERNARD, 1992). A reação de resistência de planta adulta é controlada por um par de genes (*Rmd* e *rmd*), onde o alelo dominante *Rmd* atua na resistência de planta adulta e o alelo *rmd* confere suscetibilidade (MIGNUCCI & LIM, 1980). A resistência completa é controlada por um gene dominante *Rmd-c*, alélico aos genes que conferem resistência de planta adulta (*Rmd*) e suscetibilidade (*rmd*).

Em estudo para determinação da herança da resistência ao oídio, GRAU & LAURENCE (1975) relataram que o controle é realizado por apenas um gene e também observaram que existiam dois tipos de cultivares: os resistentes (cultivar Chippewa 64) e os altamente resistentes (cultivar Wilkin). Em estudos de resistência de plantas ao oídio, Gonçalves et al. (2002) verificaram uma herança monogênica dominante para este caráter, além de observar que os indivíduos apresentaram “resistência de planta adulta”. Em seguida, DUNLEAVY (1977) observou em casa-de-vegetação e campo que, alguns cultivares suscetíveis ao oídio em casa-de-vegetação passavam a ser resistente no campo, ao passo que outras eram suscetíveis em ambos os locais. Por outro lado, todas as cultivares resistentes em casa-de-vegetação, também eram resistentes no campo. Em estudo realizado por BUZZEL & HAAS (1978), observou-se segregação nos cruzamentos de plantas da cultivar resistente Blackhawk com as cultivares suscetíveis Harosoy 63 e PI 65.388, propondo-se o símbolo do alelo dominante (*Rmd*) como resistência das plantas adultas e o alelo recessivo (*rmd*) como suscetibilidade.

De modo a observar o comportamento em plantas jovens e adultas em casa-de-vegetação e campo, LOHNES & BERNARD (1992) sugeriram a existência de um terceiro alelo (*Rmd-c*) no mesmo loco, condicionando a resistência ao oídio no estágio de plântula. Trabalhando com onze cultivares isolinhas para os três alelos (*Rmd*, *Rmd-c* e *rmd*) em condições de epidemia desta doença, LOHNES & NICKELL (1994) encontraram que, as isolinhas com alelos *Rmd* e *Rmd-c* produziam 18% a mais que as *rmd*, em condições de incidência de oídio. As isolinhas *Rmd-c*,

produziram 7% a mais que as *Rmd*. Como o gene *Rmd-c* é de fácil seleção em casa-de-vegetação e encontra-se em acoplamento com o gene de resistência à podridão de *Phytophthora* (*Rps2*), que é de difícil seleção, sugere-se a utilização do gene *Rmd-c* como marcador genético para a obtenção de linhagens com o gene *Rps2*.

Existe indicação de que este mesmo gene, *Rmd*, esteja ligado ao mesmo loco do gene que confere resistência à podridão parda da haste de soja (*Phytophthora gregata*), sendo, portanto, recomendado que estes genes sejam utilizados como genes marcadores em programas de melhoramento genético de soja para resistência a essas doenças (LOHNES & NICKELL, 1994).

Estudos realizados por UNÊDA-TREVISOLI et al. (2002), para a determinação da herança de resistência ao oídio em populações segregantes de soja, indicaram também que o controle da doença é governado por um gene dominante, com dois alelos.

2.2. Seleção de genótipos resistentes a doenças

Em todo programa de melhoramento, o processo seletivo é de fundamental importância, pois nele se baseará o sucesso do programa elaborado. As técnicas para seleção dos genótipos variam de acordo com a incidência, disseminação, estrutura e morfologia do patógeno. As avaliações do oídio são mais comuns em casa-de-vegetação ou câmaras úmidas, onde uma suspensão de conídios é pulverizada sobre as plantas (YORINORI, 1997).

Conforme citado, a metodologia requer muito trabalho e mão de obra, necessita de condições ambientais adequadas para o patógeno, além das desvantagens quanto à precisão. Sendo assim, outras metodologias podem ser utilizadas, visando a melhor eficiência do processo seletivo.

2.2.1. Seleção assistida por marcadores moleculares

A seleção de genótipos superiores com o auxílio dos marcadores moleculares representa a perfeita associação entre o melhoramento convencional e as modernas técnicas de biologia molecular disponíveis atualmente (FRONZA, 2003).

A seleção de genótipos por marcadores moleculares tem sido bastante utilizada em várias culturas, sendo que FEDERIZZI (1998) enfatiza que esta é possivelmente a área que possui maior impacto dentro dos programas de melhoramento, pela sua utilização na identificação de genótipos superiores em populações segregantes.

Atualmente, vários programas de melhoramento têm utilizado as técnicas moleculares visando à seleção assistida por marcadores (ALZATE-MARIN et al., 2003; BENCHIMOL et al., 2003; MALUF et al., 2008;).

Um dos primeiros trabalhos sobre seleção assistida por marcadores foi feito por STUBER et al. (1982), com a utilização de oito locos isoenzimáticos em uma população melhorada de milho. Verificou-se que a seleção baseada nesses locos possibilitou o aumento tanto da produtividade de grãos como no número de espigas. No entanto, não houve como saber se as alterações nessas características se deveram a ligações com poligenes ou à participação dessas aloenzimas em suas rotas metabólicas.

Uma das características mais bem estabelecidas no momento é a resistência da soja ao nematóide de cisto (NCS). Os principais QTLs que controlam a característica estão mapeados (CONCIBIDO et al., 1996; SCHUSTER et al., 2001), e a seleção assistida, neste caso, é extremamente eficiente.

A seleção de plantas resistentes assistidas por marcadores moleculares pode eliminar certos aspectos indesejáveis da seleção puramente fenotípica, melhorando a eficiência do processo uma vez que os marcadores não são influenciados pelo ambiente e são transmitidos mendelianamente. Com o auxílio dos marcadores

moleculares, a seleção pode ser feita precocemente, diminuindo os custos em geral de um processo de seleção fenotípica.

Existem vários tipos de marcadores moleculares disponíveis para estudo genéticos, sendo que os mais utilizados são as isoenzimas, o RFLP, o RAPD, o AFLP e os microssatélites (SSR).

As vantagens da seleção assistida por marcadores moleculares (SMM) foram analisadas por LEE (1995). Ele considerou que devem ser avaliados o custo e o tempo para o desenvolvimento de cultivares e para a seleção dos caracteres de interesse. O autor ressaltou que o uso dos marcadores moleculares será vantajoso quando o loco de resistência e o marcador estiverem fortemente ligados e ainda quando forem usadas as primeiras gerações de segregação para evitar a erosão da ligação entre o loco e a marca.

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

O sucesso da SMM depende do grau de associação entre o marcador e a característica de interesse: quanto maior, menor a chance de ocorrer recombinação entre o marcador e o gene que controla a característica, sendo maior a eficiência da seleção.

A seleção fenotípica das espécies domesticadas tem sido praticada consciente ou inconscientemente por milênios, porém os avanços da genética molecular prometem aumentar a eficiência das técnicas de melhoramento até então utilizadas. Por isso, existem muitas razões para se acreditar que a genética molecular não irá substituir os programas de melhoramento convencionais, mas sim

integrar-se a eles, para que se possa obter o máximo de ganho, de forma econômica e racional (LANDE e THOMPSON, 1990).

2.2.2. Marcadores moleculares microssatélites

Na década de 50, com a descoberta de que as formas alélicas de enzimas podiam ser separadas por eletroforese, iniciou-se a era dos marcadores moleculares na genética. Já na década de 80, os marcadores baseados em DNA, como RFLP e RAPD, passaram a ser utilizados. Os marcadores moleculares, em comparação com os morfológicos, têm as vantagens de serem fenotipicamente neutros, polimórficos, abundantes e alguns deles apresentarem herança codominante (TANKSLEY, 1993).

Os marcadores microssatélites foram primeiramente desenvolvidos em humanos (LITT & LUTY, 1989) e logo receberam a atenção dos melhoristas e geneticistas de plantas, pois vários estudos demonstraram que os microssatélites são amplamente distribuídos no genoma das espécies (BRUNEL, 1994).

