

ALEXANDRE GARCIA

GENÉTICA DA RESISTÊNCIA À FERRUGEM ASIÁTICA DA
SOJA: PADRÕES DE HERANÇA E MARCADORES
MOLECULARES

Monografia apresentada para a Disciplina de Estágio EM (BG016), ofertada pelo Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aluno: Alexandre Garcia

Orientador: Profa. Dra. Vanessa Kava-Cordeiro

Co-Orientador: Dr. Éberson Sanches Calvo

Curitiba

2006

Agradecimentos

A minha família, em primeiro lugar, porque sem ela com certeza não chegaria até aqui;

Ao meu pai, em especial, que durante toda minha jornada sempre me deu toda a condição, apoio, orientação, incentivo e puxões de orelha necessários;

A minha mãe por agüentar todos meus momentos de “tensão” e nem por isso deixar de me amar;

A minha irmã por ter sido uma verdadeira IRMÃ nós últimos anos e além de agradecer fico feliz por ela ter “encontrado seu caminho”

Ao meu avô Alcindo Malachias *in memorium*, por ter sido o maior exemplo e espelho que já tive;

A Éberson Sanches Calvo, pesquisador da TMG, pela orientação, confiança, atenção e grande contribuição nesse trabalho;

A professora Dra Vanessa Kava-Cordeiro por ter me orientado e dado grande apoio apesar de eu estar ausente na maior parte do tempo;

Aos pesquisadores da TMG Arlindo Harada e Romeu Afonso de Souza Kiihl pela oportunidade de ingressar na empresa, pelo exemplo profissional e pela amizade;

Aos ilustres amigos: Marcos Mafini, Lucas Gusi, Alexandre Moser Silva, Rodrigo Kaviski, Guilherme Nasser e Luiz Fernando Pfaff por sempre estarem presentes e pelos momentos de alegria;

A Hugo da Silva Alves, amigo que mesmo às vezes distante, esteve comigo 100% do tempo nos últimos 5 anos e vai continuar comigo aonde quer que eu vá;

A Alexandre Morey e Daniel Silva, excelentes pessoas e novos amigos, por terem me acolhido em Londrina e sempre demonstrarem enorme paciência, preocupação e boa vontade;

Aos eternos “irmãos” de Toledo: Fabio Xavier, Bruno e Ricardo Della Costa, Marcos Vinícius Rodrigues, Gustavo Takahachi, Luiz Felipe H. Silva, Marcelo Vanzo e todos mais que considero;

A Marina Borsoi, pela companhia, alegria, esforço e disposição em todos os momentos;

Aos amigos que fiz na Faculdade por dividirem momentos de responsabilidade, nervosismo, diversão e insanidade;

A todos os Funcionários da TMG, em especial a Marcelo Soares Baço, Alessandro Vieira e Frederico pela contribuição, parceria e auxílio;

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o meu sucesso e felicidade, que sempre me quiseram bem, deram oportunidades, quebraram galhos e se esforçaram para me ajudar.

Sumário

	Página
LISTA DE TABELAS.....	VI
LISTA DE FIGURAS.....	VII
RESUMO.....	VIII
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	14
5 RESULTADOS.....	22
6 DISCUSSÃO.....	37
7 CONCLUSÃO.....	41
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

Tabelas

	Página
TABELA 1 - Dados da avaliação fenotípica do tipo de lesão e da segregação das progênes.....	22
TABELA 2. Teste do χ^2 do cruzamento ER06 10.801x ER06 10.803.....	23
TABELA 3. Teste do χ^2 do cruzamento ER06 10.801x ER06 10.804.....	24
TABELA 4. Teste do χ^2 do cruzamento ER06 10.801x ER06 10.805.....	24
TABELA 5. Teste do χ^2 do cruzamento ER06 10.801 x ER06 10.808.....	24
TABELA 6. Teste do χ^2 do cruzamento ER06 10.801 x ER06 10.802.....	25
TABELA 7. Teste do χ^2 do cruzamento ER06 10.801 x ER06 10.806.....	25
TABELA 8. Teste do χ^2 do cruzamento ER06 10.801 x ER06 10.807.....	26
TABELA 9. Análise de polimorfismo.....	30
TABELA 10. Lista dos primers polimórficos para cada um dos 7 cruzamentos.....	33

Figuras

	Página
FIGURA 1. Placa de amplificação 1.....	26
FIGURA 2. Placa de amplificação 2.....	27
FIGURA 3. Placa de amplificação 3.....	27
FIGURA 4. Placa de amplificação 4.....	27
FIGURA 5. Placa de amplificação 5.....	28
FIGURA 6. Placa de amplificação 6.....	28
FIGURA 7. Placa de amplificação 7.....	28
FIGURA 8. Placa de amplificação 8.....	29
FIGURA 9. Placa de amplificação 9.....	29
FIGURA 10. Placa de amplificação 10.....	29
FIGURA 11. Dendograma.....	36

Resumo

A cultura da soja é um dos motores do agronegócio brasileiro e tem contribuído muito para a economia do país. Entretanto, os resultados poderiam ser ainda mais promissores não fossem problemas como a ferrugem asiática, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrrhizi* e recentemente chegada ao Brasil mas já sendo responsável por grandes perdas. Devido aos danos causados pela ferrugem da soja é imprescindível controlar o problema e a melhor solução para tal é o uso de cultivares resistentes. O presente trabalho visa gerar informações que auxiliem no desenvolvimento dessas cultivares, utilizando principalmente as facilidades dos marcadores moleculares. Para isso, fontes exóticas de resistência à ferrugem foram identificadas, testadas e cruzadas com um material de elite e os mecanismos de herança da resistência foram estudados. Foi extraído o DNA dos parentais utilizados e por meio da reação de PCR, loci de microssatélites foram amplificados e separados por eletroforese, buscando-se com isso marcadores polimórficos entre as fontes de resistência e a cultivar de elite suscetível. Na próxima etapa deste trabalho, os SSR polimórficos serão avaliados para identificar a possível ligação com genes que conferem a resistência. Confirmada a ligação, eles poderão ser usados para facilitar o melhoramento e dar subsídios para outras pesquisas na área de genética molecular.

1. INTRODUÇÃO

A agricultura é, sem dúvida, um dos setores mais significativos no desempenho da economia brasileira. Dentre as espécies vegetais cultivadas, a soja (*Glycine max* (L.) Merrill) ocupa lugar de destaque. Essa leguminosa é cultivada em praticamente todo o território nacional e o Brasil é o segundo maior produtor da oleaginosa, participando com 20% da produção mundial.

Muitos fatores contribuíram para a expansão e o sucesso da cultura no país. No aumento da produção, dentre outros fatores, devemos destacar e melhoria do potencial genético das cultivares, conseguida através dos programas de melhoramento. Contudo, o incremento da produtividade poderia ser ainda maior caso não houvessem problemas como a ocorrência de doenças. Dentro dos problemas fitossanitários da soja, a “ferrugem da soja” ou ferrugem asiática, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, identificada no Brasil na safra 2000/2001, está trazendo sérias preocupações e é hoje tratada como o maior inimigo da lavoura devido ao grande potencial de danos e ao difícil controle do patógeno.

Um das melhores estratégias preconizadas para o controle de doenças e pragas, é o uso de cultivares resistentes ou tolerantes. Essa solução facilita o manejo e reduz os custos, além de não agredir o ambiente. As cultivares resistentes normalmente são desenvolvidos pela transferência de alelos de resistência de fontes exóticas, muitas vezes não adaptadas, para cultivares elite. Devido à coevolução entre hospedeiro e patógeno e o conseqüente surgimento de novas raças, cultivares resistentes necessitam ser continuamente desenvolvidos (ALZATE-MARIN et. al.,2005).

Nos últimos anos, com o advento da biotecnologia, novas metodologias surgiram para auxiliar o melhoramento “clássico”, possibilitando a obtenção dos genótipos desejados com mais eficácia e em menor tempo. Segundo SOUZA, (2001), essas técnicas consistem basicamente na utilização da cultura de tecidos, transformação genética de plantas com genes vindos de outros organismos e o uso de marcadores moleculares.

Os marcadores moleculares surgiram como uma grande contribuição do desenvolvimento das técnicas moleculares que permitem a análise do genoma. São muitas as aplicações dos marcadores moleculares em plantas, sendo principalmente utilizados no mapeamento de genes e QTL's ("Quantitative Trait Loci") de interesse. Eles representam uma excelente estratégia para identificar os genótipos promissores e de interesse nas fases iniciais do programa de melhoramento. Quando ligados geneticamente aos genes de resistência, os marcadores possibilitam o reconhecimento precoce de plantas resistentes, reduzindo o tempo e os custos do processo de melhoramento pelo fato de eliminar etapas convencionais como a inoculação do patógeno e posterior avaliação de resistência observando o fenótipo.

Vários tipos de marcadores moleculares estão disponíveis para estudos genéticos sendo que os mais utilizados são as Isoenzimas, o RFLP, o RAPD, o AFLP e os microssatélites (SSR - "Simple Sequence Repeats").

Os microssatélites correspondem a seqüências de DNA com poucos (2-6) pares de bases de comprimento, repetidas "in tandem", tais como (AT)_n, (ATT), etc (FUGANTI et al., 2004). Como o número de repetições "in tandem" é variável, se conhecida a seqüência que flanqueia a região do microssatélite, é possível amplificar os loci pela reação de PCR e os produtos de amplificação dos diferentes indivíduos mostrarão um polimorfismo de tamanho. Atualmente a soja já dispõe de inúmeros "primers" de microssatélites disponíveis.

Tendo em vista todas essas questões, a identificação de marcadores moleculares ligados a genes de resistência a ferrugem da soja é de grande interesse e o primeiro passo para isso é a identificação de marcadores polimórficos entre os parentais resistentes e suscetíveis com potencial para serem utilizados nos programas de melhoramento. Por ser um problema recente, ainda são poucos os trabalhos realizados sobre a ferrugem da soja. Sendo assim, as informações geradas pelo trabalho podem ser úteis para a identificação de marcadores moleculares ligados aos genes de resistência à ferrugem e com isso acelerar a obtenção de cultivares de elite resistentes à doença. Além disso, o posterior mapeamento destas marcas polimórficas poderá auxiliar na clonagem posicional de genes que conferem resistência ou tolerância à ferrugem na soja.

2. OBJETIVOS

- Buscar fontes de resistência à ferrugem da soja visando o desenvolvimento de cultivares resistentes à doença.
- Identificar marcadores moleculares de microssatélites polimórficos entre as linhagens resistentes e o cultivar de elite suscetível, que possuem potencial para serem utilizados como parentais nos processos de hibridação.
- Inferir sobre o tipo de herança de cada material resistente baseado em dados das populações segregantes F₂ de cada cruzamento e das progênes F_{2:3}.
- Identificar os genótipos homocigotos resistentes e suscetíveis de cada população F₂ e preparar "bulks" de cada genótipo para futuramente serem analisados com os marcadores polimórficos visando identificar marcas que estejam fisicamente ligadas aos possíveis genes que conferem resistência à doença.
- Analisar a diversidade genética das fontes de resistência através do agrupamento dos materiais segundo os princípios adotados na taxonomia numérica.

3.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A soja

3.1.1 Características da planta

A soja cultivada [*Glycine max* (L.) Merrill] ($2n=40$ cromossomos), pertence a família Fabaceae, divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, sub-classe Rosidae e ordem Fabales (CAPELLARI JR. et al., 1999). É uma planta autógama, ou seja, reproduz-se por meio de autofecundação natural (ALLARD, 1960). A autofecundação sucessiva leva a homozigose e assim a cultivar é representada por um genótipo homozigoto (SOUZA, 2001).

Seu ciclo de vida é anual e é considerada como herbácea, ereta, de crescimento morfológico determinado ou indeterminado. Possui, dentre outros caracteres, hastes e vagens pubescentes. A altura, de acordo com a região de cultivo, varia de 0,3 a 2,0 metros, podendo ser muito ou pouco ramificada. Dependendo da cultivar e condições ambientais, o ciclo pode variar de 80 a 200 dias (SEDIYAMA et al., 1985).

A espécie possui elevados teores de óleo e proteína e também pode ser fonte de vitaminas (tiamina e riboflavina) e minerais (cálcio e ferro) (OLIVEIRA, 1981). Por isso, a soja é fundamental na alimentação humana e amplamente utilizada como fonte de proteína na alimentação animal. Além disso, novas possibilidades estão surgindo para o uso da planta, como por exemplo o Biodiesel.

FEHR e CAVINESS (1981), propuseram uma caracterização para os estádios de crescimento de plantas baseado no número de nós, no desenvolvimento das folhas e das flores. Esta classificação é universalmente usada para a soja, que possui basicamente quatro tipos distintos de folhas durante o seu desenvolvimento: (1) dois cotilédones, que constituem o primeiro par; (2) um par de folhas simples, ou primárias, unifolioladas, que se sucedem aos cotilédones; (3) as folhas trifolioladas que seguem as primárias e constituem todas as demais folhas da planta e (4) os prófilos, pequenos e pouco diferenciados, que se encontram nas bases dos ramos laterais (MÜLLER, 1981).

