



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MICHELLE PIRES RINCÃO

**VALIDAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES EM SOJA
LIGADOS A GENES DE RESISTÊNCIA À PODRIDÃO
RADICULAR DE FITÓFTORA**



Universidade Estadual de Londrina

Instituto Agronômico do Paraná

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Soja

MICHELLE PIRES RINCÃO

**VALIDAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES EM SOJA
LIGADOS A GENES DE RESISTÊNCIA À PODRIDÃO
RADICULAR DE FITÓFTORA**

MICHELLE PIRES RINCÃO

**VALIDAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES EM SOJA
LIGADOS A GENES DE RESISTÊNCIA À PODRIDÃO
RADICULAR DE FITÓFTORA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Vilela Abdelnoor.
Co-orientadora: Dr^a Lizandra Lucy Catelli.

Londrina
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca
Central da Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

R579v Rincão, Michelle Pires.
Validação de marcadores moleculares em soja ligados a genes de resistência à
podridão radicular de fitóftora / Michelle Pires Rincão. – Londrina, 2013.
96 f. : il.

Orientador: Ricardo Vilela Abdelnoor.
Coorientador: Lizandra Lucy Catelli.
Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade
Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação
em Genética e Biologia Molecular, 2013.
Inclui bibliografia.

1. Soja – Doenças e pragas – Teses. 2. Phytophthora sojae – Teses. 3.
Fungos – Genética – Teses. 4. Marcadores biológicos – Teses. I. Abdelnoor,
Ricardo Vilela. II. Catelli, Lizandra Lucy. III. Universidade Estadual de Londrina.
Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia
Molecular. IV. Instituto Agrônomo do Paraná. V. EMBRAPA. VI. Título.
CDU 633.34:582.28

MICHELLE PIRES RINCÃO

**VALIDAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES EM SOJA
LIGADOS A GENES DE RESISTÊNCIA À PODRIDÃO RADICULAR
DE FITÓFTORA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, PR, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Vilela Abdelnoor
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Carlos Alberto Arrabal Arias
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Ney Sussumu Sakiyama
Universidade Federal de Viçosa - UFV

Londrina, 27 de Fevereiro de 2013

Aos meus queridos e amados pais, Vilson e
Clair.

Honrai o vosso pai e a vossa mãe, a fim de viverdes longo tempo sobre a terra que o Senhor vosso Deus vos dará. (Decálogo: Êxodo, 20:12).

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as graças que concedeu a mim durante toda a minha vida, em todos os momentos, e por sempre me capacitar para a realização dos meus objetivos.

A toda minha família, em especial ao meu pai Vilson e à minha mãe Clair, pelo amor incondicional em todos os momentos da minha vida e pelas sábias palavras que sempre me fortaleceram nos momentos difíceis.

Ao meu marido Leandro por todo o apoio, companheirismo, amor e compreensão. Vou te amar pra sempre.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Vilela Abdelnoor, pela orientação e pela oportunidade de crescimento profissional e de realização do meu trabalho.

Aos membros da banca examinadora Prof. Dr. Carlos Alberto Arrabal Arias e Dr. Ney Sussumu Sakiyama, pelas correções e sugestões para o aperfeiçoamento do meu trabalho.

À Dr^a. Lizandra Lucy Catelli pela co-orientação, amizade e paciência, e por contribuir muito para meu crescimento profissional e pessoal. Muito obrigada por tudo Li.

Aos pesquisadores Dr. Rafael Moreira Soares e Dr^a. Francismar Correa Marcelino por toda a atenção e por todo auxílio.

Aos funcionários da Embrapa Soja, Alan, Juliano, Alvino, Rodrigo, Guilherme, Natanael e Chagas por todo o auxílio.

Aos técnicos do laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Soja, César Augusto da Silveira, Danielle Cristina Gregório da Silva, José Jairo da Silva, Luiz Alexandre Guizilini, Márcia Kamogae Kuwahara, Nilson Darlan Vieira, Renan

Novaes Milagres, Silvana Regina Rockenbach Marin e Vera Lúcia Fernandes Pieroti por toda ajuda e amizade.

Aos queridos amigos do laboratório, por sempre me ajudarem e tornarem agradável e divertida a rotina de laboratório: Adriano C. Camolese, Alan A. Pererira, Alessandra Yokoyama, Amanda Paiva, Anelise da Silva Cruz, Bruna B. Brumer, Carolina Rocha, Cibelle Engels, Cynara C. T. Romero, Euziane Lino, Fabiana A. Rodrigues, Gislaine V. de Souza, Idenize P. Orsini, Josirley Carvalho, Juliana Paula Leite, Juliana Marcolino, Juliane P. Marinho, Kátia M. Kuma, Larissa Giroto, Letícia Botelho, Lívia Maria Nogueira, Luana M. Darben, Luciano N. Aoyagi, Luiz Fernando S. de Lima, Maíra S. Maia, Maísa Pinheiro, Maria Cecília S. do Amaral, Mayra Carvalho, Paulo José Camargo, Patrícia T. Honna, Renata Fuganti, Salvador L. Brito Júnior, Selma dos Santos Pereira (*in memorian*), Tânia Hitomi (*in memorian*), Tatiana Fraga e Valéria S. Lopes pelo companheirismo e amizade.

À minha amiga Aguida Maria Alves Pereira Morales por toda amizade e ajuda nos momentos mais difíceis, e por me fazer sorrir quando eu mais precisava.

À minha amiga Adriana Polizel Podanosqui pela amizade, compreensão e por toda a ajuda.

À minha amiga Paula Oliveira Chaves, a qual eu tenho um grande carinho por ter me ajudado no início do meu desenvolvimento profissional. Muito abrigada por tudo.

Aos meus amigos João Vitor Maldonado dos Santos, André Luis de Lima Passianoto e Gabriela Vieira Silva pela grande força e amizade em todos os momentos.

A Universidade Estadual de Londrina (UEL), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – (CAPES) e Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Soja pelo apoio financeiro, concessão da bolsa e disponibilização da estrutura física para a realização deste trabalho, respectivamente.

A Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Dias por estar sempre à disposição para nos ajudar e nos orientar frente a qualquer dificuldade.

À funcionária (UEL) Sueli por toda ajuda, dedicação e paciência.

A todos os professores da Universidade Estadual de Londrina que contribuíram para minha formação profissional e pessoal.

A todos que de alguma forma contribuíram para minha formação e para o desenvolvimento deste trabalho.

Todo o meu carinho e agradecimento!

RINCÃO, Michelle Pires. **Validação de marcadores moleculares em soja ligados a genes de resistência à podridão radicular de fitóftora**. 2013. 96 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR.

RESUMO

O patógeno *Phytophthora sojae*, causador da doença conhecida como podridão radicular de fitóftora, constitui um dos principais fatores bióticos que limitam a produtividade da soja, principalmente em anos de chuvas intensas e temperaturas amenas, chegando a ocasionar prejuízos de até 100% na produção de grãos. Este trabalho objetivou a validação de marcadores moleculares microssatélites e SNPs ligados aos genes *Rps1k* e *Rps8*, que conferem resistência a *P. sojae*, para serem utilizados no programa de seleção assistida ao melhoramento para fitóftora. Para a confirmação e saturação da região cromossômica de ambos os genes, foram utilizadas duas populações segregantes F₂, BW1 e CP8, consistindo de 138 e 93 indivíduos, respectivamente, derivados dos cruzamentos entre Williams 82 (portadora do alelo *Rps1k*) e BRS 133 (suscetível) e PI 399073 (portadora do alelo *Rps8*) e MG/BR 46 (suscetível). Para a validação dos marcadores moleculares foram utilizadas plantas derivadas do programa de retrocruzamentos oriundas do programa de melhoramento para a fitóftora da Embrapa Soja, especificamente para os genes *Rps1k* e *Rps8*. Oito marcadores moleculares foram validados na progênie F₂ da população BW1, enquanto que apenas dois marcadores foram validados na progênie F₂ da população CP8. Dos marcadores mapeados próximos aos genes *Rps1k* e *Rps8* nas populações BW1 e CP8, foram selecionados três marcadores ligados a cada gene, e testados nas populações provenientes dos retrocruzamentos. Nas populações resultantes dos retrocruzamentos, dois marcadores moleculares foram validados para doze cruzamentos do programa de melhoramento para o gene *Rps1k*, enquanto que três marcadores foram validados para cinco cruzamentos do programa de melhoramento para o gene *Rps8*. Os marcadores microssatélites e SNPs validados neste trabalho podem auxiliar o desenvolvimento de futuros trabalhos de melhoramento através da seleção assistida por marcadores moleculares.