Em genomas de eucariotos, estas seqüências simples são muito freqüentes, distribuídas ao acaso além de constituírem locos genéticos altamente polimórficos (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995). Em drosófilas, 30% do genoma é formado por este tipo de seqüência; no arroz, 50%; e no tabaco chega a 70% (LEWIN, 2001).

Marcadores moleculares SSRs têm sido amplamente utilizados para seleção assistida de genótipos de soja em programas de melhoramento genético conduzidos nos Estados Unidos e também no Brasil. Os microssatélites tem sido utilizados em soja para mapeamento de genes específicos que determinam características agrônômicas e, também, para identificação de QTLs (*Quantitative Trait Loci*) de importância econômica, envolvidos na produtividade de grãos e na resistência genética a pragas e doenças, que são características de herança complexa (YUAN, 2002).

O DNA microssatélite também conhecido como *Simple Sequence Repeat* (SSR), consiste de pequenas seqüências de DNA com um a quatro nucleotídeos de comprimento, repetidas em *tandem*. De acordo com BRONDANI et al. (1998), os microssatélites são muito atrativos aos melhoristas vegetais, pois eles combinam várias vantagens, como: 1) natureza codominante e multialélica; 2) por serem altamente polimórficos, permitem discriminações precisas, mesmo de indivíduos altamente relacionados; 3) são abundantes e uniformemente dispersos em todo o genoma de plantas; 4) podem ser eficientemente analisados por PCR (*Polimerase Chain Reaction*); 5) a informação do marcador, baseada nas seqüências dos iniciadores, pode ser facilmente publicada e trocada entre laboratórios melhorando os esforços cooperativos em pesquisa e desenvolvimento.

As seqüências de DNA que flanqueiam os SSRs são geralmente conservadas dentro de uma mesma espécie, permitindo a seleção de iniciadores específicos que amplificam via PCR, fragmentos contendo o DNA repetitivo em todos os genótipos. Quando os microssatélites são individualmente amplificados, utilizando o par de iniciadores complementar às seqüências únicas que os flanqueiam, eles apresentam extensivo polimorfismo para tamanho. Esta variação de tamanho dos produtos de PCR é consequência da ocorrência de diferentes números de unidades repetitivas dentro da estrutura do microssatélite (MORGANTE & OLIVIERI, 1993; MCCOUCH et al., 1997; CREGAN et al., 1999; ASHKENAZI et al, 2001). Desse modo, vários alelos podem ser determinados para uma determinada população. Indivíduos homozigóticos possuem o mesmo número de repetições nos cromossomos homólogos, enquanto os indivíduos heterozigóticos possuem número de repetições diferentes nos dois homólogos. Portanto, o loco é definido pelo par de iniciadores e os vários alelos, pelo tamanho das bandas amplificadas.

A detecção das seqüências amplificadas é feita em gel de poliacrilamida ou agarose de alta resolução e separadas por eletroforese. É necessário utilizar géis adequados para a separação dos fragmentos, pois esses se diferem em poucos pares de bases, dependendo do número de nucleotídeos repetidos. A visualização das bandas no gel pode ser feita diretamente por coloração com brometo de etídeo,

usando tratamento com prata ou também por auto-radiografia, quando se utilizam iniciadores marcados com radioisótopos na reação de PCR. Cada loco de microssatélite pode ser analisado individualmente ou mais de um loco pode ser analisado de cada vez. Isso ocorre quando os alelos de cada loco apresentam tamanhos suficientemente diferentes para migrarem em zonas separadas no gel (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998; LANZA et al., 2000).

Os SSRs são muito freqüentes e distribuídos ao acaso ao longo do genoma, permitindo a cobertura completa dos cromossomos de uma dada espécie. Além do seu emprego para mapeamento de genomas, os microssatélites são ideais para a identificação e discriminação de genótipos e para estudos de genética de populações.

Em soja, vários grupos de pesquisadores estão desenvolvendo marcadores e mapas genéticos baseados em SSR. Isto se deve não somente à grande expressão e valor comercial da cultura no mundo, mas também aos baixos níveis de diversidade genética ao nível de DNA no germoplasma cultivado, o que tem tornado difícil a construção de mapas genéticos baseados em RFLP (KEIM et al., 1990) ou mesmo RAPD (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

A maior limitação do uso de microssatélites é o desenvolvimento dos marcadores, pois trata-se de procedimento muito trabalhoso que exige uma equipe especializada, além de equipamentos para o seqüenciamento, tornando o desenvolvimento dos marcadores SSR um empreendimento de elevado custo (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

2.2.3.Técnica de BSA (Bulked Segregant Analysis)

Existem muitos procedimentos estatísticos para determinar se um gene está ligado a um loco marcador. A metodologia conhecida como BSA - Bulked Segregant Analysis (ARNHEIM et al., 1985; MICHELMORE et al., 1991), ou análise de bulks

segregantes, normalmente utilizada para detecção de genes que controlam características de herança mendeliana simples, é considerada o processo mais direto de detecção de um marcador associado a um loco de interesse.

Para caracteres qualitativos é comum o uso da técnica de BSA. Nessa técnica, indivíduos contrastantes para a característica de interesse, pertencentes a uma população segregante (geralmente uma F_2), são agrupados em dois *bulks* diferentes, onde o DNA é analisado quanto à presença de polimorfismos. O agrupamento dos indivíduos, teoricamente, iguala o “background” genético dos dois bulks, com exceção daqueles locos envolvidos com o caráter de interesse e, os marcadores a eles associados. Logo, um eventual polimorfismo entre os dois bulks tem uma forte probabilidade de estar associado ao(s) alelo(s) que governa(m) o caráter de interesse (ALZATE-MARIN et al., 2005).

3. MATERIAL E MÉTODOS

No presente estudo foram executadas atividades em laboratório que consistiram na seleção de marcadores moleculares microssatélites que apresentem polimorfismo para a resistência ao oídio. Os experimentos desta etapa foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Melhoramento de Plantas do Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP – Campus de Jaboticabal/SP. As atividades realizadas em campo, casa de vegetação e bancada para aquisição das amostras foliares utilizadas nas análises moleculares, foram descritas para um maior entendimento de todo o processo. Esta etapa foi conduzida nas áreas experimentais do Departamento de Produção Vegetal.

3.1. Material Genético

O material genético utilizado neste estudo foram populações F_2 derivadas de dois cruzamentos entre parentais contrastantes quanto à resistência ao oídio. Para o cruzamento 1 foram utilizados os cultivares MGBR 95-20937 (R) x IAC-Foscarin-31 (S), e para o cruzamento 2 foram utilizados os cultivares MG/BR 46 Conquista (R) x EMBRAPA 48 (S). Estes genótipos foram hibridizados em condições de casa de vegetação do Departamento de Produção Vegetal.

As fontes de resistência envolvidas na genealogia do cultivar MG/BR 46 Conquista são o cruzamento entre Lo76-4484 e "Numbaráí", Lo76-4484 é uma seleção em "Bragg", que apresenta maturação tardia; a cultivar "Numbaráí" resultou da hibridação entre "Davis" e IAC71- 1113. E para o cultivar MGBR 95-20937 são os cruzamentos [Forrest x (Lancer x BR80-6989)] x 92K10R/11.

3.2. Atividades em campo e bancada

3.2.1. Plantio de populações F_1

As sementes F_1 obtidas foram semeadas em copinhos descartáveis com substrato contendo terra e vermiculita na proporção de 1:1, semeando-se apenas uma semente por copo. Depois da germinação e emissão do segundo trifolíolo, as plantas jovens foram transplantadas para o campo, sendo dispostas em covas, num espaçamento de 0,1 m entre plantas e 0,5 m entre linhas para posterior colheita das sementes F_2 . Quando atingida a maturidade, todas as plantas foram colhidas individualmente, sendo agrupadas por cruzamento, compondo as populações de geração F_2 .

3.2.2. Avaliação de populações F₂

As sementes de geração F₂ foram plantadas em vasos plásticos com capacidade de 5L, contendo solo devidamente preparado, entre os meses de março a maio para infecção natural do patógeno e para classificação das plantas quanto à sua reação em resistente ou suscetível ao oídio, de acordo com a escala de YORINORI (1997) presente na Tabela 1, dessa forma permitindo a formação dos bulks resistente e suscetível.

