

DANIEL PEDROSA ALVES

**HERANÇA E MAPEAMENTO GENÉTICO DA RESISTÊNCIA DO
ACESSO PI 587905 AO ISOLADO MONOPUSTULAR PPUFV02
DE *Phakopsora pachyrhizi*, AGENTE CAUSAL DA FERRUGEM
ASIÁTICA DA SOJA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2012

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

A474h
2012

Pedrosa Alves, Daniel, 1986-
Herança e mapeamento genético da resistência
do acesso PI 587905 ao isolado monopustular PPUFV02
de *Phakopsora pachyrhizi*, agente causal da ferrugem
asiática da soja / Daniel Pedrosa Alves. – Viçosa, MG, 2012.
x, 65f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Sérgio Hermínio Brommonschenkel.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 54-65.

1. Soja - Resistência a doenças e pragas- Aspectos genéticos.
2. Genética Molecular. 3. Ferrugem-da-soja.
4. *Phakopsora pachyrhizi*. 5. Melhoramento genético.
I. Universidade Federal de Viçosa. II.Título.

CDD 22.ed. 579.592

DANIEL PEDROSA ALVES

**HERANÇA E MAPEAMENTO GENÉTICO DA RESISTÊNCIA DO
ACESSO PI 587905 AO ISOLADO MONOPUSTULAR PPUFV02
DE *Phakopsora pachyrhizi*, AGENTE CAUSAL DA FERRUGEM
ASIÁTICA DA SOJA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 16 de fevereiro de 2012.

Cosme Damião Cruz
(Coorientador)

Luis Cláudio Vieira da Cunha

Sérgio Hermínio Brommonschenkel
(Orientador)

Dedico a Deus e

aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por todo amor, misericórdia e bênçãos que tem me dado ao longo da minha vida.

Aos meus pais, Miguel Arcanjo Alves e Elisa Aparecida Pedrosa Alves, por terem se sacrificado para que eu lograsse êxito em todos meus projetos, por sempre estarem orando por minha vida e por toda compreensão e amor incondicional. Sem o apoio de vocês eu nunca conseguiria ter chegado até aqui. À minha irmã, Dani, por sempre ter me ajudado, apoiado e dado condições para que eu estudasse. A todos meus familiares, pelo carinho, apoio e orações. A Alessandra, minha futura esposa, que tem estado ao meu lado desde o início da minha graduação, me ajudando e apoiando.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização deste curso. Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, ao Núcleo de Biotecnologia aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) e a todos os funcionários e professores, por toda ajuda, trabalho e formação científica e profissional.

À família do laboratório de genômica, Poli, Lívia, Sandra, Mi, Tadeu, Ricardo, Luís, Gabi, Dani, Nat, Éder, Gilson, Yuki, Elias, Rafael, Josney, Tácio e Thiago, por tanto terem me ensinado e ajudado. Em especial gostaria de agradecer ao Gus, que sempre de bom grado me ensinou, e a Jamile, pela ajuda nos trabalhos de genotipagem.

Ao professor Sérgio Hérmínio Brommonschekel, pela orientação e oportunidade de aprendizado.

Aos professores Cosme Damião Cruz, Tuneo Sedyama e Luis Cláudio Vieira da Cunha, por se disponibilizarem a ajudar.

A todos meus amigos de Visconde do Rio Branco, Leandro, Juninho, Cassiano, Quislon, Ivo, Henrique, Rodrigo, Gugu, Marquinhos. À eterna família da RCC, Cabral, Fábio, Feijão, Cristiano, Leo, Mateus. Aos amigos do programa MARCA/MERCOSUL e da Agronomia 2005.

A todos que de alguma maneira contribuíram para este trabalho e para minha formação pessoal e profissional, e que foram omitidos, o meu muito obrigado.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1 – INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 - A cultura da Soja	4
2.1.1 - Origem e domesticação	4
2.1.2 - Importância econômica	5
2.1.3 - Doenças que acometem a cultura	8
2.2 – Ferrugem asiática da soja	9
2.2.1 - Histórico da Doença	9
2.2.2 – Ciclo de Vida e Epidemiologia	11
2.2.3 – Sintomatologia	15
2.2.4 - Medidas de controle	16
2.2.4.1 - Controle genético	18
2.3 - Marcadores Moleculares	20
2.3.1 – Marcadores Microssatélites	22
2.4 – Mapeamento Genético	23
3 – MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 – Herança da resistência do acesso PI 587905 ao isolado PPUFV02	27
3.1.1 – Materiais genéticos e obtenção das populações segregantes	27
3.1.2 – Avaliação da resistência das plantas da população segregante	27
3.2 – Mapeamento genético utilizando marcadores microssatélites	28
3.2.1 – Extração do DNA	28
3.2.2 – Genotipagem com marcadores microssatélites	30
3.2.3 – Construção do mapa genético localizado	33
3.3 – Seleção de plantas com eventos de recombinação na região genômica que contém o gene de resistência	33

4 – RESULTADOS.....	35
4.1 – Herança da resistência do acesso PI 587905 ao isolado monopustular PPUFV02 de <i>Phakopsora pachyrhizi</i>	35
4.2 – Mapeamento genético com marcadores microssatélites.....	38
4.3 – Seleção de indivíduos F2 com eventos de recombinação informativos na região genômica delimitada pelos marcadores Sct_187r2 –Sat_064, que contém o gene de resistência derivado de PI 587905.....	40
5 – DISCUSSÃO	47
6 – CONCLUSÕES.....	53
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

RESUMO

Alves, Daniel Pedrosa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2012. **Herança e mapeamento genético da resistência do acesso PI 587905 ao isolado monopustular PPUFV02 de *Phakopsora pachyrhizi*, agente causal da ferrugem asiática da soja.** Orientador: Sérgio Hermínio Brommonschenkel. Coorientadores: Cosme Damião Cruz e Tuneo Sedyama.

A ferrugem asiática da soja (FAS) causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* é a principal doença fúngica da cultura da soja. Atualmente a principal medida de controle da doença é a aplicação de fungicidas dos grupos dos triazóis e estrobilurinas. Todavia, a utilização de variedades resistentes ou tolerantes à ferrugem é a melhor alternativa para o controle da doença, por reduzir os custos de produção, facilitar o manejo da doença e reduzir os possíveis impactos ao ambiente ocasionados pelo uso de fungicidas. Na soja, até o momento, foram identificados cinco genes (*Rpp1* a 5) de resistência a *P. pachyrhizi*. Contudo, existem novos acessos que apresentam resistência à FAS e cuja herança não é conhecida. Este trabalho teve por objetivo estudar a herança da resistência do acesso PI 587905 ao isolado monopustular PPUFV02 e demonstrar a relação do(s) gene(s) identificado(s) com os genes já descritos, por meio do mapeamento genético, utilizando marcadores microssatélites. Foi obtida uma população segregante F₂ para a resistência pelo cruzamento do acesso PI 587905 com a cultivar suscetível Conquista. Essa população foi constituída de cinco subpopulações (23C- 1 a 5) oriundas de plantas F₁ distintas. As plantas da subpopulação 23C-1 F₂ foram inoculadas no estágio V2-V3, em condições controladas, com o isolado monopustular PPUFV02 de *P. pachyrhizi*, e avaliadas aos oito, dez, doze e quatorze dias após a inoculação. O padrão de segregação obtido revelou que a resistência é governada por um gene com dominância parcial ($\chi^2 = 1,86$ p= 39,48%). As análises com marcadores microssatélites revelaram que o gene de resistência está localizado no grupo de ligação G (LG-G), no intervalo Sct_187- Sat_064 que contém o loco *Rpp1*, sugerindo que o gene de resistência do acesso PI 587905 é um alelo do gene *Rpp1* ou de um novo gene ligado. As subpopulações 23C-2 a 5 foram plantadas com o intuito de se obterem mais plantas com eventos de recombinação informativos entre os locos Sct_187 e

Sat_064. A fenotipagem dessas plantas foi realizada de maneira idêntica à da subpopulação 23C-1, contudo foi realizada a genotipagem apenas das plantas suscetíveis. Da análise conjunta de todas as subpopulações foram obtidas quatro plantas F_2 que apresentaram eventos de recombinação informativos entre os locos Sct_187 e Sat_064, que podem ser utilizadas para o mapeamento fino nessa região, visando à localização precisa do gene de resistência e sua futura clonagem posicional. Os marcadores Sct_187r2 e Sat_064 também poderão ser utilizados em programas de seleção assistida por marcadores moleculares visando à introgressão do gene de resistência do PI 587905 e à sua piramidação com outros genes de resistência à FAS em cultivares comerciais de soja.

ABSTRACT

Alves, Daniel Pedrosa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2012. **Inheritance and molecular mapping of the resistance from PI 587905 to *Phakopsora pachyrhizi* monopustular isolate PPUFV02.** Advisor: Sérgio Hermínio Brommonschenkel. Co-advisors: Cosme Damião Cruz and Tuneo Sedyama.

Asian soybean rust (ASR) caused by *Phakopsora pachyrhizi* fungus is the most important fungal disease that threatens soybean cultivation. Nowadays the main disease control procedure is administering fungicides from the triazole and strobilurin groups. However, using rust resistant or tolerating varieties is the best alternative for controlling the disease, as it reduces production costs, facilitates dealing with the disease and reduces possible environmental impact caused by usage of fungicides. Until now, five genes were identified in soybean (*Rpp1* to *5*) that are resistant to *P. pachyrzi*. However, there are new accesses that feature resistance and which inheritance is unknown. The objective of this work was studying the resistance inheritance of the PI 587905 access to the monopustular isolate PPUFV02 and demonstrating its relationship of the identified gene(s) to already described genes through genetic mapping by using microsatellite markers. A segregating F₂ population was obtained for resistance by crossing access PI 587905 with the susceptible cultivar Conquista; this population was made of five subpopulations (23C – 1 to 5) from different F₁ plants. Plants from 23C-1 F₂ population were inoculated in the V2-V3 stage in controlled conditions, with monopustular isolate PPUFV02 of *P. pachyrizi* and evaluated eight, ten, twelve and fourteen days after inoculation. Segregation pattern indicated that resistance is governed by a gene with partial dominance ($\chi^2 = 1.86$ p= 39.48%). Analysis with microsatellite markers indicated that the resistance gene is located in the linkage group G (LG-G) in the interval Sct_187-Sat_064 that contains the *Rpp1* locus, suggesting that the resistance gene in access PI 587905 is a part of *Rpp1* gene or another linked gene. Subpopulations 23C-2 to 5 were planted with the purpose of obtaining more plants with informative recombination events between the loci Sct_187 and Sat_064. Fenotyping of these plants was made in an identical way to the 23C-1 subpopulation; however genotyping was performed only in susceptible plants.

From the group analysis of all subpopulations four F₂ plants were obtained. They featured informative recombination events between the loci Sct_187 and Sat_064. Those can be used for deep mapping in this region, aiming to precisely locate the resistance gene and its future positional cloning. Markers Sct_187r2 and Sat_064 will also be suitable for use in assisted selection programs with molecular markers aiming introgression of the resistance gene in PI 587905 and its pyramid connection with other genes resistant to ASR in commercial soybean cultivars.

1 – INTRODUÇÃO

A soja cultivada (*Glycine max* (L.) Merrill) é a leguminosa com maior importância econômica no mundo (ROMERO, 2011). É uma planta autógama com origem no leste da Ásia, mais especificamente na China (EMBRAPA, 2011a; HIROMOTO & VELLO 1986). No Brasil, a soja foi introduzida em 1882, mas passou a figurar com maior importância no cenário nacional somente a partir da década de 1960. A partir da década de 1970, o país passou a investir em pesquisa visando à adaptação da cultura às nossas condições edafoclimáticas. Atualmente o Brasil é o segundo maior produtor e exportador de soja, ficando atrás apenas dos EUA (CONAB, 2011).

A soja representa grande parte da alimentação animal, principalmente como fonte de proteína. Do grão são extraídos produtos e subprodutos como óleo, lecitina e o farelo, que são de grande importância para a indústria. A soja também apresenta características químicas e nutricionais que a qualificam como um alimento funcional, sendo importante também no tratamento preventivo e terapêutico de doenças cardiovasculares, câncer, osteoporose e sintomas da menopausa (DANTAS et al., 2009).

O potencial produtivo da soja é afetado por vários fatores bióticos e abióticos, e dentre as doenças que acometem a cultura está a ferrugem asiática da soja (FAS), que possui como agente etiológico o fungo *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. O primeiro relato da FAS data de 1902 no Japão, e sua ocorrência no Brasil foi detectada somente na safra 2001/2002 (GODOY et al. 2009; HENNING & GODOY, 2006). A FAS é atualmente a principal doença na cultura da soja em áreas tropicais e subtropicais, sendo capaz de causar perdas da ordem de 90% (MILES et al., 2011; SINCLAIR & HARTMAN, 1999; YORINORI et al., 2005).

O controle da FAS é efetuado pelo emprego de diversas medidas conjuntas de manejo, entretanto o controle químico com fungicidas é, até o momento, o principal método de controle da doença (SOARES et al., 2004). Além do controle químico, a adoção do vazio sanitário, o plantio antecipado, o uso de cultivares de ciclo precoce e de variedades resistentes são outras medidas preconizadas para o manejo da doença. O cultivo de variedades

resistentes à *P. pachyrhizi* compreende a melhor alternativa para o controle dessa doença devido à redução dos custos de produção, à facilidade de manejo e ao menor impacto ambiental (ARIAS et al., 2008; GARCIA et al., 2008).

A resistência da soja à FAS é diferenciada principalmente pelo tipo de lesão, em que a reação de susceptibilidade é caracterizada por lesões marrons claras (TAN) e reações de resistência são caracterizadas por lesões marrons avermelhadas (RB *reddish-brown*). As lesões TAN apresentam, em geral, de duas a cinco urédias por lesão, e as lesões RB apresentam, em geral, de zero a duas urédias por lesão. Existe, também, a reação de imunidade, em que não se observam lesões macroscópicas como resultado das inoculações com o patógeno (GOELLNER et al., 2010).

Foram identificados até o momento cinco locos (*Rpp1*, *Rpp2*, *Rpp3*, *Rpp4* e *Rpp5*) que contêm genes que conferem resistência à FAS (GOELLNER et al., 2010). Em alguns desses locos já foram descritos diferentes alelos que conferem resistência a diferentes isolados de *P. pachyrhizi*. A resistência monogênica tem sido suplantada na natureza devido à grande capacidade evolutiva desse patógeno (GOELLNER et al., 2010).

Na safra 2011/12 foram disponibilizados aos agricultores seis variedades de soja resistentes à FAS, sendo cinco variedades desenvolvidas pela Tropical Melhoramento e Genética (Soja Inox) e uma variedade obtida pela parceria entre Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Secretaria de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Seagro) do estado de Goiás com o Centro Tecnológico para Pesquisas Agropecuária (CTPA) (FREITAS, 2011; TROPICAL MELHORAMENTO & GENÉTICA, 2012).

Devido à facilidade com que *P. pachyrhizi* suplanta a resistência monogênica, a piramidação de genes de resistência tem sido preconizada como uma estratégia para se obterem variedades com resistência mais duradoura (ALZATE-MARIN et al., 2005; CASTRO et al. 2003; LIU et al. 2000; SINGH et al. 2001). A piramidação de genes de resistência consiste na introdução de dois ou mais genes de resistência a um mesmo patógeno em um único genótipo (ALZATE-MARIN et al., 2005).

Os marcadores moleculares são uma ferramenta bastante útil no processo de introgressão de genes de resistência. Esses marcadores, se

proximamente ligados aos genes de resistência, podem ser usados na seleção assistida por marcadores (S.A.M.), particularmente nas etapas iniciais e intermediárias dos programas de melhoramento (ALZATE-MARIN et al., 2005). Isso facilita a eliminação de indivíduos que não possuem o genótipo desejado em populações segregantes ou a incorporação simultânea de vários genes de resistência. Vários marcadores microssatélites ligados a genes que conferem resistência à FAS já foram descritos (RAY et al., 2009). A análise de marcadores SSR tem sido preferida à de outros tipos de marcadores, pois se baseia na praticidade da técnica de PCR e trata-se de marcadores codominantes, distribuídos ao acaso no genoma (AKKAYA et al., 1992).

O conhecimento da herança da resistência proveniente de diferentes fontes é informação importante no delineamento de estratégias de melhoramento, contribuindo para a obtenção de variedades melhoradas (LEMOS et al., 2011). Costa (2010) identificou vários acessos de soja que apresentaram resistência ao isolado monopustular PPUFV02 de *Phakopsora pachyrhizi*. Dentre os acessos resistentes, o PI 587905 mostrou-se promissor. Contudo, não se conhece o mecanismo de resistência e a herança da segregação da resistência desse PI.

Dessa forma, este trabalho teve por objetivo determinar o padrão da herança da resistência do acesso PI 587905 ao isolado monopustular PPUFV02 de *Phakopsora pachyrhizi* e, posteriormente, demonstrar a relação do(s) gene(s) identificado(s) nesse genótipo com os genes já descritos, por meio do mapeamento genético utilizando marcadores microssatélites.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - A cultura da Soja

2.1.1 - Origem e domesticação

A soja cultivada é uma planta autógama incluída na classe Dicotyledoneae, ordem Rosales, família Leguminosae, subfamília Papilionoideae, gênero *Glycine* (GAZZONI, 1994). Não se sabe o exato local de origem da soja, mas existe uma concordância quanto à região – leste asiático, mais especificamente na China. Segundo Probst e Judd (1973 citados por PIOVESAN, 2008), existe relato do cultivo da soja há mais de cinco mil anos, mas sua domesticação se deu por volta do século IX a.C.

Por séculos, a cultura permaneceu restrita ao oriente, sendo introduzida no ocidente, mais especificamente na Europa, por volta de 1730, não com finalidade de alimentação, como acontecia na China e Japão, mas de ornamentação, em países como a Inglaterra, França e Alemanha (CISoja, 2011a; HARTMAN et al., 2011).

Os Estados Unidos foram os primeiros a cultivar soja no Continente Americano, isso somente em 1765 (HARTMAN et al., 2011; PIOVESAN, 2008). Em 1917 adequaram o processo de obtenção do farelo da soja, tornando-o disponível para a alimentação animal, fato este que impulsionou o desenvolvimento de indústrias para o processamento de soja nos EUA e a expansão da área de produção, tornando-se, já em 1970, o produtor de dois terços da soja consumida no mundo (HARTMAN et al., 2011).

No Brasil, a soja foi introduzida – inicialmente, sem sucesso – em 1882, no estado da Bahia (Figura 1), mas adquiriu importância econômica somente a partir da década de 1960, na região Sul do país, onde as condições climáticas eram semelhantes às das regiões tradicionais de cultivo do restante do mundo (CÂMARA, 1998; CARUSO, 1996; PRIOLLI et al., 2004). O plantio da soja em larga escala no Brasil foi possível com a expansão das fronteiras agrícolas,

devido às pesquisas dos diversos programas de melhoramento que também buscavam aumentar a produtividade da cultura. De acordo com Paludzyszyn Filho et al. (1993 citados por PRIOLLI et al., 2004), nas regiões tradicionais de cultivo, os programas de melhoramento se basearam em introduções de linhagens desenvolvidas no Sul dos EUA, com o posterior desenvolvimento de cultivares mais bem adaptadas. Na região de expansão, os programas de melhoramento genético seguiram a estratégia de desenvolvimento de linhagens adaptadas às baixas latitudes, por meio da incorporação da característica período juvenil longo (P JL). Assim, a cultura consolidou-se no Brasil, fazendo com que a soja seja, atualmente, o principal produto agrícola de exportação do agronegócio brasileiro (CONAB, 2011).