Palavras-chave: *Glycine max* 1. *Phytophthora sojae* 2. Gene de resistência 3. Marcadores moleculares 4.

RINCÃO, Michelle Pires. **Validation of molecular markers in soybean linked to resistance genes to *phytophthora* root rot.** 2013. 96 p. Dissertation (Master's Degree in Genetics and Molecular Biology) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR.

ABSTRACT

The pathogen *Phytophthora sojae*, causes root rot *Phytophthora* disease, is major limiting biotic factors soybean productivity. In years of heavy rainfall and mild temperatures, resulting in 100% losses in grain yield rates. This study aimed to validate molecular markers microsatellites and SNPs linked to *Rps1k* and *Rps8* genes, which confer resistance to *P. sojae*, for use in assisted selection program from *Phytophthora* breeding. For confirmation and saturation of the chromosomal region from both genes, we used two F₂ segregating population, BW1 and CP8 consisting of 138 and 93 individuals, respectively. These populations were derived from crosses between Williams 82 (allele carrier *Rps1k*) and BRS 133 (susceptible) and PI 399073 (allele carrier *Rps8*) and MG/BR 46 (susceptible). Plants derived from the backcrosses program, (specifically for the genes *Rps1k* and *Rps8*), originated from Embrapa Soja- *Phytophthora* breeding program were used for molecular markers validation. Eight molecular markers were validated in the F₂ population BW1, while only two markers were validated in the F₂ population CP8. From the markers mapped close to *Rps1k* and *Rps8* genes in populations BW1 and CP8, we had selected three markers linked to each gene, and tested in backcrosses population. In populations resulting from backcrosses, two molecular markers were validated for the twelve crosses in the breeding program for *Rps1k* gene, whereas three markers were validated for about five crossings of the breeding program for gene *Rps8*. Microsatellite markers and SNPs validated on this study may help other breeding studies can aid the development of future breeding through marker-assisted selection.

Keywords: *Glycine max* 1. *Phytophthora sojae* 2. Resistance gene 3. Molecular markers 4.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais.

- Figura 1 -** Esquema do ciclo de vida de *Phytophthora sojae*21
Figura 2 - Colônia de *P. sojae* em meio de cultura V8.22

CAPÍTULO 2 – Validação de Marcadores Moleculares em Soja Ligados a Genes de Resistência à Podridão Radicular de Fitóftora.

- Figura 3 -** Foto ilustrativa das lesões típicas de resistência (A – planta sadia), e suscetibilidade (B – planta infectada e C – planta morta) à podridão radicular de fitóftora.52
- Figura 4 -** (A) Mapa de ligação da região genômica do gene *Rps1k*, e seus respectivos marcadores mapeados na região com distâncias em cM. (B) Mapa consenso da soja da região do cromossomo 3 (GL N) que contém o gene *Rps1k*. (C) Mapa de ligação da região genômica do gene *Rps8*, e seus respectivos marcadores mapeados na região com distâncias em cM, (D) Mapa consenso da soja da região do cromossomo 13 (GL F) que contém o gene *Rps8*. Fonte: SOYBASE, 2012. Os mapas consenso da soja B e D estão representados em diferentes escalas para tornar possível a visualização da região que este estudo abrangeu61
- Figura 5 -** Representação do painel do SoyBase Browser mostrando a região do genoma da soja referente ao cromossomo 3 (GL N), e que engloba a maioria dos marcadores microssatélites e SNPs (circulados em vermelho), utilizados neste trabalho para a confirmação e saturação da região do gene *Rps1k*, bem como suas respectivas distâncias físicas em Mbp. (<http://www.soybase.org/gb2/gbrowse/gmax1.01/>)61
- Figura 6 -** Representação do painel do SoyBase Browser indicando a região do genoma da soja referente ao cromossomo 13 (GL F), e que engloba os marcadores microssatélites circulados em vermelho utilizados neste trabalho para a confirmação e saturação da região do gene *Rps8*, bem como suas respectivas distâncias físicas em Mbp. (<http://www.soybase.org/gb2/gbrowse/gmax1.01/>)61

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 – Validação de Marcadores Moleculares em Soja Ligados a Genes de Resistência à Podridão Radicular de Fitóftora.

Tabela 1 -	Probabilidade da segregação fenotípica para progênes $F_{2:3}$ com diferentes tamanhos (n), supondo que sejam derivadas de um parental (F_2) heterozigoto.....	50
Tabela 2 -	Distribuição de probabilidades para progênes $F_{2:3}$ com diferentes tamanhos (n=5; n=10 e n=15), supondo que sejam derivadas de um parental (F_2) heterozigoto e que apresentem herança de dominância completa	54
Tabela 3 -	Análise de Qui-quadrado para segregação das gerações F_2 e $F_{2:3}$ nas populações BW1 e CP8	57
Tabela 4 -	Análise de Qui-quadrado da segregação dos marcadores moleculares microssatélites e SNPs (geração F_2) nas populações BW1 e CP8	60
Tabela 5 -	Análise de polimorfismo entre os genótipos parentais do programa de melhoramento para fitóftora da Embrapa Soja para os genes <i>Rps1k</i> e <i>Rps8</i>	67
Tabela 6 -	Proporções esperadas e observadas após a seleção dos genótipos resistentes, para a segregação dos marcadores moleculares posicionados próximos ao gene <i>Rps1k</i>	70
Tabela 7 -	Proporções esperadas e observadas após a seleção dos genótipos resistentes, para a segregação dos marcadores moleculares posicionados próximos ao gene <i>Rps8</i>	71

LISTA DE ABREVIATURAS

AFLP	“Amplified Fragment Length Polymorphism” ou Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados.
cM	centiMorgan
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.
ESTs	“Express Sequence Tags” ou Etiquetas de Sequências Expressas.
GL	Grupo de Ligação ou “Linkage Group (LG)”.
LOD	“Logarithm of Odds” Logaritmo dos nós.
pb	pares de bases ou “base pair”.
PCR	“Polymerase Chain Reaction” ou Reação em Cadeia da Polimerase.
PI	“Plant Introduction” ou Introdução de Planta.
RAPD	“Random Amplified Polymorphic DNA” ou Polimorfismo de DNA Randômico Amplificado.
RFLP	“Restriction Fragment Length Polymorphism” ou Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição.
Rps	“Resistance to <i>Phytophthora sojae</i> ” ou Resistência a <i>Phytophthora sojae</i> .
SAM	Seleção Assistida por Marcadores ou “Marker Assisted Selection (MAS)”.
SNP	“Single Nucleotide Polymorphism” ou Polimorfismo de Nucleotídeo Único.
SSR	“Simple Sequence Repeat” ou Sequência Simples Repetida.
STS	“Sequence Tagged Sites” ou Sítios com Sequências Marcadas.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS	15
1 INTRODUÇÃO	15
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1 A Cultura da Soja	17
2.2 O patógeno Phytophthora sojae	18
2.2.1 Etiologia e Histórico da Doença	18
2.2.2 Ciclo de Vida	20
2.2.3 Sintomatologia e Controle	22
2.2.4 Resistência do Hospedeiro	25
2.3 Marcadores Moleculares Microsatélites e SNPs	27
2.4 Validação de Marcadores Moleculares Ligados a Doenças de Plantas	31
3 OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo Geral	33
3.2 Objetivos Específicos	33
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
CAPÍTULO 2 - VALIDAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES EM SOJA LIGADOS A GENES DE RESISTÊNCIA À PODRIDÃO RADICULAR DE FITÓFTORA	45
RESUMO	45
INTRODUÇÃO	46
MATERIAL E MÉTODOS	49
Material Vegetal	49
Instalação e Delineamento do Experimento	49
Inoculação	51
Avaliação Fenotípica	51
Extração de DNA	52
Análises Moleculares	52
Análises Estatísticas	53

RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
Confirmação e Saturação das Regiões Cromossômicas que Contém os Genes de Resistência Rps1k e Rps8	57
Validação de Marcadores Moleculares Próximos aos Genes Rps1k e Rps8.	66
CONCLUSÕES	76
REFERÊNCIAS	78
ANEXOS	85
ANEXO A - Marcadores microssatélites selecionados para análise molecular na geração F2 da população BW1.	86
ANEXO B - Marcadores microssatélites selecionados para análise molecular na geração F2 da população CP8.	87
ANEXO C - Marcadores SNPs selecionados para análise molecular na geração F2 da população BW1.....	88
ANEXO D - Marcadores SNPs selecionados para análise molecular na geração F2 da população CP8.	89
ANEXO E - Protocolos	90
ANEXO F - Soluções	95

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

A cada ano a produção de soja no Brasil assume importância mais significativa, uma vez que temos características peculiares de resistência a fatores climáticos, diversificação de variedades, estrutura de armazenamento, comercialização que opera a níveis mundiais, e fácil negociação, que é fator preponderante para a obtenção de divisas comerciais para o país (MISSÃO, 2006). A produção brasileira de soja, *Glycine max* (L.) Merrill, para a safra de 2012/2013, é estimada em 82,68 milhões de toneladas, mantendo o país na posição de segundo maior produtor mundial desse grão (CONAB, 2013).

A busca pelo primeiro lugar no “ranking” de produção de soja seria menos complexa se não fossem, dentre outros componentes, as perdas nas safras, causadas por fatores abióticos e bióticos. Dentre os fatores bióticos, pela ação de patógenos que atacam essa oleaginosa no país, o oomiceto *Phytophthora sojae* (Kauffmann e Gerdemann, 1958), responsável pela doença conhecida como Podridão Radicular de Fitóftora, ou também chamada de Podridão de Raiz e de Haste (PRH), constitui uma das principais doenças que limitam a produtividade deste grão, principalmente em anos de chuvas intensas e temperaturas amenas (COSTAMILAN, 2007). Neste patossistema, existe uma interação entre planta e patógeno que constitui uma dinâmica, na qual a co-evolução ocorre naturalmente, resultando no surgimento de novas raças do patógeno. Desse modo o desenvolvimento de cultivares resistentes se torna um processo contínuo, e novas metodologias se fazem necessárias, visando à obtenção de maior eficiência e rapidez para esse processo (ALZATE-MARIN *et al.*, 2005).

A resistência a doenças tem se caracterizado como objetivo prioritário dos programas de melhoramento. No manejo integrado de pragas e doenças, o uso de cultivares resistentes, que normalmente são desenvolvidas pela transferência de alelos de resistência de fontes exóticas, e muitas vezes não adaptadas, para cultivares denominadas “elite”, é uma das estratégias mais utilizadas (SISTEMAS DE PRODUÇÃO 13, 2008). Estas cultivares resistentes apresentam um conjunto variado de características desejáveis para o manejo da cultura, combinando,

principalmente, alta produtividade e maior durabilidade no campo (ALZATE-MARIN *et al.*, 2005).

De modo geral as análises fenotípicas para a seleção de tais materiais resistentes constituem tarefa complexa e trabalhosa, devido a diferentes raças do patógeno, herança qualitativa e quantitativa, alta demanda de pessoal qualificado e ao elevado número de plantas que devem ser analisadas (SISTEMAS DE PRODUÇÃO 13, 2008). O processo de melhoramento e caracterização para podridão radicular de fitóftora ainda é baseado, principalmente, em análises que utilizam marcadores morfológicos. Esses marcadores, gerados através de mutações geralmente simples em apenas um gene, ocasionam diferenças morfológicas que podem ser facilmente observadas (FERREIRA e GRATTAPAGLIA *et al.*, 1998).

O uso de marcadores moleculares de DNA, associados a genes que confirmam resistência às principais pragas e doenças que acometem a agricultura, podem constituir uma ferramenta muito útil nos processos de transferência de alelos de resistência a doenças, aumentando a eficiência da seleção de caracteres de interesse com base no genótipo e reduzindo o tempo empregado nas práticas de melhoramento. Estes marcadores podem ser utilizados nas etapas iniciais e intermediárias dos processos de melhoramento por meio da Seleção Assistida por Marcadores (SAM), contudo nas etapas finais é imprescindível que ocorra a exposição da planta ao patógeno em condições de campo para que a seleção indireta feita inicialmente pela utilização destes marcadores seja confirmada (ALZATE-MARIN *et al.*, 2005).

A seleção assistida por marcadores moleculares tem auxiliado programas de melhoramento na avaliação dos materiais com base em marcas genotípicas. Tais marcadores permitem a identificação de variações existentes entre gêneros e entre espécies em comum, detectando alterações muito específicas nos segmentos de DNA (SISTEMAS DE PRODUÇÃO 13, 2008; ALZATE-MARIN *et al.*, 2005).

A validação de marcadores moleculares voltada para a seleção assistida pode possibilitar um aumento na produtividade, uma vez que pode contribuir com a diminuição de tempo e custos para a geração de cultivares resistentes. Estas, por sua vez, contribuiriam para o posicionamento econômico do país frente às demandas do agronegócio e para a diminuição da utilização de insumos agrícolas que agredem o meio ambiente e acabam por onerar os custos da produção.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 A Cultura da Soja

A soja é originária da Manchúria, região nordeste da China, onde já era plantada há pelo menos cinco mil anos, sendo uma das culturas agrícolas mais antigas. Sua disseminação pelo mundo ocorreu por intermédio dos viajantes ingleses e por imigrantes japoneses e chineses, e foi introduzida no Ocidente nos Estados Unidos em 1765 onde, no início do século XX, passou a ser cultivada comercialmente (MISSÃO, 2006).

Os primeiros relatos do cultivo de soja no Brasil datam de 1882, na Bahia, posteriormente sendo cultivada nos estados de São Paulo e Rio Grande do Sul. Porém a expansão do cultivo da soja ocorreu durante a década de 1970, em razão da grande quebra de safra da Rússia e a incapacidade dos Estados Unidos suprirem a demanda mundial do mercado internacional por proteína, além do crescente interesse da indústria de óleo (MISSÃO, 2006). A história da produção de soja em escala comercial está relacionada à introdução da chamada “Revolução Verde”, traduzida em ampla mecanização e utilização de agroquímicos, com forte apoio do governo, sob a forma de créditos subsidiados (BRUM, 2005).