Para melhor adaptação ambiental, os vasos foram dispostos em bancadas ao ar livre, sendo intercalados aos vasos de plantas segregantes, alguns vasos de cultivares conhecidamente suscetíveis, como FT-Estrela, de modo a fornecer inóculo e favorecer o aparecimento do fungo no local e conseqüentemente, ocorrer a disseminação dos esporos do fungo através do vento, garantindo uma fonte de inóculo suficiente para as progênies segregantes. Estes vasos de FT-Estrela também foram observados nas avaliações, como padrão de suscetibilidade, para uma melhor classificação da reação de resistência.

O plantio deste ensaio foi realizado nestes meses do ano, em virtude de ser uma época propícia à incidência do fungo causador do oídio em soja. Além disso, a falta de ocorrência de chuvas no período, permitiu uma classificação mais segura. A incidência de chuvas freqüentes, como as que ocorrem nos meses de novembro e dezembro, que são a época mais favorável para plantio de soja, devido ao favorecimento de fotoperíodo, possuem o inconveniente de “lavarem” os esporos das folhas, fazendo com que plantas suscetíveis sejam classificadas como resistentes ou moderadamente resistentes, prejudicando a análise correta das populações.

De acordo com estes resultados, foi formulada uma hipótese de segregação, sendo a mesma testada para o estudo da herança da resistência ao oídio.

Tabela 1. Escala de notas e sintomas atribuídos quanto à reação ao oídio (Yorinori, 1997).

Nota	Sintoma	Classificação¹
0	Sem sintoma	AR
1	Traços a 10% da área foliar infectada	R
2	11 a 25% da área foliar infectada	MR
3	26 a 50% da área foliar infectada	MR
4	51 a 75% da área foliar infectada	MS
5	Mais de 76% da área foliar infectada	S

¹AR: Altamente Resistente; R: Resistente; MR: Moderadamente Resistente; MS: Moderadamente Suscetível; S: Suscetível.

3.3. Coleta das amostras foliares

As amostras foliares jovens foram coletadas nos vasos de plantas F₂, antes de surgirem os sintomas, quando estas apresentavam o segundo par de folhas trifolioladas desenvolvidas, com coleta de um ou dois folíolos jovens, correspondendo ao estágio V₂ de FEHR & CAVINESS (1977). No cruzamento 1 foram avaliadas 73 plantas, enquanto que no cruzamento 2 foram avaliadas 70 plantas. A diferença do número de plantas dentro de cada cruzamento foi devido à perda de amostras durante as etapas experimentais e de análises moleculares. A seguir, as folhas coletadas foram dispostas em microtubos de 1,5mL, etiquetadas e armazenadas em ultrafreezer a -80° C até o momento da extração de DNA. Após a coleta dos trifólios, procedeu-se à extração do DNA genômico de todos os indivíduos, descrito no item 3.4.1.

3.4. Atividades em Laboratório

3.4.1.Extração de DNA genômico

O protocolo de extração utilizado encontra-se descrito em FERREIRA & GRATTAPAGLIA (1995), sendo conhecido como método CTAB (Brometo de cetiltrimetilamônio). Este procedimento possui similaridades com o descrito por DOYLE & DOYLE (1987).

Para o tampão de extração, que foi preparado antes de iniciar a maceração, pesa-se 2,0 g de CTAB (2%) e 8,12 g de NaCl. A estes adiciona-se 4mL de uma solução 0,5M EDTA e 10 mL de uma solução Tris-HCl pH 8,0. Completou-se o volume para 100 mL com água Milli-Q. Colocou-se esta solução no agitador, para completa dissolução dos componentes, aquecendo a mesma a cerca de 45° C. Após completa dissolução, certificou-se novamente do volume, se necessário, ajustando-se novamente o mesmo para 100 mL com água Milli-Q. Em capela de exaustão, acrescentou-se 2 µL de 2-Mercapto-etanol para cada mililitro de tampão de extração. O ideal é manter o tampão de extração aquecido até a sua utilização junto ao tecido macerado.

As extrações de DNA ocorrem diretamente nos microtubos de 1,5 mL, no qual foram dispostas amostras de tecido foliar de cerca de 1g para maceração com nitrogênio líquido. Como as amostras utilizadas foram coletadas e congeladas, no momento da extração observou-se a quantidade de folhas e caso fosse necessário, seria preparado outro microtubo com a mesma identificação, retirando-se apenas uma amostra do que foi coletado para melhor adequação ao processo de maceração, arrumando-se as folhas contra a parede do microtubo, para que o nitrogênio líquido possa percorrer toda a sua extensão. Após a folha disposta no

ependorf, adicionou-se nitrogênio líquido em quantidade suficiente para encher o tubo. Esperou-se até que o tecido estivesse totalmente congelado, com textura “crocante” e então iniciou-se a maceração com bastão de vidro com a ponta lapidada, até que o tecido ficasse em condição de pó fino.

Ao tecido recém macerado, adicionou-se 700 µL de tampão de extração CTAB, ressuspensando o tecido neste tampão. A seguir, os microtubos foram incubados em banho-maria a 65° C entre 30 minutos e uma hora. Durante esta incubação, os tubos foram agitados em intervalos de 10 minutos para homogeneização da suspensão. Os tubos eram então retirados do banho-maria e esfriados em capela de exaustão. Neste local, foi realizada a primeira extração com solvente orgânico pela adição de 600 µL de CIA (clorofórmio-álcool isoamílico 24:1). Os tubos foram agitados por 5 minutos, invertendo-se no mínimo 20 vezes, ou até se formar uma emulsão homogênea.

As fases eram separadas por centrifugação em microcentrífuga, a velocidade de 12000 a 15000 rpm, durante 5 minutos. Logo após, os tubos foram retirados cuidadosamente da microcentrífuga, evitando perturbar a interface entre as duas fases formadas. A seguir, a fase aquosa (superior) foi pipetada em cerca de três alíquotas de 180 µL e disposta em novo tubo. Este procedimento, ajudou a evitar possíveis contaminações com a fase orgânica inferior. Ao novo tubo, foi adicionado isopropanol frio (-20° C) na proporção de 2/3 do volume da solução aquosa, perfazendo um volume de cerca de 400 µL. A mistura era delicadamente agitada para precipitação dos ácidos nucléicos. Foi então formado um sedimentado (“pellet”) de DNA, sendo essa precipitação imediata. Caso o precipitado não seja visível, coloca-se o tubo a -20° C por 30 minutos ou até o próximo dia, se não for possível a continuidade do processo naquele momento. A seguir, os tubos foram novamente centrifugados em microcentrífuga (6000 a 7500 rpm) durante 3 a 5 minutos.

Neste momento, com o sedimentado já formado, descartou-se o sobrenadante e em seguida, este sedimento foi lavado por duas vezes com 1 mL de etanol 70%, deixando-o imerso por 5 a 10 minutos em cada lavagem. O sedimento geralmente

fica mais branco nesta fase da extração. Em seguida, nova lavagem foi realizada com 1 mL de etanol absoluto, por 2 a 3 minutos, sendo que o sobrenadante foi novamente dispensado. Nesta fase, foi preciso retirar o máximo possível do etanol, sendo necessário muitas vezes a utilização de micropipeta e ainda a secagem ao ar em fluxo laminar. Após a secagem, o sedimento foi então ressuscitado em 100 µL de Tampão TE (10mM Tris pH 8,0 + 1mM EDTA), contendo 10µg/mL de RNase. Foi feita então a incubação a 37° C em banho-maria, por 30-60 minutos para a digestão do RNA, e purificação do DNA.

A seguir, foi realizada a quantificação do DNA extraído em aparelho Biofotômetro Eppendorf, verificando-se a quantidade de DNA presente na amostra, assim como a sua qualidade, obtida pela relação entre as leituras a 260 e 280nm, com DNA de boa qualidade indicado pelos valores de 1,8 a 2,0 (SAMBROOK et al., 1998). Posteriormente à quantificação, uma alíquota das amostras de DNA foi diluída para a concentração de 30 ng/µL, sendo parte estocada a - 20° C para uso posterior.