3.1.2 Histórico e Economia

A agricultura é um dos setores mais significativos no desempenho da economia brasileira. Dentre as espécies vegetais cultivadas, a soja ocupa lugar de destaque. Não seria exagero comparar a revolução socioeconômica e tecnológica protagonizada pela soja no Brasil Moderno, ao fenômeno ocorrido com a cana de açúcar no Brasil Colônia e com o café no Brasil Império/República que, em épocas diferentes, comandaram o comércio exterior do País.

Tendo como centro de origem primário a região leste da Ásia, provavelmente na região Centro-Sul da China (XU et al., 1989), a soja é reconhecida como uma das mais antigas plantas cultivadas no planeta. Relatos destacam seu cultivo nesta região por volta do século V a.C. O mesmo autor também cita a Manchúria, região chinesa onde a cultura foi domesticada, como o centro de origem secundário.

Apesar de conhecida e explorada no Oriente há mais de cinco mil anos, o Ocidente ignorou o seu cultivo até a segunda década do século vinte, quando os Estados Unidos iniciaram a exploração comercial (primeiro como forrageira e, posteriormente, como grão) (VIDOR et al., 2004).

No Brasil, a soja foi introduzida por Gustavo D'Utra na Bahia em 1882 via Estados Unidos, porém sem sucesso (MEDINA, 1981). Mais tarde, no Rio Grande do Sul, encontrou efetivas condições para se desenvolver e expandir, dadas as semelhanças climáticas do ecossistema do sul dos EUA (local de origem dos materiais introduzidos) com as condições climáticas predominantes no extremo sul do Brasil (VIDOR et al, 2004).

A partir de 1960, impulsionada pela política de subsídios ao trigo visando auto-suficiência, a soja cresceu em importância. Na década seguinte, a cultura se consolidou como a principal cultura do agronegócio brasileiro, e sua produção passou de 1,5 milhões de toneladas (1970) para mais de 15 milhões de toneladas (1979), obtendo uma participação de 16% da produção mundial (BONATO e BONATO, 1987). Esse crescimento foi devido não apenas ao aumento da área cultivada (1,3 para 8,8 milhões de hectares), mas também ao expressivo incremento da produtividade (1.140 para 1.730 kg/ha).

Atualmente, a soja é cultivada em praticamente todo o território nacional sendo os estados do Mato Grosso, Paraná, Goiás, Rio Grande do Sul, Mato Grosso

do Sul, Minas Gerais e Bahia os principais produtores. Dados da CONAB (2006) mostram que produtividade média na safra de 2003/2004 foi de 2.339kg/ha. Com isso, o Brasil se tornou o segundo maior produtor da oleaginosa, participando com 20% da produção mundial com previsão para alcançar a posição de maior produtor na safra de 2007/2008.

Tal fato só foi possível devido ao desenvolvimento de um bem sucedido pacote tecnológico relacionado à melhoria do complexo ambiental e principalmente aos programas de melhoramento genético que, assistido por diversas outras áreas, desenvolvem variedades adaptadas às diversas regiões e condições brasileiras.

Nas últimas duas safras, problemas de estiagem durante o início do desenvolvimento da lavoura, chuvas contínuas no período de colheita e principalmente a ocorrência da ferrugem asiática ocasionaram perdas de produtividade, ficando assim aquém das estimativas. Entretanto, mesmo com os problemas, a produção brasileira apresentou resultados expressivos. Na safra 2004/2005 a área plantada com soja aumentou em 8,6% (BROGIN, 2005) e na safra 2005/2006 a produção foi de 58 milhões de toneladas com produtividade média de 2.627 kg/ha (CONAB 2006).

3.2 Melhoramento Genético

O melhoramento de plantas visa a obtenção de cultivares superiores aos existentes em cultivo, seja na produção de grãos, de massa verde ou fibras, na resistência às pragas e moléstias, seja, ainda, na maior riqueza em proteínas, óleo, qualidade da fibra ou outras características de interesse (CONAGIN et. al., 1997)

Dentre as principais contribuições do melhoramento para o complexo soja no Brasil, devemos destacar o desenvolvimento de variedades com adaptação a latitude mais baixas e resistência às principais doenças (ARIAS et. al., 2006). O mesmo autor também relata que a resistência genética tem solucionado problemas sérios de doenças como a mancha olho de rã (*Cercospora sojina*), o cancro da haste (*Diaporthe phaseolorum f.sp. meridionallis*), o oídio (*Microphaera diffusa*) e o nematóide de cisto (*Heterodera glycines*). BROGIN (2005) acrescenta à resistência à pústula bacteriana, ao crestamento bacteriano, podridão parda da haste, vírus da necrose da haste e vírus do mosaico comum da soja.

No caso da soja, o melhoramento tem sido feito principalmente por meio de introdução de materiais, seleção e pela hibridação (cruzamentos artificiais), reunindo em uma nova linhagem pura, a ser utilizada pelos produtores rurais como nova cultivar, alelos favoráveis presentes em dois ou mais genótipos.

A escolha do germoplasma, o bom planejamento do bloco de cruzamentos pelo melhorista visando os objetivos programados e a seleção dos parentais, são etapas importantes para o sucesso na obtenção de uma nova cultivar. Conhecer o tipo de herança do caráter é outro quesito necessário para racionalizar o processo de desenvolvimento de cultivares (ARIAS et. al., 2006).

Para conduzir as gerações segregantes são utilizados vários métodos dos quais devemos destacar o método da população ("Bulk Method"), o SSD ("Single Seed Descent") e o retrocruzamento. No final de todo processo seletivo o melhorista irá identificar uma ou algumas linhas puras com características superiores que irão originar uma nova cultivar.

No método da população a condução das gerações segregantes, geralmente de F2 a F5, é feita com a semeadura e colheita de todas as plantas misturadas em uma única população. Portanto, no método da população as sementes utilizadas para o cultivo de cada geração segregante são uma amostra das sementes colhidas na geração anterior. Após cinco gerações de autofecundação as plantas apresentam elevado grau de homozigose e podem ser selecionadas para colheita individual. (SOUZA, 2001)

O método SSD em soja foi inicialmente descrito por BRIM (1966) e consiste em avançar gerações segregantes (de F2 até F5) colhendo-se uma única vagem (2 a 3 sementes) de cada planta, mas apenas uma planta de cada vagem é utilizada para conduzir a próxima geração. Colhe-se também uma amostra para reserva. Dessa forma, no final do processo cada linhagem corresponde a uma planta F2 diferente e, portanto, reduz-se a perda devido a amostragem deficiente ou ação da seleção natural.

O retrocruzamento não é propriamente um método para condução de populações segregantes. É um método utilizado para melhorar a expressão fenotípica de uma característica deficiente, especialmente se essa característica for de herança qualitativa. Ele permite a transferência de um gene ou de poucos genes de um parental denominado doador (PD) para outro parental denominado recorrente

(PR). O parental recorrente geralmente é uma cultivar de grande interesse comercial mas que apresenta um defeito grave para o seu cultivo e esse defeito é corrigido com o gene transferido do PD. O termo retrocruzamento refere-se aos repetidos cruzamentos dos indivíduos da população segregante com o parental recorrente. Cerca de 5 retrocruzamentos já são suficientes para recuperar quase 100% do genótipo do parental recorrente. (SOUZA, 2001)

Quando se trata do melhoramento visando resistência a doenças e pragas, é muito desejável a piramidação, ou seja, a associação de vários genes de resistência existentes em uma mesma cultivar visando a obtenção de uma resistência duradoura e de amplo espectro (KELLY et al.,2003). No processo de piramidação, os marcadores moleculares do DNA constituem uma ferramenta imprescindível pois permitem o monitoramento simultâneo de vários genes de interesse em um mesmo "background" genético.

No programa de piramidação de genes de resistência assistido por marcadores moleculares, ALZATE-MARIN et. al.(2005) citam que primeiro é necessário selecionar genitores contrastantes para genes de resistência às doenças de interesse e identificação das raças do patógeno de maior importância para a região a qual se destinam as novas cultivares. Então, são feitos estudos de herança da resistência às raças selecionadas a partir de cruzamentos entre as fontes de resistência e a cultivar suscetível de interesse. O próximo passo é a identificação de marcadores moleculares ligados aos diferentes alelos de resistência. Em seguida são obtidas as isolinhas contendo os genes de resistência e as marcas moleculares correspondentes, mais comumente, por meio de retrocruzamentos. Por último é necessário fazer a validação dos marcadores moleculares capazes de discriminar especificamente cada um dos genes de resistência, evitando problemas posteriores com os falsos positivos. Após todos estes procedimentos, as isolinhas obtidas são intercruzadas para a piramidação dos alelos de resistência.

Para dar seqüência ao referido programa, a caracterização contínua da variabilidade genética dos patógenos e do hospedeiro, a introdução e caracterização de novas fontes de resistência e a identificação de marcadores moleculares ligados a alelos de resistência são atividades que devem ser realizadas rotineiramente.

3.3 Marcadores Moleculares

Os marcadores surgiram como uma grande contribuição no desenvolvimento das técnicas que permitem a análise do genoma. Como o próprio termo já indica, tem como função marcar, identificar. Eles são classificados como morfológicos ou moleculares. Os marcadores moleculares são marcações ao longo do DNA que podem ser usadas para distinguir DNA de diferentes origens, sempre levando em conta a ocorrência de polimorfismo. Podem ser baseados em proteínas (isoenzimas) ou podem marcar diretamente o DNA.

O grande potencial do uso dos marcadores reside no fato de eles serem praticamente ilimitados em número e de fácil detecção. Além disso, não são influenciados pelo ambiente e são transmitidos mendelianamente (FUGANTI et al., 2004).

No melhoramento de plantas, marcadores do DNA foram primeiramente utilizados no início da década de 80 (SOLLER; BECKMANN, 1983) e eles vem sendo utilizados principalmente em análises de diversidade genética, na caracterização de germoplasma e no mapeamento de genes e QTL's ("Quantitative Trait Loci") de interesse (BROGIN 2005).

ALZETE-MARIN et al. (2005) citam que no melhoramento, os marcadores moleculares podem ser usados no processo de retrocruzamento para facilitar e acelerar a recuperação do genoma do genitor recorrente; no processo de transferência de alelos de resistência; na seleção assistida por marcadores (S.A.M.) quando estreitamente ligados aos alelos de resistência; e também em situações em que o fenótipo é de difícil mensuração. Entretanto MICHELMORE et al. (1991) ressaltam que as marcas precisam estar mais próximas que 15cM do locus de interesse para serem efetivas. Assim, mesmo com a ocorrência de recombinação, eles tendem a ficar juntos.

O sucesso dos marcadores moleculares do DNA deve-se muito à descoberta das enzimas de restrição, técnicas de hibridação por sondas, uso da eletroforese para DNA e a reação de PCR ("Polymerase Chain Reaction"), sendo que muitas vezes essas técnicas são usadas em conjunto.

No início dos anos 70, descobriu-se que o princípio da eletroforese, utilizado com proteínas, poderia ser usado também para moléculas de DNA, já que estas

possuem carga elétrica negativa e, em um gel, migram do pólo negativo em direção ao pólo positivo (ALBERTS et al., 2004). Através dessa técnica as marcas são distinguidas pelo polimorfismo de tamanho observado. Assim, surgiu a possibilidade da utilização de marcadores de DNA como ferramenta para a análise direta do DNA, não sofrendo influência do ambiente, nem estando sujeita a variações do estágio de desenvolvimento do organismo em questão (PUTERKA et al., 1993).

A reação de PCR, ou reação em cadeia da polimerase, foi uma das técnicas desenvolvidas para a análise de DNA e RNA que teve mais impacto. É uma técnica de procedimento simples que vem sendo extensivamente utilizada. A PCR baseia-se na amplificação de um segmento de DNA flanqueado por dois oligonucleotídeos iniciadores ("primers"). Estes oligonucleotídeos iniciadores hibridam com as regiões flanqueadoras da seqüência alvo e também apresentam a extremidade 3'-OH livre, permitindo o início da amplificação do segmento pela enzima DNA polimerase. Este tipo de reação utiliza uma DNA polimerase especial, a Taq DNA polimerase (WILLIAMS et al., 1990), que é termoestável e resiste à alta temperatura necessária para a desnaturação do DNA dupla fita. Ciclos repetidos de desnaturação, hibridação dos primers (anelamento) e síntese enzimática do fragmento (polimerização) resultam numa amplificação exponencial do DNA alvo. Desenvolvida na década de 80 por Kary Mullis, a PCR possibilitou a produção de múltiplas cópias de seqüências específicas de DNA in vitro, sem a necessidade de clonar estas seqüências (ALBERTS et al., 2004).

Entre as grandes vantagens da técnica de PCR, destaca-se a pequena quantidade de DNA necessária para se obter bons resultados e também a facilidade de não ser necessário isolar a seqüência que será amplificada. Dentre as desvantagens, existe a necessidade de conhecer a seqüência que flanqueia o segmento a ser amplificado e também os cuidados que devem ser tomados para evitar uma contaminação com DNA exógeno (ALBERTS et al., 2004).

Atualmente os marcadores moleculares do DNA mais utilizados são: RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism"), RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA"), AFLP ("Amplified Fragment Length Polymorphism"), microssatélite ou SSR ("Single Sequence Repeat"), que são de especial importância para este trabalho, e mais recentemente os SNP ("Single Nucleotide Polymorphism").