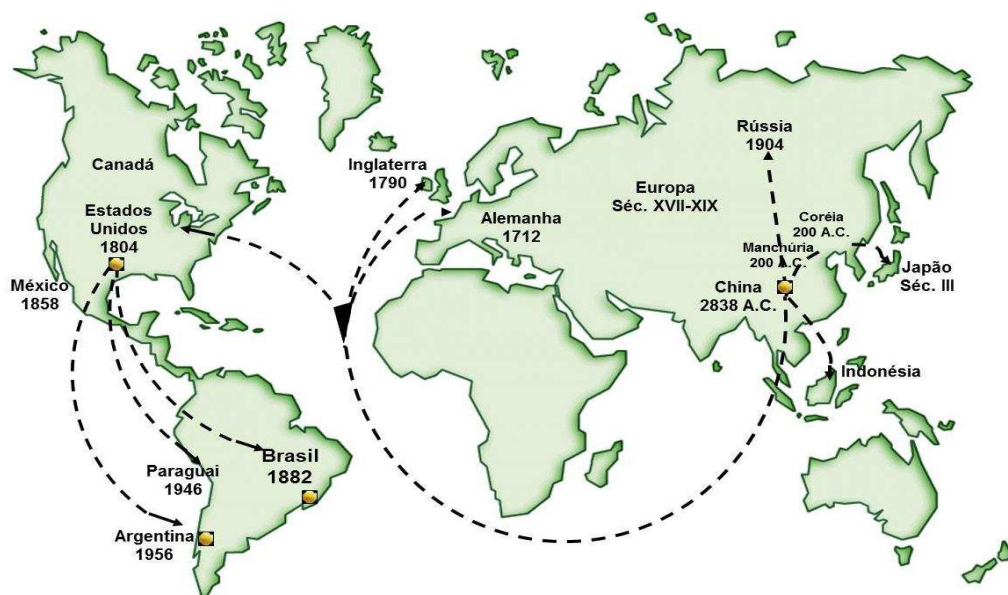


Figura 1: Mapa da distribuição da soja pelo mundo. Fonte: BONETTI 1977. Adaptado de CAMARA, 2011. Disponível em <http://www.lpv.esalq.usp.br/lpv584/584%20Soja%2001%20-%20Apostila%20Texto%20-%20Agronegocio%20Soja%202011.pdf>

2.1.2 - Importância econômica

Uma das razões da importância econômica da soja é a composição de seu grão, 18% de lipídios e 38% de proteínas (HARTMAN et al., 2011). Essa composição possibilita a utilização da soja em diversos produtos e subprodutos da agroindústria, indústria química e de alimentos.

Na alimentação humana o uso mais comum é óleo refinado, mas também entra na composição de vários produtos embutidos. A proteína da soja é a base de ingredientes como massa, produtos de carne, cereais, misturas preparadas, bebidas, alimentos para recém-nascidos e alimentos dietéticos (EMBRAPA, 2011c).

O farelo de soja é empregado na alimentação animal, sendo parte constituinte de rações usadas na pecuária e na criação doméstica de animais. O uso do farelo em rações é importante tanto pelo alto valor protéico como também por ser veículo na administração de antibióticos e vitaminas aos animais (CISOJA, 2011b).

A soja também é muito usada pela indústria de adesivos, nutrientes, adubos, formulador de espumas, fabricação de fibra, revestimento, papel e emulsão de água para tintas. Recentemente, sua utilização vem crescendo também como fonte alternativa de para a produção de biodiesel (CISOJA, 2011b; EMBRAPA, 2011c).

Atualmente, os EUA são os maiores produtores do grão, seguidos por Brasil e Argentina (Figura 2) (HARTMAN et al., 2011; USDA, 2011). Segundo Hartman et al. (2011), esses três países são responsáveis por 81% da produção mundial. Essa produção vem aumentando rapidamente nos últimos anos, devido à incorporação de novas áreas de cultivo e, principalmente, pelo emprego de novas tecnologias, que tem permitido uma maior produtividade. Esse fato fica evidente ao se analisar a evolução mundial da cultura no período que corresponde à safra de 1987/1988 a 2009/2010, em que se constata um incremento de 88,6% na área cultivada, enquanto que a produção teve um acréscimo de 150,7% (LAZZAROTTO & HIRAKURI, 2010).

Em comparação com outras grandes culturas, a soja tem apresentado um maior percentual de aumento, tanto em área quanto em produção, nos últimos 40 anos. Em 2008, o cultivo da soja ocupava seis por cento da terra arável do mundo, porcentagem que é inferior somente àquela ocupada pelo trigo, arroz e milho (HARTMAN et al., 2011).

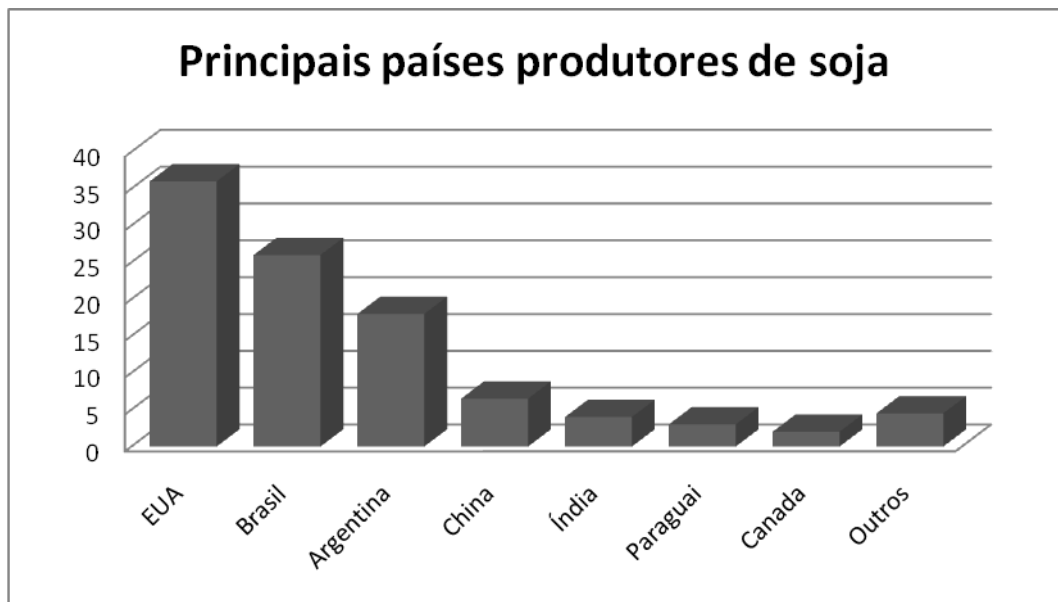


Figura 2: Principais países produtores de soja. Participação em porcentagem (%)

Fonte: USDA, 2010

Atualmente o Brasil é o segundo maior produtor de soja, figurando atrás somente dos EUA; contudo, existe uma expectativa de que até 2020 o Brasil consiga aumentar sua produção em 40%, enquanto que os EUA devem atingir a marca de no máximo 15%. Se essa previsão realmente se confirmar, a produção brasileira atingirá a marca de mais de 105 milhões de toneladas do grão, tornando o Brasil, isoladamente, o maior produtor mundial de soja (FREITAS, 2011; VECANTO et al, 2010).

A soja representa atualmente cerca 27% do valor das exportações agrícolas do Brasil, sendo o principal produto agrícola de exportação brasileira (CONAB, 2011). A área plantada no Brasil na safra 2011/2012 foi estimada em 24,35 milhões de hectares, com uma produção de aproximadamente 72 milhões de toneladas do grão e produtividade média de 2,928 kg/ha (Gráfico 1) (CONAB, 2011).

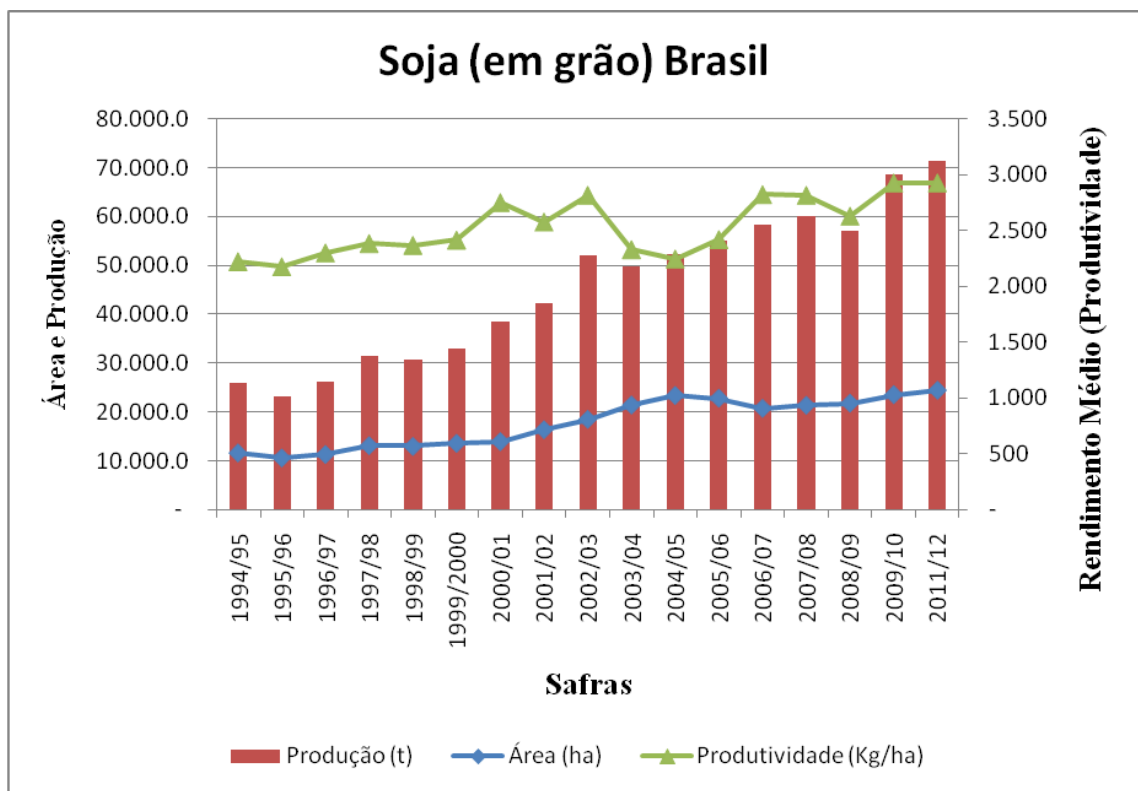


Gráfico 1: Evolução da soja no Brasil

Além da importância econômica da soja propriamente dita, o complexo soja tem grande importância social, pois gera aproximadamente 5 milhões de empregos diretos e indiretos (FREITAS, 2011; ROESSING & LAZZAROTTO 2004). Roessing & Lazzarotto (2004) relatam ser difícil obter uma estimativa exata do número de empregos criados pelo complexo soja, mas apresentaram uma estimativa – que julgam bastante realista – de um emprego direto no campo para cada 35 ha plantados com a cultura, e que cada emprego direto no campo seria capaz de criar seis emprego indiretos, nos setores a montante e a jusante do negócio agrícola.

2.1.3 - Doenças que acometem a cultura

Assim como as demais culturas, diversos patógenos de etiologia variada são capazes de infectar a soja. De acordo com Hartman et al. (2011), o número de doenças conhecidas que afligem a cultura em todo o mundo subiu de 50 para 300, em um pequeno intervalo de tempo entre a publicação das duas últimas edições do “*Soybean Disease Compendium*”. Segundo esses autores, tal aumento no número de doenças é resultado do cultivo em monocultura e da

expansão das áreas de cultivo em novas regiões do mundo com condições climáticas diferentes.

Almeida et al. (1997) e Yorinori (1997), citados por Roese et al. (2001), relatam 45 doenças que ocorrem na cultura da soja no Brasil, causadas por diversos fungos, vírus, bactérias e nematóides.

A importância econômica de cada doença varia de ano para ano e de região para região, dependendo das condições climáticas de cada safra. As perdas anuais de produção por doenças são estimadas em cerca de 15% a 20%, entretanto algumas doenças, como a FAS, podem ocasionar perdas de quase 100% (EMBRAPA, 2004a). Assim, atualmente, a FAS tem sido reportada como a doença mais grave que acomete a cultura da soja no Brasil (GOELLNER et al. 2010; LEMOS et al. 2011, MILES et al. 2011).

2.2 – Ferrugem asiática da soja

2.2.1 - Histórico da Doença

Existem duas ferrugens que acometem a cultura da soja: a “ferrugem americana” e a “ferrugem asiática”. A primeira possui como agente etiológico o fungo *Phakopsora meibomiae* Arthur (Arthur) e teve seu primeiro relato no Brasil em 1979, em Minas Gerais (DESLANDES, 1979). Inicialmente esse autor havia classificado a doença como a ferrugem asiática, no entanto, Carvalho Junior & Figueiredo (2000, citados por HENNING & GODOY, 2006) afirmaram que, até essa data, só havia no Brasil o *P. meibomiae*, patógeno considerado menos agressivo (HENNING & GODOY, 2006).

A ferrugem asiática da soja (FAS) tem como agente etiológico o patógeno *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd, que foi relatado pela primeira vez em 1902, no Japão, e posteriormente em diversos países da Ásia (HENNING & GODOY, 2006). Em 1934, a FAS foi relatada pela primeira vez na Austrália (GOELLNER et al., 2010), e em 1976 na América, em Porto Rico (HENNING & GODOY, 2006). Em 1994, ocorreram relatos do patógeno *P. pachyrhizi* no Hawaii (KILLGORE et al., 1994), e a partir de 1996 foi detectado

em vários países das regiões sul e central da África. Na África, a primeira constatação ocorreu em Uganda, em 1996 (KAWUKI et al., 2003). Em 1998 foi relatada sua ocorrência no Zimbábue e na Zâmbia, e em 2001 na África do Sul (HENNING & GODOY, 2006; PRETORIUS et al., 2001).

Na América do Sul, o primeiro relato de *P. pachyrhizi* data de 2001, no Paraguai e no Brasil (estado do Paraná). Desde então, rapidamente se disseminou por todo continente, tendo sido citado em 2002, em grande parte do Brasil e Argentina, em 2003 na Bolívia e em 2004 nos Estados Unidos (DEL PONTE et al., 2009; FREIRE et al., 2008; GOELLNER et al., 2010; HENNING & GODOY, 2006; YORINORI & LAZZAROTTO, 2004).

Essa rápida dispersão da FAS pelo mundo é atribuída à facilidade de disseminação dos esporos de *P. pachyrhizi* pelos ventos e ao aumento da mobilidade humana (FREIRE et al., 2008; GOELLNER et al., 2010). A distribuição histórica de *P. pachyrhizi* pelo mundo é apresentada na Figura 3.

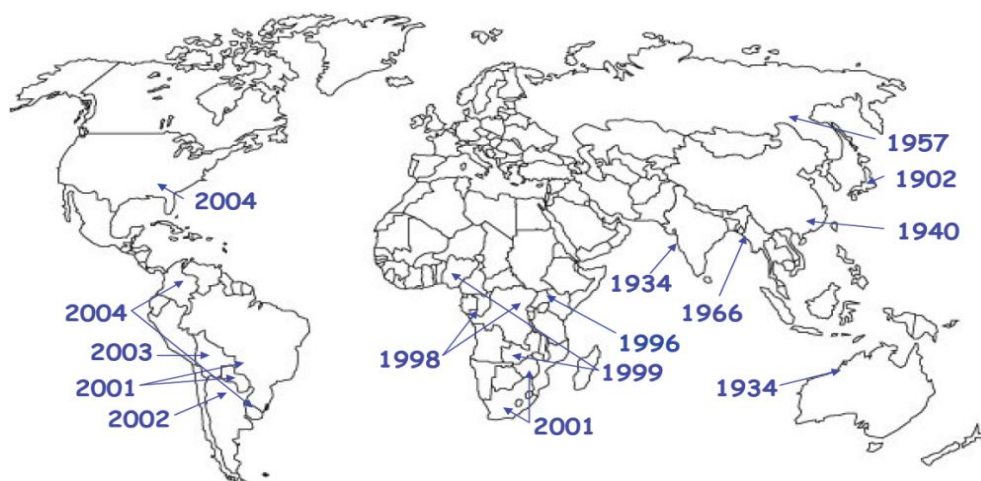


Figura 3: Ocorrência global do fungo *Phakopsora pachyrhizi*, agente causal da ferrugem asiática da soja. Adaptado de Henning & Godoy (2006).

Após a sua constatação inicial no sul do Brasil, a FAS se disseminou rapidamente (Figura 4). Na safra 2000/2001, a FAS foi relatada somente no oeste e norte do estado do Paraná. Na safra 2001/2002, foi constatada nos estados do RS, PR, SP, MS, GO, MG e MT, atingindo, assim, uma área equivalente a 60% da área brasileira cultivada com soja e, na safra seguinte, a área atingida já era de 90% (FURTADO, 2007; HENNING & GODOY, 2006; YORINORI & LAZZAROTTO, 2004).

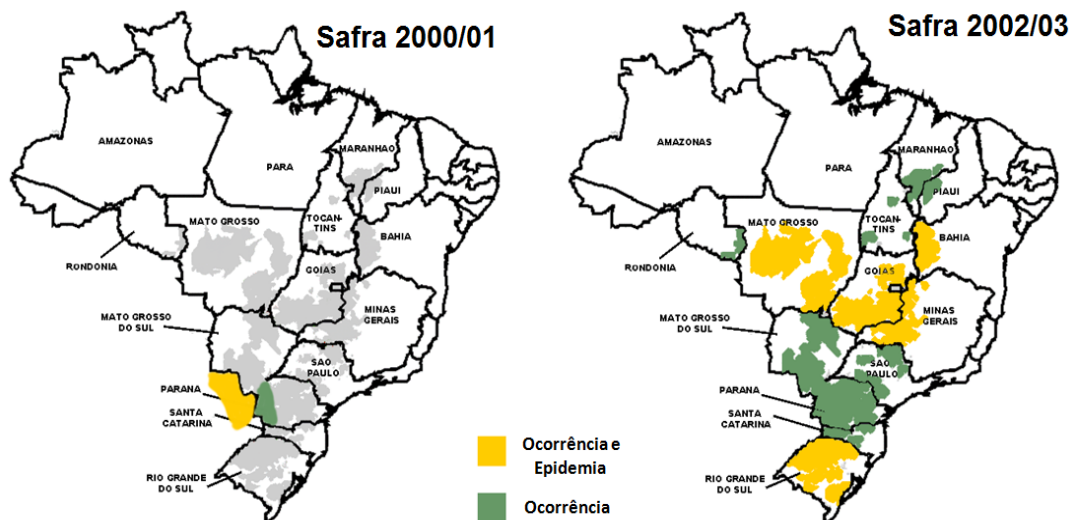


Figura 4: Expansão da ocorrência de FAS no Brasil. Fonte: Consórcio Antiferrugem(2011).

Del Ponte et al. (2009) revelaram que desde o surgimento da FAS no Brasil, em 2001, até a safra 2008/09 o “custo ferrugem” ultrapassou a ordem dos US\$ 13 bilhões, valor este que leva em consideração as perdas diretas nas lavouras, as perdas em arrecadação e o custo do controle químico da doença. Segundo esses mesmos autores, nas safras 2007/08 e 2008/09, as perdas em produtividade devido à FAS representaram menos de 1% da produção nacional, sendo o “custo ferrugem” nessas safras, devido basicamente ao custo de controle químico da doença.

2.2.2 – Ciclo de Vida e Epidemiologia

O ciclo de vida de *P. pachyrhizi* inicia-se com os uredósporos produzidos nas urédias (Figura 5d) em plantas de soja voluntárias ou em outros hospedeiros, cujas sementes germinam após a colheita. Essa “ponte verde” é essencial para a ocorrência de epidemias da doença, visto que esse fitopatógeno é biotrófico (ZAMBOLIM, 2006). Esses uredósporos são liberados através de um ostíolo, e dispersos pelo vento. Em condições adequadas, temperatura entre 18 e 26°C e período mínimo de molhamento foliar de seis horas, os uredospóros germinam formando um tubo germinativo. O

crescimento do tubo germinativo é encerrado pela formação de um apressório globoso (Figura 5b), que apresenta aproximadamente o mesmo tamanho de um uredóspero (GOELLNER et al., 2010).

A penetração direta no tecido hospedeiro inicia-se com a formação de uma estrutura afunilada, denominada cone apressorial, dentro do apressório. Esse cone é contíguo com a parede celular da hifa de penetração formada dentro da célula epidérmica, também denominada de vesícula transepidermal (BROMFIELD, 1984). As células da epiderme penetradas pelo fungo tornam-se desorganizadas e necrosam. A hifa de penetração cresce através da célula epidérmica e atinge o espaço intercelular, sendo separada da hifa primária que emerge por um septo. A hifa primária se ramifica formando hifas secundárias, a partir das quais as células mãe do haustório diferenciam-se nas regiões de contato com células do mesófilo (Figura 5c). A formação do haustório primário (Figura 5c) é observada de 24 a 48 horas após o primeiro contato entre os uredósperos e o hospedeiro suscetível (GOELLNER et al., 2010; KOCH et al., 1983).

Tendo-se condições favoráveis à infecção e colonização, os sintomas podem surgir em cinco a sete dias, e os uredósperos são observados nas lesões de nove a doze dias após a germinação e penetração (ZAMBOLIM, 2006). Cada urédia pode permanecer produzindo esporos por aproximadamente 21 dias. Esses esporos vão iniciar novas infecções na mesma lavoura (Figura 6) ou irão, através do vento, alcançar lavouras mais distantes do foco inicial de infecção. Com o final do ciclo da cultura, o fungo sobrevive nas plantas voluntárias ou em outras plantas hospedeiras (Consórcio Antiferrugem, 2012; Passini, 2007).