3.4.2. Seleção de marcadores microssatélites

Nesta etapa, foram selecionados 10 pares de iniciadores SSRs ou microssatélites localizados a uma distância de até 42 cM ao redor do gene de resistência ao oídio (*Rmd*), localizado no grupo de ligação J (Cregan, 1999). Os SSRs utilizados foram: Sat_366, Satt244, Satt547, Sat_224, Satt431, Sat_395, Satt712, Sat_393, Sat_394, Sat_350. A seqüência dos marcadores foi obtida pelo site <http://www.soybase.com>, como descrito na Tabela 2.

Tabela 2. Listagem de iniciadores SSR testados nas reações de PCR, visando à identificação de polimorfismo para resistência ao oídio em soja.

NOME	SEQUÊNCIA FOWARD (5-->3')	SEQUÊNCIA REVERSE (5-->3')
Sat_366	GCGGCACAAGAACAGAGGA AACTATT	GCGGACATGGTACATCTATA TTACGAGTAT
Satt244	GCGCCCCATATGTTTAAATT ATATGGA	GCGATGGGGATATTTTCTTTA TTATCA
Satt547	GCGCTATCCGATCCATATG TG	TGATTTGCTAGGTAAAATCA
Sat_224	GCGGGGAACAGTTGTTAAC TCAGTCAAAGT	GCGAATGGATCAAGAATCAG TGGTATAATCA
Satt431	GCGTGGCACCCTTGATAAA TAA	GCGCACGAAAGTTTTTCTGTA ACA
Sat_395	GCGTCTTAGTCGTGCTGAC ACTACTC	GCGAGTTTGTGTTAGCTCAATC TTTCACTC
Satt712	GCGAATATAGCCAAATTTAG GTTGAATGACA	GCGACCACCCATCACCTCCA CCTCAAACAAC
Sat_393	GCGGTCTGTCATGTTAATG TTGATT	GCGGGTCCCTACAATGTGAG TGG
Sat_350	GCGTAAGAGCATCTCCAAACC ATCAAACCTCA	GCGATTTATTACATTTAACAATT GTTATTTA
Sat_394	GCGGACAGTGTGCTCCTCA TATAATAG	GCGTGACTCGGACTTGAAGA TAATAATG

A Figura 1 ilustra um esquema representativo da localização dos iniciadores ao longo do cromossomo J e ao redor do gene de resistência.

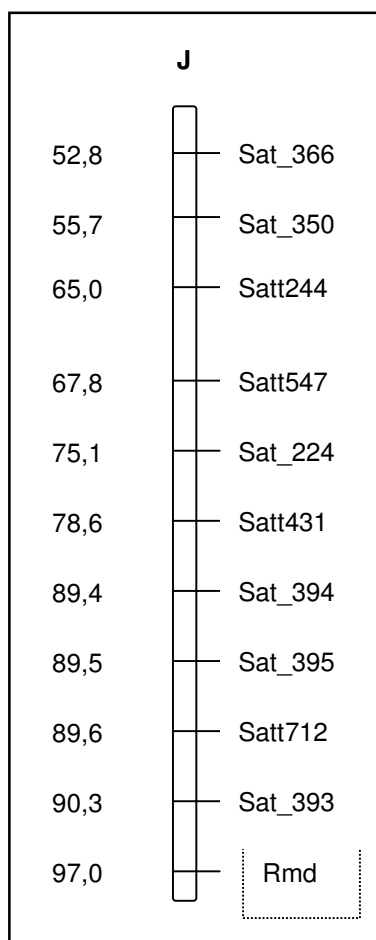


Figura 1. Esquema representativo da posição relativa, de cerca de 42 cM dos 10 marcadores SSRs selecionados do grupo de ligação J.

3.4.3. Amplificação de locos microssatélites e visualização dos fragmentos

Após a quantificação do DNA de cada planta selecionada para compor os bulks, preparou-se uma solução de trabalho de 30 ng/ μ L para cada indivíduo, procedendo-se então às reações de PCR com os marcadores microssatélites, utilizando-se o protocolo, contendo: Tampão PCR 1X (10mM Tris-HCl pH 8,3 e 50 mM KCl); 1,5 mM $MgCl_2$; 0,15 mM de dNTP's; 0,15 pmol do iniciador "Forward" e

“Reverse”; 500 ng de DNA genômico, 1 Unidade de Taq Polimerase e Água Milli-Q autoclavada e filtrada para um volume final de 25 μ L.

Na termociclagem, foi utilizado um aparelho termociclador marca “MJ”, modelo PTC 100, sendo empregado o seguinte programa: 25 segundos a 94°C (desnaturação); 25 segundos a 47°C (anelamento do iniciador); 2 minutos a 68°C (extensão pela Taq Polimerase). Este ciclo foi repetido 40 vezes, finalizando com um passo de 7 minutos a 68°C e por último estabilizando-se a 4°C, até que os microtubos fossem retirados do aparelho. Após a retirada, adicionou-se 3 μ L de tampão de carregamento [5,75mL de glicerol; 2mL de EDTA 0,5M pH 8,0; 0,5mL de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) 20%; 1,75mL de água e 0,01% de azul de bromofenol] antes da aplicação da amostra no gel.

A eletroforese procedeu-se em gel de agarose de alta resolução (agarose 1000) a uma concentração 3% (p/v) para um melhor padrão de diferenciação das bandas, o qual foi corado com brometo de etídeo, na concentração de 10mg/mL, adicionando-se 4,6 μ L para 200mL de gel. A eletroforese procedeu-se a 80V por cerca de duas horas, utilizando-se tampão TAE pH 8,0 (2M de Tris; 1M de Ácido Acético e 100mM de EDTA). A visualização foi feita em luz UV através de transluminador e fotografada pelo sistema Kodak EDAS 290. A amplitude de variação do tamanho de cada banda foi estimada por meio de comparação com o marcador de tamanho 100 pb e também através das ferramentas digitais do Programa Kodak EDAS 290.

3.4.4. Utilização da técnica BSA

Para esta etapa foi utilizada a técnica de BSA (Bulked Segregant Analysis) descrita por MICHELMORE et al. (1991). O objetivo desta etapa foi identificar marcadores polimórficos entre os bulks, que sejam eficientes na discriminação de genótipos resistentes e suscetíveis ao oídio. Dentro de cada cruzamento, foram

feitas as composições dos bulks resistente e suscetível, utilizando-se a avaliação correspondente para cada planta (geração F₂) quanto à reação ao oídio, através da escala de notas de YORINORI (1997). Para a composição dos bulks, foram tomadas dez plantas mais contrastantes, sendo estabelecidas como resistentes somente aquelas com percentuais de infecção de 0-10% da área foliar infectada e como plantas suscetíveis, aquelas com no mínimo 90% da área foliar infectada, devido a certeza destas plantas serem altamente suscetíveis ou resistentes ao oídio. Tal cuidado foi tomado, em virtude das escalas intermediárias poderem prejudicar a perfeita classificação dos dois extremos (resistente e suscetível).

3.5. Análises estatístico-genéticas

Com os valores observados nas avaliações fenotípicas e genotípicas, para as populações F₂ de cada cruzamento, realizou-se o teste de Qui-quadrado (χ^2) para a análise da segregação dos marcadores (1:2:1) e avaliação fenotípica da resistência (3:1), assim como a análise do co-segregação dos mesmos, através do Programa Genes (CRUZ et al., 2001), para a confirmação ou não de segregação independente.

Além destes testes, também foi aplicado o teste de heterogeneidade para os resultados do teste do Qui-quadrado nos cruzamentos, de forma a se testar a consistência dos resultados obtidos. Este teste avalia os desvios encontrados na segregação dos cruzamentos estudados, sendo que, quanto maior o valor da probabilidade obtida no teste de heterogeneidade, maior também é a chance de que os desvios sejam devidos aos fatores de acaso (MATHER, 1957; RAMALHO et al., 2000).