Os bons resultados estimularam a expansão e a exportação da soja era, já naquela época, motivada pelo desejo do governo brasileiro de ampliar os saldos comerciais. A maior expansão da produção mundial vem ocorrendo em uma área quase contínua da América do Sul, abrangendo a Argentina, Brasil, Paraguai, Uruguai e Bolívia. Em todos eles cresce igualmente a presença de grandes empresas multinacionais nos segmentos de comercialização e industrialização, que se estende também às áreas de produção de sementes e financiamento da produção do grão. Dentre outros fatores, a grande disponibilidade de terras apropriadas ao plantio da soja faz do Cone Sul da América do Sul uma das áreas preferenciais para expansão do cultivo da soja (SCHLESINGER, 2008).

A espécie cultivada de soja é a *Glycine max* Merrill, uma dicotiledônea que pertence à família Fabaceae, subfamília Papilionoides, com número somático de cromossomos $2n=40$. Possui sistema radicular pivotante com raiz principal bem desenvolvida e raízes secundárias em grande número que desenvolvem interações simbióticas com bactérias fixadoras de nitrogênio, *Bradyrhizobium japonicum*. A soja

apresenta caule herbáceo, ereto com porte variável de 0,60 a 1,50m, bastante ramificado, cujos ramos formam ângulos variáveis com a haste principal. As folhas são longas, pecioladas e alternadas, compostas por três folíolos ovalados ou lanceolados. Possui inflorescência do tipo racemo, com geralmente 9 a 10 flores cada um, de coloração branca ou violácea. Os frutos são do tipo vagem, achatadas e pubescentes, de coloração cinza, amarela palha ou preta, dependendo da variedade. Estes produzem de duas a cinco sementes que se apresentam de forma arredondada, achatada ou alongada, de tamanho e coloração variada (MISSÃO, 2006).

A soja cultivada é uma *commodity* importante no comércio mundial, e a principal oleaginosa do mundo (SONKA *et al.*, 2004). É cultivada comercialmente em mais de 35 países, e sua principal utilização está relacionada ao consumo humano e de animais, uma vez que sua qualidade de proteínas e teor de óleo atende às necessidades dietéticas de ambos, seres humanos e animais (LUSAS, 2004). A soja origina diversos produtos e subprodutos utilizados pela indústria química, agroindústria e indústria de alimentos. Seu uso mais conhecido na indústria de alimentos é como óleo refinado, obtido a partir do óleo bruto. Porém recentemente novos produtos estão sendo desenvolvidos, como, por exemplo, o biodiesel, que surge como uma forma alternativa de combustível mostrando o grande potencial que esse grão ainda carrega. Atualmente a soja é o principal agroproduto brasileiro, tornou-se o motor da economia de várias regiões e têm sido um dos maiores responsáveis pela expansão da receita cambial do país conferindo ao Brasil a posição de segundo maior produtor e exportador mundial desse grão (MISSÃO, 2006).

2.2 O patógeno *Phytophthora sojae*

2.2.1 Etiologia e Histórico da Doença

O agente causador da podridão radicular de fitóftora, que acomete principalmente a cultura da soja, é denominado *Phytophthora sojae*, que tem como sinônimas *P. megasperma* var. *sojae* Hildebrand., *P. megasperma* f. sp. *glycinea* e *P. sojae* f. sp. *glycines*, mas antes de 1991, *P. sojae* era comumente referido como

P. megasperma (FARR *et al.*, 2007). A palavra *Phytophthora* é de origem grega (Phyto = planta + phthora = destruidor) significando destruidor de planta. Inicialmente esse patógeno foi descrito como pertencente ao reino Fungi, uma vez que possui semelhanças morfológicas e fisiológicas, principalmente quanto aos hábitos de crescimento e estratégias nutricionais, com os representantes desse reino. Porém, são evolutivamente muito distintos dos fungos verdadeiros (Eumycota), e apresentam características próprias que possibilitam essa diferenciação, como parede celular composta de celulose, micélio diplóide na maior parte do ciclo de vida, presença de centríolos, produção de esporos biflagelados tendo pêlos em um dos flagelos, diferenças nas seqüências de DNA, entre outras (COSTAMILAN, 2001).

Atualmente os indivíduos pertencentes ao gênero *Phytophthora*, Família Pythiaceae, Ordem Pythiales, Classe Oomycetes, ocupam um pequeno, mas patologicamente significativo nicho do filo Oomycota que, foi transferido do reino Fungi para o reino Stramenopila, antigamente chamado de Chromista (LUZ e MATSUOKA, 2001). Além dos oomicetos, o reino Stramenopila inclui algumas espécies de algas e diatomáceas. A presença de alguns genes possivelmente originados de algas na seqüência do genoma de *P. sojae* sugere que o ancestral comum a todos os Stramenopilas, incluindo os oomicetos, foi fotossintetizante (TYLER *et al.*, 2006).

P. sojae é uma das mais de 80 espécies do gênero *Phytophthora* que causam doenças destrutivas em grande quantidade de plantas utilizadas na agricultura e ainda em plantas ornamentais, incluindo genótipos de diferentes ecossistemas (TYLER, 2007). *P. sojae* se restringe principalmente a soja, embora alguns genótipos silvestres, tais como os tremoços (*Lupinus* spp.), também podem ser suscetíveis (ERWIN e RIBIER, 1996).

A podridão radicular de fitóftora foi observada inicialmente em Indiana em 1948 e em Ohio em 1951, porém, o patógeno *P. sojae*, foi identificado somente em 1954, em Ohio e Carolina do Norte (SCHMITTHENNER, 1999). Desde então a doença tem sido relatada em diversos países como França, Itália, Rússia, Ucrânia, China, Irã, Japão, Republica da Coreia, Paquistão, Argentina, Brasil, Canadá, Estados Unidos da America e Austrália (CAB International, 2006). O prejuízo econômico para plantações afetadas por essa doença é estimado em bilhões de dólares, incluindo os custos das medidas de controle e as perdas nas safras (ERWIN

e RIBIER, 1996). Os prejuízos em todo o mundo giram em torno de 1 a 2 bilhões de dólares por ano, sendo que o meio-oeste dos EUA apresenta sozinho, perdas de cerca de 200 milhões de dólares (TYLER, 2007). Nos Estados Unidos a podridão radicular de fitóftora foi a segunda doença da soja que mais causou prejuízos, ficando atrás apenas das perdas causadas por nematóide de cisto, e entre os anos de 1996 e 1998, a perda média anual estimada foi de mais de 1,2 milhões de toneladas, já em 2002, a perda econômica ocasionada foi calculada em cerca de 252 milhões de dólares (WRATHER *et al.*, 2001).

No Brasil, a doença foi detectada pela primeira vez na safra 1994/1995, em Passo Fundo no Rio Grande do Sul, e atualmente também pode ser encontrada em Santa Catarina, Paraná e Mato Grosso do Sul (SISTEMAS DE PRODUÇÃO 13, 2008). As perdas significativas nas safras brasileiras por decorrência dessa doença ocorreram inicialmente na safra de 2005/2006, quando várias lavouras do Rio Grande do Sul e do Paraná foram atingidas por esse patógeno, apresentando prejuízo significativo para os agricultores da região (COSTAMILAN *et al.*, 2007).