Embora teliósporos tenham sido observados na Ásia em vários hospedeiros, inclusive soja, sua germinação nunca foi relatada na natureza (BROMFIELD, 1984). No entanto, a germinação de teliósporos e a formação de basidiósporos podem ser induzidas sob condições controladas em laboratório (SAKSIRIRAT & HOPPE, 1991). Todavia, não há informações sobre o processo de infecção basidial ou se *P. pachyrhizi* é uma ferrugem autoécia ou heteroécia (GOELLNER et al., 2010).

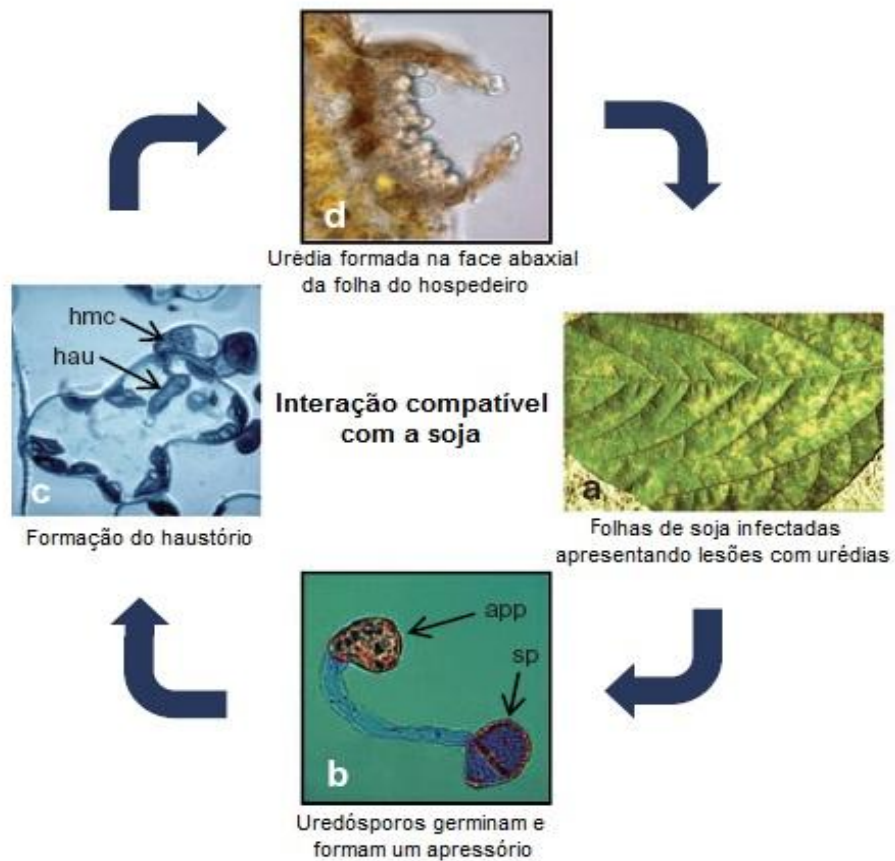


Figura 5: Interação compatível entre *P. pachyrhizi* e a soja. a) Durante o processo de infecção, o patógeno forma urédias localizadas na face abaxial da folha. Os uredósporos (sp) formados são dispersos pelo vento, b) e germinam formando tubo germinativo que diferenciam em apressório (app). c) A hifa intercelular coloniza o mesófilo foliar e forma células-mãe haustoriais (hmc) de onde o haustório (hau) desenvolve-se dentro das células contactadas. d) O ciclo de vida de *P. pachyrhizi* completa-se com a formação dos uredósporos na urédia. Adaptado de Goellner et al. (2010)

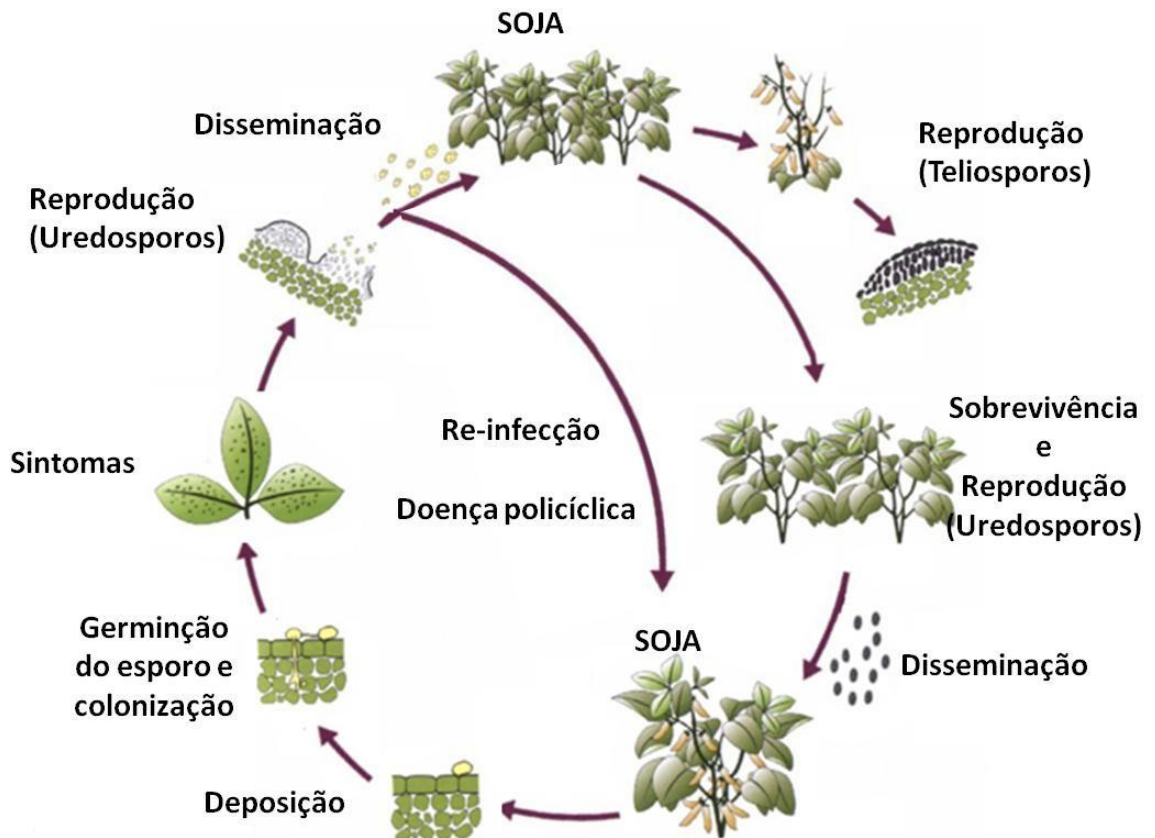


Figura 6: Ciclo esquemático da ferrugem asiática da soja. Fonte: REIS et al. (2006), adaptado de PASSINI (2007).

As condições ambientais são de extrema importância para a ocorrência da FAS, a começar pela dispersão dos uredósporos, que acontece principalmente pelo vento, além do fato de todo o processo infeccioso ser dependente das condições ambientais (CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM, 2011; GOELLNER et al., 2010; PLOPER & DEVANI, 2002). As epidemias de FAS são favorecidas pela ocorrência de chuvas constantes e de baixa intensidade e temperaturas entre 18 e 26 °C por vários dias. No entanto, a temperatura ideal para a infecção varia com os diferentes períodos de molhamento foliar. Zambolim (2006) menciona que os climas que favorecem a epidemia de FAS são aqueles em que predominam temperaturas entre 18 e 26°C durante 10 horas de molhamento foliar, ou 20 a 25°C durante 6 horas de molhamento foliar ou abaixo de 28°C durante 10-12 horas de molhamento foliar. A doença não ocorre em regiões onde as médias diárias de temperaturas situam-se acima de 30°C e abaixo de 15°C (ANDRADE & ANDRADE, 2002; CASEY, 1981; SINCLAIR & BACKMAN, 1989; YORINORI et al., 2003; ZAMBOLIM, 2006).

Bergamin Filho (2006) citando Melching et al. (1979) explica a alta correlação entre chuva e severidade final de doença, através de uma característica incomum de *Phakopsora*, que não é compartilhada com a maioria das outras ferrugens: os uredósporos do fungo tendem a permanecer firmemente juntos, não sendo facilmente liberados pela ação do vento. Assim, as gotas de chuva contribuem na liberação dos esporos, seja por efeito *splash*, seja pelo impacto causado nas folhas. Portanto, as chuvas constituem um fator extremamente importante para as epidemias de campo, pois influenciam diretamente no período de molhamento foliar (necessário para a infecção), na disseminação (atuando na liberação, disseminação e deposição de esporos do fungo) e também, indiretamente, na sobrevivência do inóculo (pela menor exposição dos esporos à radiação UV durante períodos nublados) (COSTAMILAN et al., 2011).

Isard et al. (2006) relatam a menor viabilidade de esporos de *Phakopsora* expostos à radiação solar. Furtado et al. (2009) relatam que a germinação dos esporos no escuro é de 40,7%, valor este significativamente superior a germinação na luz, 28,5%. O mesmo ocorreu para a formação de apressórios, que foi maior no escuro (24,7%) do que na luz (12,8%).

2.2.3 – Sintomatologia

Os sintomas iniciam-se nas folhas inferiores da planta e se caracterizam por pontos minúsculos (1 a 2 mm) mais escuros que o tecido sadio, apresentando saliências na face de adaxial da folha, sem halo amarelo ao redor das pontuações. Com o desenvolvimento as lesões tendem a apresentar um formato angular e podem atingir 2 a 5 mm de diâmetro, podendo aparecer em pecíolos vagens e caules, sendo, porém, mais comuns na superfície foliar, onde podem ocupar extensas áreas, levando ao amarelecimento e queda das folhas (CONSORCIO ANTIFERRUGEM, 2012; EMBRAPA, 2004a; FURTADO, 2007; HARTMAN et al., 2011).

É possível distinguir diferentes tipos de respostas das plantas à infecções por *P. pachyrhizii*. Plantas suscetíveis geralmente apresentam lesões bronzeadas ou castanhos claras com esporulações, conhecidas por lesões tipo

TAN (Figura 7A). As plantas resistentes podem apresentar dois tipos de respostas: imunidade, com (IF) ou sem lesões “*flecks*” (Figura 7C) e lesões castanho-avermelhadas (Figura 7B) (RB, *Reddish-Brown*), que apresentam pouca ou nenhuma esporulação (GOELLER et al., 2010; MILES et al., 2011; TWIZEYIMANA et al., 2008).



Figura 7: Sintomas de FAS na parte abaxial de folhas de plantas de soja suscetível (A) e resistentes (B e C) após inoculação com o isolado PPUFV02, 14 dias após a inoculação. Lesões TAN (A), RB (B) e Imunidade com “*flecks*” (IF) (C). Barras horizontais equivalem a 1 cm.

2.2.4 - Medidas de controle

Como a FAS é uma doença muito agressiva, várias medidas integradas de manejo são necessárias para o seu controle, dentre elas: (i) a adoção do vazio sanitário, (ii) o uso de variedades de ciclo precoce, (iii) o plantio da soja no início da época de semeadura indicado, (iv) a adequação da densidade de plantio, (v) o uso de unidades de alerta, (vi) o controle químico e (vii) o uso de variedades resistentes (CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM, 2012; DEL PONTE et al., 2009; YORINORI & LAZZAROTTO, 2004; ZAMBOLIM, 2006).

O vazio sanitário é uma medida de controle em que se preconiza um período de 60 a 90 dias com a ausência de plantas de soja na entressafra. Esse período visa reduzir o inóculo inicial de *Phakopsora*, retardando o desenvolvimento da doença na próxima safra (DEL PONTE et al., 2009). Tal prática teve início em 2006 nos estados de Mato Grosso, Goiás e Tocantins, e atualmente é realizada em 11 estados brasileiros produtores de soja (CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM, 2012).

O uso de variedades de ciclo precoce e o plantio no início da época de semeadura indicado têm como objetivo o escape do inóculo do fungo. Essa tática consiste em tentar “fugir” do patógeno e de um ambiente que seja favorável ao desenvolvimento da doença. Dessa forma, o patógeno tem menor tempo para causar perdas de produtividade, já que a cultura permanece menos tempo no campo (YORINORI & LAZZAROTTO, 2004; ZAMBOLIM, 2006).

A adequação da densidade de plantio visa permitir melhor penetração da calda de fungicida no interior das plantas. Os cultivos adensados dificultam o controle da doença nas folhas do terço médio e inferior das plantas (YORINORI & LAZZAROTTO, 2004; ZAMBOLIM, 2006).

As unidades de alerta são áreas de 100m² onde o plantio de soja é efetuado 15 a 20 dias antes do cultivo comercial da cultura. Essa área é monitorada para a ocorrência de FAS, servindo como um indicativo de necessidade de aplicação de fungicidas na lavoura (CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM, 2012; FREIRE, 2007).

A aplicação de fungicidas tem sido a estratégia mais comum empregada no controle da FAS, sendo usada de forma preventiva ou após a instalação da doença (AZEVEDO, 2001; SOARES et al., 2004). A mistura de fungicidas do grupo dos triazóis e estrobilurinas é o que tem se mostrado mais eficiente (DEL PONTE, et al., 2009). Contudo, apesar de eficiente, o uso de produtos químicos para o controle da FAS é dispendioso e eleva substancialmente o custo de produção da soja. Na safra 2007/2008 o custo do controle químico representou mais de 80% do custo total gerado pela doença (DEL PONTE & MARTINS 2008, DEL PONTE et al., 2009). Freire (2007) ressalta a importância do uso racional dos fungicidas para não tornar o cultivo da soja extremamente caro, inviabilizando o cultivo e agredindo ao meio ambiente.

O uso de resistência genética é considerado a forma mais eficiente de controle da FAS, sendo a melhor alternativa para o controle da doença por reduzir os custos de produção, facilitar o manejo da doença e reduzir os possíveis impactos ambientais ocasionados pelo uso de fungicidas (GARCIA et al., 2008; ZAMBOLIM, 2006). No Brasil, variedades resistentes foram disponibilizadas para o plantio comercial a partir da safra 2009/2010. Na safra 2011/12, seis variedades de soja resistentes à FAS foram disponibilizadas para os produtores. Destas, cinco variedades foram desenvolvidas pela Tropical

Melhoramento e Genética (Soja Inox), das quais duas cultivares são convencionais (TMG 801 e TMG 803) e três, transgênicas (TMG 7161RR, TMG 7188RR e TMG 7262RR). Uma variedade convencional (BRSGO 7560) foi desenvolvida na parceria da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), da Secretaria de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (SEAGRO) do estado de Goiás com o Centro Tecnológico para Pesquisas Agropecuárias (CTPA) (FREITAS, 2011, TROPICAL MELHORAMENTO & GENÉTICA, 2012).

2.2.4.1 - Controle genético

Na soja, até o momento, foram descritos cinco genes que conferem resistência raça-específica à FAS, estando estes localizados em locos denominados *Rpp1*, *Rpp2*, *Rpp3*, *Rpp4* e *Rpp5* (BROMFIELD & HARTWIG, 1980; BROMFIELD & MELCHING, 1982; GARCIA et al., 2008; HARTWIG, 1986; MCLEAN & BYTH, 1980). O loco *Rpp1* está localizado no grupo de ligação G (LG-G); *Rpp2* no LG-J; *Rpp3* no LG-C2; *Rpp4* no LG-G e *Rpp5* no LG-N (GOELLNER et al., 2010). O gene do loco *Rpp1* foi inicialmente descrito no acesso PI 200492 (MCLEAN & BYTH, 1980), o *Rpp2* no acesso PI 230970 (BROMFIELD & HARTWIG, 1980), o *Rpp3* no acesso PI 462312 (BROMFIELD & MELCHING, 1982), o *Rpp4* no acesso PI 459025 (HARTWIG, 1986) e o *Rpp5* nos acessos PI 200456, PI 200526 e PI 471904 (GARCIA et al., 2008).

Contudo, alguns desses locos apresentam novos genes proximamente ligados ou outros alelos aos inicialmente descritos, também conferindo resistência à FAS. O acesso PI 594538A foi caracterizado como apresentando um alelo distinto do *Rpp1* ou novo gene proximamente ligado a este, sendo denominado *Rpp1b* (CHAKRABORTY et al., 2009; HYTEN et al., 2007). Outro gene proximamente ligado ao *Rpp1* ou alélico a este foi descrito por Ray et al. (2009) nos acessos PI 587886 e PI 587880A. Estes autores designaram este novo gene ou alelo de *Rpp1?*. Este se difere tanto de *Rpp1* quanto de *Rpp1b*, pois exibe dominância parcial, sendo que as plantas homozigotas para o alelo de resistência (*Rpp1?/Rpp1?*) são imunes, plantas heterozigotas (*Rpp1?/:rpp1?*) exibem lesões do tipo RB e as plantas homozigotas para o alelo *rpp1?*

apresentam lesões do tipo TAN. Laperuta et al. (2008) verificaram que os acessos PI 197182, PI 230971 e PI 417125 possuem diferentes alelos do gene *Rpp2* ou diferentes genes proximalmente ligados. O PI 506764 (Hyyuga) teve o gene de resistência mapeado no mesmo grupo de ligação do loco *Rpp3* (LG-C2). A região genômica na qual foi localizado o loco *Rpp4* possui três genes que apresentam identidade com genes de resistência na cultivar suscetível Williams82 e cinco genes candidatos no acesso resistente PI459025B. Um dos genes ausentes na cultivar suscetível é responsável por conferir a resistência em PI459025B (MEYER et al., 2009). No *Rpp5*, os diferentes PIs (PI200526, PI471904 e PI200456), apresentam diferentes respostas à FAS, sendo assim considerados diferentes alelos do gene, com distintos tipos de ação gênica (dominância, dominância parcial e recessiva) (GARCIA et al., 2008).

A existência de variedades de soja com resistência à FAS é uma importante estratégia para facilitar o manejo dessa doença no Brasil. Em 2001, quando a doença foi primeiramente relatada no país, todos os genes de resistência eram efetivos contra o fungo; no entanto, em 2003, um novo isolado encontrado no Mato Grosso suplantou a resistência dos PIs (200492 e 462312) que apresentam os genes *Rpp1* e *Rpp3* (ARIAS et al. 2008; GARCIA et al. 2008; LEMOS et al., 2011). Yamanaka et al. (2010), avaliando a resposta de diferentes genótipos de soja inoculados com três populações de *P. pachyrhizi* (duas originárias do Brasil e uma do Japão), verificaram a existência de diferenças na virulência nas populações, sendo as originárias do Brasil mais virulentas que a proveniente do Japão. Também encontraram evidências de que está ocorrendo a quebra da resistência conferida por genes de efeito principal, em especial do gene *Rpp2* dos acessos PI 230970 e PI 417125, e que estão ocorrendo mudanças na virulência dentro das populações do patógeno existentes no país.

Os fatos supracitados demonstram a alta capacidade do fungo *P. pachyrhizi* em suplantar resistências monogênicas; por isso, a melhor estratégia de manejo da doença é o uso de variedades com mais de um gene de resistência (piramidação de genes), aliada a outras estratégias de controle (anteriormente descritas) visando aumentar a longevidade das variedades resistentes (UNFRIED et al., 2010).

Resistência à FAS tem sido descrita em outros genótipos de soja, mas ainda não se conhecem os genes envolvidos na resistência desses materiais (COSTA, 2010; MILES et al., 2006; MILES et al., 2008; PHAM et al., 2009; SOARES et al., 2009a; SOARES et al., 2009b; YAMANAKA et al., 2010). Costa (2010) avaliou a reação de diversos genótipos de soja ao isolado monopustular PPUFV02 de *P. pachyrhizi*. Nessa avaliação foram identificadas diversas fontes de resistência ao patógeno, dentre as quais o acesso PI 587905. Outros autores já haviam relatado a resistência do PI 587905 à FAS, contudo ainda não se conhece a herança da sua resistência (MILES et al., 2006; MILES et al., 2008; PHAM et al., 2009; SOARES et al., 2009; SOARES et al., 2009b; YAMANAKA et al., 2010).

2.3 - Marcadores Moleculares

Os marcadores genéticos são usados para marcar alelos cuja expressão é de difícil identificação, permitindo, assim, selecionar alelos de forma indireta. É imprescindível que o marcador seja herdável, de fácil avaliação e que esteja intimamente ligado ao alelo de interesse (RAMALHO et al., 2008).

Os marcadores genéticos podem ser morfológicos ou moleculares. Um marcador morfológico é um fenótipo de fácil identificação, que normalmente é determinado por um único gene com herdabilidade próximo de um e intimamente ligado ao gene que se deseja selecionar (RAMALHO et al., 2008).