As frequências de recombinação e estimativa das distâncias entre os marcadores identificados e o gene de resistência foram efetuadas pelo Programa GQMOL (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).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação fenotípica

As plantas da geração F₂ foram avaliadas e classificadas quanto à sua reação de resistência ou suscetibilidade ao oídio, de acordo com a escala de YORINORI (1997).

Com as avaliações fenotípicas realizadas, foi testada a hipótese de segregação 3:1 (Resistente:Suscetível) nas duas populações. As plantas que receberam as notas 0, 1, 2 e 3 foram agrupadas no grupo das resistentes e as plantas com notas 4 e 5 foram colocadas no grupo das suscetíveis.

Na Tabela 3 podem ser observados os resultados para as duas populações, onde as mesmas se comportaram conforme o esperado, com probabilidades de aceitação da hipótese de segregação testada de 83,94 e 67,88%, respectivamente. Na mesma Tabela, encontra-se o resultado do teste de heterogeneidade que indica, com uma probabilidade de 66,16%, que os resultados do teste de Qui-quadrado (χ^2) foram consistentes para as duas populações estudadas, confirmando a segregação esperada, com a presença de um gene dominante condicionando a resistência.

Tabela 3. Número de plantas classificadas como resistentes (PR) e suscetíveis (PS) e resultados do teste de χ^2 e de heterogeneidade nos dois cruzamentos avaliados quanto à resistência ao oídio em soja, na geração F₂.

Cruzamentos	PR	PS	GL	χ^2	P ⁽¹⁾
1	54	19	1	0,041 ^{ns}	83,94
2	54	16	1	0,171 ^{ns}	67,88
Total			2	0,212 ^{ns}	89,92
Desvio			1	0,02 ^{ns}	88,48
Heterogeneidade			1	0,191 ^{ns}	66,16

^{ns} = valores não significativos ao nível de 5% de probabilidade. ⁽¹⁾ P = probabilidade (%) obtida no teste de χ^2 .

O controle genético da resistência comportou-se de forma semelhante aos obtidos em trabalhos anteriores que indicam a presença de um gene dominante controlando a resistência ao oídio, podendo ser citados os trabalhos feitos por GONÇALVES et al. (2002), GRAU & LAURENCE (1975), MIGNUCCI & LIM (1980) e UNEDA-TREVISOLI et al. (2002). GONÇALVES et al (2002) e UNEDA-TREVISOLI et al (2002), também utilizaram em seus cruzamentos as cultivares MGBR 95-20937 e MG/BR46 Conquista como fonte de resistência, obtendo resultados semelhantes a este trabalho.

4.2. Avaliações moleculares

Para as análises moleculares, a primeira etapa das reações com os marcadores SSRs foram realizadas com os dez iniciadores. Primeiramente, foram utilizados os DNAs dos parentais resistentes e suscetíveis, de modo a verificar se

eram detectados polimorfismos entre os mesmos, em ambos os cruzamentos. Com isso, os iniciadores Sat_394, Sat_350 e Satt224 não apresentaram polimorfismo para os parentais do cruzamento 1 e os iniciadores Sat_394, Satt547, Sat_244 e Sat_350 não foram polimórficos para o cruzamento 2, sendo desta maneira, excluídos para as etapas posteriores de análise molecular.

Após esta etapa, foram identificados os iniciadores polimórficos entre os bulks resistente e suscetível. Para o cruzamento 1, os iniciadores que se mantiveram polimórficos foram: Sat_366, Satt224, Satt712 e Sat_395; e para o cruzamento 2 foram: Satt431, Sat_393 e Sat_366.

Após esta confirmação, os iniciadores foram testados em toda a população. Estes iniciadores se mantiveram discriminativos na análise da população completa, apresentando suas respectivas marcas, conforme as Figuras 2a e 2b. Este resultado indica que os bulks resistente e suscetível formados a partir da seleção das plantas contrastantes de cada cruzamento foram representativos para toda a população em ambos os cruzamentos.

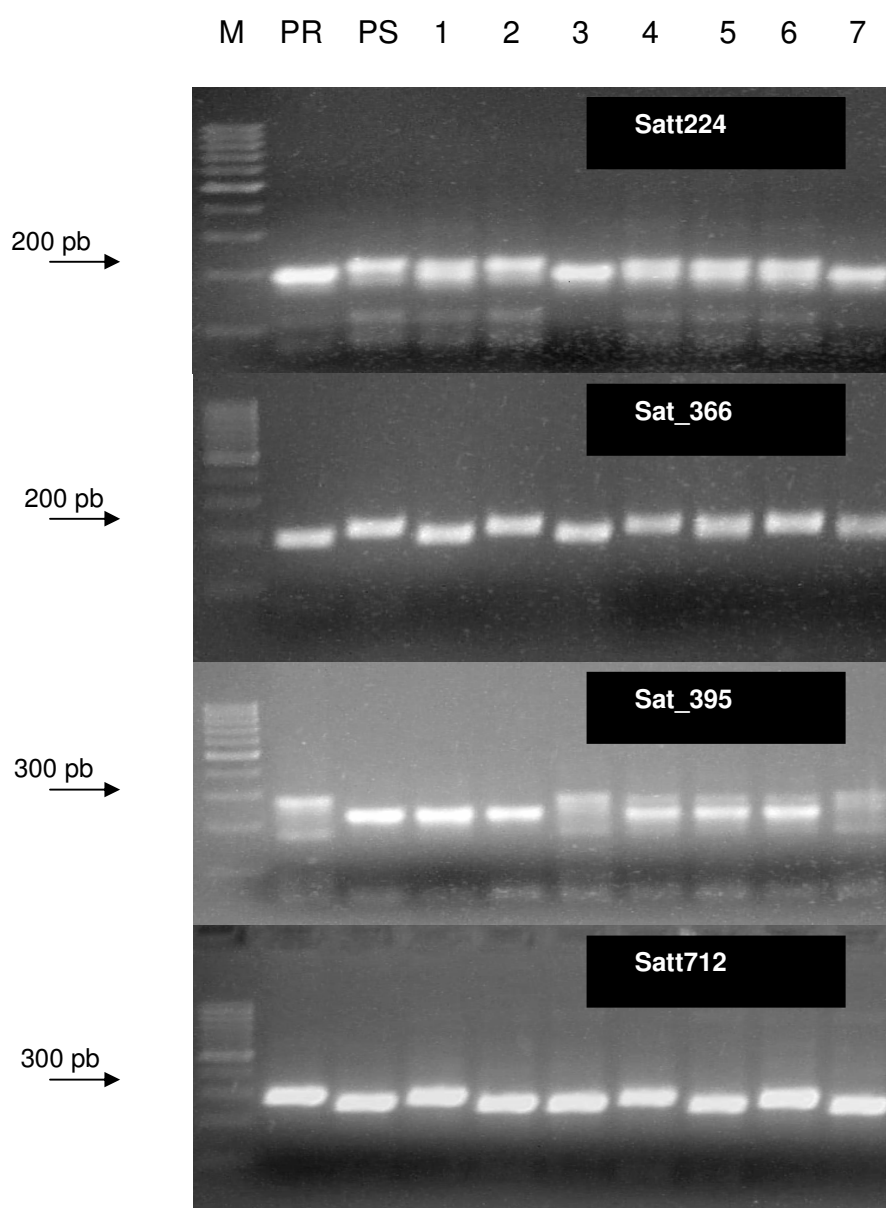


Figura 2a. Marcadores SSRs no cruzamento 1 com fragmentos polimórficos para resistência ao oídio em soja. Na seqüência, encontram-se o marcador de peso molecular (M) e as reações do parental resistente (PR) e do parental suscetível (PS) e algumas plantas do cruzamento numeradas de 1 a 7, para cada marcador.