2.2.2 Ciclo de Vida

A podridão radicular de fitóftora, em soja, é uma doença monocíclica. Este oomiceto apresenta anterídios (gametângio masculino) diclinos, principalmente paráginos, e oogônios (gametângio feminino) grandes, de diâmetro variado, esféricos ou subesféricos e com paredes finas. Logo após a fertilização dos oogônios, oósporos (esporos sexuais) são formados. Estes podem sobreviver por muitos anos no solo, na ausência do hospedeiro, uma vez que possuem paredes espessas e lisas, protegendo-os da dessecação. Em temperatura ótima de 24°C, os oósporos germinam através de tubo germinativo, que se desenvolve em hifa ou em esporângio (COSTAMILAN, 2001). A germinação, aproximadamente 30 dias após a formação, ocorre em água e é auxiliada por baixos níveis de nutrientes e por exudatos de raízes (SCHMITTHENNER, 1999). O esporângio pode germinar tanto de modo direto, pela formação de tubo germinativo à uma temperatura de 25°C, atuando como esporos, como de modo indireto, pela extrusão de zoósporos (esporo sexual) à uma temperatura de 14°C (ALMEIDA *et al.*, 2005). O modo de germinação indireto ocorre mediante o encharcamento do solo (SISTEMAS DE PRODUÇÃO 13,

2008). Os zoósporos liberados são ovóides, afinados em uma ou em ambas as extremidades, achatados nos lados, e apresentam dois flagelos, que por sua vez auxiliam na natação em direção às raízes de soja, atraídos por isoflavonóides (genisteína e daidzeína) produzidos pelas raízes e pelas sementes em germinação (ALMEIDA *et al.*, 2005; FERRAZ *et al.*, 1995). Quando encontram o tecido vegetal, os zoósporos fixam-se, encistam, germinam e penetram diretamente, dando início a doença (ALMEIDA *et al.*, 2005). Os cistos, frequentemente, germinam imediata e diretamente, podendo formar apressório em contato com uma superfície sólida (COSTAMILAN, 2001). Os clamidósporos são estruturas de resistência e sobrevivência, que, assim como os oósporos, possuem paredes espessas e resistentes ao dessecamento (LUZ e MATSUOKA, 2001). O ciclo de vida de *P. sojae* é esquematicamente apresentado na Figura 1.

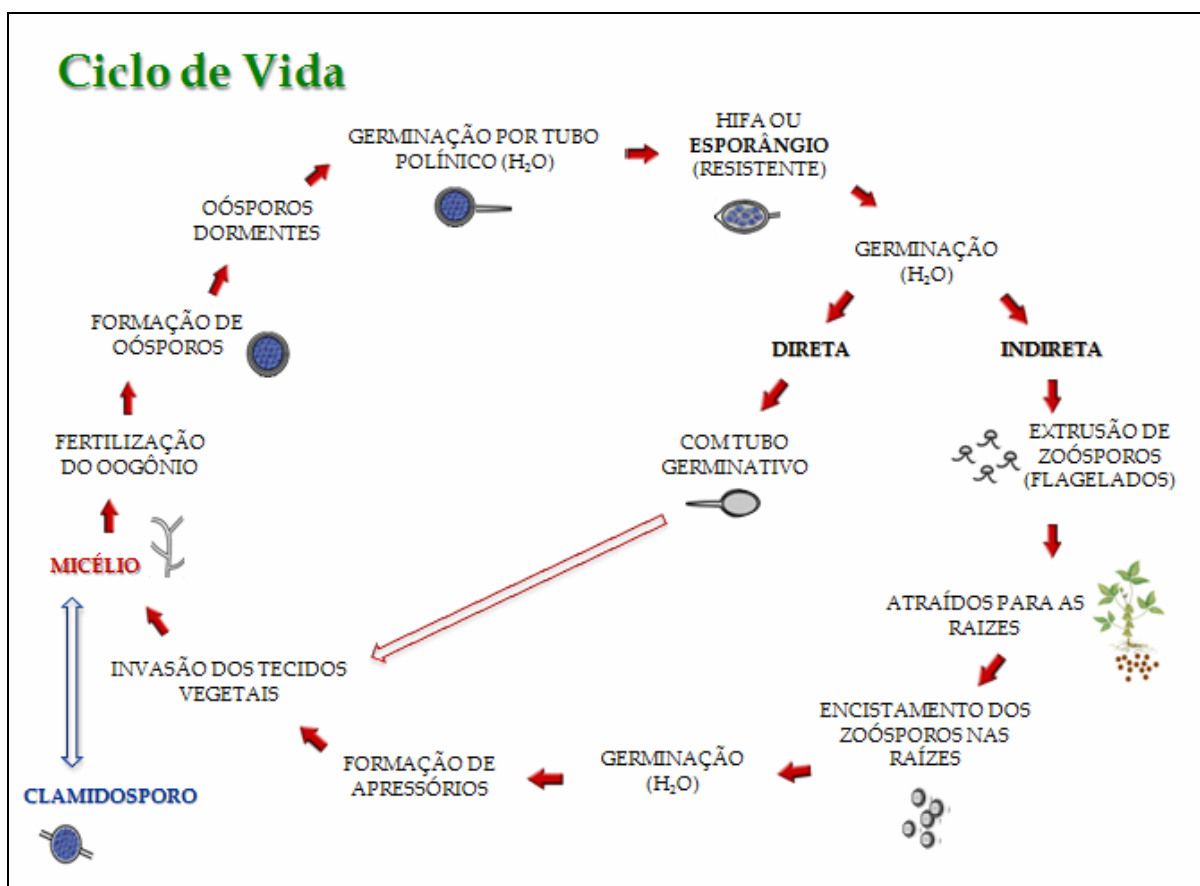


Figura 1 - Esquema do ciclo de vida de *Phytophthora sojae*.

O oomiceto é homotático e apresenta micélio cenocítico em colônias novas, adaptando-se com o envelhecimento. A temperatura ótima para o crescimento da

maioria dos isolados encontra-se entre 25°C e 28°C. A formação dos oósporos, imediatamente após fertilização do oogônio, ocorre tanto em meio de cultura (Figura 2) como em tecidos infectados (ALMEIDA *et al.*, 2005).



Figura 2 - Colônia de *P. sojae* em meio de cultura V8.

2.2.3 Sintomatologia e Controle

Os sintomas podem ser observados em plantas de soja em qualquer fase de desenvolvimento. Durante a pré-emergência, ocorre o apodrecimento de sementes ou a flacidez da radícula; sementes infectadas germinam lentamente, e quase sempre, as plântulas, por serem mais suscetíveis, morrem durante a emergência ocasionando falhas de estande (COSTAMILAN, 2001). Plantas no estágio de folha primária apresentam a extremidade da raiz principal flácida e de coloração marrom, a seguir, essa coloração estende-se envolvendo o hipocótilo até o nó cotiledonar e por fim causa o colapso do tecido. As folhas tornam-se amarelas e murcham e as plântulas morrem. A doença causada pelo oomiceto em plantas jovens recebe o nome de “tombamento de plântulas” (SCHMITTHENNER, 1999).

Em estádios mais avançados de desenvolvimento, os sintomas dependem da suscetibilidade ou da tolerância da variedade. Em plantas adultas, de modo geral,

este patógeno é responsável por apodrecimento radicial, e os sintomas se iniciam com clorose de folhas e murcha de plantas. As murchas secam e mantêm-se presas à haste voltadas para baixo (COSTAMILAN, 2001). A haste e os ramos laterais apodrecem e assumem coloração marrom-escura, que circunda a haste, progredindo de baixo para cima na planta a partir da linha do solo, podendo atingir vários nós. O córtex e os tecidos vasculares tornam-se escuros, a raiz principal e a haste continuam apresentando tecidos firmes (ALMEIDA *et al.*, 2005).

É considerada uma das doenças mais destrutivas da soja, sendo já verificado reduções de rendimento de grãos de até 100% em cultivares altamente suscetíveis. A gravidade das perdas depende de diversos fatores tais como a suscetibilidade da cultivar, precipitação, tipo de solo, plantio direto e compactação (COSTAMILAN, 2007). A doença se torna mais agressiva em solos argilosos, menos drenados e que são facilmente inundados, porém pode ocasionar a morte de plantas jovens mesmo em solos leves e bem drenados, caso estes estejam saturados por um longo período (SCHMITTHENNER, 1999).