Embora os marcadores morfológicos tenham contribuído de forma significativa para o desenvolvimento teórico da análise de ligação gênica e para as construções dos primeiros mapas de genéticos, apenas ocasionalmente foram identificados marcadores morfológicos ligados a características de interesse, limitando-se, assim, o seu uso em programas de melhoramento (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Marcadores moleculares são segmentos de DNA fisicamente ligados a locos que determinam característica de interesse e que permitem a diferenciação de dois ou mais indivíduos, podendo estar presentes em regiões expressas ou não do genoma (ALZATE-MARIN et al. 2005; FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998; SANO et al., 1997).

Os marcadores moleculares apresentam várias vantagens comparativamente aos marcadores morfológicos: (i) apresentam alto nível de polimorfismo, (ii) exibem neutralidade fenotípica, (iii) apresentam menor efeito epistático ou pleiotrópico, (iv) são em geral codominantes, (v) podem ser utilizados para caracterizar o genótipo a partir de amostras de células ou tecidos, não necessitando da planta inteira ou da planta estar na fase adulta, (vi) permitem que a seleção e novos cruzamentos sejam realizados em uma mesma geração, o que aumenta consideravelmente a eficiência do programa de melhoramento (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Os marcadores moleculares podem ser utilizados em análises de diversidade genética e relacionamento filogenético, seleção de germoplasmas, construção de mapas genéticos, na clonagem posicional de genes, na descrição molecular de um genótipo, na identificação de regiões genômicas associadas a estresses bióticos e abióticos, na introgressão gênica, na determinação de grupos heteróticos, no estabelecimento de associação com regiões genômicas que afetam a heterose, e em testes de pureza genética (BRAMMER & MILACH, 2002; MARTINS et al., 2003).

Atualmente existem diversas classes de marcadores moleculares, que se diferenciam pela tecnologia utilizada para revelar a variabilidade existente no genoma, e que variam na capacidade de detectar diferenças entre indivíduos, no custo, na facilidade de uso, na consistência e repetibilidade dos resultados (MILACH, 1998). Dentre as técnicas moleculares que usam o DNA, destacam-se as baseadas em hibridação, como o RFLP e os minissatélites, nas quais o genoma é fragmentado por enzimas de restrição e observado por hibridação desses fragmentos com sequências homólogas e marcadas radioativamente (sondas) e aquelas derivadas de aplicação da técnica de PCR, como o RAPD, AFLP, microssatélites (SSR- *Single Sequence Repeats*), SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*) e STS (*Sequence Tagged Sites*) (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998; SILVA, 2008b). Dentre estes, destacam-se os marcadores SSR, os quais são marcadores de caráter codominante e multialélicos, tendo um maior conteúdo de informação de polimorfismo (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996).

2.3.1 – Marcadores Microsatélites

Os genomas de eucariotos são densamente povoados por sequências simples repetidas (SSR), denominadas microsatélites. Os microsatélites são constituídos por um a seis nucleotídeos que se repetem de forma justaposta, ou seja, uma após a outra (CAIXETA et al. 2009). O número de elementos repetitivos é altamente variável, fornecendo um marcador multialélico de grande conteúdo informativo (FERREIRA & GRATTAPLAGLIA, 1998). As sequências de DNA que flanqueiam os microsatélites geralmente são conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie, permitindo a amplificação do DNA repetitivo via PCR (reação em cadeia da polimerase) com o emprego de oligonucleotídeos específicos (CAIXETA et al. 2009). Ferreira & Grattapaglia (1996) relatam que essa é uma das classes mais polimórficas de marcadores existentes. Este alto grau de polimorfismo é gerado pelo *crossing-over* desigual, como também por deleções e inserções no DNA (CAIXETA et al. 2009; FERREIRA & GRATTAPLAGLIA, 1998). O polimorfismo dos SSR se refere a *amplicon* de tamanho diferente, sendo que cada segmento amplificado de tamanho diferente representa um alelo do mesmo loco. Os polimorfismos de tamanho são decorrentes da variação no número de repetições de um dado motivo (CATELLI, 2009).

Os marcadores microsatélites apresentam como principais vantagens: (i) são codominantes; (ii) apresentam alto nível de polimorfismo; (iii) são de fácil reprodutibilidade; (iv) apresentam possibilidade de detecção simultânea de vários microsatélites (análise *multiplex*) (FALEIRO, 2007).

A obtenção dos marcadores envolve a amplificação dos microsatélites via PCR, utilizando-se oligonucleotídeos específicos (geralmente de 20 a 30 pb) complementares às sequências únicas de DNA que flanqueiam os microsatélites (FERREIRA & GRATTAPLAGLIA, 1996). Para o desenvolvimento desses iniciadores específicos é necessária a construção de bibliotecas genômicas, seleção e sequenciamento dos clones positivos, e caracterização da sequência que contém o microsatélite, e posteriormente o desenho dos *primers* (FALEIRO, 2007).

A visualização dos amplicons que contêm SSR pode ser feita por meio de eletroforese em gel de agarose de alta resolução, como também em gel de poliacrilamida desnaturante ou não desnaturante (CAIXETA et al., 2009). Atualmente, têm-se utilizado oligonucleotídeos marcados com fluorescência e eletroforese capilar em sequenciador automático de DNA (OLIVIERA, 2009). Segundo Ewing et al. (1998) e Kaiser et al. (1989) citados por Oliveira (2009), na análise de fragmentos em sequenciador automático, estes são identificados por diferentes corantes fluorescentes acoplados a cada primer. No capilar, um laser excita os corantes fluorescentes no momento em que os fragmentos passam em uma janela onde uma câmera coleta as intensidades da emissão de quatro diferentes comprimentos de onda. Esse processo não para durante a eletroforese até que se construa uma imagem do gel na escala desejada das bandas com quatro diferentes colorações, em que cada banda corresponde aos fragmentos de tamanho específico. Além da possibilidade de automação e da análise simultânea de mais de um loco (análise *multiplex*), a detecção dos marcadores microssatélites por eletroforese capilar em sequenciador automático permite distinguir com facilidade alelos que variam em uma única unidade repetitiva, o que aumenta a precisão dos dados moleculares obtidos e a reprodutibilidade dos resultados (OLIVEIRA, 2009).

2.4 – Mapeamento Genético

Os mapas de ligação são importantes por constituírem uma informação básica, necessária para a realização de estudos mais avançados, como mapeamento de genes e estudos comparativos de sintonia genômica (PEREIRA et al., 2009). A construção de mapas de ligação envolve, basicamente, a aplicação das técnicas de genética molecular aos conceitos originais de herança genética apresentados por Mendel.

Antes do advento dos marcadores de DNA, a construção de mapas genéticos era feita com o uso dos marcadores morfológicos, mas estes demoravam décadas, mesmo assim, tais mapas eram, em geral, incompletos e de baixo nível de saturação devido ao número limitado destes marcadores (PEREIRA et al., 2009).

O mapeamento genético se baseia no princípio de que alelos de pares de locos situados próximos num cromossomo cossegregarão mais frequentemente do que alelos de pares de locos que estão mais distantes ou em outros cromossomos. Portanto, quanto menor a distância entre dois locos ligados (próximos no mesmo cromossomo), menor será a frequência de recombinação entre eles. Desse modo, a frequência observada de genótipos recombinantes numa população pode ser utilizada para o cálculo da fração de recombinação e, conseqüentemente, da distância genética entre dois locos, sendo possível ordenar linearmente a informação genética ao longo do cromossomo (GRANT & SHOEMAKER, 2001; KUMAR, 1999; SEMAGN et al., 2006).

A construção do mapa genético se baseia na análise de indivíduos de uma população segregante. A escolha dos genitores e a determinação do tipo de cruzamento (F_2 , retrocruzamentos, meios irmão, irmãos completos, duplo-haploides) são consideradas uma etapa crítica para o sucesso da construção do mapa de ligação (CARNEIRO & VEIRA, 2002; STAUB et al., 1996). Nessa escolha é necessário o atendimento de duas condições básicas: o máximo de polimorfismo entre os genitores e que sejam produzidas gerações em que os locos estejam em desequilíbrio de ligação (CARNEIRO & VEIRA, 2002; PATERSON et al., 1991; TANKSLEY, 1993).

As populações mais comuns utilizadas para a construção dos mapas de ligação são as gerações F_2 ou aquelas oriundas de retrocruzamentos (CARNEIRO & VEIRA, 2002). Os indivíduos F_2 são portadores de dois gametas informativos, enquanto que os indivíduos oriundos de retrocruzamentos são portadores de apenas um gameta informativo, sendo o complemento não informativo. Assim, um indivíduo F_2 fornece duas vezes mais informação genética (CARNEIRO & VIEIRA, 2002; COELHO, 2000). Schuster & Cruz (2004) ressaltaram vantagens como: rapidez, disponibilidade de informação a respeito dos possíveis genótipos (AA, Aa, aa), alta precisão dos componentes genéticos ao se utilizar uma população F_2 , tendo cada indivíduo uma progênie F_3 individual ($F_{2:3}$). Carneiro & Vieira (2002) salientam que o tipo de população ideal para a construção de mapas genéticos está relacionado com o tipo de marcador utilizado, sendo que o máximo de informação genética é alcançado

quando se dispõe de uma população F_2 e um marcador codominante (STAUB et al., 1996).

A população segregante deverá, então, ser genotipada para os marcadores inicialmente selecionados como polimórficos (ou seja, que detectem os diferentes alelos) entre os parentais. Uma matriz de dados é, então, gerada, e nela as linhas constituem os marcadores moleculares e as colunas, os diferentes indivíduos genotipados. Primeiramente, é aplicado um teste estatístico para cada marcador com o objetivo de testar a hipótese nula de segregação de acordo com as proporções esperadas (1:2:1, 1:1, 3:1), para esse teste pode ser usado o teste qui-quadrado (χ^2). Os marcadores que segregarem de acordo com as proporções esperadas são, então, submetidos a um teste de ligação gênica. Esse teste envolve, basicamente, uma hipótese nula, de segregação independente, contra uma alternativa de ligação gênica, e deve ser realizado para todos os marcadores (FERREIRA & GRATTAPLAGLIA, 1996).

Na construção de mapas de ligação utilizam-se programas computacionais como “Mapmaker” (LANDER et al., 1987), “Linkage 1” (SUITER et al., 1983), “Gmendel” (LIU & KNAPP, 1990) e GQMOL 9.1 (CRUZ & SCHUSTER, 2006). Esses programas estimam a distância em unidades de recombinação entre os dois marcadores. Tal distância, que não é uma distância física, reflete a porcentagem de recombinação (*crossing over*), sendo que esse parâmetro pode ser expresso em centiMorgans (cM). Um cM equivale a aproximadamente 1% de recombinação quando os marcadores estão próximos, ou pode diferir consideravelmente quando os marcadores estão distantes, isto por causa do aumento da probabilidade de *crossing over* duplos, triplos, etc., que podem influenciar a estimativa da proporção de genótipos recombinantes em relação aos parentais (FERREIRA & GRATTAPLAGLIA, 1996).

Existem diversas funções de mapeamento que têm sido usadas na correção de distância calculada em porcentagem de recombinação para distância calculada em cM (CROW, 1990; HALDANE, 1919; KOSAMBI, 1944).

Dois marcadores são considerados ligados quando a frequência de recombinação entre eles for inferior a um limite predefinido de distância e/ou o LOD score (“Logarithm of Odds” ou Logaritmo dos Nós) for superior a um limite também predefinido. A distância máxima de ligação utilizada como padrão em vários programas de mapeamento é 30,0% de recombinação e o LOD score é igual a 3,0. Um LOD score igual a 3 indica que a ocorrência de ligação é mil vezes mais provável que a de segregação independente (BEARZOTI, 2000; SCHUSTER & CRUZ, 2004; SILVA 2008).

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Herança da resistência do acesso PI 587905 ao isolado PPUFV02

3.1.1 – Materiais genéticos e obtenção das populações segregantes

Foram utilizados os genótipos PI 587905 e 'Conquista' como genitores resistentes e suscetíveis, respectivamente, nos cruzamentos, com o objetivo de se obter a população segregante para o estudo da herança da resistência ao isolado monopustular PPUFV02 de *P. pachyrhizi*. O PI 587905 foi utilizado como genitor feminino, enquanto que a cultivar Conquista foi utilizada como genitor masculino. O cruzamento foi efetuado dessa forma devido à menor liberação de pólen pelo PI 587905.

Das sementes oriundas desses cruzamentos, dez foram plantadas em vasos de três decímetros cúbicos, contendo uma mistura de solo, substrato Plantmax® e esterco na proporção de 3:1:1, sendo a adubação realizada de acordo com a recomendação da cultura (RIBEIRO et al., 1999). Essas plantas F₁ tiveram o broto apical retirado para estimular as brotações laterais e obter maior produção de sementes/planta.

A natureza híbrida das plantas foi confirmada utilizando-se a análise de locos microssatélites polimórficos entre os parentais. Após a constatação da natureza híbrida, foram selecionadas cinco plantas para originar a população segregante para a resistência. As plantas selecionadas foram denominadas 23C-1, 23C-2, 23C-3, 23C-4 e 23C-5.

3.1.2 – Avaliação da resistência das plantas da população segregante

A subpopulação segregante oriunda da autofecundação da planta 23C-1 foi plantada em vasos de dois decímetros cúbicos, sendo esta constituída por 233 plantas. Essas plantas foram inicialmente plantadas em vasos de meio

decímetro cúbico e, após a inoculação e a primeira avaliação, elas foram transplantadas para vasos de dois decímetros cúbicos, contendo a mistura de solo substrato Plantmax® e esterco conforme anteriormente descrito.

As plantas foram inoculadas no estágio de desenvolvimento V2-V3 descrito por Fehr & Cavines (1977). Para a inoculação foram utilizados os esporos do isolado monopustular PPUFV02, previamente multiplicado em plantas da cultivar Conquista, e então armazenados a -80° C. Esses uredósporos foram submetidos a um choque térmico por 10 minutos a 40° C, em banho-maria, e reidratados por 24h para quebra da dormência (FURTADO et al., 2008). As inoculações foram feitas com um atomizador de ar direto, usando uma suspensão de $1,0 \times 10^5$ uredósporos/mL do isolado PPUFV02 em água destilada + Tween 20 (0,01%). Após as inoculações as plantas foram mantidas em câmara de nevoeiro, a 25°C no escuro, durante 24h, sendo, posteriormente, transferidas para a casa de vegetação, onde permaneceram até a colheita das vagens. Como controle, em todas as inoculações foram utilizadas 15 plantas da cultivar Conquista (padrão de suscetibilidade) e 15 plantas do acesso PI 587905 (padrão de resistência).

As avaliações da subpopulação 23C-1 foram realizadas aos oito, dez, doze quatorze dias após as inoculações (dpi), classificando-se as plantas qualitativamente quanto ao fenótipo apresentado (RB, TAN e IF).

Os dados da avaliação fenotípica dessa subpopulação foram submetidos a um teste de aderência de qui-quadrado (χ^2), testando a hipótese de segregação de um único gene com dominância parcial (1AA : 2 Aa : 1aa) e segregação de dois genes com epistasia recessiva (9: 3: 4).

3.2 – Mapeamento genético utilizando marcadores microssatélites

3.2.1 – Extração do DNA

As extrações de DNA das plantas foram realizadas seguindo o protocolo descrito por Doyle & Doyle (1987) com modificações conforme apresentado a

seguir: cerca de 100 a 200 mg de tecido foliar foram macerados em N₂ líquido. Posteriormente o macerado foi ressuspenso em 1 mL de Tampão de Extração [2% (p/v) CTAB; 100mM Tris-HCl (pH 8.0); 20 mM EDTA (pH 8.0); 1,4 M NaCl, 2% (p/v) PVP 40 e 0,2% B-Mercaptoetanol], seguido de incubação a 65 °C por 30 min, invertendo-se os tubos a cada 5 min. Após esse tempo, os tubos foram mantidos por 5 min a temperatura ambiente e em seguida foram adicionados 500 µL de CIA (clorofórmio: álcool isoamílico; na proporção 24:1). Os tubos foram invertidos várias vezes até a obtenção de uma “emulsão” e centrifugados a 12000 rpm por 10 min, sendo a fase aquosa transferida para um novo tubo; essa etapa foi realizada duas vezes. À fase aquosa foi acrescentado 0,6 volume de isopropanol gelado e 1/10 de volume de uma solução de NaOAc (3M, pH 5,2), e em seguida os tubos foram mantidos a -20 °C por 2 h. Após esse tempo, os tubos foram centrifugados a 14000 rpm por 10 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado duas vezes com etanol 70% e uma vez com etanol 95%. Os tubos foram mantidos abertos a temperatura ambiente até a secagem dos precipitados, que posteriormente foram ressuspendidos em 100 µL de TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) contendo RNase (40 µg/mL), sendo os tubos incubados a 37 °C por 1 h. A seguir foi adicionado 10% do volume de NaOAc (3M, pH 5,2) e 2/3 do volume de isopropanol gelado, sendo os tubos invertidos e incubados a -20 °C por 2 h. Novamente os tubos foram centrifugados a 14000 rpm/ 10 minutos, sendo o sobrenadante desprezado e o precipitado lavado duas vezes com 70% e uma vez com etanol 95%. Os tubos foram então mantidos abertos a temperatura ambiente até que os precipitados estivessem secos. Posteriormente os precipitados foram ressuspendidos em 50 µL de TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) contendo RNase (40 µg/mL).

A estimativa da concentração, da qualidade e da integridade do DNA extraído foi realizada por análise eletroforética em gel de agarose 1%, seguida de coloração com brometo de etídio e visualização em fotodocumentador de luz ultravioleta. Quantidades conhecidas de DNA do fago λ *lambda* foram aplicadas no gel nas concentrações de 50ng e 100ng. Posteriormente, foram feitas as diluições do DNA para a concentração de 5ng/ µL.

3.2.2 – Genotipagem com marcadores microssatélites

Foram utilizados oligonucleotídeos que amplificam locos microssatélites ligados aos cinco locos conhecidos de resistência à *P. phachyrhizi*. Os oligonucleotídeos utilizados neste trabalho são apresentados na Tabela 1.

As reações de PCR foram realizadas em Termociclador GeneAmp PCR System 9700 (ABI), seguindo-se as condições de termociclagem: 94°C por 5 minutos, seguidos de 40 ciclos de 94°C por 40 segundos 55°C por 40 segundos 72°C por 40 segundos e uma etapa final de 25 minutos a 72°C.

As reações de PCR continham: tampão de PCR (10mM de Tris-HCl pH 8,3 e 50mM KCl), MgCl₂ 1,5 mM, dNTP mix 0,2 mM, oligonucleotídeos 0,4µM, taq DNA polymerase 1 U, 30ng de DNA, em volume final de 20µL.

Todos os oligonucleotídeos foram testados com ambos parentais, a fim de verificar a existência de polimorfismo nos locos amplificados. Feita a seleção dos locos polimórficos, foi utilizada a estratégia de análise de segregantes agrupados (“Bulked Segregant Analysis” ou BSA; MICHELMORE et al., 1991) modificada, a fim de identificar marcadores que estivessem ligados com o gene de resistência à FAS. Na BSA, amostras de DNA extraídas de plantas fenotipicamente semelhantes são agrupadas em quantidades equimolares. Assim, um agrupamento é constituído por indivíduos resistentes e o outro, por indivíduos suscetíveis. Os polimorfismos existentes entre os agrupamentos deverão estar ligados à característica selecionada para discriminá-los, isto porque polimorfismos que não estão ligados à característica de interesse são compartilhados pelos oagrupamentos. Dessa forma, os locos polimórficos entre os parentais e os agrupamentos contrastantes tornam-se bons candidatos a estarem ligados ao gene de interesse, porém a ligação desses locos ao gene de interesse deve ser confirmada por meio da avaliação de toda a população segregante (MICHELMORE et al., 1991; ZHU et al., 2004). Neste trabalho não foram agrupadas as amostras de DNA dos indivíduos semelhantes. Foram utilizados 15 indivíduos com o fenótipo IF e 15 indivíduos suscetíveis, analisando-se cada um desses 30 genótipos com todos os marcadores que apresentaram polimorfismo entre os parentais (*Bulk* aberto).

Os oligonucleotídeos que amplificavam locos polimórficos que se apresentavam como ligados ao gene de resistência foram utilizados para a genotipagem de toda a subpopulação segregante, totalizando 233 plantas.

Primeiramente os produtos de PCR foram verificados em gel de agarose 1% para constatar a presença dos *amplicons*, sendo o tamanho deles estimado por comparação com marcador de peso molecular conhecido. A visualização dos amplicons foi feita utilizando-se um fotodocumentador de luz ultravioleta. Após se constatar a ocorrência de amplificação, os produtos de PCR foram analisados no sequenciador automático ABI 3100 para a coleta de dados sob um filtro virtual D usando o DataCollection (ABI). O tamanho dos fragmentos amplificados em pares de bases foi estimado usando o programa GeneMapper versão 3.5.