3.3.1 Microssatélites

Microssatélites, também conhecidos como SSR ("Single Sequence Repeat") ou STR ("Short Tandem Repeats"), são regiões de DNA repetitivo, não-codificadoras, compostas de pequenas seqüências de 1 a 6 nucleotídeos repetidas "in tandem", e que estão amplamente espalhadas pelo genoma, ocorrendo tanto em procariontes como em eucariontes (TOTH et al., 2000).

É um marcador do tipo codominante e vem sendo amplamente usado em estudos de doenças em humanos (O'DONNELL; WARREN, 2002), testes de paternidade (SCHOLOTTER; HARR, 2000), construção de mapas genéticos (CREGAN et al., 1999) e em diversos programas de melhoramento vegetal. ZHANG et al. (2005) e WU- YANG et al. (2006) também utilizaram microssatélites para analisar a diversidade genética e calcular o índice de similaridade entre indivíduos e populações.

As regiões de microssatélites têm o atributo particular de sofrer altas taxas de mutação, quando comparadas com o resto do genoma (JARNE; LAGODA, 1996). Sendo assim, para um mesmo locus indivíduos podem ter diferentes números de repetições "n tandem", variando de um par de bases a dezenas deles. Dessa forma, no mesmo locus, uma população pode conter inúmeros alelos com diferentes números de repetições, o que torna os marcadores SSR muito úteis para distinguir indivíduos (OLIVEIRA et al, 2006).

SOUZA (2001) explica que enquanto o número de repetições "in tandem" de um microssatélite varia, a seqüência de bases adjacente ao microssatélite pode ser única no genoma e conservada (no mesmo locus) entre os indivíduos da mesma espécie. Assim, pode-se desenhar um "primer" específico para essas seqüências adjacentes e através de uma reação de PCR é possível amplificar esse locus nos diferentes genótipos. Como o número de repetições "in tandem" é variável entre os genótipos, os produtos de amplificação dos diferentes indivíduos, quando submetidos a eletroforese, mostrarão um polimorfismo de tamanho do fragmento amplificado.

Estudos recentes feitos por MORGANTE et al. (2002) demonstram a grande freqüência da ocorrência dos microssatélites em plantas, sendo que o número de

microssatélites por Mb é em torno de 1844 em *Arabidopsis thaliana*, 2757 em arroz, 1470 em milho, 1796 em trigo e de 2000 na soja.

A soja dispõe de um conjunto de marcadores de microssatélites de acesso público para a utilização em estudos genéticos, além de já possuir o mapa de ligação integrado (AKKAYA et al., 1992; CREGAN et al., 1999). Nessa leguminosa, os marcadores de microssatélites têm sido muito utilizados para o mapeamento de genes específicos que determinam características agronomicamente importantes, como a resistência genética a pragas e doenças e, também, para a identificação de QTLs que exercem um controle de herança complexo (SCHUSTER et al. 2001).

Atualmente, com o problema da ferrugem asiática, os microssatélites associados à estratégia de análise de “bulks” segregantes (BSA) estão sendo muito úteis no mapeamento dos genes que conferem resistência à doença, como mostram os trabalhos de DA SILVA et al. (2006a) e DA SILVA et al. (2006b).

3.4 Ferrugem Asiática da Soja

Entre os principais fatores que limitam a obtenção de altos rendimentos em soja estão as doenças. Sendo assim, o controle ou redução dos efeitos das doenças tem efeito direto, aumentando a produtividade (ALMEIDA, 2001).

A ferrugem asiática, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, é uma das doenças mais antigas da soja. Ela foi identificada pela primeira vez no Japão em 1902 mas só chegou ao Brasil a partir da safra 2000/01, trazendo sérias preocupações devido ao grande potencial de danos (YUYAMA; SUZUKI, 2005). Esta é a principal doença da soja em áreas tropicais e subtropicais (SINCLAIR; HARTMAN, 1999). A doença tem sido reportada na Ásia, África, América do Sul, América Central Caribe e Austrália e atualmente já foi constatada sua presença em todas as regiões produtoras de soja no Brasil. Além da soja cultivada, HARTMAN et al. (2005) relatam que mais de 95 espécies de 42 gêneros da família *Fabaceae*, são hospedeiras da *P. pachyrhizi*.

Esse fungo é um organismo essencialmente biotrófico e existem relatos da ocorrência de várias raças do patógeno no continente asiático. A doença manifesta-se de forma irregular dependendo das condições ambientais. Segundo YUAMA e SUZUKI, (2005) alta umidade e temperaturas amenas favorecem o desenvolvimento

do patógeno. O sintoma da doença é caracterizado por pequenos pontos com menos de 1 mm de diâmetro, de coloração pardo- avermelhada, na superfície superior da folha. As lesões podem culminar em infecções severas, formando grandes manchas castanhas, causando amarelecimento e queda prematura das folhas (YORINORI, 2004). Na parte inferior da folha, a lesão é de coloração castanha-clara a castanha escura, tendo uma pequena elevação no centro, de coloração mais clara. Essa parte mais clara constitui a cutícula que cobre a massa de uredósporos produzida no interior do tecido da folha.

Segundo HARTMAN et al. (2005), a ferrugem asiática da soja ocorre em folhas como lesões de cor palha ("TAN") a marrom escuras ou marrom avermelhadas (RB - "Reddish-Brown"). Genótipos considerados resistentes apresentam uma lesão RB e ausência de esporulação. Os suscetíveis possuem lesões "TAN" e abundante esporulação na face abaxial das folhas. Sob condições favoráveis, as primeiras lesões podem ser visíveis 4-5 dias após a inoculação com o patógeno e as primeiras frutificações (urédias) e esporulações aparecem aos 6-7 dias após a inoculação (YORINORI, 2004a).

No momento, todas as plantas de soja cultivadas no Brasil são suscetíveis ao fungo em todos os estádios de crescimento. Contudo, ataques no florescimento e no período de enchimento das vagens reduzem mais severamente a produtividade (KAWUKI et al., 2003).

De acordo com BROGIN (2005), perdas na produtividade variando de 10% a 80% foram verificadas em países asiáticos e na Austrália. No Brasil, na safra de 2002/2003, perdas de até 90% ocorreram em algumas propriedades onde a doença ocorreu com alta severidade (YORINORI, 2004). O mesmo autor também cita que na mesma safra, considerando-se o custo com o controle da doença e a redução na produtividade, foram calculados prejuízos de mais de US\$ 3 milhões.

Na safra 2003/04, segundo YORINORI e LAZZAROTTO (2004), as perdas na produção de grãos de soja, devido à ferrugem, foram estimadas em 4,6 milhões de toneladas, o que correspondeu ao valor de U\$ 1,22 bilhão (U\$ 266,72/t). Considerando a ocorrência da ferrugem em 70% da área brasileira cultivada com soja e a realização média de 1,5 aplicações adicionais de fungicida em toda essa área, visando controlar a doença, os gastos com o controle químico (fungicidas e despesas com aplicação) atingiram a estimativa de U\$ 860,00 milhões (U\$ 38,8/ha

tratado), totalizando um montante de U\$ 2,08 bilhões perdidos com a ferrugem asiática da soja (KOGA, 2005).

Em função das grandes perdas na produtividade e elevação de custos na produção para o controle da ferrugem, a estratégia mais eficiente e sustentável para o controle da ferrugem é o uso de variedades resistentes e com alta produtividade.

3.4.1 Controle Genético

Para desenvolver variedades resistentes ou mesmo tolerantes à ferrugem da soja, é necessário avaliar o germoplasma disponível buscando fontes de resistência. Muitos genótipos são citados na literatura como possíveis fontes de resistência (VELLO et. al., 2002) mas nenhuma dessas fontes é adaptada às condições brasileiras.

Um esquema de melhoramento que está sendo muito utilizado para incorporar a resistência à ferrugem envolve a hibridação artificial, feita entre fontes exóticas de resistência e materiais de elite adaptados, seguidos de retrocruzamentos sucessivos ou o avanço das gerações pelos métodos da população e SSD.

A resistência à ferrugem também é observada entre as espécies perenes selvagens do gênero *Glycine* e estas também são consideradas como fontes potenciais de genes de resistência para transferência para a soja cultivada, uma vez que cruzamentos interespecíficos são possíveis (BURDON; MARSHALL, 1981).

Até o momento, foram relatados 4 genes dominantes independentes (em loci diferentes) para a resistência. Eles foram identificados em introduções de plantas (PI's) e foram denominados : Rpp1 identificado na PI 200492, Rpp2 identificado na PI 230970, Rpp3 (PI 462312) e Rpp4 (PI 459025) (BROMFIELD; HARTWIG, 1980; BROMFIELD; MECHING 1982; MCLEAN ; BYTH 1980; HARTWIG, 1986).

Entretanto alguns materiais derivados das diferentes fontes não seguem exatamente o padrão de resistência citado, podendo apresentar outro tipo de relação de dominância em função do "background" genético onde está inserido, o que caracteriza a presença de alguns efeitos genéticos complicadores, como epistasia (ARIAS et. al., 2006). Essas diferentes relações de dominância encontradas, em geral prejudicam a seleção nas gerações precoces de avanço após cruzamento e

também dificultam a introgressão desses genes através do método tradicional do retrocruzamento. Outro problema reside no fato de que a resistência conferida por poucos genes dominantes não é uma forma estável de resistência, pois é quebrada quando ocorrem mutações no patógeno (VELLO et al. 2002).

YORINORI (2004) cita que em estudos feitos em 2002 com as cultivares comerciais, foram observadas grandes variações, desde alto grau de resistência a alta suscetibilidade. A resistência de todos os materiais era derivada da variedade FT-2 e determinada por um gene dominante (ARIAS et. al. 2003). Porém, na safra de 2002/03, com o surgimento de uma raça do fungo mais virulenta, todas as cultivares resistentes/tolerantes em 2002 tornaram-se suscetíveis e simultaneamente foi quebrada a resistência das fontes primárias de Rpp1 e Rpp3.

Portanto, a melhor estratégia para desenvolver cultivares resistentes à ferrugem asiática é utilizar todos os genes disponíveis e suas possíveis combinações, junto com outras fontes de tolerância ou resistência horizontal e para isso os marcadores moleculares são indispensáveis.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Toda a parte experimental foi realizada na empresa TMG – Tropical Melhoramento e Genética Ltda - localizada no município de Cambé, Paraná.

4.1 Escolha das fontes de resistência

Foram escolhidos 48 genótipos com resistência à ferrugem com base nas informações disponíveis na literatura e também a partir de dados não publicados de pesquisadores americanos que estão realizando testes nos materiais do banco de germoplasma do USDA (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos). A grande maioria dos materiais escolhidos eram exóticos e identificados internacionalmente por um número de PI ("Plant Introduction"). Os genótipos foram previamente testados para confirmação da pureza genética e depois de testados, 7 fontes foram selecionadas. Após a seleção foi realizada a hibridação entre cada fonte de resistência e uma cultivar de alto valor agrônômico, porém suscetível à doença. A cultivar de elite utilizada foi a mesma para todos os 7 cruzamentos. Cada cruzamento foi identificado com um código e as sementes F1 – todas não apresentando segregação - foram colhidas e armazenadas separadamente. Essas etapas foram realizadas durante o segundo semestre de 2005.

4.2 Plantio das Populações

Todos os plantios foram realizados em casa-de-vegetação, com temperatura controlada entre 25° a 30° C e em vasos de 4 ou 7 litros. O substrato usado para manter as plantas nos vasos foi preparado adequadamente, sendo coletado solo na camada superficial (até 20 cm), com pH aproximado de 6,5 (ideal para a soja). A cada 100 litros de solo adicionou-se 30 litros de matéria orgânica (estrume de frango curtido), 20 litros de areia grossa e lavada para melhorar a aeração e fertilizante químico na formulação NPK de 00-20-20 conforme análise do solo. Para eliminar fungos, insetos e ervas daninhas foi utilizado Brometo de Metila (0,03 mL para cada 100 litros de solo).

4.2.1 Plantio das populações F2

Para o plantio foram separadas 204 sementes (F1) de cada um dos 7 cruzamentos. Cada conjunto de 204 sementes foi separado em 2 grupos de 102 sementes, originando assim 14 grupos (1.428 plantas) . As sementes de cada grupo foram plantadas em seqüência mas as populações foram distribuídos ao acaso ao longo da casa de vegetação. Os parentais de cada população foram plantados no início e no fim de cada seqüência. Em cada vaso foram semeadas 3 sementes e cada planta germinada foi identificada individualmente. Foi realizada o inoculação do patógeno e depois de confirmada a presença da doença foi realizada a avaliação para a resistência conforme o tipo de lesão. Após a avaliação, a doença foi controlada e foram coletadas folhas de cada exemplar. Todas as plantas foram mantidas para se autofecundarem. Cada planta foi colhida e trilhada individualmente.

4.2.2 Plantio das progênies F_{2:3}

Cerca de 20 sementes de cada uma das plantas F2 foram utilizadas para se fazer o teste de progênie. Esse número foi escolhido com base nos dados estatísticos que fornecem a probabilidade de se ocorrer uma determinada combinação genotípica. Cada progênie de 20 sementes foi plantada no mesmo vaso, que estava identificado com o número de sua planta F2 genitora. Foi realizada a inoculação do patógeno e cada vaso foi avaliado analisando qual progênie estava segregando, qual não segregava para resistência e qual não segregava para suscetibilidade. O objetivo desse teste foi identificar os genótipos homozigotos e heterozigotos das plantas F2 e também para apoiar as hipóteses do tipo de herança formuladas em F2. A partir desses dados foram feitos "bulks" das plantas F2 homozigotas distintas.