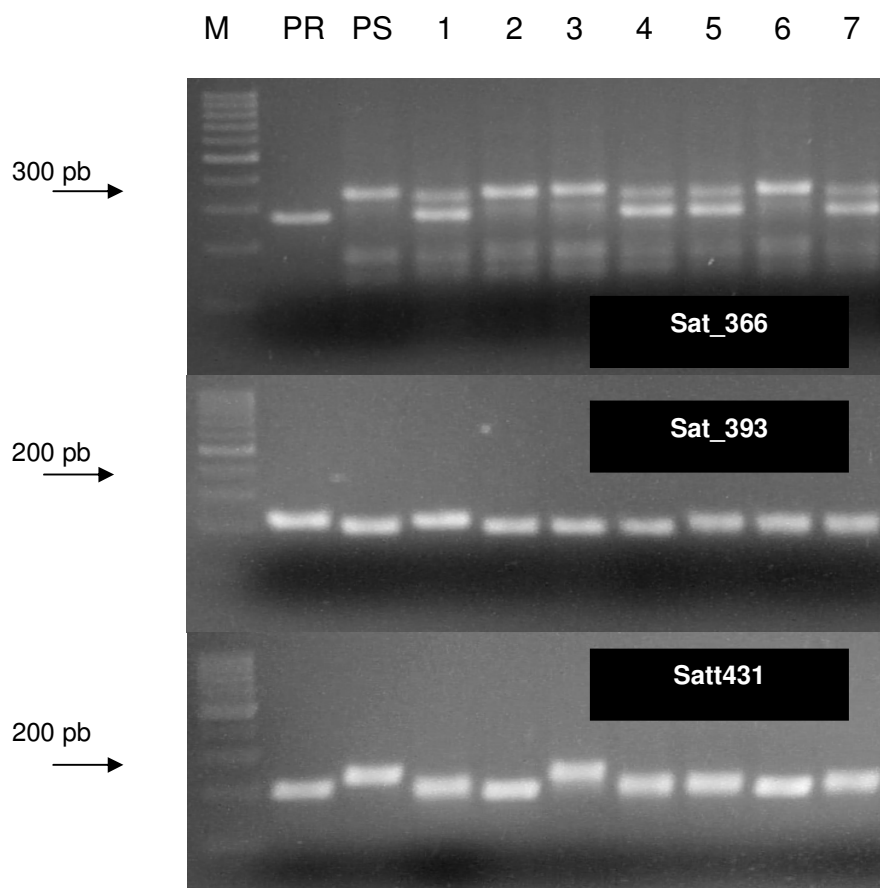


Figura 2b. Marcadores SSRs no cruzamento 2 com fragmentos polimórficos para resistência ao oídio em soja. Na seqüência, encontram-se o marcador de peso molecular (M) e as reações do parental resistente (PR) e do parental suscetível (PS) e algumas plantas do cruzamento numeradas de 1 a 7, para cada marcador.

A partir deste dados foi realizado o teste de Qui-quadrado (χ^2) para confirmação da segregação dos iniciadores polimórficos, testando-se a hipótese de 1:2:1 (homozigoto resistente : heterozigoto : homozigoto suscetível), devido à natureza codominante do marcador. Na Tabela 4 podem ser observados os resultados do χ^2 para os SSRs polimórficos em ambos os cruzamentos, sendo que a

hipótese de segregação testada foi confirmada para todos no cruzamento 1 e para o cruzamento 2 apenas para o iniciador Satt431 não foi aceita a hipótese.

Tabela 4. Número de plantas classificadas como homozigotas resistentes (HR), heterozigotas (HE) e homozigotas suscetíveis (HS) e resultados do teste de χ^2 , para a hipótese de segregação de 1:2:1 dos marcadores, nos dois cruzamentos avaliados.

Marcadores SSR	HR	HE	HS	GL	χ^2	P ⁽¹⁾
Cruzamento 1						
Sat_366	15	35	23	2	1,87 ^{ns}	39,13
Satt224	18	37	17	2	0,08 ^{ns}	95,92
Sat_712	16	38	18	2	0,33 ^{ns}	84,65
Sat_395	22	30	21	2	2,34 ^{ns}	30,99
Cruzamento 2						
Sat_393	21	30	19	2	1,54 ^{ns}	46,24
Satt431	27	26	16	2	7,69*	2,13
Sat_366	15	31	22	2	1,97 ^{ns}	37,33

^{ns} = valores não significativos ao nível de 5% de probabilidade. ⁽¹⁾ P = probabilidade (%) obtida no teste de χ^2 .

Com os resultados de segregação dos iniciadores polimórficos, os mesmos foram confrontados com as avaliações fenotípicas de resistência ao oídio. Neste caso, foi testada a hipótese da co-segregação (9:3:3:1) de cada marcador polimórfico com o gene de resistência, de modo a detectar a presença ou não de ligação. No cruzamento 1, para o marcador Sat_366 o valor do teste de χ^2 foi de 56,70, sendo altamente significativo (P < 0,00001); para o marcador Satt224, o teste de χ^2 resultou no valor de 3,39, apresentando uma probabilidade de 6,57%; o marcador Satt712 apresentou o valor do teste de χ^2 de 0,02, com probabilidade de 87,51%; e para o Sat_395, obteve-se o valor de 0,95, com probabilidade de 32,94%. No cruzamento 2,

o marcador Sat_366 apresentou um valor de 13,53 do teste de χ^2 e probabilidade de 0,02% e para o marcador Sat_393 foi obtido o valor de 37,64 para o teste de χ^2 sendo altamente significativo ($P < 0,00001$). Com este resultado, apenas o marcador Sat_366 se apresentou significativo para o cruzamento 1 e os marcadores Sat_393 e Sat_366 para o cruzamento 2, sendo portanto rejeitada a hipótese de segregação independente entre estes marcadores e o gene de resistência ao oídio nestes cruzamentos. Este resultado também pode ser visto na Tabela 5.

Tabela 5. Teste de co-segregação dos marcadores SSRs com análise de χ^2 admitindo segregação independente entre o marcador e o gene de resistência, nos dois cruzamentos avaliados.

Marcadores SSR	Segregação	χ^2	P ⁽¹⁾
Cruzamento 1			
Sat_366	9:3:3:1	56,70*	0
Satt224	9:3:3:1	3,39 ^{ns}	6,57
Sat_712	9:3:3:1	0,02 ^{ns}	87,51
Sat_395	9:3:3:1	0,95 ^{ns}	32,94
Cruzamento 2			
Sat_393	9:3:3:1	37,64*	0
Sat_366	9:3:3:1	13,83*	0,02

^{ns} = valores não significativos ao nível de 5% de probabilidade.

(1) P = probabilidade (%) obtida no teste de χ^2 .

Após obtido o resultado de possível ligação gênica entre o marcador Sat_366 para o cruzamento 1 e os marcadores Sat_393 e Sat_366 para o cruzamento 2 com o gene de resistência ao oídio, foi estimada, através do programa GQMOL (Cruz e

Schuster 2008), a distância entre cada marcador e o gene de resistência, assim como seu desvio-padrão e o valor de LOD score, para as populações estudadas. Para o cruzamento 1, o Sat_366 apresentou uma distância de 9,3 cM entre o marcador e o gene, com LOD score de 9,45. Para o cruzamento 2, apenas o Sat_393 foi considerado ligado ao gene de resistência, apresentando uma distância de 12,45 cM com LOD score de 7,24. Este resultado de LOD score obtido acima de 3,0 indica a confiabilidade da hipótese de ligação entre os marcadores e o gene.

Com os resultados de estimativa das distâncias para os marcadores e o gene nos dois cruzamentos, foi gerado um mapa de ligação hipotético para cada um dos cruzamentos, com as melhores estimativas de ordenamento e distâncias, conforme pode ser observado nas Figuras 3a e 3b.