Plantas infectadas podem ser encontradas na linha de semeadura em pequenos grupos ou ainda esparsas, e podem ser facilmente arrancadas do solo, devido ao apodrecimento das raízes e desidratação da planta. Esses sintomas são causados pela ação de *P. sojae* nas células vegetais, uma vez que ao infectar estas células acabam ocasionando morte celular que se espalha pelos tecidos vegetais atingindo inclusive os vasos condutores (SISTEMAS DE PRODUÇÃO 13, 2008). Variedades com moderada suscetibilidade podem desenvolver lesões lineares, estreitas, aprofundadas e escuras, em apenas um dos lados da haste. Nesses casos, as plantas afetadas dificilmente murcham (COSTAMILAN, 2001).

A infecção, em algumas vezes, também pode ocorrer por meio de respingos de solo contaminado em folhas e na haste. Os folíolos jovens podem desenvolver grandes lesões de coloração marrom clara e margens amareladas, em contrapartida, folhas mais desenvolvidas podem apresentar lesões menores, gerando assim um fenômeno conhecido como resistência relacionada à idade (ATHOW, 1987).

A doença é favorecida por condições ideais como fatores que mantenham água disponível no solo, dentre eles textura argilosa, compactação e longos períodos de saturação de umidade, provocando a liberação e disseminação de zoósporos, e ainda por temperatura ótima, igual ou superior a 25°C. Solos compactados e semeadura direta, monocultura, aplicação de altas doses de

fertilizantes orgânicos ou com potássio antes da semeadura, também aumentam a intensidade da doença (ALMEIDA *et al.*, 2005). Os sintomas da podridão radicular de fitóftora podem ser confundidos, algumas vezes, com injúrias causadas por herbicidas, porém a chave para o correto diagnóstico dessa doença é a presença de descoloração da haste a partir da linha do solo, característica única dessa patologia (MANAGEMENT, 1999).

Geralmente, o controle químico de oomicetos é muito difícil, uma vez que não são afetados pela maioria dos fungicidas. No caso da podridão radicular de fitóftora a dificuldade de controle é agravada porque as plantas são infectadas a partir da raiz, onde controle químico é muito mais complicado (TYLER, 2007). A eliminação pendente de fumigantes do solo, como o brometo de metila agrava ainda mais o problema. Para podridão radicular de fitóftora, o controle químico é efetivo para cultivares com elevado grau de tolerância. Os princípios ativos eficazes são metalaxil e mefenoxam, da classe fenilamidas (SCHMITTHENNER, 1999), que atuam por cerca de duas a três semanas. Ambos os compostos apresentam dois modos de ação: fungistática (inibindo a síntese de rRNA de *P. sojae*) e sistêmica (induzindo a formação da fitoalexina gliceolina) (COSTAMILAN, 2007).

Altas doses de metalaxil controlam a doença em cultivares com pouca resistência parcial, mas não em condições severas de doença. O tratamento pode ser realizado via semente ou diretamente na linha de semeadura, no solo. No entanto, já foi relatado casos de ocorrência de resistência de *P. sojae* a metalaxil em condições *in vitro* (BHAT *et al.*, 1993) e em campo, nos EUA (YANG, 2002). Uma complicação extra reside no fato de que muitos oomicetos parecem ter uma extraordinária flexibilidade genética, o que permite que eles rapidamente se adaptem e superem as medidas de controle químico e resistência genética produzida em plantas hospedeiras (TYLER, 2007).

A rotação de culturas pode ser usada para evitar o aumento do nível de inóculo no solo (SCHMITTHENNER, 1999). O controle também é favorecido quando são adotadas medidas para drenar e/ou descompactar áreas com solo muito úmido ou compactado, evitando longos períodos de alta umidade livre no solo, uma vez que os zoósporos de *P. sojae* são produzidos apenas em solo saturado de água (DORRANCE *et al.*, 2001).

2.2.4 Resistência do Hospedeiro

Atualmente o modelo da maioria dos tipos de resistência a doenças em plantas consiste basicamente de duas formas ligadas à imunidade inata. A primeira forma é desencadeada na presença de padrões moleculares associados a patógenos (*Pathogen-Associated Molecular Patterns* PAMPs), estruturas microbianas conservadas que são reconhecidas por receptores presentes no hospedeiro (NURNBERGER *et al.*, 2004; ZIPFEL e FELIX, 2005; CHISHOLM *et al.*, 2006). Esse reconhecimento induz respostas imunes que compõem o sistema de defesa basal das plantas (ZIPFEL *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2005; HE *et al.*, 2006; ZIPFEL *et al.*, 2006). A segunda forma é chamada de imunidade efetora, sinônimo de resistência específica do hospedeiro ou de resistência gene-a-gene. Neste tipo de resistência, genes específicos codificam proteínas especializadas na identificação de fatores de virulência microbianos (efetores) também específicos, desencadeando respostas imunes nas plantas. Estes genes são conhecidos como genes R de resistência (AUSUBEL *et al.*, 2005; CHISHOLM *et al.*, 2006).

Dois tipos de resistência têm sido descritos em soja para infecção com *P. sojae*: a resistência mediada por genes R, chamada de resistência completa, identificada mediante inoculação do hipocótilo; e resistência parcial identificada mediante inoculação da raiz e que limita o dano ao tecido radicial com um lento desenvolvimento da doença (COSTAMILAN, 2007).

A resistência mediada por genes R é determinada por genes dominantes chamados *Rps*, distribuídos em nove *loci*, com uma série alélica em dois destes *loci*: *Rps1* (BERNARD *et al.*, 1957) (*Rps1a*, *1b*, *1c*, *1d*, *1k*), *Rps2* (KILEN *et al.*, 1974), *Rps3* (MUELLER *et al.*, 1978) (*Rps3a*, *3b* e *3c*), *Rps4* (ATHOW *et al.*, 1980), *Rps5* (BUZZELL e ANDERSON *et al.*, 1981), *Rps6* (ATHOW e LAVIOLETTE *et al.*, 1982), *Rps7* (ANDERSON e BUZZELL *et al.*, 1992; DORRANCE *et al.*, 2004), *Rps8* (BURNHAM *et al.*, 2003; SANDHU *et al.*, 2005; GORDON *et al.*, 2006) e *RpsYu25* (SUN *et al.*, 2011).

Até 2004 mais de 55 raças de *P. sojae* haviam sido descritas usando-se o conjunto de diferenciais contemplando os genes *Rps1a*, *Rps1b*, *Rps1c*, *Rps1d*, *Rps1k*, *Rps3a*, *Rps6* e *Rps7*. Atualmente, a identificação de patótipos ou de formas de virulência, baseados em reações de suscetibilidade ou resistência de plantas com

genes *Rps*, é preferível para descrever a variabilidade dentro da espécie (DORRANCE *et al.*, 2004; COSTAMILAN, 2007).

Todos os genes descritos, exceto *Rps2* (ligado a expressão de resistência apenas em raízes), limitam completamente o crescimento de *P. sojae* através de reação de hipersensibilidade no hipocótilo (COSTAMILAN, 2007). Os mecanismos de resistência associados aos genes *Rps*, principalmente *Rps1a* e *Rps1b*, incluem rápida necrose, morte celular e formação de aposições na parede celular, que enclausuram o haustório do patógeno. Processos iniciados quatro horas após inoculação (ENKERLI *et al.*, 1997).