4.3 Inoculação do patógeno e avaliação dos materiais.

O fungo causador da ferrugem é um parasita obrigatório, portanto o patógeno foi mantido em plantas de soja suscetíveis, em casa-de-vegetação.

A inoculação foi feita quando as plantas estavam em estágio de desenvolvimento vegetativo V3/V4. Para a inoculação, os uredósporos foram coletados lavando-se a superfície abaxial das folhas infectadas com ajuda de pincel e suspensos em água destilada contendo tween 20 (0,1 mL/L) até se obter uma concentração de 50×10^3 esporos por mL. A solução resultante foi pulverizada manualmente sobre as plantas até o “ponto de gotejo”. Essa inoculação do patógeno sempre foi feita ao anoitecer, período em que as condições ambientais estão mais propícias para o desenvolvimento do fungo (alta umidade e temperaturas amenas). Aos 15 dias após a inoculação as plantas foram avaliadas visualmente de acordo com o tipo de lesão apresentada.

Depois de feitas as avaliações para reação à ferrugem, a doença era controlada com o uso de IMPACT[®], um fungicida sistêmico do grupo químico triazol. O produto foi diluído em água (3 mL / L) e aplicado cerca de 10 mL por vaso.

4.4 Estimativa do tipo de Herança de cada material

O controle genético do caráter foi hipotetizado observando-se os dados da segregação das populações F2 e das progênes F_{2.3}. Como as fontes de resistência eram distintas, foi formulada uma hipótese de herança para cada caso. As hipóteses foram testadas pelo teste do qui-quadrado e foi estabelecido um grau de confiança de 95% ou seja, as hipóteses foram aceitas quando a probabilidade de que os desvios eram consequência do acaso fosse maior que 5%.

4.5 Coleta de folhas para extração de DNA

Folhas saudáveis, jovens, e sem a presença de lesões foram coletadas dos 8 parentais e de todas as plantas das populações F2. As folhas coletadas foram inseridas com a devida identificação em embalagens próprias para liofilização, feitas em tela com poros finos o suficiente para permitir a saída da água mas evitar eventual mistura dos materiais. Logo após coletadas, foram congeladas em nitrogênio líquido e depois armazenadas em freezer à -80° C.

4.6 Liofilização e moagem

As amostras de folhas foram liofilizadas em Liofilizador “FreeZone 12 liter” da marca LabConco (Kansas, USA). Cada amostra foi retirada do freezer -80°C e colocada em nitrogênio líquido para permanecer congelada enquanto os frascos de liofilização eram preparados. As amostras ficaram submetidas ao processo de liofilização por 72h. Durante a liofilização a temperatura do coletor permaneceu em -44°C e o vácuo manteve-se inferior a 180×10^{-3} mBAR.

Depois de liofilizadas as folhas foram moídas em triturador Janke and Kunkel A-10[®] (Alemanha) e armazenadas em frascos de polietileno protegidas da umidade em mantidas em câmara fria a 10°C .

4.7 Extração de DNA

A extração de DNA foi baseada no método proposto por SHAGAI- MAROOF et al., (1984), com algumas modificações.

Cerca de 30 mg de amostra liofilizada foram transferidas para microtubos com capacidade para 2 mL. Foi realizada a adição de tampão de extração previamente aquecido a 68°C na proporção de 3 vezes o volume da amostra [100 mM tris, pH 7,5, 700 mM NaCl, 50 mM EDTA pH 8,0, 1% (m/v) brometo de trimetil N-cetil amônio (CTBA), 140 mM β -mercaptoetanol]. A suspensão foi incubada a 65°C por 60 minutos, com agitação contínua. Após incubação, adicionou-se 0,45 mL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e as amostras foram gentilmente agitadas por 5 minutos e em seguida centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e a extração com clorofórmio foi repetida. A fase aquosa foi novamente pipetada para um novo tubo contendo 25 μL de RNase A (10 mg/mL) e incubada por 30 minutos a temperatura ambiente. O DNA foi então precipitado com a adição de 0,6 mL de isopropanol e a solução foi centrifugada a 13000 rpm por 5 minutos, descartando-se em seguida o sobrenadante e adicionando-se 0,5 mL de etanol 70% para lavar o “pellet”. Foi realizada uma nova centrifugação e descarte do sobrenadante e então o DNA precipitado foi ressuspenso em 0,5 mL de TE 1x (10 mM TRIS/ 1 mM EDTA pH 7,5). Para se obter um DNA de maior pureza, foi realizada uma extração com 0,5 mL de fenol

equilibrado, seguida de centrifugação a 13.000 rpm por 10 minutos e transferência da fase aquosa para um novo tubo. Foi realizada mais uma extração com 0,5 mL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e a fase aquosa transferida para um novo tubo no qual o DNA foi precipitado com a adição de 50 μ L de NaCl 5 M e 1,250 mL de Etanol absoluto. Os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. Por fim o "pellet" foi lavado com 0,4 mL solução de lavagem 1 (76% Etanol, 0,2 M Acetato de Sódio) e depois com 0,2 mL de solução de lavagem 2 (76% Etanol, 10mM Acetato de Amônio). O sobrenadante foi descartado e o DNA suspenso em 0,1 mL de TE 1x e as amostras armazenadas a 4°C.

A concentração do DNA foi estimada após feita a eletroforese em gel de agarose 0,7%, comparando-se a intensidade das bandas com a banda de concentração conhecida de DNA do fago λ .

4.8 Amplificação dos loci de microssatélites

PCRs ("PCR- Polimerase chain reaction" – Reação de polimerização em cadeia) foram realizadas para cada amostra, em termociclador PTC -200 (MJ Research). Para as reações foi utilizado de 1,0 μ L de DNA molde (10ng/ μ L); 2,0 μ L de tampão de reação 10x (100mM de Tris-HCl pH 8,3; 500mM de KCl e 400 μ L de água MilliQ); 1,0 μ L de MgCl₂ (50mM); 0,5 μ L de dNTP's (2,5mM); 0,3 μ L de Taq DNA polimerase (5U/ μ L) e 1,0 μ L dos "primers" [0,5 μ L forward e 0,5 μ L reverse (5 μ M)], completando-se com água MilliQ para o volume final de 20 μ L. Foi realizada uma reação para cada tratamento (combinação genótipo x marcador microssatélite).

O programa de termociclagem para amplificação foi composto de desnaturação inicial a 94°C por 7 minutos seguidos de 35 ciclos de :

- desnaturação a 94°C por 1 minuto,
- anelamento (ciclos de 62 ° C, 57 ° C, 55 ° C ou 52 ° C ,conforme a T_m dos "primers") por 1 minuto,
- extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos.

Um ciclo de 72°C por 7 minutos foi feito no final.

Para encontrar marcadores polimórficos entre os genótipos parentais foram utilizados 108 pares de primers previamente escolhidos a partir do mapa de ligação

da soja publicado por CREGAN et al. (1999). Os 108 “primers” estão distribuídos uniformemente entre os 20 grupos de ligação da soja e cobrem todo o genoma. A seqüência de cada um pode ser visualizada no site www.soybase.org.

4.9 Separação e visualização dos fragmentos

Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose MetaPhor[®] (Cambrex) 4% preparado em TAE 1x. Esse gel permite visualizar produtos que diferem em tamanho por 2%, em uma extensão de 50 pb a 800 pb. Dessa forma, por exemplo, um fragmento de DNA 200 pb pode ser separado de um fragmento de 204 pb. O corante Brometo de Etídio foi adicionado a mistura do gel (1 uL de Brometo a 10 mg/mL para cada 10 mL de solução de agarose). Os 8 produtos de amplificação de cada “primer” (1 de cada genótipo) foram aplicadas no gel lado a lado. O tempo de corrida foi de 2 h a voltagem constante de 120 V. A visualização dos géis foi feita em transiluminador UV para confirmar a amplificação e a aquisição das imagens para análise foi feita através do scanner Typhoon[®] da Molecular Dynamics (CA, USA).

4.10 Análise da diversidade genética dos parentais

A análise da variabilidade genética foi feita utilizando-se o programa TFPGA (“Tools for Population Genetic Analyses”), disponível no site <http://bioweb.usu.edu/mpmbio/>. Foi utilizado o coeficiente de similaridade de Nei (1972) para calcular a similaridade entre as linhagens utilizando-se como base os dados de amplificação dos loci de microssatélite. Foram escolhidos ao acaso 40 “primers”. Para o cálculo do coeficiente, cada “primer” equivale a um locus – 40 loci - e as bandas amplificadas de cada “primer” referem-se aos alelos. Quanto mais bandas 2 linhagens tiverem em comum, maior a semelhança entre elas e maior é o índice de similaridade. As unidades (linhagens) foram agrupadas pelo método UPGMA, um modelo de agrupamento hierárquico que permite a construção de dendrogramas.

5. RESULTADOS

Os materiais utilizados neste trabalho estão catalogados no banco de germoplasma da empresa com o código ER06 10.80_ e dessa forma serão tratados aqui. ER06 10.801 equivale ao parental suscetível e ER06 10.802 a 10.808 às 7 fontes de resistência exóticas. Em alguns momentos os materiais serão tratados simplesmente pelo número 1 a 8 respectivamente.

5.1 Avaliação das populações F2 e progênes F_{2:3}

No processo de avaliação das populações F2, os genótipos foram considerados resistentes quando apresentavam exclusivamente lesões marrom-avermelhada (RB) e os suscetíveis, lesões castanho claras (TAN). Durante a avaliação das progênes tomou-se o cuidado em identificar se eram segregantes ou se não segregavam para resistência ou suscetibilidade. Assim, foram obtidos os resultados apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Dados da avaliação fenotípica do tipo de lesão e da segregação das progênes.

Cruzamento	Resultado da Avaliação						
	População F2			Progênie F _{2:3}			
ER06 10.801X	Resist.	Susctet	Total	Todas Resist.	Segregante	Todas Susct.	Total
10.802	43	152	195	65	98	36	199
10.803	166	33	199	52	89	49	190
10.804	150	49	199	51	66	34	151
10.805	158	43	201	60	91	40	191
10.806	53	148	201	56	90	50	196
10.807	113	91	204	39	120	43	202
10.808	123	64	187	19	111	69	199

5.2 Hipóteses de Herança

As proporções observadas em F2 e o padrão de segregação apresentado nas progênes foram utilizados para formular as hipóteses sobre o mecanismo de herança e estas hipóteses foram testadas pelo teste de significância do qui-quadrado para verificar a conformidade com as proporções esperadas. Na população F2 o grau de liberdade é 1, portanto, utilizando uma confiança de 95%, o somatório de $(O-E)^2/E$ não pode ser maior que 3,841 para se aceitar a hipótese. Em F_{2:3} o grau de liberdade é 2 logo, para valores acima de 5,991 as hipóteses são rejeitadas.

5.2.1 Resistência governada por 1 gene dominante :

Segregação esperada em F2 de 3 resistentes para 1 suscetível e de 1 homocigoto resistente, 2 heterocigotos e 1 homocigoto recessivo nas progênes F_{2:3}, conforme apresentado nas tabelas 2 a 5.

Tabela 2. Teste do χ^2 do cruzamento ER06 10.801x ER06 10.803 para verificar a conformidade das segregações observadas com as esperadas a partir da hipótese inicial de um gene dominante.

10.801 x 10.803	Teste do χ^2						
	População F2			Progênie F _{2:3}			
	Resist.	Suscet	Total (Σ)	Homocigotas Resistentes	Heterocigot	Homocigotas Suscetíveis	Total (Σ)
Observado	166	33	199	52	89	49	190
Esperado	149	50	199	47,5	95	47,5	190
$(O-E)^2/E$	1,939	5,780	7,719	0,426	0,379	0,0473	0,852
Significância	Valor de P Significativo			Valor de P não Significativo			

Tabela 3. Teste do χ^2 do cruzamento ER06 10.801x ER06 10.804 para verificar a conformidade das segregações observadas com as esperadas a partir da hipótese inicial de um gene dominante.

10.801 x 10.804	Teste do χ^2						
	População F2			Progênie F 2:3			
	Resist.	Suscet	Total (Σ)	Homozigotas Resistentes	Heterozigot	Homozigotas Suscetíveis	Total (Σ)
Observado	150	49	199	51	66	34	151
Esperado	149	50	199	38	75	38	151
(O-E) ² /E	0,00671	0,0200	0,0871	4,447	1,080	0,421	5,948
Significância	Valor de P não Significativo			Valor de P não Significativo			

Tabela 4. Teste do χ^2 do cruzamento ER06 10.801x ER06 10.805 para verificar a conformidade das segregações observadas com as esperadas a partir da hipótese inicial de um gene dominante.

10.801 x 10.805	Teste do χ^2						
	População F2			Progênie F 2:3			
	Resist.	Suscet	Total (Σ)	Homozigotas Resistentes	Heterozigot	Homozigotas Suscetíveis	Total (Σ)
Observado	158	43	201	60	91	40	191
Esperado	151	50	201	48	95	48	191
(O-E) ² /E	0,324	0,980	1,304	3,000	0,169	1,333	4.502
Significância	Valor de P não Significativo			Valor de P não Significativo			

Tabela 5. Teste do χ^2 do cruzamento ER06 10.801 x ER06 10.808 para verificar a conformidade das segregações observadas com as esperadas a partir da hipótese inicial de um gene dominante.