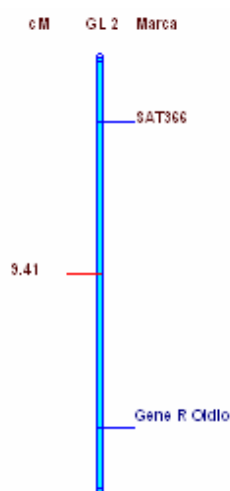


Figura 3a. Mapa de ligação com as distâncias estimadas (em cM) entre o marcador SSR (Sat_366) e o gene de resistência ao oídio (Gene R Oídio) para o cruzamento 1 (MGBR 95-20937 x IAC-Foscarin-31)

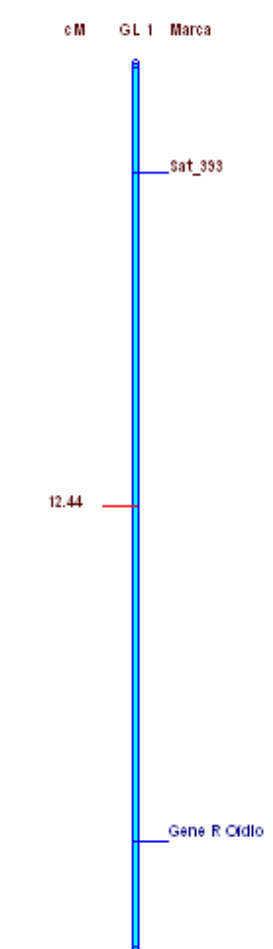


Figura 3b. Mapa de ligação com as distâncias estimadas (em cM) entre o marcador SSR (Sat_393) e o gene de resistência ao oídio (Gene R Oídio) para o cruzamento 2 (MGBR 46 x EMBRAPA 48).

Vários estudos encontram-se em andamento na tentativa de identificar marcadores microssatélites relacionados com as principais doenças de soja. Dentre esses, SILVA et al. (2007) identificaram vários marcadores microssatélites associados à resistência às raças 3 e 14 do nematóide-de-cisto (*Heterodera glycines*

Ichinohe) da soja, para serem utilizados em programas de seleção assistida por marcadores moleculares. FUGANTI et al. (2004), identificaram marcadores SSR ligados ao gene de resistência ao nematóide de galhas (*Meloidogyne javanica*) em soja, destacando-se Satt114 e Satt423. Com relação ao oídio, MUNIZ (2007) utilizou os marcadores SSRs Sat_366, Satt431, Sat_224 e Satt547 para análise de variabilidade genética de crossing-overs em cruzamentos de soja para resistência ao oídio.

Outros estudos tem indicado que no mesmo grupo de ligação J, onde encontra-se localizado o gene de resistência ao oídio (*Rmd*), também pode-se localizar os genes *Rps2* que confere resistência a podridão de *Phytophthora* e *Rj2* que confere resistência a nodulação em soja. Segundo DEVINE et al (1991), LOHNES et al (1993) e POLZIN et al (1994), estes genes (*Rmd*, *Rps2* e *Rj2*) apresentam-se ligados entre si no mesmo grupo de ligação. CREGAN et al (1999) mostrou que o gene *Rmd* está localizado na região de 97 cM, o gene *Rps2* esta 90,80 cM e o gene *Rj2* esta em 86,0 cM no grupo de ligação J. Com estas informações pode-se sugerir que os resultados obtidos neste trabalho podem ser utilizados em estudos futuros, para outras doenças em soja, como as relacionadas acima.

Os resultados obtidos no presente estudo também indicam a possibilidade de utilização dos marcadores SSRs Sat_366 e Sat_393 para a seleção assistida de genótipos resistentes ao oídio, portadores da mesma fonte de resistência existentes nos cruzamentos avaliados, devendo ser validados na tentativa de uso para outras fontes. Quando compara-se o resultado obtido neste trabalho com o mapa representativo sugerido por CREGAN (1999), observamos que o Sat_393 é o mais próximo do gene *Rmd* (resultado obtido no cruzamento 1) e o Sat_366 é o mais distante (resultado obtido no cruzamento 2).

A obtenção de marcadores microssatélites polimórficos e discriminativos para a reação de resistência ao oídio em soja são de grande importância, possibilitando a utilização no processo de seleção assistida, visando identificar genótipos resistentes e suscetíveis ao patógeno em populações segregantes pertencentes a programas de

melhoramento de soja. Como este tipo de marcador molecular permite intercâmbio, os resultados poderão auxiliar programas de melhoramento de soja de várias instituições de pesquisa com interesse na presente área de estudo.

5. CONCLUSÕES

Os marcadores microssatélites Sat_366 e Sat_393 podem ser indicados para seleção assistida em populações segregantes de soja portadoras de genes de resistência ao oídio, que apresentarem a mesma fonte de resistência utilizada no presente estudo. As fontes de resistência envolvidas na genealogia do cultivar MG/BR 46 Conquista são o cruzamento entre Lo76-4484 e "Numbaráí", Lo76-4484 é uma seleção em "Bragg", que apresenta maturação tardia; a cultivar "Numbaráí" resultou da hibridação entre "Davis" e IAC71- 1113. E para o cultivar MGBR 95-20937 são os cruzamentos [Forrest x (Lancer x BR80-6989)] x 92K10R/11.

Esses resultados, diferente do mapa apresentado por Cregan et al (1999), se devem ao fato de termos trabalhado com populações segregantes oriundas de parentais distintos. O Sat_366 que se apresentou como o mais distante do gene, neste trabalho obtivemos bons resultados, mostrando assim a importância da pesquisa, mesmo utilizando mapas já publicados.

Os fragmentos gerados pelos marcadores microssatélites se constituem em bons marcadores para serem utilizados em programas de melhoramento, de soja, visando seleção indireta de plantas portadoras dos genes de resistência ao oídio.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A.M.R. Doenças da soja (*Glycine Max* L.) In: KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997, p.642-664.

ALZATE-MARIN, A.L., COSTA, M. R., SARTORATO, A., RAVA, C., BARROS E.G. & MOREIRA, M.A. Use of markers as a tool to investigate the presence of disease resistance genes in common bean cultivars. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.1, p.125-133, 2001.

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

ARNHEIM, N.; STRANGE, C.; ELRICH, H. Use of pooled DNA samples to detect linkage disequilibrium of polymorphic restriction fragments and human disease: studies of HLA class II loci. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.82, p.6970-6974, 1985.

ASHKENAZI, V.; CHANI, E.; LAVI, U.; LEVY, D.; HILLEL, J.; VEILLEUX, R.E. Development of microsatellite markers in potato and their use in phylogenetic and fingerprinting analyses. **Genome**, v.44, p.50-62, 2001.

BEDENDO, I.P. Oídios. In: BERGAMIM FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1995, p.866-871.

BENCHIMOL, L.L.; LANZA, L.L.B.; SOUZA, J.R.; SOUZA, A. P. Microsatellite- assisted backcross selection in maize. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 4, p. 789-797, 2005.

BRONDANI, R.P.V.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R.; GRATTAPAGLIA, D. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.97, p.816-827, 1998.

BRUNEL, D. A microsatellite marker in *Helianthus annuus* L. **Plant Molecular Biology**, v. 24, p. 297-400, 1994.

BUZZELL, R.I.; HAAS, J.H. Inheritance of adult plant resistance to powdery mildew in soybean. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v.20, p.151-153, 1978.

CONAB-COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Produção Mundial de Soja. Disponível:www.conab.gov.br/politica_agricola/ConjunturaSemanal/Semana19a2308/Soja-19a2308.doc. Acesso em: 10/06/2008.

CONCIBIDO, V.C.; YOUNG, N.D.; LANGE, D.A.; DENNY, R.L.; DANESH, D.; ORF, J.H. Target comparative genome analysis and qualitative mapping of major partial-resistance gene to the soybean cyst nematode. **Theoretical Applied Genetics**, v.93, p.234-241, 1996.

CREGAN, P.B.; JARVIK, T.; BUSH, A.L.; SHOEMAKER, R.C.; LARK, K.G.; KAHLER, A.L.; KAYA, N.; VANTOAI, T. T.; LOHNES, S.D.G.; CHUNG, J.; 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. Editora UFV, Viçosa, 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: 21 de abril, 2008.

DEMSKI, J.W.; PHILLIPS, D.V. Reactions of soybean cultivars to powdery mildew. **Plant Disease Reporter**, v.58, p. 23-726, 1974.

DEVINE, T.E.; KILEN, T.C.; O'Neill, J.J. Genetic linkage of the phytophthora resistance gene *Rps2* and the nodulation response gene *Rj2* in soybean. **Crop Science**, v.31, p.713-715, 1991.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1987.