O loco *Rps1* situado no cromossomo 3 (GL - Grupo de Ligação N) da soja contém cinco alelos, e um alto número de marcadores moleculares mapeados próximos à sua posição. DIERS *et al.* (1992) e POLZIN *et al.* (1994), por meio de marcadores moleculares RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), determinaram que *Rps1k* estava localizado no GL K (KEIM *et al.*, 1990). Este grupo de ligação foi mais tarde renomeado e designado como GL N por SHOEMAKER e OLSEN (1993). KASUGA *et al.* (1997) utilizaram marcadores moleculares RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) para criar um mapa genético da região contendo *Rps1k*. DEMIRBAS *et al.* (2001) utilizaram marcadores moleculares microssatélites para diminuir as distâncias genéticas entre os marcadores e alguns genes *Rps*, dentre eles o *Rps1*, que foi flanqueado por marcadores microssatélites a uma distância muito pequena. No genoma da soja, 38 genes foram encontrados apresentando forte similaridade com *Rps1k*, destes, 10 estão localizados no cluster *Rps1* no cromossomo 3 (BHATTACHARYYA *et al.*, 2005).

Identificado na PI399073, o loco *Rps8* foi mapeado inicialmente no cromossomo 8 (GLM A2) da soja, por meio da utilização de marcadores moleculares microssatélites, em duas populações pequenas, contendo respectivamente 38 e 54 indivíduos (BURNHAM *et al.*, 2003). Posteriormente, o gene foi mapeado no cromossomo 13 (GLM F), utilizando a mesma fonte de resistência, PI399073, porém com populações segregantes maiores para as análises moleculares (SANDHU *et al.*, 2005; GORDON *et al.*, 2006). O gene *Rps8*, recentemente descoberto, apresenta apenas dois alelos (GORDON *et al.*, 2006), e está situado próximo a uma região em que numerosos genes R e QTLs foram previamente mapeados (YU *et al.*, 1996; ASHFIELD *et al.*, 2004; HAYES *et al.*, 2004). ORTEGA *et al.* (2008 e 2009)

confirmaram a localização do gene *Rps8* no cromossomo 13, através do uso de populações geneticamente avançadas e marcadores moleculares desenhados especificamente para o mapeamento fino do *locus*.

Dentre as cultivares de soja brasileira, ambos os genes, *Rps1*, mais especificamente o alelo *Rps1k*, e *Rps8*, apresentam grande importância comercial, contribuindo de maneira significativa na manutenção dos mecanismos de resistência ao fungo *P. sojae*, uma vez que são mais efetivos na defesa às raças brasileiras desse patógeno (GARDNER *et al.*, 2001; COSTAMILAN, 2007).

2.3 Marcadores Moleculares Microssatélites e SNPs

Define-se como marcador molecular “todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso”, como no caso das isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA, correspondentes a regiões expressas ou não expressas de um genoma (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

A utilização de marcadores moleculares baseados na reação em cadeia da polimerase, ou PCR (*Polymerase Chain Reaction*; MULIS e FALONA *et al.*, 1987) para a amplificação das sequências alvo de DNA, facilitou a evolução e descoberta de procedimentos e técnicas complexas de análise molecular (LEVINSON e GUTMAN, 1987). Microssatélite é uma denominação para certas regiões simples repetidas do genoma de eucariotos, as quais são constituídas de um a seis nucleotídeos repetidos em tandem, também conhecidas como “Sequências Simples Repetidas” (SSR – *Simple Sequence Repeat* – LITT e LUTTY, 1989), “Pequenas Repetições em Tandem” (STR - *Short Tandem Repeats* - EDWARDS *et al.*, 1991), “Polimorfismos de Fragmentos de Sequências Simples” (SSLP – *Simple Sequence Length Polymorphisms* - TAUTZ *et al.*, 1989), e “Locais Alvo de Sequências Microssatélites” (STMS – *Sequence Tagged Microsatellite Sites* – BECKMANN e SOLLER, 1990).

Estes marcadores moleculares microssatélites são flanqueados por sequências de DNA, geralmente conservadas, que permitem a seleção de primers específicos, amplificando, via PCR, os fragmentos de interesse do DNA. Uma vez amplificadas, as regiões de interesse podem apresentar extensivo polimorfismo para o tamanho das bandas observadas por meio de eletroforese (LEVINSON e

GUTMAN, 1987). A variação observada no tamanho das bandas, geralmente, é decorrente de diferentes números de repetições dentro da sequência do marcador. Tais diferenças podem ter origem durante os processos de divisão celular, por meio de *crossing-over* desigual ou erros cometidos pela DNA polimerase no momento da replicação (*slippage*) (CAIXETA *et al.*, 2006).

Estudos em animais e plantas mostraram que a diversidade alélica pode, também, ser consequência de fenômenos mais complexos, como substituições e inserções/deleções de bases nas sequências de DNA que flanqueiam os microssatélites (GRIMALDI e CROAU-ROY, 1997). A natureza altamente informativa dos microssatélites proveniente da grande variação no número de repetições ou multialelismo, combinado com a eficiência e rapidez da técnica de PCR, coloca estes marcadores na posição de ferramenta eficiente e útil para estudos genéticos em organismos eucariontes. (MACAUBAS *et al.*, 1997). Estimar a abundância de microssatélites nos genomas é tarefa complexa devido aos diferentes critérios de tamanho mínimo de repetições adotados, as diferentes classes de sequência destes marcadores, além do número absoluto de locos microssatélites que varia entre as espécies (CAIXETA *et al.*, 2006).

O desenvolvimento de marcadores baseados em microssatélites para plantas cultivadas tem substituído rapidamente outros marcadores durante os processos de estudos genéticos. A preferência pelo uso destes marcadores ocorre mediante sua reprodutibilidade e simplicidade técnica, pequena quantidade de DNA necessária, baixo custo (uma vez disponível), elevado poder de resolução, co-dominância, distribuição frequente e aleatória no genoma e altos níveis de polimorfismo obtidos (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). O alto polimorfismo torna possível a diferenciação entre populações multiparentais, em populações derivadas de híbridos de genótipos relacionados, e em acessos de germoplasma diretamente relacionados.

A maior limitação dos microssatélites é a necessidade de serem isolados e desenvolvidos individualmente para cada espécie, tornando a estratégia de desenho de “primers universais” não aplicável nas análises que utilizam estes marcadores. O processo de desenvolvimento dos microssatélites é demorado, trabalhoso e de alto custo, porém se torna menos oneroso frente à facilidade e eficiência do seu uso pela comunidade. Com o sequenciamento do genoma da soja, a detecção de novos microssatélites se tornou mais fácil, ampliando e

diversificando a disponibilidade destes marcadores (SONG, *et al.*, 2010). Os microssatélites proporcionaram aos melhoristas e geneticistas uma eficiente ferramenta para conectar variações fenotípicas e genotípicas, atuando ainda na integração de mapas genéticos e físicos, na identificação de genótipos, proteção de variedades, análise de pureza de sementes, utilização e conservação de germoplasma, estudos de diversidade, análise gênica e de locos quantitativos, análise de bibliotecas para clonagem gênica, seleção assistida por marcadores, estudos de ligação e por fim análise de *pedigree* (CAIXETA *et al.*, 2006).