10.801 x 10.808	Teste do χ^2						
	População F2			Progênie F 2:3			
	Resist.	Suscet	Total (Σ)	Homozigotas Resistentes	Heterozigot	Homozigotas Suscetíveis	Total (Σ)
Observado	123	64	187	19	111	69	199
Esperado	140	47	187	50	199	50	199
(O-E) ² /E	2,064	6,149	8,213	19,220	1,454	7,220	27,894
Significância	Valor de P Significativo			Valor de P Significativo			

5.2.2 Resistência governada por 1 gene recessivo:

Segregação esperada em F2 de 3 suscetíveis para 1 resistente e de 1 homocigoto resistente, 2 heterocigotos e 1 homocigoto recessivo nas progênies F_{2:3}, conforme apresentado nas tabelas 6 e 7.

Tabela 6. Teste do χ^2 do cruzamento ER06 10.801 x ER06 10.802 para verificar a conformidade das segregações observadas com as esperadas a partir da hipótese inicial de um gene recessivo.

10.801 x 10.802	Teste do χ^2						
	População F2			Progênie F _{2:3}			
	Resist.	Suscet	Total (Σ)	Homocigotas Resistentes	Heterocigot	Homocigotas Suscetíveis	Total (Σ)
Observado	43	152	195	36	98	65	199
Esperado	49	156	195	50	99	50	199
(O-E) ² /E	0,735	0,247	0,982	3,920	0,100	4,500	8,43
Significância	Valor de P não Significativo			Valor de P Significativo			

Tabela 7. Teste do χ^2 do cruzamento ER06 10.801 x ER06 10.806 para verificar a conformidade das segregações observadas com as esperadas a partir da hipótese inicial de um gene recessivo.

10.801 x 10.806	Teste do χ^2						
	População F2			Progênie F _{2:3}			
	Resist.	Suscet	Total (Σ)	Homocigotas Resistentes	Heterocigot	Homocigotas Suscetíveis	Total (Σ)
Observado	53	148	201	56	90	50	196
Esperado	50	151	201	49	98	49	196
(O-E) ² /E	0,180	0,0596	0,239	1,000	0,653	0,0204	1,673
Significância	Valor de P não Significativo			Valor de P não Significativo			

5.2.3 Resistência governada pela interação de 2 genes ocorrendo um caso de epistasia recessiva dupla :

Segregação esperada em F2 de 9 resistentes para 7 suscetíveis e de 1 genótipo não segregando para resistência, 8 segregantes e 7 não segregando para suscetível nas progênes F_{2:3}:

Tabela 8. Teste do χ^2 do cruzamento ER06 10.801 x ER06 10.807 para verificar a conformidade das segregações observadas com as esperadas a partir da hipótese inicial de 2 genes com epistasia recessiva dupla.

10.801 x 10.807	Teste do χ^2						
	População F2			Progênie F _{2:3}			
	Resist.	Suscet	Total (Σ)	Resistentes	Heterozigot	Homozigotas Suscetíveis	Total (Σ)
Observado	113	91	204	39	120	43	202
Esperado	115	89	204	13	101	88	202
(O-E) ² /E	0,0349	0,045	0,0799	52,000	3,574	23,011	78,585
Significância	Valor de P não Significativo			Valor de P Significativo			

5.3 Análise de Polimorfismo

Os produtos de reação de PCR de cada um dos loci avaliados foram fracionados em gel de agarose e as imagens foram digitalizadas , como mostram as figuras 1 a 10.

Figura 1. Placa 1 -primers com a menor Tm acima de 68°C - ciclo de anelamento a 62°C.

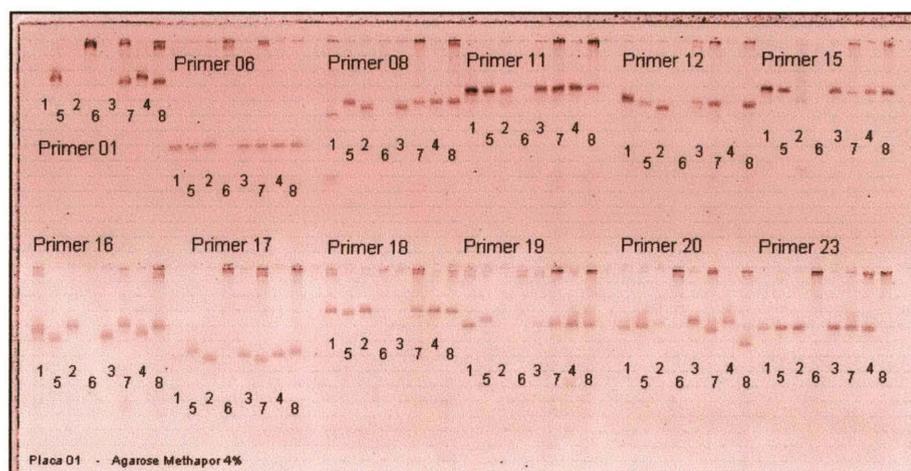


Figura 2. Placa 2 -primers com a menor Tm acima de 68⁰C - ciclo de anelamento a 62⁰C.

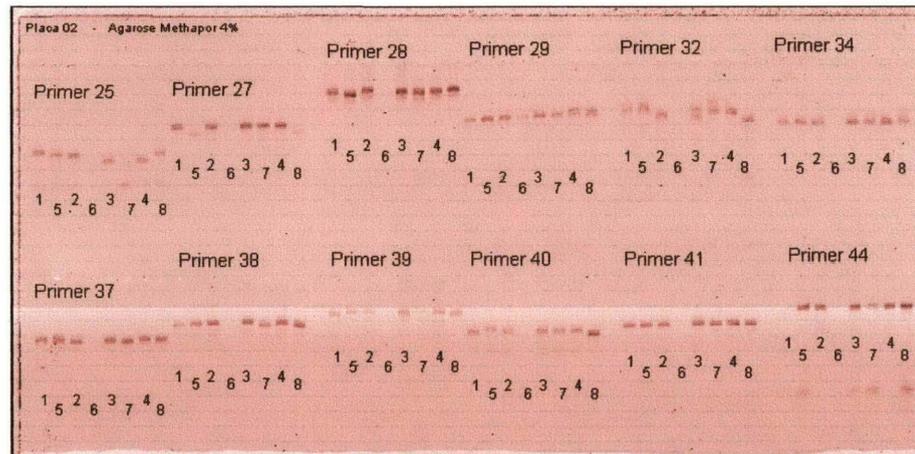


Figura 3. Placa 3 -primers com a menor Tm acima de 68⁰C - ciclo de anelamento a 62⁰C.

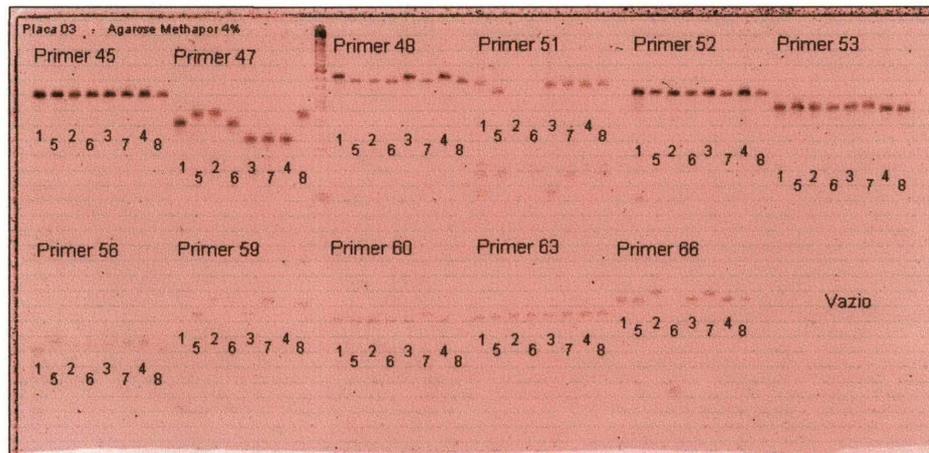


Figura 4. Placa 4 -primers com a menor Tm acima de 68⁰C - ciclo de anelamento a 62⁰C.

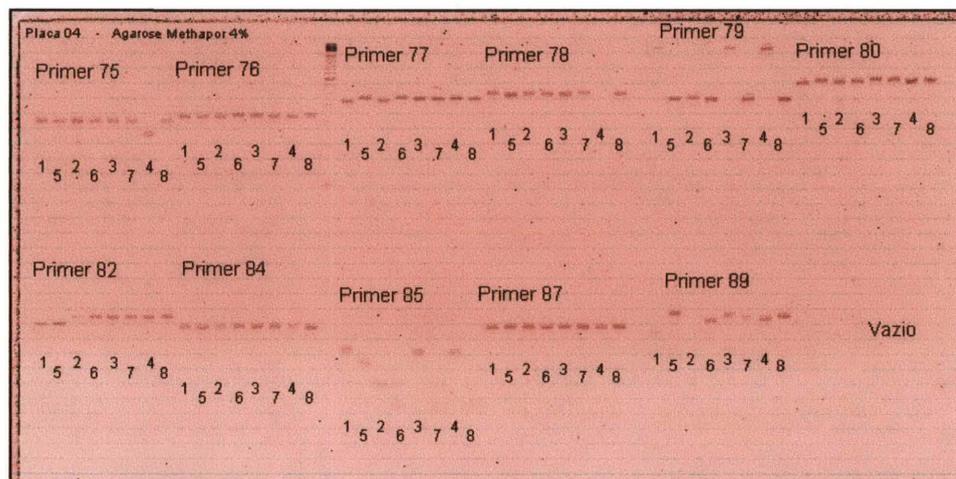


Figura 5. Placa 5 -primers com a menor Tm acima de 68⁰C - ciclo de anelamento a 62⁰C.

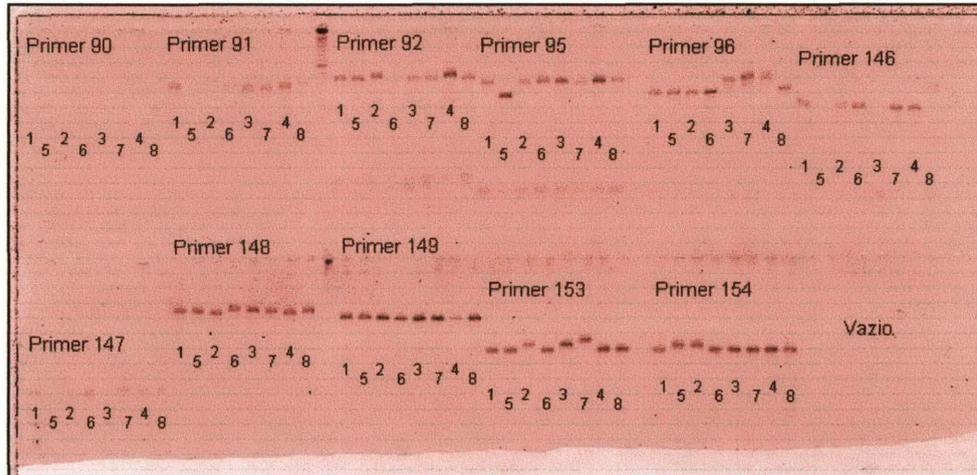


Figura 6. Placa 6 -primers com a menor Tm entre 65 e 67⁰C - Ciclo de anelamento a 57⁰C.

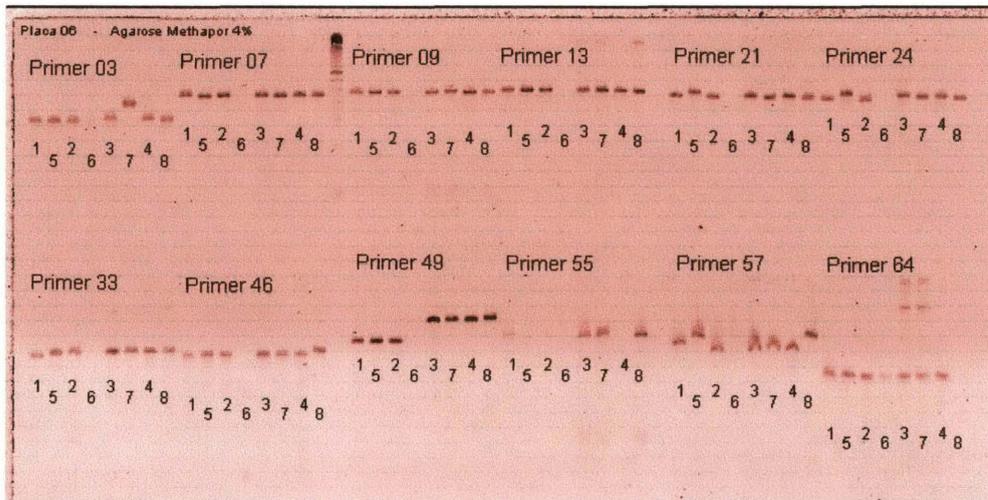


Figura 7. Placa 7 -primers com a menor Tm entre 65 e 67⁰C - Ciclo de anelamento a 57⁰C.