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados na amplificação de locos microssatélites descritos como ligados a genes de resistência à FAS em soja

Marca SSR e locus <i>Rpp</i>	Grupo de Ligação	Sequência do primer 1	Sequência do primer 2
Sat_164 BARCSOYSSR_18_1865 BARCSOYSSR_18_1875	G	GTGATCTTCGAAAAGTTCAAT	GCTGTCCCTGAACAAGACTAT
Sat_191N Satt191	G	GCATGACTTGGGTTTCACGTATAG	CGCGATCATGTCTCTGCCATCAGC
<i>Rpp1</i>	G	CGCGATCATGTCTCTG	GGGAGTTGGTGTCTTCTGTG
Sct_187r1	G	ATAGTTTCACATTAGGGTGTGGGG	GAGTGGGTCATTTGAGTACGACTTTTC
Sct_187r2	G	ACTCCTCTGTAGTGTGGCTTCTTTGCC	CATGATGACCAACAATGGCTTTCAATC
Sct_187r3	G	CGTGTATTTGGGATAGCTGTGAAAT	GTGTGAAGATTGCCTTACCAACCTA
Sct_187	G	CATGCTCCCATTTCTCT	AACATTGGCTTTTTACTTAG
Sat_372	G	GCGTCTCGAGGTAATTATCTATTTATCTTTT	GCGAGTTTGGTAACATCGAGTATTGAT
Sat_372-1N	G	GATTCACGAAGTGTATTTCTC	GACAGAGTCGCAATATACTCATC
Sat_064N	G	CGGCCTTACTTATCCATTTGCCATCC	CCTAAGACTACTCGGTTTTACTACTGCAC
Sat_064	G	TAGCTTTATAATGAGTGTGATAGAT	GTATGCAAGGGATTAATTAAG
Sat_165	J	GCGGACAGGCAGCCACACATCTTA	GCGGATTAATCAGTTTGTATCGA
Satt622	J	GCGGTGTAGGTAATAATTTAATTCTCAT	GCGGTGTAGGTTTCACACTTCATTCAC
Sat_255	J	GCGGCATGTCATGGTATACGTAACCTTAGA	GCGCAACTGAAGCAAGAAAAGAAACCT
<i>Rpp2</i>	J		
Satt620	J	GCGGGACCGATTAATCAATGAAGTCA	GCGCATTTAATAAGGTTTACAAATTAGT
Satt708	C2	GCGCAATTTTAAGAGATTTTCGGGATAA	GCGACTCGGTTGATTTTTTTTCAATTTTTT
Satt460	C2	GCGCGATGGGCTGTTGGTTTTTAT	GCGCATACGATTTGGCATTTTTCTATTG
Satt079	C2	AGTCGAAGATACACAATTAGAT	CTTTTAGACACAAAATTTATCACT
<i>Rpp3</i>	C2		
Satt307	C2	GCGCTGGCCTTTAGAAC	GCGTTGTAGGAAATTTGAGTAGTAAG
Sat_164	G	GTGATCTTCGAAAAGTTCAAT	GCTGTCCCTGAACAAGACTAT
Satt288	G	GCGGGGTGATTTAGTGTGTTGACACCT	GCGCTTATAATTAAGAGCAAAAGAAG
<i>Rpp4</i>	G		
Satt612	G	GTCATACTGGGTGTTTCATTTATGAC	GCGCCTTTTAGTCTCTGAAAGTATTT
Sat_166	N	GCGCTAATTTATCGGGACCCAACATAT	GCGGAAATAGTGCATTGATGAAAAACA
<i>Rpp5</i>	N		
Sat_275	N	GCGCGCTGGCAATTATTCAAACTTAACGAT	GCGAAGGCTACGGTGAATAGAAAGGAC
Sat_280	N	GGCGGTGGATATGAAACTTCAATAACTACAA	GGCGGGCTTCAAATAATTACTATAAAACTACGG
sc21_3360M	G	AGGATAAGTTAGGTGGTATG	AGTTTTAGAGAACGGTGAGG
sc21_3420M	G	ATAATAATGAGTGTGCTGCCTG	ACAATCCGCACAACACTACAAC
sc21_4058M	G	CTAAAAGTCTGCAACTTAGC	ACGATTTGGCAGTATATGAC
sc21_4808M	G	TGAGTTCAATTTGTCTCTCTC	ACTGACCACCAAAATACAAAG

Sequências disponíveis em <http://soybase.org/resources/ssr.php>

3.2.3 – Construção do mapa genético localizado

Os dados obtidos com os marcadores SSR foram dispostos em uma matriz, em cujas linhas foram codificados os diferentes marcadores e o dado referente à fenotipagem da subpopulação 23C-1, enquanto as informações de todos os 233 indivíduos que compõem essa subpopulação foram codificadas nas colunas. Os marcadores receberam a seguinte codificação: 0 (zero) é o código para aquelas plantas homozigotas para o alelo do progenitor resistente, 1 é o código dado às plantas heterozigotas e 2 para plantas homozigotas para o alelo do progenitor suscetível. Tais dados foram utilizados para a análise de ligação e construção do mapa no programa GQMOL 6.1 (CRUZ & SCHUSTER, 2006), utilizando-se a função de mapeamento de Kosambi (KOSAMBI, 1944). O critério de ligação foi um LOD score $>3,0$ e a porcentagem máxima de recombinação de 30,0%.

3.3 – Seleção de plantas com eventos de recombinação na região genômica que contém o gene de resistência

As subpopulações 23C-2 e 23C-3 foram plantadas em onze bandejas de plástico (0,6m x 0,4m x 0,15m), contendo 40 plantas/bandeja. As bandejas continham uma mistura de solo e substrato Plantmax®, na proporção 1:1. Após a inoculação e avaliação, as plantas suscetíveis foram transplantadas, totalizando 122 plantas, para vasos de dois decímetros cúbicos preenchidos com a mesma mistura anterior de solo: substrato Plantmax®: esterco (3:1:1).

As subpopulações 23C-4 e 23C-5 foram plantadas em dez bandejas de plástico (0,6m x 0,4m x 0,15m) e foram seguidos os mesmos procedimentos das populações 2 e 3, obtendo-se no final 87 plantas suscetíveis.

Nas populações 23C-2, 23C-3, 23C-4 e 23C-5, foi feita apenas uma avaliação aos oito dpi, sendo que as plantas que apresentaram lesões RB e ou IF foram eliminadas e as plantas suscetíveis (TAN) foram transplantadas e novamente avaliadas aos dez, doze e quatorze dpi.

A extração de DNA e a análise dos locos microssatélites Satt191, Sct_187r2, Sat_064 e Sat_372 foram efetuadas conforme nos itens 3.2.1 e 3.2.2.

4 – RESULTADOS

4.1 – Herança da resistência do acesso PI 587905 ao isolado monopustular PPUFV02 de *Phakopsora pachyrhizi*

As 15 plantas do progenitor PI 587905, padrão de resistência, apresentaram reação de resistência quando confrontados com o isolado PPUFV02 de *P. pachyrhizi*. Essa reação de resistência, caracterizada por lesões necróticas pequenas, foi denominada imunidade com *flecks* (IF) (Figura 8). As plantas do progenitor 'Conquista' apresentaram as lesões TAN, típicas de reação de suscetibilidade (Figura 9).

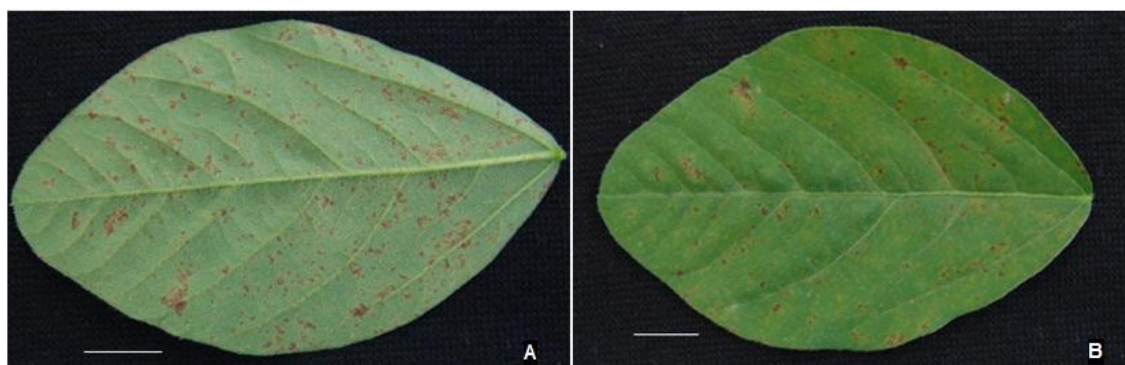


Figura 8: Fenótipo de resistência com lesões necróticas pequenas, denominada imunidade com *flecks*, apresentada pelo PI 587905 aos quatorze dias após a inoculação com o isolado monopustular PPUFV02 de *Phakopsora pachyrhizi* (1×10^5 uredósporos/ml). Detalhe dos sintomas na face abaxial (A) e adaxial (B) de um folíolo avaliado. A barra corresponde a 1 cm.

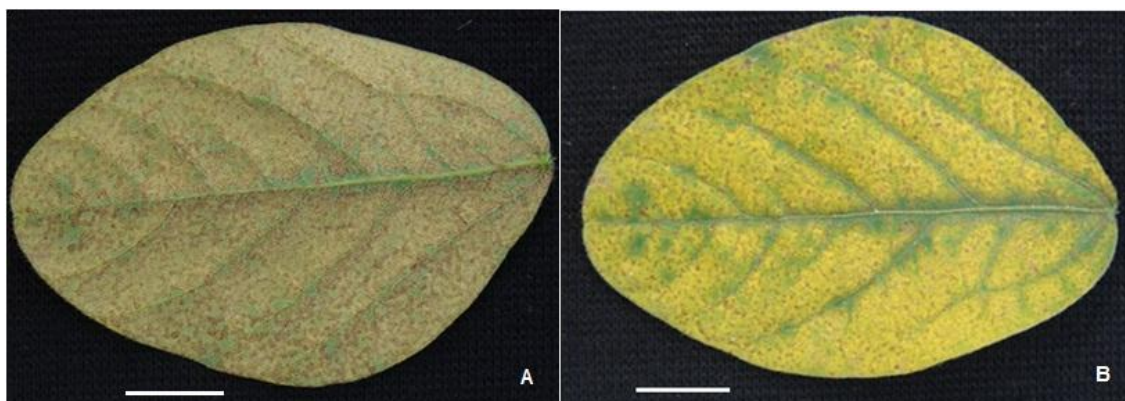


Figura 9: Fenótipo de suscetibilidade, com lesões esporulantes de coloração amarelo-palha (lesão tipo TAN), apresentado pela cultivar Conquista aos quatorze dias após a inoculação com isolado monopustular PPUFV02 de *Phakopsora pachyrhizi* (1×10^5 uredósporos/ml). Detalhe dos sintomas na face abaxial (A) e adaxial (B) de um fóliolo avaliado. A barra corresponde a 1 cm.

Nos indivíduos da subpopulação F₂ 23C-1 foram observados três tipos de reação ao isolado PPUFV02: (i) reação de imunidade com *flecks* semelhante à reação apresentada pelo progenitor resistente; (ii) lesões vermelho-escuras (*reddish-brown*, lesões RB), que se diferem da reação apresentada por ambos progenitores (Figura 10); e (iii) reação de suscetibilidade (TAN), semelhante à reação apresentada pelo progenitor suscetível.

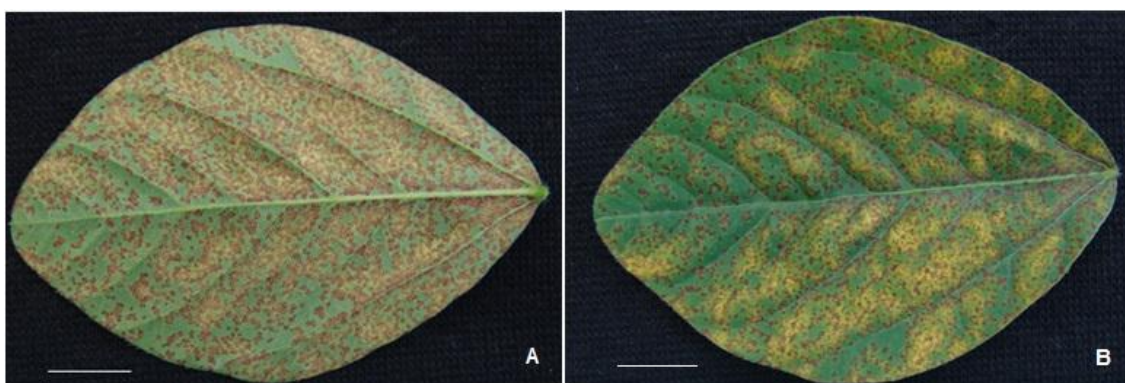


Figura 10: Fenótipo de resistência com lesões RB apresentado por alguns indivíduos da subpopulação F₂ 23C-1 aos quatorze dias após a inoculação com o isolado monopustular PPUFV02 de *Phakopsora pachyrhizi* (1×10^5 uredósporos/ml). Detalhe dos sintomas na face abaxial (A) e adaxial (B) de um fóliolo avaliado. A barra corresponde a 1 cm.

A subpopulação 23C-1 foi composta por 233 plantas, sendo que 66 foram classificadas como suscetíveis (lesão TAN), 60 apresentaram fenótipo de imunidade com *flecks* (IF) e 107 apresentaram lesões RB. Assumindo-se que o fenótipo RB era devido à heterozigose no loco de resistência, testou-se a conformidade da proporção observada com a proporção mendeliana esperada para a segregação de um único gene com dominância parcial (1: 2: 1). O valor de qui-quadrado (χ^2) obtido de 1,86 indicou que a proporção observada não foi significativamente diferente da esperada pelo modelo genético proposto (p=39,48%) (Tabela 2^a). Também foi feito um teste de aderência de χ^2 para testar se a proporção observada na subpopulação 23C-1 seria compatível como uma segregação esperada para a hipótese de segregação de dois genes com epistasia recessiva (9:3:4). O valor de qui-quadrado (χ^2), obtido de 11,54, indicou que esse modelo não explica a segregação observada nessa subpopulação (p=0,31%) (Tabela 2^b).

Assim, a resistência apresentada pelo PI 587905 é governada por um gene que apresenta dominância parcial.

Tabela 2: Análise da segregação da resistência ao isolado monopustular PPUFV02 de *Phakopsora pachyrhizi* na subpopulação F₂ 23C-1, derivada do cruzamento entre 'Conquista' e o PI 587905, considerando-se a hipótese de segregação de um gene com dominância parcial(1:2:1)^a e de dois genes com epistasia recessiva (9:3:4)^b.

Fenótipo	Observado	Esperado (1:2:1) ^a	Esperado (3:9:4) ^b
IF	60	58,25	43,69
RB	107	116,5	131,06
Suscetível	66	58,25	58,25
Total	233	233	233
Qui-quadrado		1,86 ns	11,54**
Probabilidade		39,48%	0,31%

ns- não significativo a 5 % de probabilidade. ** significativo a 1% de probabilidade

4.2 – Mapeamento genético com marcadores microssatélites

Foram analisados 29 marcadores microssatélites. Inicialmente efetuou-se o ajuste das condições de termociclagem e de reação para que fosse possível obter a amplificação dos locos microssatélites dos genótipos parentais. Obteve-se essa amplificação para 19 marcadores avaliados: Satt191, Sat_191N, Sct_187, Sct_187r1, Sct_187r2, Sct_187r3, Sat_372, Sat_372-1N, Sat_064, Sat_064N, Sat_255, Sat_460, Sat_166, Sat_280, Satt622, Satt708, Satt612, Sat_275, sc21_3.420M, sc21_4.808M, sc21_4.058M, BARCSOYSSR_18_1865, BARCSOYSSR_18_1875. Foram polimórficos os seguintes marcadores: Satt191, Sat_191N, Sct_187r2, Sat_372, Sat_372-1N, Sat_064, Sat_064N, Satt622, sc21_3.360M, Satt622, Satt708.

Esses marcadores polimórficos foram analisados em 15 plantas IF e em 15 plantas suscetíveis da subpopulação segregante 23C-1, além dos dois parentais, buscando identificar os marcadores microssatélites que pressupostamente estavam ligados ao gene de resistência. A análise revelou a possível ligação dos marcadores Satt191, Sat_191N, Sct_187r2, Sat_372, Sat_372-1N, Sat_064 e Sat_064N, localizados no grupo de ligação G do mapa genético da soja.

Como os marcadores Satt191 e Sat_191N identificam regiões semelhantes do genoma, procedeu-se à genotipagem utilizando-se apenas o Satt191 pela qualidade e consistência da amplificação obtida na reação de PCR. O mesmo foi feito para os marcadores Sat_372 e Sat_372-1N, Sat_064 e Sat_064N. Assim, a genotipagem de toda a subpopulação 23C-1 foi efetuada para os marcadores Satt191, Sct_187r2, Sat_064 e Sat_372.

O marcador Satt191 amplifica um fragmento de 202pb na cultivar Conquista, e um fragmento de 188pb no PI 587905 (Figura 11). O marcador Sat_372 amplifica fragmentos de 299pb e 292pb na cultivar Conquista e no PI 587905, respectivamente (Figura 12). O marcador Sat_064 amplifica um fragmento de 142 pb na cultivar Conquista e de 104pb no PI 587905 (Figura 13). Já o marcador Sct_187r2 amplifica uma região de 305 e 285 pb na cultivar Conquista e no PI 587905 respectivamente (Figura 14).

Todos os marcadores apresentaram um padrão de segregação codominante (Tabela 3). O mapeamento dos marcadores e do gene de resistência utilizando o programa QQMOL 6.1 revelou que o gene de resistência está localizado na região genômica delimitada pelos marcadores Sct_187r2 e Sat_064 (Figura 15), distando $1,10 \pm 0,49$ cM e $0,90 \pm 0,44$ cM, desses marcadores, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 3: Análise do padrão de segregação dos marcadores microssatélites na subpopulação F₂ 23C-1, derivada do cruzamento entre PI 587905 e 'Conquista', constituída por 233 indivíduos

Marcador	Plantas			Hipótese	χ^2 (probabilidade)
	Fenótipo	Observado	Esperado		
Satt191	RR	61	58,25	1:2:1	2,58 (27,54%)
	Rr	105	116,5		
	rr	67	58,25		
	Total	233	233		
Sct_187r2	RR	57	58,25	1:2:1	1,42 (49,15%)
	Rr	110	116,5		
	rr	66	58,25		
	Total	233	233		
Sat_064	RR	58	58,25	1:2:1	1,52 (46,88%)
	Rr	109	116,5		
	rr	66	58,25		
	Total	233	233		
Sat_372	RR	67	58,25	1:2:1	5,89 (5,28%)
	Rr	98	116,5		
	rr	68	58,25		
	Total		233		

Tabela 4: Matriz de distância genética (cM) entre marcadores e o gene de resistência com base na análise de segregação na subpopulação F₂ 23C-1 derivado do cruzamento PI 587905 x ‘Conquista’, composta por 233 indivíduos

Marcador	Satt191	Sct_187r2	Gene R	Sat_064	Sat_372
Satt191	-	5,5	6,6	6,2	9,1
Sct_187	69,5	-	1,1	0,6	3,5
Gene R	64,7	96,4	-	0,9	3,7
Sat_064	66,5	99,9	98,4	-	2,8
Sat_372	56,0	81,2	80,4	85,3	-

Valores acima da diagonal principal referem-se às distâncias entre marcadores. Valores abaixo da diagonal principal referem-se ao valor LOD. Distâncias em função de kosambi.

4.3 – Seleção de indivíduos F₂ com eventos de recombinação informativos na região genômica delimitada pelos marcadores Sct_187r2 –Sat_064, que contém o gene de resistência derivado de PI 587905.

As plantas F₂ originadas a partir da autofecundação das plantas 23C-2, 23C-3, 23C-4 e 23C-5 foram analisadas quanto à resistência, oito dias após a inoculação, e as plantas que apresentavam o fenótipo de IF e RB foram eliminadas, selecionando-se 209 plantas suscetíveis, que foram analisadas com os marcadores Satt191, Sct_187r2, Sat_064 e Sat_372. Foram obtidas 31 plantas com recombinação na região compreendida pelos marcadores Satt191 –Sat_372. Dessas, somente uma possui recombinação no intervalo Sct_187r2 –Sat_064.

A análise conjunta de todos os recombinantes informativos obtidos neste trabalho (Tabela 5) revela que dois recombinantes possuem um evento de recombinação no intervalo Sct_187r2–gene R e dois no intervalo gene R–Sat_064, colocando o gene proximal aos marcadores Sct_187r2 e Sat_064.