DUNLEAVY, J.M. Comparison of the disease response of soybean cultivars to *Microsphaera diffusa* in the greenhouse and the field. **Plant Disease Reporter**, v. 61, p.32-34, 1977.

DUNLEAVY, J.M. Soybean seed yield losses caused by powdery mildew. **Crop Science**, v.18, p.337-339, 1978.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa de Soja. **Recomendações técnicas para a cultura da soja na Região Central do Brasil**. Londrina: Embrapa Soja, 1998, 182p. (Documentos, 120).

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa de Soja. 2000. **Recomendações Técnicas para a cultura da soja na região Central do Brasil**. Londrina: Embrapa Soja, 2000, 245p. (Documentos, 146).

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária SOJA. **Tecnologias de produção de soja – Região Central do Brasil – 2001 / 2002**. Londrina: Embrapa Soja, 2001. 276p.

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. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. p.3-15.

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

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995. 220p.

FRONZA, V. **Genética da reação da soja a *Fusarium solani f.sp.glycines***. 2003. 166 f. Tese (Doutorado em Genética e melhoramento de plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

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

GAZZONI, D.L.; YORINORI, J.T. **Manual de Identificação de Pragas e Doenças da Soja**. Brasília: EMBRAPA – SPI, 1995. 128p.

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

GRAU, C.E.; LAURENCE, J.A. Observations on resistance and heritability of resistance to powdery mildew of soybean. **Plant Disease Reporter**, v.59, p.458-460, 1975.

GRAU, C.R. Powdery mildew, a sporadic but damaging disease of soybean. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 3., 1985, Iowa, USA. **Proceedings of the III**. Iowa: Westview Press, 1985. p.568-574.

JOHNSON, H.W.;CHAMBERLAIN, D.W.; LEHMAN, S.G. Diseases of soybeans and methods of control. **United States Department of Agriculture** 1954. 40p. (Circ. n.931).

KEIM, P.; DIERS, B.W.; OLSON, T.C.; SHOEMAKER, R.C. RFLP mapping in soybean: association between marker loci and variation in quantitative traits. **Genetics**, v.126, p.735-742, 1990.

KIIHL, R.A.S.; ALMEIDA, L.A. O futuro do melhoramento genético como agregador de tecnologia via semente. In: TECNOLOGIA E COMPETITIVIDADE DA SOJA NO MERCADO GLOBAL, 1., 2000, Cuiabá. **Anais**. Rondonópolis: Fundação Mato Grosso, 2000. p.45-47.

LANDE, R.; THOMPSON, R. Efficiency of marker-assisted selection in improvement of quantitative traits. **Genetics**, v.124, n.3, p.743-756, 1990.

LANZA, M. A.; GUIMARÃES, C. T.; SCHUSTER, I. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**, v. 21, n. 204, p. 97-108, 2000.

LEATH, S.; CARROLL, R.B. Powdery mildew on soybean *Glycine max* in Delaware. **Plant Disease Reporter**, v.66, n.1, p.70-71, 1982.

LEE, M. DNA markers and plant breeding programs. **Advances in Agronomy**, v.55, p.265-343, 1995.

LEHMAN, S.G. Powdery mildew of soybean. **Phytopathology**, v.37, p.434, 1931.

LEHMAN, S.G. Powdery mildew of soybean. **Phytopathology**, v.37, p.434. 1947.

LEWIN, B. **Genes VII**. Porto Alegre: Artmed Editora, 2001. 955p.

LITT, M.; LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, v.44, p.398:401, 1989.

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

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

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

MALUF, M.P.; GUERREIRO FILHO, O.; FAZUOLI, L.C. Biotecnologia: aporte tecnológico ao melhoramento do cafeeiro no IAC. Disponível em: www.iac.sp.gov.br/New/Oagronomico/532/05_biotecnologia.pdf. Acesso em: 07/03/2008.

MASCARENHAS, H.A.A.; ITO, M.F. IAC/IAS-5: soybean cultivar resistant to stem canker. **Bragantia**, v.57, n.2, p.267-269, 1998.

MATHER, J. **The measurement of linkage in heredity**. London: Butler & Tanner, 1957. p.149.

MCCOUCH, S.R.; CHEN, O.; PANAUD, S.; TEMNYKH, Y.; XU, Y.G.; CHO, N.; HUANG, T.; ISHII, M. Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. **Plant Molecular Biology**, v.35, p.89-99, 1997.

MCGEE, D.C. **Soybean diseases: a reference source for seed technologist**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1992. 151p.

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**, v.88, p.9828-9832, 1991.

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

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

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

MUNIZ, F.R.S. **Análise da variabilidade genética em populações segregantes de soja**. 2007. 94f. Dissertação (Doutorado em Genética e melhoramento de plantas) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

PAXTON, J.D.; ROGERS, D.P. Powdery mildew of soybeans. **Mycologia**, v.66, p.894-896, 1974.

PICININI, E.C.; FERNANDES, J.M. **Doenças da soja**: diagnose, epidemiologia e controle. 3. ed. Passo Fundo: Embrapa trigo, 1998. 90p.

POLZIN, K.M.; LOHNES, D.G.; NICKELL, C.D.; SHOEMAKER, R.C. Integration of *Rps2*, *Rmd*, and *Rj2* into linkage group J of the soybean molecular map. **Journal of Heredity**, v.85, p.300-303, 1994.

RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B.; PINTO, C.A.B.P. **Genética na agropecuária**. Lavras:UFLA, 2000. 472p.

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

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

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MATIAS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998. 2100p.

SINCLAIR, J.B. Powdery mildew. In: HARTMAN, G.L.; SINCLAIR, J.B.; RUPE, J.C. **Compendium of Soybean Diseases**. 4. ed. St. Paul: APS Press, 1999. 100p.

SILVA, M.F.; SCHUSTER, I.; SILVA, J.F.L.; FERREIRA, A.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Validation of microsatellite markers for assisted selection of soybean resistance to

cyst nematode races 3 and 14. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.8, p.1143-1150, 2007.

STADNICK, M.J.; RIVERA, M.C. **Oídios**. 1ed. Jaquariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2001. 484p.

STUBER, C.W.; GOODMAN, M.M.; MOLL, R.H. Improvement of yield and ear number resulting from selection at allozyme loci in a maize population. **Crop Science**, v.22, n.4, p.737-740, 1982.

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

TAKAMATSU, S.; HIRATA, T.; SATO, Y. Análise filogenética e estruturas secundárias preditas e transcritos internos do rDNA dos fungos causadores de oídios (*Erysiphaceae*). **Mycoscience**, v. 39, p.441-453, 1998.

TANAKA, M.S.A. Desenvolvimento do oídio da soja em casa de vegetação. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.19, n.2, p.125-126, 1993.

TANAKA, M.S.A.; MASCARENHAS, H.A.A.; ITO, M.F. Reação de cultivares de soja ao oídio (*Microsphaera diffusa*) em casa de vegetação. **Summa Phytopathologica**, v.25, n.2, p.158-161, 1999.

UNÊDA- TREVISOLI, S.H.; MAURO, A.O.; COSTA, M.M.; ARRIEL, N.H.C.; CAPELOTO, A.; BABARO, I.M.; MUNIZ, F.R.S. Avaliação da herança de resistência ao oídio (*Microsphaera diffusa*) e do potencial agrônômico em populações de soja. **Revista Brasileira de oleaginosas e fibrosas**, v.6, p.627-634, 2002.

YORINORI, J.T. **Oídio da Soja**. Londrina: Embrapa-Soja, 1997. 13p.

YORINORI, J.T.; HIROMOTO, D.M. Determinação de perdas em soja causadas por doenças fúngicas. In: EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Soja. **Resultados de Pesquisa da Embrapa Soja 1998**. Londrina, 1998. p. 112-114.

YUAN, J.; NJITI, V.N.; MEKSEN, K.; IQBAL, M.J.; TRIWITAYAKORN, K.; KASSEM, M.A.; DAVIS, G.T.; SCHMIDT, M.E.; LIGHTFOOT, D.A. Quantitative trait loci in two soybean recombinant inbred line populations segregating for yield and disease resistance. **Crop Science**, v.42, p.271-277, 2002.