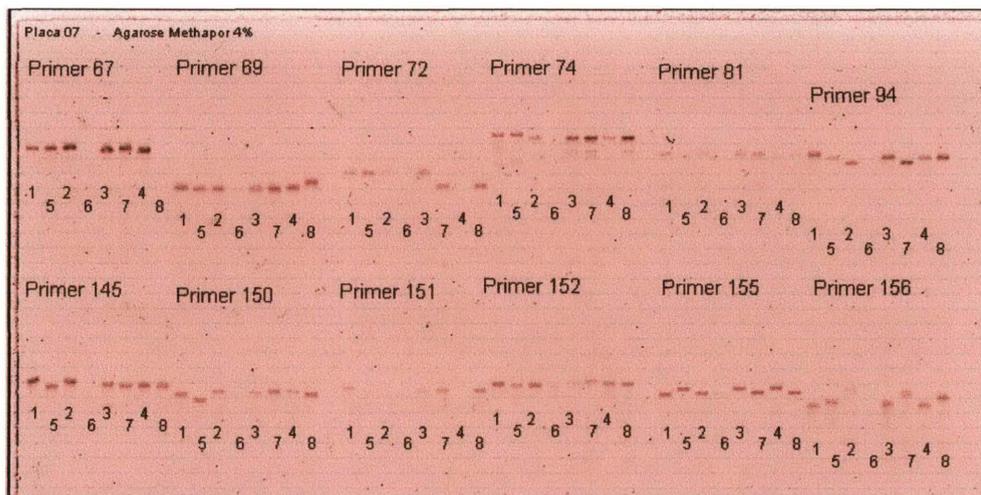


Figura 8. Placa 8 - primers com a menor Tm menor que 65°C - Ciclo de anelamento a 52°C.

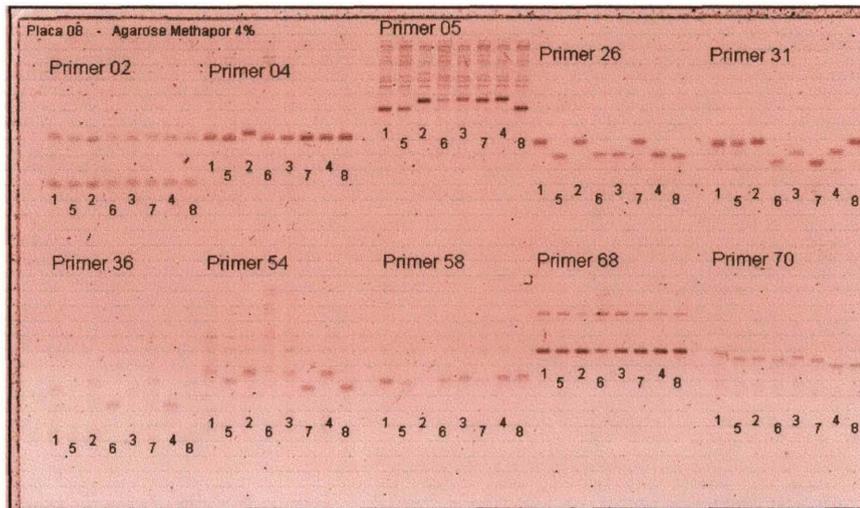


Figura 9. Placa 9 - primers com a menor Tm menor que 65°C - Ciclo de anelamento a 52°C.

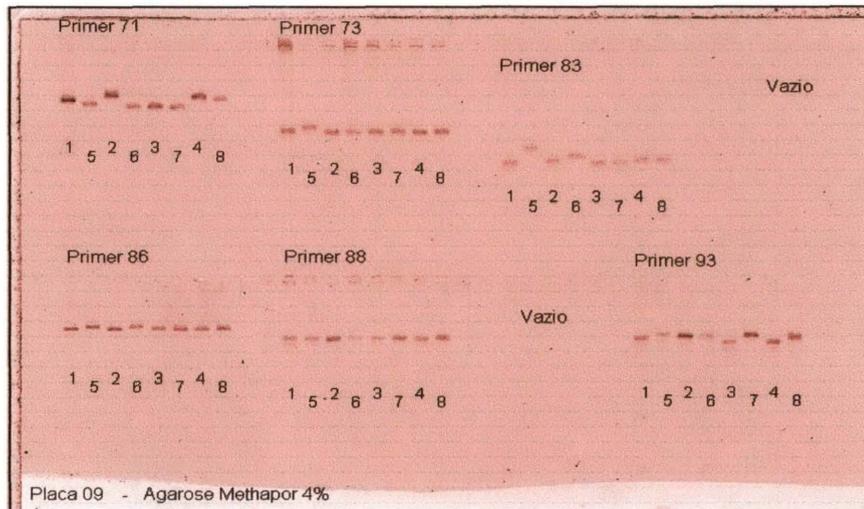
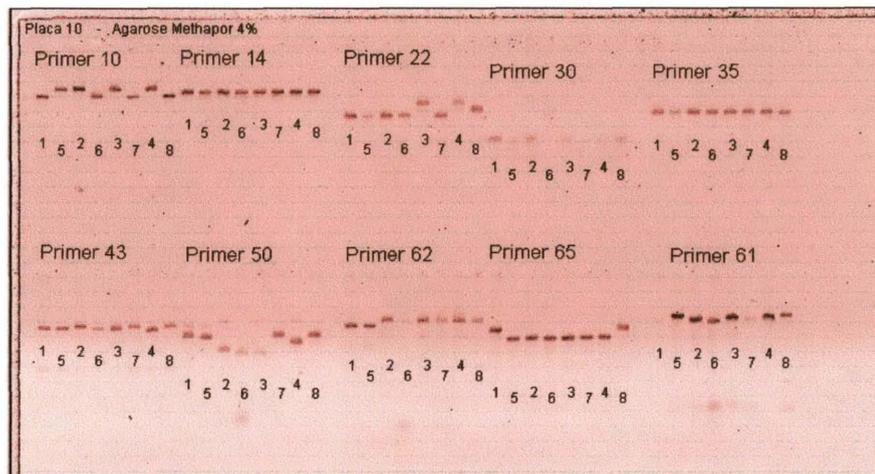


Figura 10. Placa 10 - primers com Tm variando muito entre o Forward e o Reverse - Ciclo de anelamento a 55°C.



24	Satt 453	B1	1	1	3	3	2	n	1	1
25	Satt 577	B2	1	4	3	3	4	n	2	1
26	Satt 126	B2	1	1	2	2	2	2	1	2
27	Satt 467	B2	1	1	1	1	2	n	1	2
28	Satt 416	B2	1	1	1	1	2	n	1	1
29	Satt 601	B2	1	1	1	1	1	1	1	1
30	Satt 066	B2	1	1	1	1	3	2	3	1
31	Satt 063	B2	1	1	2	2	1	3	3	1
32	Satt 565	C1	1	2	2	1	2	n	1	2
33	Satt 396	C1	1	3	3	3	2	n	3	3
34	Satt 578	C1	1	1	1	1	1	n	1	1
35	Satt 399	C1	1	1	1	1	1	1	1	1
36	Sat_ 042	C1	1	3	1	2	1	2	3	1
37	Satt 524	C1	1	1	1	1	1	n	1	1
38	Satt 164	C1	1	1	1	1	1	n	1	1
39	Sat_ 130	C2	1	1	1	1	1	n	1	1
40	Sat_ 062	C2	1	2	1	1	1	1	1	3
41	Satt 291	C2	1	1	1	1	1	n	1	1
42	Satt 170	C2	-	-	-	-	-	-	-	-
43	Satt 332	B1	1	2	1	1	1	1	2	2
44	Satt 450	C2	1	1	1	1	1	n	1	1
45	Satt 286	C2	1	1	1	1	1	1	1	1
46	Satt 319	C2	1	1	1	1	1	n	1	1
47	Satt 460	C2	1	3	2	2	3	1	2	3
48	Satt 202	C2	1	2	1	1	2	2	2	2
49	Satt 357	C2	1	1	2	2	1	n	2	2
50	Satt 184	D1A	1	3	3	2	1	3	1	1
51	Satt 368	D1A	1	n	1	1	2	1	1	1
52	Satt 321	D1A	1	1	1	1	1	1	1	1
53	Satt 203	D1A	1	1	1	1	1	1	1	1
54	Sat_ 036	D1A	1	1	1	1	2	1	3	3
55	Satt 071	D1A	1	1	1	n	1	n	1	1
56	Satt 129	D1A	1	2	2	2	3	2	2	1
57	Satt 216	D1B	1	2	2	2	3	3	2	3
58	Satt 095	D1B	1	2	1	1	2	1	1	1
59	Satt 157	D1B	1	2	3	3	3	2	2	2
60	Satt 296	D1B	1	1	1	1	1	1	2	3
61	Satt 290	D1B	1	1	1	2	1	1	1	2
62	Satt 546	D1B	1	2	2	2	1	3	2	2
63	Satt 274	D1B	1	1	1	1	1	1	1	1

64	Satt 271	D1B	1	1	2	1	1	1	2	n
65	Satt 135	D2	1	2	2	2	2	2	2	1
66	Satt 372	D2	1	3	1	1	1	2	4	1
67	Satt 154	D2	1	1	1	1	1	n	1	n
68	Satt 447	D2	1	1	1	1	1	1	1	1
69	Satt 461	D2	1	1	1	1	1	1	1	2
70	Sat_ 001	D2	1	2	4	3	2	2	2	3
71	Satt 186	D2	1	3	2	4	5	2	2	1
72	Satt 386	D2	1	1	1	1	1	n	2	2
73	Satt 212	E	1	1	1	1	2	1	1	1
74	Sat_ 112	E	1	2	2	2	1	n	2	2
75	Satt 384	E	1	1	1	2	1	1	1	1
76	Satt 573	E	1	1	1	1	1	1	1	1
77	Satt 204	E	1	1	1	1	2	2	1	1
78	Satt 369	E	1	1	1	n	1	1	1	1
79	Satt 230	E	1	2	1	1	2	2	2	2
80	Satt 146	F	1	1	1	1	1	1	1	1
81	Satt 160	F	1	1	1	2	2	1	1	1
82	Satt 516	F	1	2	2	2	1	2	2	2
83	Satt 114	F	1	4	1	4	2	3	1	4
84	Satt 334	F	1	1	1	1	1	1	1	1
85	Satt 510	F	1	3	1	1	2	3	3	3
86	Sct_ 188	F	1	1	1	1	2	2	1	1
87	Satt 144	F	1	1	1	1	1	1	1	1
88	Satt 218	F/G	1	1	1	1	1	1	1	1
89	Sat_ 074	G	1	n	2	4	3	5	4	2
90	Satt 038	G	N	n	n	n	n	n	n	n
91	Satt 131	G	1	2	1	1	n	1	1	1
92	Satt 394	G	1	2	1	2	1	1	1	1
93	Satt 303	G	1	2	3	3	4	2	2	1
94	Satt 505	G	1	2	3	3	3	n	2	3
95	Satt 288	G	1	1	1	1	2	1	1	1
96	Satt 472	G	1	1	3	3	1	1	3	2
145	Satt 521	N	1	1	2	2	2	2	2	2
146	Satt 091	N	1	1	2	1	n	1	1	3
147	Satt 410	M	1	1	2	2	n	1	2	2
148	Satt 132	J	1	2	1	2	1	3	1	1
149	Satt 492	O	1	1	1	1	1	1	1	1
150	Satt 259	O	1	2	1	2	3	n	2	1

151	Satt 420	O	1	2	2	n	2	n	2	2
152	Satt 478	O	1	1	1	1	1	2	3	1
153	Satt 477	O	1	2	2	1	1	1	3	1
154	Satt 581	O	1	2	1	1	2	1	1	1
155	Satt 153	O	1	1	2	2	2	1	1	1
156	Sat_ 109	O	1	2	1	1	3	n	4	5

Devido ao fenômeno de recombinação, as regiões que circunvizinham o locus de interesse podem ser distintas. Logo, o marcador que é polimórfico entre o cruzamento 01 e 02 pode não ser polimórfico entre 01 e 03, mesmo estando no genoma o mesmo gene ou alelo. Por isso, as fontes de resistência foram comparadas uma a uma com o parental suscetível (ER06 10.801) e identificados primers polimórficos para cada cruzamento. No entanto, marcadores como Satt377, Satt396, Satt216, Satt157, Satt303, Satt505, Sat_001 e Sat_074 são muito informativos e úteis em todos os cruzamentos por serem polimórficos entre todas as populações. Na tabela 10 estão relacionados todos os “primers” que produziram bandas polimórficas para cada cruzamento.