Tabela 5: Fenótipo e genótipo de plantas com eventos de recombinação informativos na região genômica do PI 587905 compreendida pelos marcadores Sct_187-Sat_064, que contém o gene que confere resistência ao isolado monopustular PPUFV-02 de *Phakopsora pachyrhizi*

Subpopulação de origem	Código da planta	Fenótipo	Genótipo			
			Satt191	Sct_187	Sat_064	Sat_372
23C-1	23C-1-31	RB	2	2	1	1
23C-1	23C-1-156	R	2	2	1	1
23C-1	23C-1-216	RB	1	1	2	2
23C-3	23C-3-47	TAN	3	3	2	2

1= homocigoto para alelo proveniente do genitor PI 587905, 2 , heterocigoto, com presença de alelos de ambos progenitores, 3 homocigoto para o alelo proveniente do genitor 'Conquista'

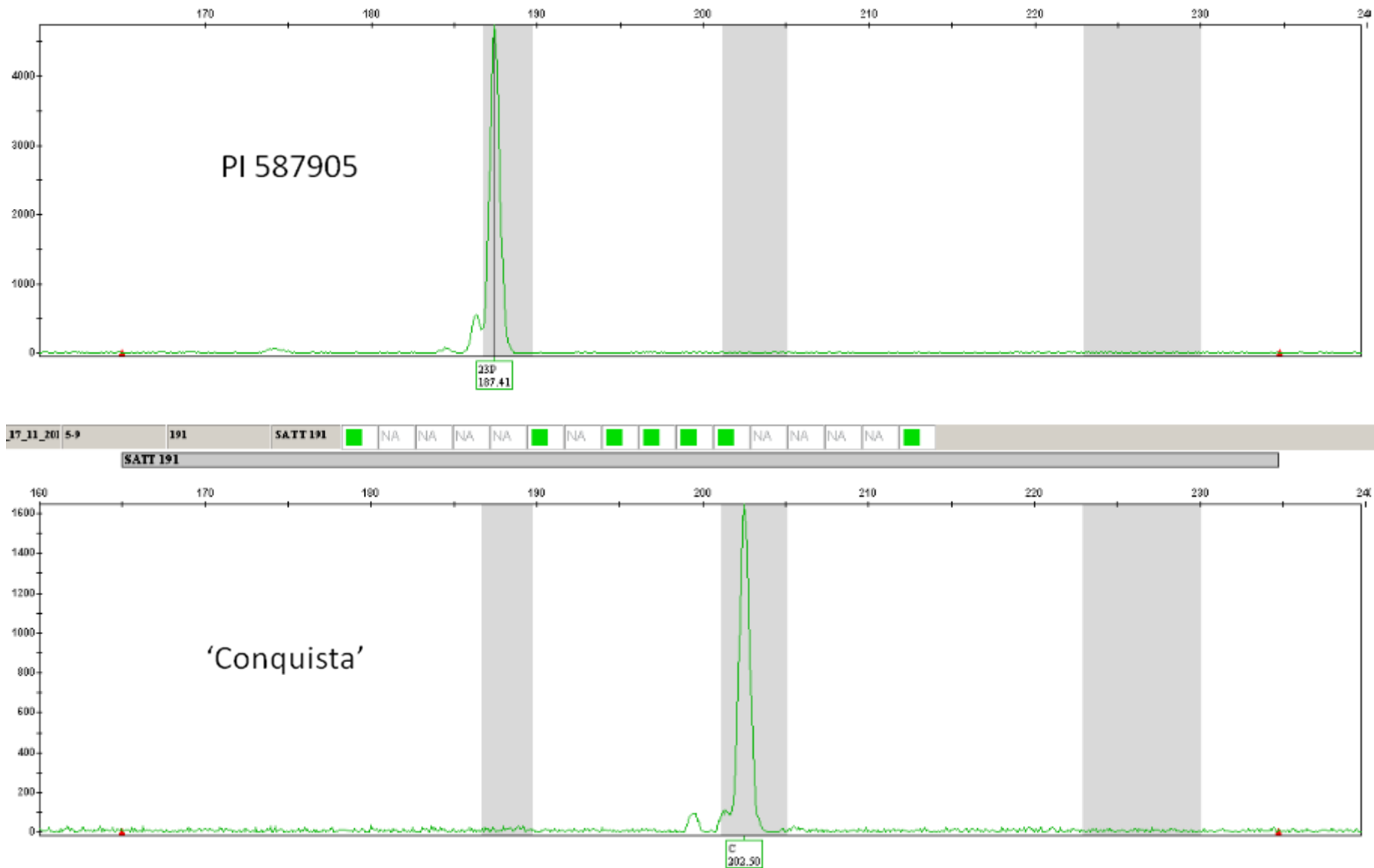


Figura 11: Polimorfismo entre os genitores PI 587905 (188pb) e 'Conquista' (202pb) gerados pela amplificação do DNA genômico com o marcador Satt191, evidenciado após análise dos *amplicons* no sequenciador automático ABI 3100

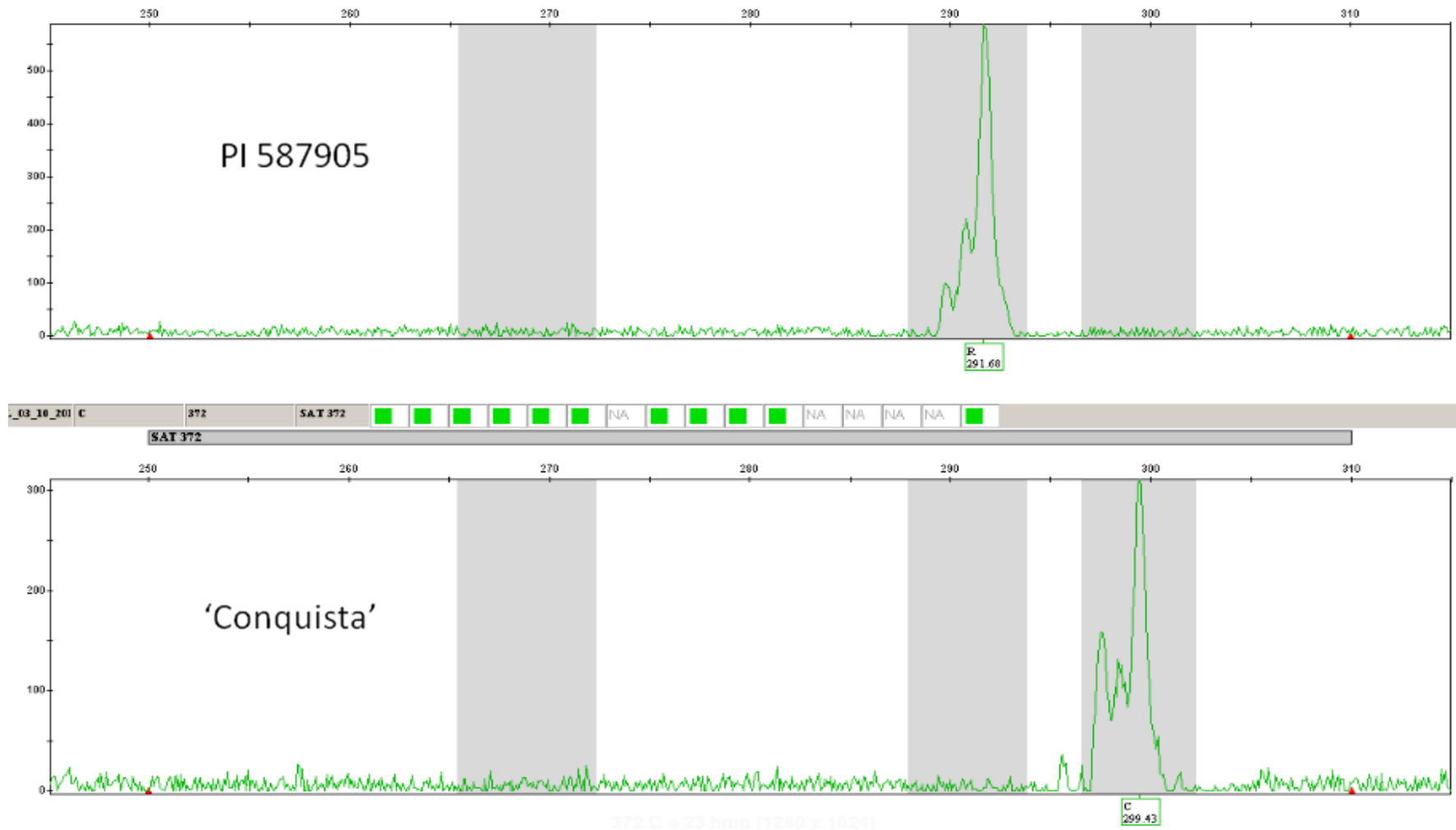


Figura 12: Polimorfismo entre os genitores PI 587905 (292pb) e 'Conquista' (299pb) gerados pela amplificação do DNA genômico com o marcador Sat_372, evidenciado após análise dos *amplicons* no sequenciador automático ABI 3100

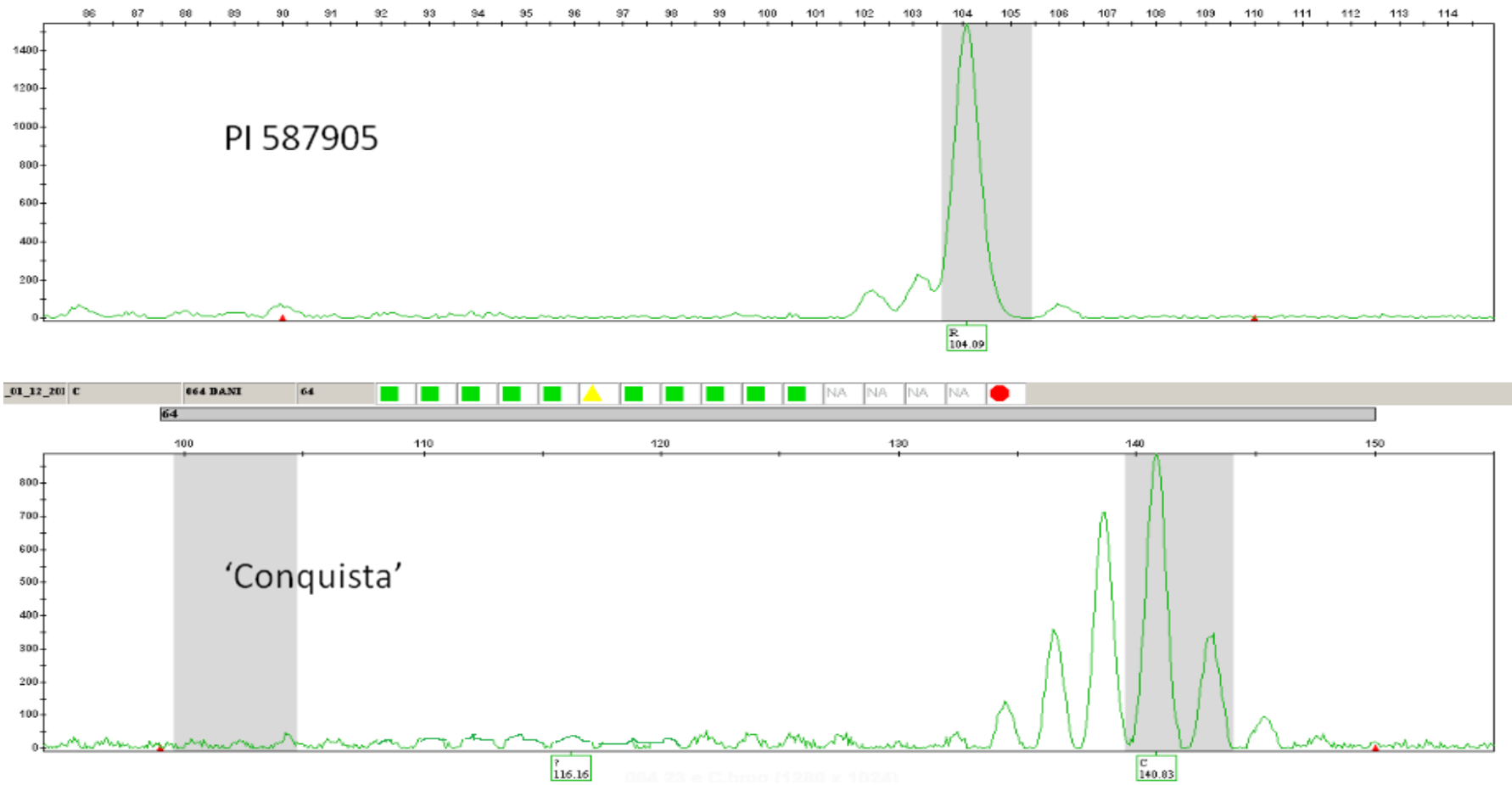


Figura 13: Polimorfismo entre os genitores PI 587905 (104pb) e 'Conquista' (142pb) gerados pela amplificação do DNA genômico com o marcador Sat_064, evidenciado após análise dos *amplicons* no sequenciador automático ABI 3100

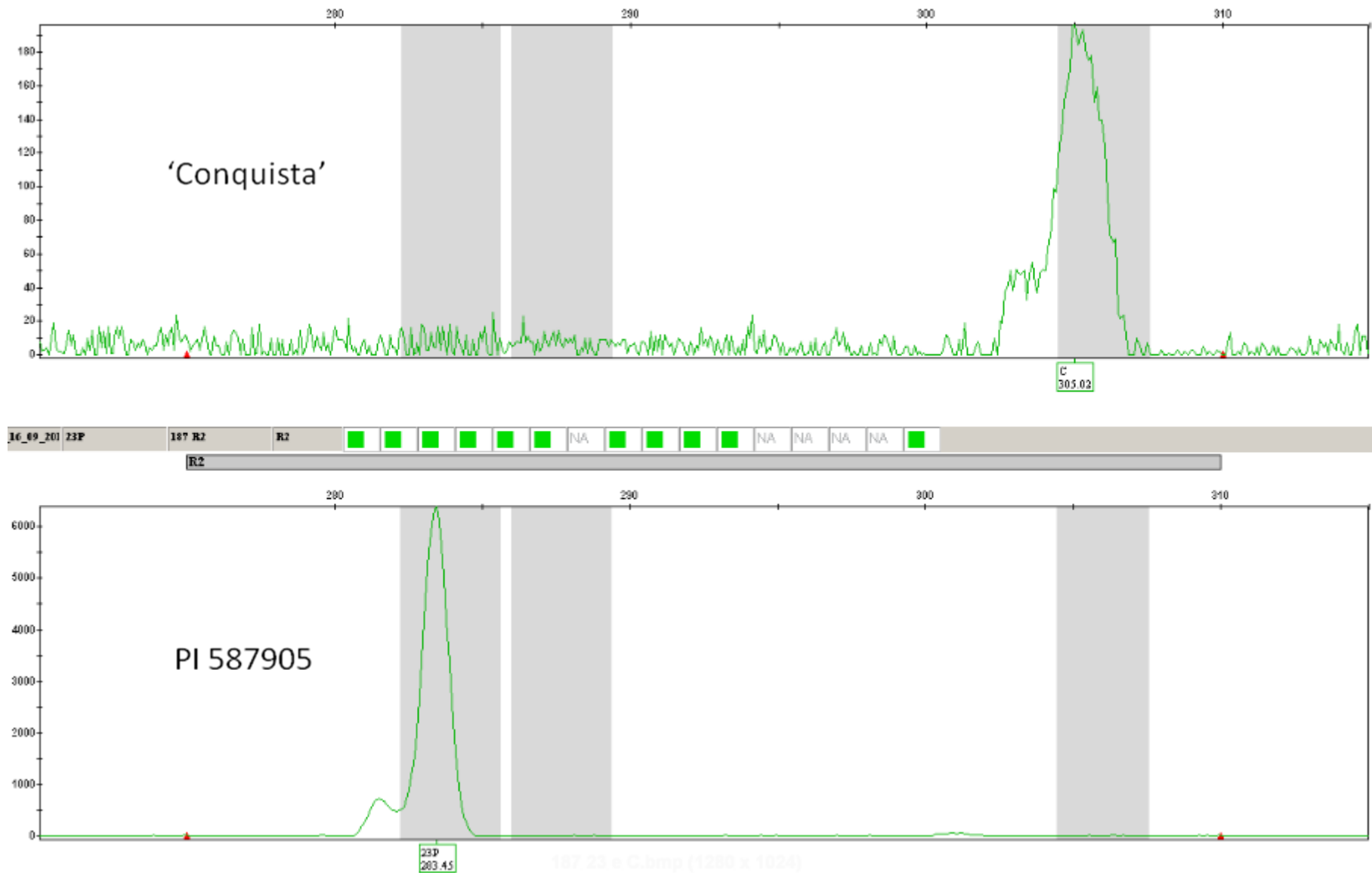


Figura 14: Polimorfismo entre os genitores PI 587905 (283pb) e 'Conquista' (305pb) gerados pela amplificação do DNA genômico com o marcador Sct_187r2, evidenciado após análise dos *amplicons* no sequenciador automático ABI 3100

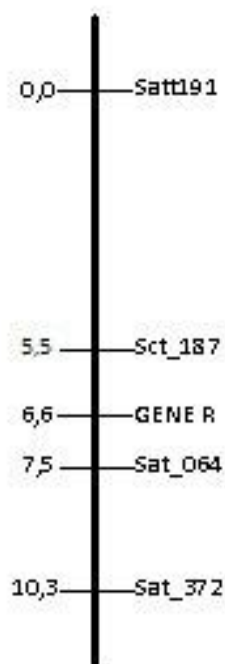


Figura 15: Mapa de ligação da região genômica do PI 587905 que contém o gene que confere resistência ao isolado monopustular PPUFV02 de *P. pachyrhizi*. Este mapa foi construído com base na análise de segregação da resistência e dos marcadores microssatélites na subpopulação F2 23C-1, constituída por 233 indivíduos, utilizando-se o programa GQMOL 6.1 (CRUZ & SCHUSTER, 2006). Distâncias representadas em cM foram calculadas utilizando-se a função de Kosambi.

5 – DISCUSSÃO

A resistência do PI 587905 ao isolado monopustular PPUFV02 de *P. pachyrhizi* é devida a um gene com dominância parcial, localizado no grupo de ligação G da soja (cromossomo 18), entre os marcadores Sct_187 e Sat_064. Na condição homozigota, atestada pela análise de locos microssatélites ligados, esse gene confere um fenótipo de imunidade com *flecks*, enquanto que na condição heterozigota confere o fenótipo de resistência tipo RB.

Nessa mesma região, Hyten et al. (2007) mapearam o gene *Rpp1* derivado do PI 200492, que foi localizado a 0,4 cM dos marcadores Sct_187 e Sat_064 (Figura 16C). Como Costa (2010) demonstrou que o isolado PPUFV02 suplanta a resistência conferida pelo *Rpp1*, o gene de resistência do PI 587905 é um alelo diferente do gene *Rpp1*, ou um alelo de um gene muito proximamente ligado. Nessa mesma região foi mapeado o gene de resistência do PI 594538A por Chakraborty et al. (2009). Esses autores consideram que o gene desse acesso é provavelmente um alelo do gene *Rpp1*, e o designaram *Rpp1b* (Figura 16B). Suportaram essa conclusão o fato do PI 200492 apresentar um fenótipo de imunidade aos isolados para os quais é efetivo e a resposta diferenciada dos acessos PI 200492 e PI 594538A ao isolado ZM01-1 utilizado em seus estudos. ZM01-1 produz lesões tipo RB em PI 594538A e TAN no PI 200492, fonte original do gene *Rpp1*. Entretanto, Chakraborty et al. (2009) não excluem a possibilidade de *Rpp1b* ser um novo gene proximamente ligado a *Rpp1*.

Ray et al. (2009) também mapearam, nessa mesma região do Grupo de ligação G, o gene de resistência do PI 587886 e do PI 587880A, que foi mapeado 5,cM acima do Sat_064 (5,2 cM) (Figura 16A). Eles denominaram esse gene *Rpp1?*, por considerarem possível que ele também fosse um alelo do gene *Rpp1* ou de um gene proximamente ligado. Essa maior distância do gene estudado por Ray et al. (2009) para com o loco Sat_064, comparativamente à obtida nos trabalhos realizados por Hyten et al. (2007) e Chakraborty et al (2009), pode ser explicada por possíveis erros na avaliação fenotípica, que foi feita em campo. Ray et al. (2009) verificaram que a resposta do PI 594538A, PI 587886 e PI 587880A a oito diferentes isolados de

P. pachyrhizi era idêntica, exceto para o isolado AU79-1, que mostrou reação imunidade com algumas lesões RB (IR/RB) em PI587886 e PI 587880A, e lesão RB no PI 594538A. Não se descarta a possibilidade de a resistência do PI 587886 e PI 587880A ser devida ao *Rpp1b*. A resposta diferenciada com AU79-1 levou esses autores a designar o gene de resistência desses acessos *Rpp1?*. até que a realização de estudos mais detalhados demonstrem se *Rpp1?* é, ou não, um alelo diferente do gene *Rpp1*.