Tabela 10. Lista dos “primers” polimórficos para cada um dos 7 cruzamentos

10.802	10.803	10.804	10.805	10.806	10.807	10.808
Satt050	Satt385	Satt385	Satt187	Satt385	Satt155	Satt377
Satt385	Satt589	Satt187	Satt377	Satt216	Satt385	Satt538
Satt225	Satt187	Satt377	Satt409	Satt066	Satt377	Satt197
Satt589	Satt377	Satt409	Satt538	Satt063	Satt409	Satt444
Satt187	Satt409	Satt538	Satt429	Sat_042	Satt197	Satt216
Satt377	Satt538	Satt197	Satt426	Satt202	Satt577	Satt467
Satt455	Satt197	Satt444	Satt453	Satt184	Satt066	Satt565
Satt409	Satt444	Satt453	Satt577	Satt129	Satt063	Satt396
Satt519	Satt453	Satt577	Satt126	Satt216	Satt396	Sat_062
Satt577	Satt577	Satt126	Satt467	Satt157	Sat_042	Satt332
Satt565	Satt126	Satt063	Satt416	Satt546	Satt332	Satt460
Satt396	Satt063	Satt396	Satt066	Satt135	Satt460	Satt202
Sat_042	Satt565	Sat_042	Satt396	Satt372	Satt202	Satt357
Sat_062	Satt396	Satt460	Satt460	Sat_001	Satt357	Sat_036
Satt332	Satt460	Satt357	Satt202	Satt186	Sat_36	Satt216
Satt460	Satt357	Satt184	Satt368	Satt204	Satt129	Satt157
Satt202	Satt184	Satt129	Sat_36	Satt230	Satt216	Satt296
Satt184	Satt129	Satt216	Satt129	Satt516	Satt157	Satt290
Satt129	Satt216	Satt157	Satt216	Satt114	Satt296	Satt546

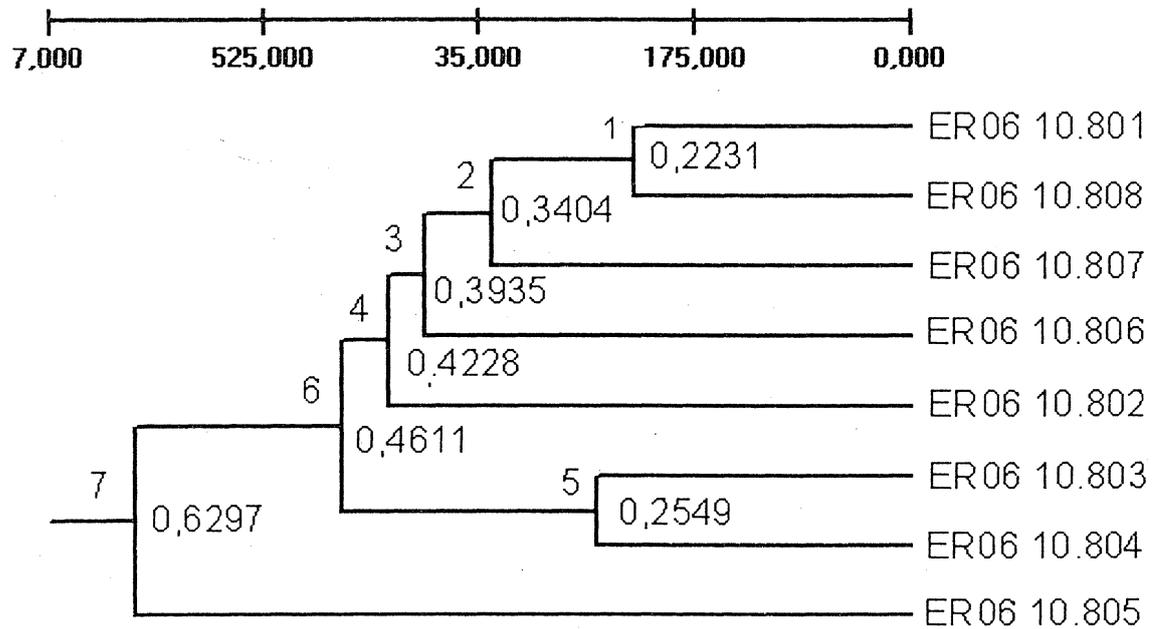
Satt216	Satt157	Satt290	Satt095	Satt510	Satt546	Satt461
Satt95	Satt546	Satt546	Satt157	Sct188	Satt271	Sat_001
Satt157	Satt271	Satt135	Satt135	Sat_074	Satt135	Satt386
Satt546	Satt135	Sat_001	Sat_001	Satt303	Satt372	Sat_112
Satt135	Sat_001	Satt186	Satt186	Satt521	Sat_001	Satt230
Satt372	Satt186	Sat_112	Satt212	Satt132	Satt186	Satt516
Sat_001	Sat_112	Satt384	Satt204	Satt478	Satt386	Satt114
Satt186	Satt516	Satt160	Satt230		Sat_112	Satt510
Sat_112	Sat_074	Satt516	Satt160		Satt230	Sat_074
Satt230	Satt303	Satt114	Satt114		Satt516	Satt505
Satt516	Satt505	Sat_074	Satt510		Satt510	Satt472
Satt114	Satt472	Satt394	Sct188		Sat_074	Satt521
Satt510	Satt521	Satt303	Sat_074		Satt303	Satt091
Satt131	Satt091	Satt505	Satt303		Satt505	Satt410
Satt394	Satt420	Satt472	Satt505		Satt472	Satt420
Satt303	Satt477	Satt521	Satt288		Satt521	Sat_109
Satt505	Satt153	Satt410	Satt521		Satt410	
Satt132		Satt132	Satt259		Satt259	
Satt259		Satt259	Satt420		Satt420	
Satt420		Satt153	Satt581		Satt478	
Satt477			Satt153		Satt477	
Satt581			Sat_109		Sat_109	
Sat_109						

5.4 Análise da diversidade Genética

Para a entrada de dados no programa TFPGA, cada "primer" foi considerado como um locus, portanto 40 loci analisados. As bandas de cada locus referem-se aos alelos. O número máximo de alelos que ocorreram para um mesmo locus foi 4. Cada parental foi considerado uma população, logo temos 8 populações. A população é diplóide e o marcador SSR é codominante. Na matriz de dados a ser analisada pelo programa, cada material deve ser colocado em uma linha. Primeiro é colocado o número da população, depois um espaço e o genótipo separado por vírgulas. No final é necessário colocar uma linha com 0 para indicar o fim da entrada de dados.

5.5.3 Agrupamento pelo método UPGMA (“Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average”):

Figura 11. Dendograma gerado a partir da matriz de dados e do cálculo de similaridade de acordo com o coeficiente de Nei (1972).



6. Discussão

Dentro de um programa de melhoramento, para tentar solucionar problemas que estão constantemente surgindo como a ferrugem no Brasil, é fundamental acessar a diversidade existente, seja dentro da espécie ou em outro ser vivo. Tal diversidade, frequentemente é encontrada no centro de origem primária onde existe um grande número de genótipos selvagens que já estão submetidos à seleção natural a milhares de anos.

As fontes de resistência usadas nesse trabalho são oriundas de diversas regiões do continente asiático. ER06 10.805 é uma linhagem adaptada, proveniente de Taiwan e por isso está mais afastada de todas as outras fontes, como mostra o dendograma. Tal fato era esperado também para ER06 10.801, que é uma cultivar adaptada às condições brasileiras, mas o índice de similaridade aproximou este material de ER06 10.808, um genótipo selvagem coletado no Japão em 1956. Para esclarecer essa discrepância será necessário estudar a genealogia da cultivar. Assim como ER06 10.808, ER06 10.802, 10.803, 10.804 e 10.806 também são materiais selvagens coletados no Japão por volta de 1950 e todos eles são agrupados pelo método do UPGMA como possuindo o mesmo ancestral, sendo que 10.803 e 10.804 estão mais próximos entre si que do restante do grupo. ER06 10.807 é proveniente da Indonésia e embora classificado junto ao grupo anterior, é colocado em um ramo isolado. É provável que este genótipo tenha derivado do mesmo ancestral de ER06 10.806.

Além da diversidade mostrada pelo dendograma e índice de similaridade, os resultados obtidos para a segregação em F₂ e em F_{2:3} também mostram que é grande a variabilidade para o caráter em questão, visto que foram encontradas diversas formas de controle para a resistência ao patógeno. Das sete fontes testadas, ER06 10.804 e 10.805 não apresentaram uma proporção observada significativamente diferente do modelo esperado. ER06 10.803 diferiu do modelo em F₂, mas se adequou as proporções em F_{2:3}. Por serem mais confiáveis os dados da progênie, fica evidenciado que nesses três casos, a resistência envolve dominância completa. Esse resultado não surpreende, visto que a literatura indica que são quatro genes dominantes independentes responsáveis pelo caráter (BROMFIELD e HARTWIG, 1980), (BROMFIELD e MECHING, 1982) (MCLEAN e BYTH 1980),

(HARTWIG, 1986). Contudo, ER06.10.808 é citado como contendo um desses 4 genes mas a proporção fenotípica observada diferiu significativamente da proporção 3:1, o que leva a concluir que existem outros fatores atuando nesse material, não sendo excluídas a possibilidade de outro gene ou da ação complementar de outros genes. No entanto serão necessários estudos complementares para o caso.

A evidência de um gene de resistência recessivo presente em ER06 10.802 e 10.806 nunca foi citada na literatura é uma novidade não apenas para a ferrugem. LI et. al. (2001) apresentam que até aquele momento, em plantas, muitos genes de resistência dominantes já foram clonados ao contrário dos genes de resistência recessivos, que são poucos. YAN e CHEN (2006), estudando um gene recessivo que confere resistência à ferrugem em cevada, lançou uma hipótese que o alelo suscetível dominante pode ser a forma selvagem do gene e o alelo recessivo pode ser uma deleção do locus. Três genes de resistência recessivos já caracterizados aparentam produzir produtos diferentes e ter diferentes funções daquelas conhecidas nos genes dominantes que compartilham domínios conservados (CHU et al., 2004). Existe então a expectativa de que o gene recessivo condicione uma forma de resistência vertical alternativa e possivelmente mais duradoura.

A fonte ER06 10.807, apesar de ter se adequado a proporção fenotípica de 9:7 na segregação de F₂, apresentou uma alta diferença da segregação esperada na progênie F_{2:3}. Embora BURDON (1988) tenha observado a segregação de 9:7 em um genótipo de *Glycine canescens* submetida a infecção de uma raça australiana específica (R4) do fungo, são pequenas as chances de se tratar do mesmo gene ou que o fungo utilizado no presente trabalho seja da mesma raça. Portanto, o teste com este genótipo será refeito.

Apesar de terem sido encontrados diferentes mecanismos para a resistência, ainda não foi possível dizer se foram identificados diferentes alelos do mesmo gene nas fontes ER06 10.802; 10.803; 10.804; 10.805; 10.806 e 10.808, se estes alelos pertencem a alguns dos loci descritos na literatura ou se pertencem a loci diferentes. Como foi quebrada a resistência conferida por Rpp1 e Rpp3, não será possível testar esses loci. Porém testes de alelismo já estão sendo feitos para Rpp2 e Rpp4. Durante esses testes, os marcadores moleculares serão utilizados, visto que já foram publicados trabalhos identificando marcadores de SSR ligados aos genes Rpp2 e Rpp4

DA SILVA et al. (2006a) mapearam o gene *Rpp2* no grupo de ligação J, estando a 10,4 cM dos microssatélites Satt456, Satt280, Satt406, a 9,9 cM do marcador Satt366 e a 8,6 cM do Sct_001. Apesar dessas distâncias serem altas para serem confiáveis no melhoramento assistido, MICHELMORE et al, (1991) relataram que o limite de detecção de um gene é de 25 cM. Sendo assim, o marcador Satt132, identificado no trabalho como polimórfico para o cruzamento envolvendo 10.802, 10.804 e 10.806, será útil para confirmar se a resistência dessas fontes está ou não no locus *Rpp2* pois este marcador está a 0,99 cM do Satt406, 0,48cM do Satt280 e a 1,65cM do Satt456 e portanto em torno de 10 cM distante do gene.

O gene *Rpp4*, estudado por DA SILVA et al. (2006b), foi mapeado no grupo de ligação G da soja, situado a 21,8 cM do microssatélite Satt191, a 12,3 cM do marcador AF16283 e a 1,6cM do marcador Satt288. O cruzamento envolvendo ER06 10.805 apresentou-se polimórfico entre os parentais o marcador Satt288, o que resultará em um dado preciso para confirmar a identificação do gene como o *Rpp4*. Para os outros cruzamentos, mesmo identificados outros primers no grupo G, o marcador Satt505 será usado no teste pelo fato de ele ser polimórfico entre todos os parentais e estar localizado a 13,77 do marcador Satt288 e provavelmente a 12,7 cM do gene.

Com a relevante identificação dos marcadores polimórficos entre os parentais realizada neste trabalho, e também com a obtenção das populações F2 segregantes, aliada à informação de quais indivíduos são homozigotos e quais são heterozigotos, na seqüência deste trabalho será conduzida a técnica de BSA (MICHELMORE et al, 1991) para correlacionar nas 7 populações, um marcador com o locus de interesse. Por essa técnica, os indivíduos homozigotos contrastantes para a característica de interesse serão reunidos em 2 "bulks" – um resistente e outro suscetível. Já que a divisão dos "bulks" é feita levando em conta apenas a resistência, sendo que todos os outros genes são agrupados ao acaso, teoricamente o "background" genético se iguala entre os 2 grupos, com exceção dos loci envolvidos na resistência. Sendo assim, um marcador polimórfico entre os parentais que se mantenha polimórfico entre os 2 "bulks" tem uma grande possibilidade de estar associado ao gene que governa a característica de interesse.

Caso seja identificado algum marcador polimórfico entre os “bulks”, a região do marcador será saturada com outros marcadores e serão realizados testes estatísticos para confirmar a associação, mapear e delimitar a distância entre o marcador e o gene ou QTL.