O fenótipo da resistência do PI 587905 ao isolado PPUFV-02 é similar ao relato por Ray et al. (2009) para os PI 587886 e PI 587880A, quando avaliados com o isolado AU79-1. Esses três acessos também apresentam o mesmo tipo de reação ao isolado PPUFV-02 nos estudos de Costa (2010). Da mesma forma, o tipo de ação gênica do gene *Rpp1?* descrito no PI 587886 e no PI 587880A é idêntico à observada para o gene do PI 587905 no presente estudo. Dessa forma, esses três PI's podem possuir o mesmo alelo de resistência à *P. pachyrhizi*, contudo isso só pode ser confirmado após serem feitos testes de alelismo ou mapeamento fino e clonagem dos genes de resistência desses acessos.

A ordem dos marcadores usados neste trabalho foi a mesma ordem encontrada por Hyten et al. (2007), Chakraborty et al. (2009) e Ray et al. (2009), e alterada quando comparada com o mapa consenso da soja desenvolvido por Song et al. (2004). Buscando entender a causa da diferença entre o mapeamento elaborado por eles e por Song et al. (2004), Hyten et al. (2007) chegaram à conclusão de que a aparente inversão na ordem dos marcadores Sat_372 e Sat_064 foi causada pela análise feita com base em varias populações no “*JoinMap analysis*”. O mapa consenso da soja feito por Song et al. (2004) foi baseado em cinco populações, sendo que apenas uma continha análise dos marcadores Sct_187, Sat_064 e Sat_372 (HYTEN et al., 2007).

A resistência conferida pelo gene derivado de PI 587905 parece ser do tipo isolado-específica. Soares et al. (2009b) reportaram a resposta diferencial do PI 587905 em seus estudos da avaliação da resistência de germoplasma de soja nas diversas regiões de cultivo no Brasil. Segundo esses autores, na safra 2007/2008 o PI 587905 apresentou lesões RT (predomínio de RB, com algumas TAN) em Londrina (PR), lesões TR (predomínio de TAN, com RB) em

Passo Fundo (RS), lesões TAN em Dourados (MS) e ausência de lesões (imunidade) em Goiânia (GO). Na safra 2008/2009 o PI 587905 apresentou as reações TR nos cultivos realizados em Londrina (PR), RB em Passo Fundo (RS), RB em Dourados, RB em Goiânia, e imunidade em São Desidério (BA). Essa variabilidade nos resultados provavelmente reflete a diversidade do patógeno presente nesses diferentes locais e épocas de plantio.

Esse PI foi classificado como altamente resistente (quase imune) a uma população japonesa de *P. pachyrhizi* (JRP), e como suscetível a uma população brasileira (BRP-1) por Yamanaka et al. (2010). Esses autores também verificaram uma reação denominada “*mix*” (mistura de lesões RB e TAN) em resposta à inoculação com a população brasileira BRP-2. Essa população provavelmente também contém isolados que suplantam a resistência de PI 587905.

Com base nesses estudos, é pouco provável que o desenvolvimento de variedades de soja resistentes à ferrugem asiática com base somente na incorporação do gene de resistência derivado de PI 587905 seja capaz de proporcionar uma resistência durável em condições de campo. Assim, os marcadores Sct_187 e Sat_064 poderiam ser utilizados para piramidar o gene de resistência de PI 587905 juntamente com genes de resistência disponíveis nos locos *Rpp2*, *Rpp3*, *Rpp4* e *Rpp5*.

A maioria dos genes de resistência clonados até o momento codifica proteínas com domínios NBS (*Nucleotide Binding site*) e LRR (*Leucine-Rich Repeats*) (EITAS & DANGL, 2010; JONES & DANGL, 2006). No genoma da cultivar Williams, recentemente caracterizado (SCHMUTZ et al., 2010), a região compreendida pelos marcadores Sct_187 e Sat_064 corresponde a aproximadamente 150 kpb, que contém três análogos de genes de resistência do tipo NBS/LRR (Figura 17). É provável que um desses análogos no genoma do PI 587905 seja o gene de resistência mapeado no presente estudo. Dessa forma, os quatro indivíduos com eventos de recombinação informativos na região poderão ser utilizados no mapeamento genético fino do gene de resistência, com novos marcadores moleculares, para identificar a sequência homóloga que seja candidata a ser o gene de resistência, priorizando-a para a caracterização completa e estudos funcionais, como efetuado por Meyer et al. (2009) na clonagem recente do gene *Rpp4*. A caracterização do gene de

resistência desse PI e de outros genes localizados no loco *Rpp1* permitirá o melhor entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na geração de novos genes de resistência nesse loco, contribuindo com o estabelecimento de novas estratégias para o desenvolvimento de resistência durável à ferrugem asiática da soja.

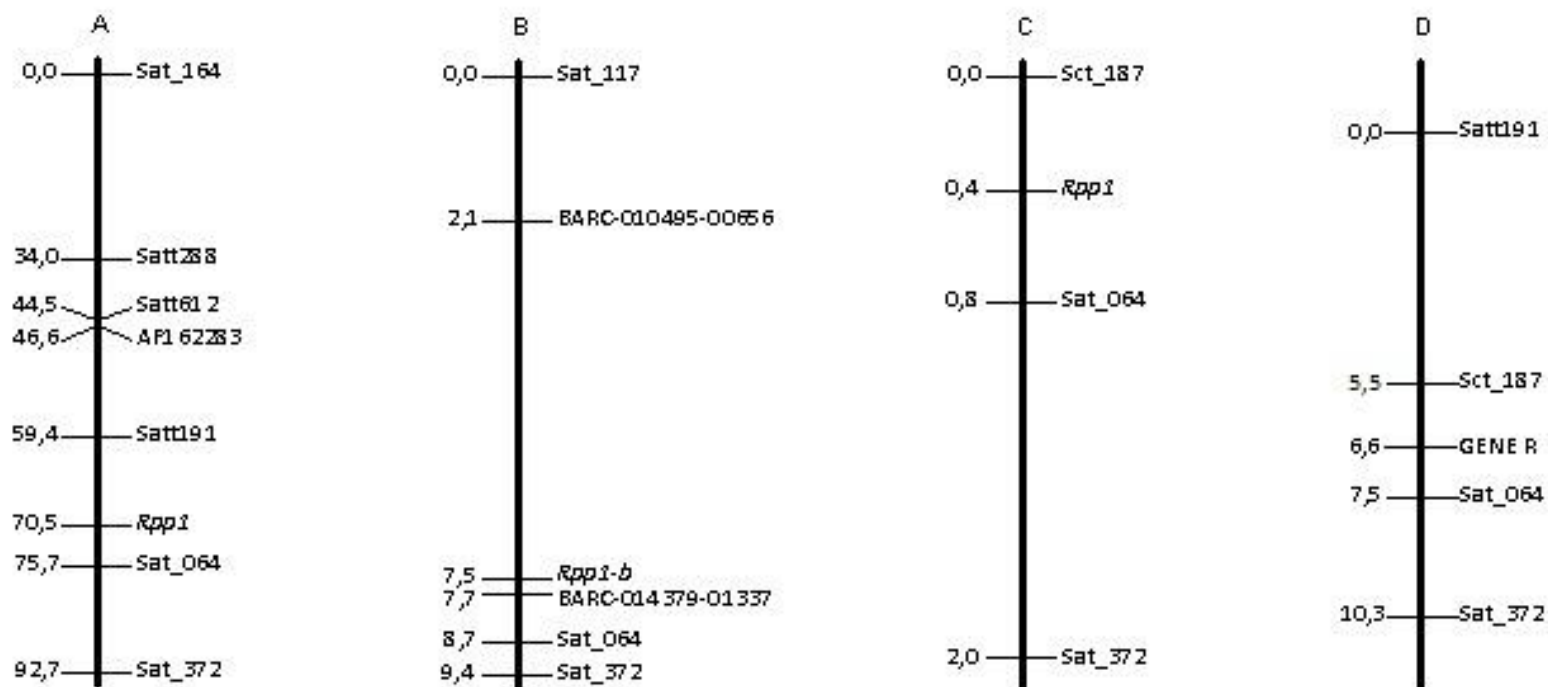


Figura 16: Mapas de ligação no LG-G (cromossomo 18) que apresentam o loco *Rpp1* e os locos proximamente ligados a este. (A) Integração dos mapas de populações de campo apresentado por Ray et al. (2009) do novo alelo do gene *Rpp1*, apresentado pelos autores como *Rpp1?*. Novo alelo este presente nos acessos PI 587886 e PI 587880A. (B) Mapa de ligação com a localização do *Rpp1b* baseado em famílias $F_{3:4}$ do cruzamento do PI 594538A x Loda. (C) Mapa de localização do loco *Rpp1* relatado por Hyrten et al. (2007). (D) Mapa apresentado neste trabalho, proveniente da subpopulação F_2 23C-1, constituída de 233 plantas e mapeadas utilizando o programa GQMOL 6.1 (CRUZ & SCHUSTER, 2006). Distâncias representadas em CM foram calculadas utilizando a função de Kosambi.

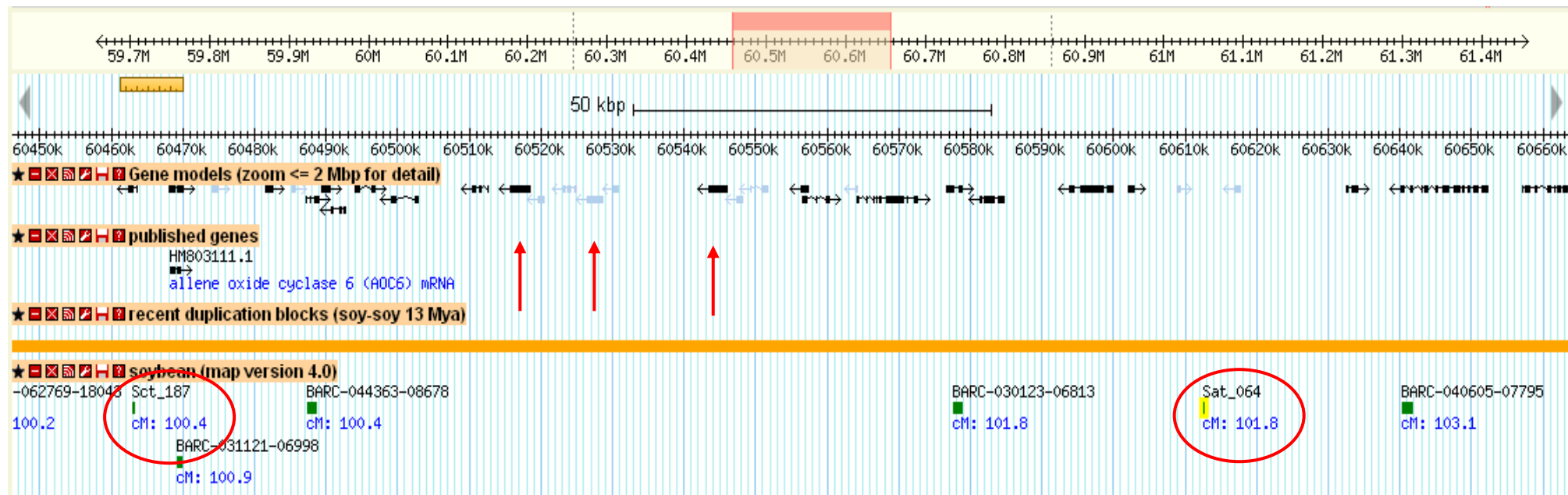


Figura 17: Detalhe da região genômica da cultivar Williams compreendida pelos marcadores Sct_187 e Sat_064 (círculo vermelho), mostrando a presença dos genes preditos que apresentam similaridade com genes de resistência do tipo NBS-LRR (seta vermelha). (Glycine max genome assembly version 1.01, disponível no www.soybase.org)

6 – CONCLUSÕES

- i. A resistência do acesso PI 587905 a *P. pachyrhizi* deve-se a um único gene com dominância parcial;
- ii. O gene de resistência do acesso PI 587905 é um alelo do gene *Rpp1* ou de um novo gene proximamente ligado;
- iii. O gene de resistência do PI 587905 está localizado na região genômica compreendida pelos marcadores Sat_064 e o Sct_187r2, que, no genoma da cultivar Williams contém três análogos de gene de resistência do tipo NBS-LRR.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKKAYA, M.S., BHAGWAT, A.A. & CREGAN, P.B. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. **Genetics**. 132:1131-1139. 1992.
- ALMEIDA, A. M. R. et al. Doenças da soja (*Glycine max* L.). IN: KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia** (doenças das plantas cultivadas). São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1997. Cap. 61. p. 642-664.
- 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. **Fitopatol. bras.** 30(4), jul - ago 2005
- ANDRADE, P. J. M.; ANDRADE, D. F. A. A. **Ferrugem asiática: uma ameaça à sojicultura brasileira**. Dourados: Embrapa Fundação Chapadão, 2002. 11 p.
- ARIAS, C. A. A.; TOLEDO, J. F. F.; PIPOLO, A. E.; CARNEIRO, G. E. S.; ABDELNOOR, R.V.; RACHID, B. F.; RIBEIRO, A.S. Desenvolvimento e estratégia de uso de cultivares resistentes no manejo da ferrugem da soja. p. 66-71 In: **Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil** (29. : 2008: Campo Grande, MS). Ata da XXIX Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil. Organizadores: Saraiva, O. F.; Leite, R. M. V. B. C.; Grosskopf, S.E. Londrina: Embrapa Soja, 242 p. – (Documentos / Embrapa Soja, ISSN 1516-781X; n.294). 2008.
- AZEVEDO, L.A.S. de **Proteção integrada de plantas com fungicidas: teoria, prática e manejo**. São Paulo, 2001. 30 p.
- BEARZOTI, E. Mapeamento de QTL. In: PINHEIRO, J. B.; CARNEIRO, I. F. (Ed.). **Análise de QTL no melhoramento de plantas**. Goiânia: FUNAPE, 2000. p.63-223.
- BERGAMIN FILHO, A. Epidemiologia comparativa: ferrugem da soja e outras doenças. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.) **Ferrugem asiática da soja**. Viçosa-MG: Suprema Gráfica e Editora Ltda., 2006. p.15-36.
- BONDE, M. R.; NESTER, S. E.; AUSTIN, C. N.; STONE, C. L.; FREDERICK, R. D. Evaluation of Virulence of *Phacopsora pachyrhizi* and *P. meibomiae* isolates. **Plant Disease**. Saint Paul, v. 90, n.6, p. 7108-7116, 2006.
- BONETTI, L. P. Distribuição da soja no mundo. In: MIYASAKA, S.; MEDINA, J. C. **A soja no Brasil**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, p. 1-6, 1977.
- BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. 2. ed. Viçosa. Ed. UFV 969p. 2005
- BRAMMER, S. P.; MILACH, S. C. K. Marcadores genéticos usados em plantas. In: BRAMMER, S. P.; IORCZESKI, E. J., (Ed.). **Atualização em técnicas celulares e**

moleculares aplicadas ao melhoramento genético vegetal. Passo Fundo: Embrapa-CNPT, 2002.

BROMFIELD, K. R. *Soybean rust.* (1984). 65 f. (Monograph) **American Phytopathological Society**, St. Paul, MN, 1984.

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

BROMFIELD, K.R.; MELCHING, J.S. Sources of specific resistance to soybean rust. **Phytopathology**, v.72, p.706, 1982.

CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A. C. B.; BRITO, G. G.; SAKIYAMA, N. S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (Eds). **Marcadores moleculares**. 2. ed. Viçosa-MG: Editora Folha de Viçosa, 2009. p.11-94.

CÂMARA, G.M. de S. **SOJA: Tecnologia da produção.** USP, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Departamento de Agricultura – Piracicaba, 1998. 293 p.

CÂMARA, G. M. de S. **Notas de aula da disciplina LPV 584: Cana-de-açúcar, mandioca e soja.** Curso de graduação em Engenharia Agrônômica da USP/ESALQ, 2011. Disponível em: <<http://www.lpv.esalq.usp.br/lpv584/584%20Soja%2001%20-%20Apostila%20Texto%20%20Agronegocio%20Soja%202011.pdf> >

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

CARUSO, R. **Soja: uma caminhada sem fim.** Campinas: Fundação Cargill, 1996. 95 p.

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

CASEY, P.S. The epidemiology of soybean rust: *Phakopsora pachyrhizi* Syd. **Soybean Rust Newsletter**, v.4, p.3-5, 1981.

CASTRO AJ, CHEN X, HAYES PM, JOHNSTON M. Pyramiding quantitative trait locus (QTL) alleles determining resistance to barley stripe rust: effects on resistance at the seedling stage. **Crop Sci** 43:651–659. 2003

CATELLI, L.L. **Resistência da soja à ferrugem asiática e ao oídio:** herança de caracteres quali-quantitativos e mapeamento genético. Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade estadual Paulista “Julio de mesquita Filho” Faculdade de ciências Agrárias e Veterinárias campus de Jaboticabal. Jaboticabal-SP, 106 p., 2009.

Cisoja, CENTRO DE INTELIGÊNCIA DA SOJA - Histórico. Disponível em: <<http://www.cisoja.com.br/index.php?p=historico>> Acesso em: 28 dez 2011^a.

Cisoja, CENTRO DE INTELIGÊNCIA DA SOJA - Utilização do grão. Disponível em: <<http://www.cisoja.com.br/index.php?p=utilizacao>> Acesso em: 29 dez. 2011^b.

CHAKRABORTY, N.; CURLEY, J.; FREDERICK, R. D.; HYTEN, D. L.; NELSON, R. L.; HARTMAN, G. L.; DIERS B.W. Mapping and confirmation of a new allele at *Rpp1* from

soybean PI 594538A conferring RB lesion-type resistance to soybean rust. **Crop Science**, v.49, p.783–790, 2009.

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

CONAB, 2011 Acompanhamento da Safra Brasileira – Grãos, Safra 2011/12. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_10_11_14_19_05_boletim_o_tubro-2011.pdf> Acesso em: 20 dez. 2011.

CONAB, 2011. Série histórica. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_12_13_17_24_52_sojaserie_hist.xls> Acesso em: 20 dez. 2011.

CONAB, 2011 Exportações do complexo soja e trigo. Disponível em: <www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_01_09_11_26_24_0204_export_complexo_soja_e_trigo.xls> Acesso em: 20 dez. 2011.

CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM, 2011. Palestra Padrão. Histórico de ocorrência da ferrugem. Disponível em: <http://www.consorcioantiferrugem.net/portal/wp-content/uploads/2010/04/Palestra_CAF_2008_parte1_hist%C3%B3rico.ppt> Acesso em: 31 dez. 2011.

CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM, 2012. Palestra Padrão. Epidemiologia. Disponível em: <http://www.consorcioantiferrugem.net/portal/wp-content/uploads/2010/04/Palestra_CAF_2008_parte4_epidemiologia.ppt> Acesso em: 04 jan. 2012.

CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM, 2012. Palestra Padrão. Sintomas. Disponível em: <http://www.consorcioantiferrugem.net/portal/wp-content/uploads/2010/04/Palestra_CAF_2008_parte3_sintomas.ppt> Acesso em: 04 jan. 2012.

CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM, 2012. Palestra Padrão. Controle. Disponível em: <http://www.consorcioantiferrugem.net/portal/wp-content/uploads/2010/04/Palestra_CAF_2008_parte5_controle.ppt> Acesso em: 04 jan. 012.

COSTA, P.M, **Caracterização e expressão transiente de genes de *Phakopsora pachyrhizi* que codificam proteínas secretadas**. Dissertação. Mestrado em Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa-UFV, Viçosa, MG, 83p., 2010.

COSTAMILAN, L. M.; HENNING, A. A.; ALMEIDA, A. M. R.; GODOY, C.V.; SEIXAS, C. D. S.; DIAS, W. P. **La Niña e os possíveis efeitos sobre a ocorrência de doenças de soja na safra 2010/2011**. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/pesquisa/fitopatologia/LaNina_ocorrencia_doencas_soja_2010-2011.pdf>

CROW, J. F. Mapping functions. **Genetics** 125:669-671. 1990.

- CRUZ, C. D.; SCHUSTER, I. **QGMOL**: aplicativo computacional para análise de dados moleculares e de suas associações com caracteres quantitativos, Versão 6.1. 2006
- DANTAS, M. I. S. Farinhas mistas de trigo e de soja agregam valor nutricional e sensorial em pães. **Rev. Inst. Adolfo Lutz (Impr.)** vol.68 n.2 SP. 2009.
- DEL PONTE, E. M.; SPOLTI, P.; GODOY, C.V. Ferrugem asiática da soja: panorama e perspectivas para o manejo. **Revista Plantio Direto**, out-nov 2009, p.16-19, 2009.
- DEL PONTE, E., E. J.; MARTINS. Decifrando a complexa equação de risco da ferrugem da soja no Brasil. **Revista Plantio Direto**, nov-dez. 2008, p.12-16, 2008.
- DESLANDES, J. A. Ferrugem da soja e de outras leguminosas causadas por *Phakopsora pachyrhizi* no Estado de Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 4, n. 2, p. 337-339, jun. 1979.
- DOYLE J. J. E DOYLE J. L. A rapid DNA isolation method for small quantities of fresh tissues. *Phytochem Bull.* **Botanical Society of América**, Saint Lois, v.19, p.11-15, 1987.
- Eitas, T.K. & Dangl. J.L. Dangl NB-LRR proteins: Pairs, pieces, perception, partners and pathways. *Curr. Opinion in Plant Biology*. 13:1-6, 2010.
- EMBRAPA, 2004a. **Tecnologias de produção de soja região central do Brasil 2004**. Doenças e medidas de controle. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/doenca.htm>> Acesso em: 30 dez. 2011.
- EMBRAPA, 2004b. Notícias cultivar Conquista. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/1996/julho/bn.2004-11-25.6692269003/>> Acesso em: 04 jan. 2012.
- EMBRAPA, 2011a. História da soja. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=112&cod_pai=33> Acesso em: 20 dez. 2011.
- EMBRAPA, 2011c. Usos do Grão. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=25&cod_pai=29> Acesso em: 29 dez. 2011.
- FALEIRO, F. **Marcadores moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina-DF: Embrapa Cerrados, 2007. 99 p.
- FEHR, W. R.; CAVINESS, J. A. **Stages of soybean development**. Ames: Iowa State University. 11p. (Special Report, 80), 1977.
- FERREIRA, M.E. & GRATTAPLAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN., 1998. 220 p.
- FERREIRA, M.E. & GRATTAPLAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas**. 2. ed. Brasília, EMBRAPA/CENARGEN. 1996. 220 p.

FREIRE, M.C.M., **História evolutiva de *Phakopsora pachyrhizi* no Brasil com base em sequências de nucleotídeos de região espaçadora interna do DNA ribossomal nuclear**. Dissertação (mestrado em Genética e Melhoramento). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 64 p. 2007.

FREIRE, M. C. M.; OLIVEIRA, L. O. de; ALMEIDA, A. M. R.; SCHUSTER, I.; MOREIRA, M. A.; LIEBENBERG, M. M.; MIENIE, C. M. S. Evolutionary history of *Phakopsora pachyrhizi* (the Asian soybean rust) in Brazil based on nucleotide sequences of the internal transcribed spacer region of the nuclear ribosomal DNA. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 4, p. 920-931, 2008.

FREITAS, M. C. M. A cultura da soja no Brasil: O crescimento da produção brasileira e o surgimento de uma nova fronteira agrícola. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia**, vol.7, N.12;. 12 p, 2011

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

FURTADO, G.Q.; ALVES, S.A.M.; CZERMAINSKI, A.B.C.; MASSOLA JÚNIOR, N.S. Preservation of *Phakopsora pachyrhizi* uredospores. **Journal of Phytopathology**, v.156, p.62-64, 2008.

FURTADO, G.Q.; ALVES, S. A. M; GODOY, C.; SALATINO, M.L.F.; MASSOLA JÚNIOR, N.S. Influência da luminosidade e da camada de cera epicuticular de superfícies de folhas de soja na infecção de *Phakopsora pachyrhizi*. **Tropical Plant Pathology**, v.34, n.5, p.306-312, 2009.

GARCIA, A.; CALVO, E.S.; KIIHL, R. A. DE S.; HARADA, A.; HIROMOTO, D. M.; VIEIRA, L.G.E. Molecular mapping of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) resistance genes: discovery of a novel locus and alleles. **Theoretical and Applied Genetics**, v.117, p.545-553, 2008.

GAZZONI, D.L. Botany. In Embrapa- CNPSO. **Tropical soybeans improvement and production**. Plant production and Protection Serie N° 27. Food and Agriculture Organization of the United Nation. p 1-12. 1994.

GODOY, V.V.; FLAUSINO, A. M.; SANTOS, L.C.M.; DEL PONTE, E.M. Eficiência do controle da ferrugem asiática da soja em função do momento de aplicação sob condições de epidemia em Londrina, PR. **Tropical Plant Pathology**, vol. 34, 1, 056-061, 2009.

GOELLNER, K.; LOEHRER, M.; LANGENBACH, C.; CONRATH, U.; KOCH E.; SCHAFFRATH, U. *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust. **Molecular Plant Pathology**, v.11, n.2, p.169–177, 2010.

GRANT, D. & SHOEMAKER R.C. Plant gene mapping techniques. **Encyclopedia of Life Sciences**. 2001.

GRIN, 2012. **Germplasm Resources Information Network**. Disponível em: <<http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/acc/display.pl?1489364>> Acesso em: 10 jan. 2012.

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

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

HARTMAN, G.L.; WEST, E.D.; HERMAN, T.K. Crops that feed the World 2. Soybean—worldwide production, use, and constraints caused by pathogens and pests. **Food Security**, v.3, p.5-17, 2011.

HENNING, A.A. & GODOY, C. V. Situação da ferrugem da soja no Brasil e no mundo. In: Zambolin, L. (Ed.). **Ferrugem asiática da soja**. Viçosa, MG: Suprema, 139 p. 2006.

HIROMOTO, D.M.; VELLO, N.A. The genetic base of Brazilian soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) cultivars. **Revista Brasileira de Genética**, v.9, n.2, p.295-306, 1986.

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

ISARD, S.A., DUFAULT, N.S., MILES, M.R., HARTMAN, G.L., RUSSO, J.M., DE WOLF, E.D., MOREL, W. The effect of sola irradiance on the mortality of *Phakopsora pachyrhizi* urediniospores. **Plant disease**, St. Paul, v. 90, n.7, p. 941-945, 2006.

Jones, J.D.G. & Dangl, J.L. The plant immune system. **Nature**. 444:323-9. 2006.

KAWUKI, R. S.; ADIPALA, E.; TUKAMUHABWA, P. Yield loss associated with soya bean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.) in Uganda. **Journal of Phytopathology**, Hamburg, v. 151, n. 1, p. 7-12, 2003.

KILLGORE, E., HEU, R., GARDNER, D.E. **First report of soybean rust in Hawaii**. *Plant Dis.* 78, 1216–1216. 1994.

KOCH, E. *et al.* Light and electron-microscopic studies on the development of soybean rust (*Phakopsora-pachyrhizi* Syd) in susceptible soybean leaves. **Phytopathologische Zeitschrift - Journal of Phytopathology** [S.I.], v. 106, n. 4, p. 302-320, 1983.

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

KUMAR, L.S. DNA markers in plant improvement: An overview. **Biotechnology Advances**, v.17, p.143–182, 1999.

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

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

LAZZAROTTO, J. J.; HIRAKURI, M. H. **Evolução e perspectivas de desempenho econômico associadas com a produção de soja nos contextos mundial brasileiro**. Londrina: Embrapa Soja, p. 46. (Embrapa Soja. Documentos, 319). 2010

LEMONS, N.G.; BRACCINI, A.L.; ABDELNOOR, R.V.; OLIVEIRA, M.C.N.; SUENAGA, K.; YAMANAKA, N. Characterization of genes *Rpp2*, *Rpp4*, and *Rpp5* for resistance to soybean rust. **Euphytica**, DOI 10.1007/s10681-011-0465-3. 2011.

LIU J, LIU D, TAO W, LI W, WANG S, CHEN P et al. Molecular marker-facilitated pyramiding of different genes for powdery mildew resistance in wheat. **Plant Breed** 119:21–24. 2000.

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

MARTINS, C.M., XAVIER, G.R., RUMJANEK, N.G., **Utilização de RAPD como Marcador Molecular em Plantas**. EMBRAPA Agrobiologia. Documentos 166. ISSN 1517-8498. dez. 2003.

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

MELCHING, J.S.; BROMFIELD, K.R.; KINGSOLVER, C.H Infection colonization, and uredospore production on Wayne soybean by four cultures of *Phakopsora pachyrhizi*, the cause of soybean rust. **Phytopathology**, v.69, p.1262-1265, 1979.

MEYER, J.D.F.; SILVA, D.C.G.; YANG, C.; PEDLEY, K.F.; ZHANG, C.; VAN DE MORTEL, M.; HILL, J.H.; SHOEMAKER, R.C.; ABDELNOOR, R.V.; WHITHAM, S.A. AND GRAHAM, M.A. Identification and analyses of candidate genes for *Rpp4*-mediated resistance to Asian soybean rust in soybean. **Plant Physiology**, v.150, p.295–307, 2009.

MICHELMORE, R. W., PARAN, I., KESSELI, R. V. Identification of marker linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect marker in specific genomic regions by using segregation populations. **Proceedings of the national Academy Science USA**. v.88, p. 9828-9832, 1991.

MILACH, S. C. K. Marcadores de DNA. Aplicações no melhoramento de plantas. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 5, p. 14-17, 1998.

MILES, M. R.; BONDE, M. R.; NESTER, S. E.; BERNER, D. K.; FREDERICK, R. D.; HARTMAN, G. L. Characterizing resistance to *Phakopsora pachyrhizi* in soybean. **Plant Disease**, v.95, p.577-581, 2011.

MILES, M.R.; FREDERICK, R.D.; HARTMAN, G.L. Evaluation of soybean germplasm for resistance to *Phakopsora pachyrhizi*. **Plant Health Progress**, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1094/PHP-2006-0104-01-RS>>

MILES, M.R.; MOREL, W.; RAY, J.D.; SMITH, J.R.; FREDERICK, R.D.; HARTMAN, G.L. Adult plant evaluation of soybean accessions for resistance to *Phakopsora pachyrhizi* in the field and greenhouse in Paraguay. **Plant Disease**, v.92, p.96-105, 2008.

MORGAN, T.H.; STURTEVANT, A.H.; MULLER, H.J.; BRIDGERS, C.B. The mechanism of mendelian heredity. **Henry Holt and Company**, New York, 262p. 1915.

OLIVEIRA, M.B. **Caracterização molecular de cultivares de soja utilizando marcadores microssatélites genotipados em seqüenciador automático**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia aplicada à agricultura) – Umuarama: Universidade Paranaense – UNIPAR, 88 f.. 2009

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

PALUDZYSZYN FILHO, E.; KIIHL, R.A. de S.; ALMEIDA, L.A. Desenvolvimento de cultivares de soja na região Norte e Nordeste do Brasil. In: ARANTES, N.E.; SOUZA, P.I. de M. de (Ed.). **Cultura da soja nos cerrados**. Piracicaba: Potafos, 1993. p.255-266.

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

PATERSON, A.H.; TANKSLEY, S.D.; SORRELLS, M.E. DNA markers in plant improvement. **Advances in Agronomy**, San Diego, v.46, p.39-89, 1991.

PEREIRA, M.G., PEREIRA, T.N.S., COSTA, F.R. Marcadores Moleculares no Pré-Melhoramento. In: Borém, A.; Caixeta, E.T. (Eds). **Marcadores moleculares**. 2. ed. Viçosa-MG: Editora Folha de Viçosa, 2009. p.103-128,

PHAM, T.A.; MILES, M.R.; FREDERICK, R.D.; HILL, C.B.; HARTMAN, G.L. Differential responses of resistant soybean entries to isolates of *Phakopsora pachyrhizi*. **Plant Disease**, v.93, p.224–228, 2009.

PIOVESAN, N.D. **Análises biométricas e moleculares visando o desenvolvimento de linhagens de soja com alto teor protéico e produtivas**. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.

PLOPER, D.P, DEVANI, M.R. La roya de la soja: Principales aspectos de la enfermedad y consideraciones sobre su manejo. **Soja en Siembra Directa**. AAPRESID 51-55. 2002.

PRETORIUS, Z.A.; KLOPPERS, R.J.; FREDERICK, R.D. First report of soybean rust in South África. **Plant Disease**, v. 85, p. 1288, 2001.

- PRIOLLI, R. H. G.; MENDES-JUNIOR, C.T.; SOUSA, S. M. B.; SOUSA, N. E. A.; CONTEL, E. P. B. Diversidade genética da soja entre períodos e entre programas de melhoramento no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, p.967-975, 2004.
- PROBST, A.H.; JUDD, R.W. Origin U.S. history and development and world distribution. In: CALDEWILL, B.E. **Soybeans, improvement, production and uses**. Madison ASA, 618p, 1973.
- RAMALHO M.A.P, SANTOS J.B DOS & PINTO C.A.B.P. **Genética na agropecuária**, 4a ed. rev. Lavras, Editora UFLA. 463p. 2008.
- RAY, J.D.; MOREL, W.; SMITH, J.R.; FREDERICK, R.D.; MILES, M.R. Genetics and mapping of adult plant rust resistance in soybean PI 587886 and PI 587880A. **Theoretical and Applied Genetics**, v.119, p.271–280, 2009.
- REIS, E. M.; BRESOLIN, A. C. R.; CARMONA, M. Doenças da soja. In: **Ferrugem asiática**. Passo Fundo: Ed. Universidade de Passo Fundo, 2006. 48p.
- RIBEIRO AC; GUIMARÃES PTG; ALVAREZ VVH. **Recomendações para uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais – 5ª aproximação**. Viçosa: UFV, 359p. 1999.
- ROMERO, C. C.T. **Avaliações microscópicas e moleculares da interação incompatível entre plantas de soja e o fungo *Uromyces appendiculatus***. 2011. 95p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, 2011.
- ROESE A.D., ROMANI R.D., FURLANETTO C., STANGARLIN J.R., PORTZ R.L. Levantamento de doenças na cultura da soja em municípios da região oeste do estado do Paraná. **Acta Scientiarum** 23:1293- 1297. 2001.
- ROESSING, A. C.; LAZZAROTTO, J.J. **Criação de empregos pelo complexo agroindustrial da soja**. Londrina: Embrapa Soja, p. 50. (Embrapa Soja. Documentos, 233). 2004.
- SAKSIRIRAT, W., HOPPE, H.H. Teliospore germination of soybean rust fungus (*Phakopsora pachyrhizi* Syd). **J. Phytopathol.** 132, 339–342. 1991.
- SANO, T., SMITH, C.L., CANTOR, C. R., Dexoribonucleic acids as unique marks in molecular detection. **Genetics analysis: biomolecular engineering**, v.14 p. 37-40, 1997.
- SCHMUTZ J, CANNON SB, SCHLUETER J, MA J, MITROS T, NELSON W, HYTEN DL, SONG Q, THELEN JJ, CHENG J, et al. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. **Nature** 463:178-183. 2010.
- SCHUSTER, I.; CRUZ, C. D. **Estatística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados**. Viçosa MG: UFV, 568 p. 2004.
- SEMAGN, K.; BJØRNSTAD, A.; NDJIONDJOP, M. N. Principles, requirements and prospects of genetic mapping in plants. **African Journal of Biotechnology**, v.5, n.25, p.2569-2587, 2006.

SILVA, D. C. G. da, **Mapeamento de genes de resistencia da soja à ferrugem asiática e análise transcricional na interação patógeno-hospedeiro**. Tese de doutorado na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Campus de Jaboticabal, SP. 167p. 2008.

SILVA, E. K. C. **Cowpea Severe Mosaic Virus**: diagnóstico, estudo de herança e identificação de marcadores moleculares associados à resistência. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE. 2008b.

SINCLAIR, J. B.; BACKMAN, P. A. Infectious diseases: rust. In: SINCLAIR, J. B.; BACKMAN, P. A (Eds). **Compendium of soybean diseases**. 3. ed. St. Paul: APS Press, p. 24-27. 1989.

SINGH S., SIDHU J. S., HUANG N, VIKAL N. Y, LI Z, BRAR DS et al. Pyramiding three bacterial blight resistance genes (xa5, xa13, Xa21) using marker-assisted selection into indica rice cultivar PR106. **Theor Appl Genet** 102:1011–1015. 2001.

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

SOARES, R. M.; AKAMATSUO, H.; YAMANAKA, N.; SUENAGA, K.; YAMAOKA, Y. IVANCOVICH, A.; MOREL, W.; JANEGITZ, T. Variabilidade patogênica do fungo *Phakopsora pachyrhizi*. Parte I - Projeto Ferrugem da Soja JIRCAS/Embrapa Soja/CRIA/INTA/Tsukuba University. In: **Resumos da Reunião do Consórcio Antiferrugem Safra 2008-09**. Londrina-PR: Embrapa Soja, p.93-101. (Documento n.315). 2009a.

SOARES, R. M.; ALMEIDA, A. M. R.; MEYER, M. C.; COSTAMILAN, L. M.; ROESE, A. D.; JUNES JR., J.; PIMENTA, C. B.; MARTINS, M. C.; FARIAS NETO, A. L.; MOREL, W.; GILLI, J.; LENZI, L.; LUCIA, A.; CONDORI, M.; GERMAN, S.; ALONZO, M. J. R. Variabilidade patogênica do fungo *Phakopsora pachyrhizi*. Parte II - Projeto Southnomics - Plataforma para estresses bióticos e abióticos em culturas. In: **Resumos da Reunião do Consórcio Antiferrugem Safra 2008-09**. Londrina-PR: Embrapa Soja, p.103-113. (Documento n.315). 2009b.

SONG, Q.J.; MAREK L.F.; SHOEMAKER, R.C.; LARK, K.G.; CONCIBIDO, V.C.; DELANNAY X.; SPECHT, J.E.; CREGAN, P.B. A new integrated genetic linkage map of the soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, Verlag, v.109, p.122-128, 2004.

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

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

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

TROPICAL MELHORAMENTO & GENÉTICA, 2012. Disponível em: <<http://www.tmg.agr.br/cultivares/?c=soja>> Acesso em: 12 jan. 2012.

TWIZEYIMANA, M.; OJIAMBO, P.S.; IKOTUN, T.; LADIPO, J.L.; HARTMAN, G.L.; BANDYOPADHYAY, R. Evaluation of soybean germplasm for resistance to soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Nigeria. **Plant Disease**, v.92, p.947-952, 2008.

UNFRIED, J.R.; KIIHL, R.A.S.; CALVO, E.S.; TAKEDA, C.; NOUCHI, A.; OTUBO, S.; SIQUERI, F. Genética e Melhoramento para resistência à ferrugem asiática da soja. In: **Ata da XXXI Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil**. Londrina-PR: Embrapa Soja, p.130-140, 2010.

USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. FAS Databases. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/data.asp>>. Acesso em: 29/12/2011.

USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Production, Supply and Distribuiton Online. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdQuery.aspx>>. Acesso em: 30 dez. 2011.

USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. <<http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome>> Acesso em: 30 dez. 2011.

USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Disponível em: <www.fas.usda.gov/psdonline/psdQuery.aspx> Acesso em: 30 nov. 2010.

VENCATO, A. Z., et al. **Anuário Brasileiro da Soja 2010**. Santa Cruz do Sul: Ed. Gazeta Santa Cruz, 2010. p. 144.

YAMANAKA, N.; YAMAOKA, Y.; KATO, M.; LEMOS, N.G.; PASSIANOTO, A.L.L.; SANTOS, J.V.M.; BENITEZ, E.R.; ABDELNOOR, R.V.; SOARES, R.M.; SUENAGA, K. Development of classification criteria for resistance to soybean rust and differences in virulence among Japanese and Brazilian rust populations. **Tropical Plant Pathology**, v.35, p.153-162, 2010.

YORINORI, J.T. LAZZAROTTO, J.J. **Situação da ferrugem asiática da soja no Brasil e na America do Sul**. Documentos Embrapa 236. 30 p. ISSN 15 16 – 78 1x agosto 2004.

YORINORI, J.T.; NUNES JUNIOR, J.; LAZZAROTTO, J.J. **Ferrugem “asiática” da soja no Brasil: evolução, importância econômica e controle**. LONDRINA-PR: EMBRAPA SOJA, 36P. (DOCUMENTOS 247). 2004.

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

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

YORINORI, J. T.; COSTAMILAN. L. M.; PAIVA, W. M.; PAIVA, W. M.; BERT AGNOLLI, P. F. **Ferrugem da soja (Phakpsora pachyrhizi):** identificação e controle. Londrina: EMBRAPA/SOJA, 25p. (Documentos 204). 2003.

ZAMBOLIM, L. Manejo integrado da ferrugem asiática da soja. In: Zambolim, L. (Ed.) **Ferrugem asiática da soja.** Viçosa-MG: Suprema Gráfica e Editora Ltda., 2006. p.73-98.

ZHU, M.; WANG, L.; PAN, Q.H. Identification and characterization of a new blast resistance gene located on rice chromosome 1 through linkage and differential analyses. **Phytopathology**, v.94, p.515-519, 2004