7. Conclusões

A maioria fontes de resistência à ferrugem usadas neste trabalho foi encontrada no Japão, centro de origem da doença. Foi mostrado que são diversas as fontes para se controlar a doença ou mesmo diminuir seus efeitos mas pelo fato do patógeno apresentar grande capacidade de gerar novas raças a busca por fontes de resistência deverá ser contínua.

Foi demonstrado que não estão atuando apenas os genes dominantes maiores de resistência vertical citados na literatura. É possível que outros alelos ou outros genes estejam presentes, interagindo de formas diferentes com o patógeno e conferindo outras formas de resistência. Até mesmo QTL's conferindo resistência horizontal podem estar envolvidos no controle da doença. Essa informação sobre a disponibilidade de formas alternativas de resistência, além daquelas descritas na literatura, será primordial para se estabelecerem novas estratégias de combate a doença.

Com os dados das progênies $F_{2,3}$ foi possível identificar quais das plantas F_2 eram homozigotas para o caráter resistência e esses dados são essenciais para os próximos testes.

Foram testados 108 primers de microssatélites dos quais 76% apresentaram-se polimórficos entre pelo menos 1 dos parentais. Existe uma alta probabilidade de alguns desses marcadores polimórficos aqui encontrados estarem ligados a esses genes de resistência ou ao menos fornecerem pistas de onde eles estão. Se isso for confirmado, avançaremos um grande passo na tentativa de desenvolver cultivares resistentes. A eficiência de seleção irá aumentar, pois a avaliação dos fenótipos será mais precisa, assim como será possível monitorar a transferência dos genes e estudar as interações dos diferentes genes. Existe ainda a possibilidade de realizar a piramidação de vários genes que conferem a resistência, mapear QTLs e fazer a clonagem posicional dos genes. Dessa forma o trabalho do melhorista terá eficientes ferramentas que encurtarão o caminho para o sucesso.

8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALZATE-MARIN, A. L.; CERVIGNI, G. D. L.; MOREIRA, M. A.; (2005) Marker assisted selection in the development of disease resistant plants, with emphasis on common bean and soybean. **Fitopatologia brasileira**. v.30, no.4, p. 333-342.
- AKKAYA, M.S.; A.A. BRAGWAT; P.B. CREGAN; (1992) Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. **Genetics**, v. 132, p.1131-1139.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P; (2004) **Biologia Molecular da Célula**. 4^a ed. Porto Alegre: Artmed Editora.
- ALLARD, R. W; (1960) **Principles of plant breeding**. John Wiley and Sons, New York.
- ALMEIDA, A.M.R; (2001). Observação de resistência parcial A *Septoria glycines* em soja. **Fitopatologia brasileira**. vol.26 n.2.
- ARIAS C.A.A et al. Melhoramento e biotecnologia: ferrugem da soja. In: **IV CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA**. Realizado entre 05 e 08 de junho de 2006. Londrina [Anais.].
- ARIAS, C.A.A; BROGIN, R.L; YORINORI, J.T; KIIHL, R.A. de S. TOLEDO.; J.F.F; (2003) Um gene dominante determinando a resistência da cultivar FT-2 à ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi*) In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS**,. Porto Seguro. [Anais].
- BONATO, E.R; BONATO, A.L.V. **A soja no Brasil: história e estatística**. Londrina: EMBRAPA/ CNPSo, 1987. 61p (Documentos,21).
- BRIM, C. A.; (1966) A modified pedigree method of selection in soybeans. **Crop Science**, v.6, p.20.
- BROGIN, R,L. **Mapeamento de genes de resistência à ferrugem e de QTL's envolvidos na resistência à Septoriose**. 2005. 93 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, ESALQ/USP, Piracicaba, SP.
- BROMFIELD, K.R.; HARTWIG, E.E; (1960) Resistance to soybean rust and mode of inheritance. **Crop Science**, v20, n.2, p. 254-255.
- BROMFIELD, K.R.; MELCHING, J.S.; (1982) Sources of specific resistance to soybean rust. (**Abstr.**) **Phytopatology**, v.72, p.706.
- BURDON J.J and MARSHALL D.R; (1981) Evaluation of Australian native species of *Glycine* for resistance to soybean rust. **Plant Disease**. V.65, p. 44-45.

BURDON J.J.; (1988) Major gene resistance to *Phakopsora pachyrhizi* in *Glycine canescens*, a wild relative of soybean. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 75, p 923-928.

CAPELLARI JR., L.; RODRIGUES, R. R.; SOUZA, V. C. **Apostila de Botânica Sistemática**. Piracicaba, Departamento de Botânica, ESALQ/USP, 95p. 1999.

CHU ZH, FU BY, LL ZK, ZHANQ F., WANG, SP.; (2004) Targeting the recessive rice gene, *Xa13*, for bacterial blight resistance to a 14.8-kb DNA fragment. In: **Proceedings of the 4th International Crop Science Congress**. Brisbane, Australia. Realizado de 26 de set a 1 de out. Disponível em: http://www.cropscience.org/au/icsc2004/poster/3/2/1/1906_chuz.ht.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. 2006. Indicadores da Agropecuária. **Estimativa de safras**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/download/safra/4lavantamentoPlantio.doc>>. Acesso em 15 de junho. 2006.

CONAGIN, A.;AMBROSANO, G. M. B.; NAGAI, V.; 1997 Poder discriminativo da posição de classificação de dos testes estatísticos na seleção de genótipos. **Bragantia**, v.56, no.2 p.403-417.

CREGAN, P.B.; T. JARVIK; A.L. BUSH.; et. al; (1999) An integrated genetic linkage map of the soybean. **Crop Science**. v. 39 p. 1464-1490.

DA SILVA, D.C.G et. al. (2006a) Mapeamento do gene *Rpp2* que confere resistência à ferrugem asiática da soja. In: **IV CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA**, Londrina Realizado entre 05 e 08 de junho [Resumos].

DA SILVA, D.C.G et. al. (2006b) Mapeamento do gene *Rpp4* que confere resistência à ferrugem asiática da soja. In: **IV CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA**. Londrina, Realizado entre 05 e 08 de junho. [Resumos].

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

FUGANTI, R.; BENEVENTI M. A.; VELOSO J.F; ARIAS C.A. A; et. al; (2004) Identificação de Marcadores Moleculares de Microssatélites para Seleção de Genótipos de Soja Resistentes a *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, v. 28(2), p.125-130,

HARTMAN, G.L.; MILES, M.R.; FREDERICK, R.D; (2005). **Soybean rust: is the U.S. soybean crop at risk?** Disponível em: <http://apsnet.org/online/feature/rust/top.asp>. Acesso em: 19 junho de . 2006.

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

HARTWIG, E.E.; (1986) Identification of a fourth major genes conferring to rust ins soybeans. **Crop Science**, v26, p. 1135-136.

JARNE, P. and LAGODA P.J.L.; (1996) Microsatellites, from molecules to population and back. **Trends in Ecology an Evolution**. v. 11, p. 424-429.

KAWUKI, R.S.; ADIPALA, E.; TUKAMUHABWA, P.; (2003) Yield loss associated with soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.) in Uganda. **J. Phytopathology**, v. 151, p. 7-12.

KELLY, J.D., GEPTS, P., MIKLAS, P.N., COYNE, D.P.; (2003) Tagging and mapping of genes and QTL and molecular marker-assisted selection for traits of economic importance in bean and cowpea. **Field Crops Research**. v.82 p.135-154.

KOGA, L.J.; (2006) **Relação entre medidas de refletância com a área foliar sadia, severidade da ferrugem asiática e produtividade da cultura da soja**, 58p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina.

Li ZK, et al.; (2001) Are the dominant and recessive plant disease resistance genes similar?: a case study of rice R genes and *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* races. **Genetic**, v. 159 p. 757–765.

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

MEDINA, J.C. Introdução e Evolução da Soja no Brasil: Primeiras Notícias da Soja no Brasil. In. Miyasaka, S.; Medina, J.C. (eds.). **A Soja no Brasil**. Campinas: ITAL, 1981. p. 17-24.

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

MORGANTE M.; HANAFEY, M and POWELL, W.; (2002) Microsatellites are preferentially associated with non repetitive DNA in plant genomes. **Nature Genetics**, v. 30, p. 194-2000.

MÜLLER, L. Morfologia, Anatomia e Desenvolvimento. In: Miyasaka, S.; Medina, J.C. (eds.). **A Soja no Brasil**. Campinas: ITAL, 1981. p. 73-104.

O'DONNELL, WT. and WARREN ST; (2002) A decade of molecular studies of fragile X syndrome. **Neurosciences**, v. 25, p. 315-338.

OLIVEIRA E.J et. al.; (2006) Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, pg. 294-307.

OLIVEIRA, J.E.D; (1981). Valor da Soja como Alimento. In: MIYASAKA S.; MEDINA. J.C. **A Soja no Brasil**, Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, pg. 820 -823.

PUTERKA, G.J.; BLACK, W.C.; STEINER, W.M.; BURTON, R.L., (1993). Genetic variation and phylogenetic relationships among worldwide collections of the russian wheat aphid, *Duraphis noxia* (MORKVILKO), inferred from allozyme and RAPD-PCR markers. **Heredity**, London, v. 70, p. 604-618.

SCHLOTTER, C. and HARR, B.; (2000) *Drosophila virillis* has long and highly polymorphic microsatellites. **Molecular Biology and Evolution**, v.17 p. 1641-1646.

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.; (2001) Identification of a new QTL associated with resistance to soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*). **Theoretical and Applied Genetics** v.102 p. 91-96.

SEDIYAMA, T.; PEREIRA, M. G.; SEDIYAMA, C. S.; GOMES, J. L.; (1985) **Cultura da Soja, parte 1**. Minas Gerais: UFV . 96p.

SINCLAIR, J.B. & HARTMAN, G. L.;(1999) Soybean diseases In: Hartman, G.L.; Sinclair, J.B. & Rupe, J.C. (Eds.) Compendium of Soybean Diseases.. **St. Paul. American Phytopathological Society**, 4ed. p.3-4.

SHAGAI-MAROOF M.A., SOLIMAN K.M. JORGENSEN R.A. y ALLARD R.W.; (1984) Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal locations, and populations dynamics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v.81 p. 8014-8018.

SOLLER, M. e BECKMANN, J.S.; (1983). Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement. **Theoretical Applied Genetics** v.67 p. 25-33.

SOUZA, A. P. Biologia Molecular Aplicada ao Melhoramento. In: **Recursos Genéticos e Melhoramento – Plantas**. Luciano L Nass; Afonso C C Valois; Itamar S de Melo; Maria Clélia Valadares-Ingliš. (Org.) 1 ed. Rondonópolis, 2001, v. 1, p. 939-966.

TOTH G. GÁSPARI, Z. and JURKA. J.; (2000) Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. **Genome Research**. v.10, p. 967-981.

VELLO N.A; BROGIN R.L; ARIAS C.A.A; (2002) Estratégias de melhoramento para o controle da ferrugem da soja. **Congresso Brasileiro de Soja**, Londrina.

VIDOR C.; FONTOURA J.U.G.; MACEDO J.; et al. A soja no Brasil In: **Embrapa -Tecnologias de Produção de Soja Região Central do Brasil 2004**. Disponível em:

<<http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/SojanoBrasil.htm>> Acesso em 15 fev. 2006.

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

WU- YANG, ; ZHOU, Y-H. ZHANG, Y.; et al.; (2006) The genetic diversity among *Leymus* species based on random amplified microsatellite polymorphism (RAMP). **Genetic Resources and Crop Evolution** v. 53 p. 139–144

XU, B.; ZHEN, H.; LU, Q.; ZHAO, S; (1989). Three new evidences of the original area of soybean. IN: **World Soybean Research Conference**, 4. Proceedings, Buenos Aires, pg124-128,

YAN, G.P. & CHEN, X. M.;(2006. Molecular mapping of a recessive gene for resistance to stripe rust in barley. **Theoretical and Applied Genetics** , v. 113. Disponível em: www.springerlink.com. Acessado em 29 de junho de 2006

YORINORI, J.T. **Ferrugem “asiática” da soja no Brasil: evolução, importância econômica e controle**. Yorinori, J. T et al (eds) – Londrina: Embrapa Soja, 2004. 36p. (Documentos, 27).

YORINORI, J.T. Ferrugem da Soja: panorama geral. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE,7/INTERNATIONAL SOYBEAN PROCESSING NA UTILIZATION CONFERENCE, 4./ CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA,3./ Foz do Iguaçu, 2004. **Proceedings**. Londrina, Embrapa Soybean, 2004.

YORINORI, J.T & LAZZAROTTO, J.J (2004). Situação da ferrugem asiática da soja no Brasil e na América do Sul. In: **Documentos / Embrapa Soja**, n. 236, 2004a, Londrina. Documentos...Londrina: Embrapa Soja,. 27p.

YUYAMA, M.M; SUZUKI, S. Doenças da Soja. In: **Boletim de pesquisa de soja 2005**. Sérgio Suzuki; Márcia Midori Yuyama; Silvia Aguiar Camacho (Org.) 9 ed. Rondonópolis 2005. pg 103-125.

ZHANG, L. et al.; (2005) The genetic diversity and similarities among *Kengyilia* species based on random amplified microsatellite polymorphism (RAMP). **Genetic Resources and Crop Evolution** vol. 52, pg 1011–1017.