Os marcadores moleculares conhecidos como Polimorfismos de Base Única (SNP - *Simple Nucleotide Polimorphism*), consistem, resumidamente, em uma única base nitrogenada que se altera entre duas sequências de DNA, assim, sequências alternativas diferentes (alelos) podem existir entre indivíduos dentro de uma população (BROOKES, 1999). Estes marcadores podem ser caracterizados de acordo com as substituições dos nucleotídeos, sendo denominados de marcadores de “transição” (C/T ou G/A), ou de “transversão” (C/G, A/T, C/A, ou T/G). Para que uma variação de base única seja considerada um SNP, sua frequência na população deve ser de pelo menos 1%. Sequências relacionadas de SNPs podem diferenciar dentro de um mesmo indivíduo e entre indivíduos de uma população. A herança de cada variável pode ser medida de modo direto na prole (EDWARDS *et al.*, 2007). A detecção de SNPs se torna complexa na presença de genes ou genomas duplicados. Nestes casos, muitas vezes a diferenciação entre a duplicação de homólogos e parálogos em um dado local, se torna difícil sem estudos detalhados de herança genética (CAIXETA *et al.*, 2006).

Os SNPs receberam maior importância no decorrer do processo do sequenciamento do genoma humano, nos quais os cientistas constataram grande número de variações de ponto ao comparar segmentos do genoma que se mostravam correspondentes, sendo que 90% dos polimorfismos encontrados no genoma eram decorrentes de SNPs. O desenvolvimento de outras técnicas e a redução dos custos do sequenciamento do DNA acelerou a descoberta destes marcadores nos genomas vegetais (EDWARDS *et al.*, 2007). São relatados como os marcadores moleculares mais abundantes em grandes genomas eucarióticos, incluindo as plantas e sua frequência é determinada pela biologia e história da espécie, sendo geralmente menos diversificados em espécies cultivadas do que em espécies selvagens (YUAN *et al.*, 2008; SIM *et al.*, 2009). Como na maioria dos

marcadores moleculares, um dos limites para os SNPs é o custo inicial associado à técnica, durante os processos de construção de primers específicos. Estes marcadores também apresentam ampla distribuição no genoma, ocorrendo tanto em regiões expressas quanto em não expressas, e assumem natureza bi-alélica. Estas características tornaram os SNPs marcadores de grande importância na construção de mapas de alta resolução, cerca de 100 vezes superior àquela apresentada pelos mapas já existentes. A maior resolução é possível devido ao fato de que a densidade dos marcadores SNPs pode ser mensurada na escala de kilobase, diferentemente dos demais marcadores que têm sua densidade determinada por escala de megabase (CAIXETA *et al.*, 2006).

Diversas metodologias têm sido desenvolvidas para a detecção destes marcadores, utilizando diferentes estratégias de comparação entre regiões específicas do DNA de vários indivíduos. As abordagens iniciais de detecção amplificam e sequenciam fragmentos genômicos equivalentes, de regiões gênicas específicas do DNA de vários indivíduos, comparando suas sequências, e buscando variações. A via direta para a identificação de SNPs é o sequenciamento direto de fragmentos de DNA amplificados por PCR. A análise eletrônica de variação de ponto se caracteriza como outra técnica de identificação. O fato é que, independentemente do método utilizado, a contribuição da bioinformática nos processos de identificação dessa classe de marcadores é indiscutível, aliada a necessidade de validação experimental dos dados (CAIXETA *et al.*, 2006). Em um dos mapas de ligação mais recentes, por meio da utilização de marcadores moleculares microssatélites e SNPs, cerca de 1.141 genes diferentes foram posicionados nos 20 grupos de ligação da soja (CHOI *et al.*, 2007).

A alta frequência de SNPs combinada ao poder dos métodos de genotipagem de alta escala tornam estes marcadores apropriados para aplicações tais como a identificação rápida de cultivares e a construção de mapas genéticos de alta resolução (RAFALSKI *et al.*, 2000; KOTA *et al.*, 2003). O desenvolvimento acelerado de tecnologias e métodos moleculares tornará possível a redução dos custos e ampliará a viabilidade do emprego dos SNPs em estudos de larga escala, facilitando os processos de mapeamento (RAGOSSIS, 2009).

2.4 Validação de Marcadores Moleculares Ligados a Doenças de Plantas

Podemos definir o processo de Seleção Assistida por Marcadores (SAM) como uma “tecnologia que usa marcadores moleculares ligados a um gene alvo como uma etiqueta molecular que pode ser usada para a sua seleção indireta” (PATAN e SLEPER, 2008). Nos últimos anos, vários estudos têm sido conduzidos com o propósito de validar marcadores moleculares previamente identificados em estudos de mapeamento buscando sua utilização em larga escala nos programas de melhoramento visando redução de custos e do tempo demandados para o desenvolvimento de novas cultivares (ALZATE-MARIN *et al.*, 2005).

DA SILVA *et al.*, (2008) validaram marcadores moleculares associados a genes de resistência à ferrugem da folha do trigo. Foram utilizados 25 genótipos de trigo (23 cultivares e 2 linhagens) que apresentavam ou não os genes de resistência (genes *Lr* em trigo; MCINTOSH *et al.*, 2007). Com base nos resultados obtidos, os autores concluíram que os marcadores SCAR associados aos genes *Lr9*, *Lr10* e *Lr24* apresentam potencial de uso na SAM em cultivares brasileiras de trigo, podendo reduzir o tempo e os custos do processo. Os autores afirmam que a utilização destes marcadores se restringe aos cruzamentos cujos genótipos são contrastantes para o alelo de resistência e para o marcador, portanto é necessário que o melhorista realize avaliação prévia dos marcadores para a verificação de polimorfismo entre os genótipos contrastantes (ZOLDAN *et al.*, 1998).

Em um trabalho desenvolvido por ZHANG, *et al.* (2009) o objetivo foi a identificação e validação de marcadores moleculares microssatélites estreitamente ligados a genes da toxina de sensibilidade presentes no trigo (*Triticum aestivum* L.) e que atuam na resposta de defesa ao ataque do fungo *Stagonospora nodorum*. Uma população segregante e um conjunto de 88 acessos representando *T. aestivum* e *T. turgidum* foi utilizado para a validação de marcadores moleculares para os loci *Snn2* e *Tsn1*, que codificam as toxinas de sensibilidade SnTox2 e ToxA. Para atingir mais marcadores para o locus *Snn2*, marcadores STS (*Sequence Tagged Sites*) foram desenvolvidos a partir de ESTs (*Express Sequence Tags*) resultantes do desenvolvimento e mapeamento de 36 marcadores. Juntos, marcadores microssatélites e EST-STS posicionaram o locus *Snn2* a um intervalo de 4,0 cM. Já o gene *Tsn1* foi posicionado em um intervalo de 1,0 cM entre marcadores microssatélites. Os marcadores posicionados próximos aos genes *Snn2* e *Tsn1*

foram validados apenas para cerca de 19% dos acessos de trigo testados. Apesar de serem eficientes para relativamente poucos acessos, estes marcadores se mostraram úteis para a seleção assistida, particularmente para a remoção de toxinas a partir destes alelos de sensibilidade de germoplasma elite e variedades.

A validação de marcadores moleculares para determinada doença e, mais especificamente, para um gene específico não é tarefa fácil, uma vez que não há uma distância genética limite que defina a maior ou menor eficiência de seleção para tais marcadores. O objetivo dos estudos de validação é a maior aproximação possível entre o marcador e o gene alvo, tentando reduzir ou, se possível, eliminar a taxa de recombinação entre eles. Porém essa redução da distância genética muitas vezes pode ser subjetiva uma vez que regiões conhecidas como “*hotspots*” - regiões que são mais suscetíveis a sofrer recombinações - podem ocorrer até mesmo em distâncias muito pequenas. Portanto a definição de qual é o limite e qual é a melhor distância de validação para o gene alvo dependerá da espécie em estudo, e das condições observadas durante cada etapa.

Assim, o uso de marcadores moleculares, associados a genes que confirmam resistência às principais pragas e doenças de determinada cultura, pode aumentar a eficiência da seleção de caracteres de interesse com base no genótipo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Validação de marcadores moleculares microssatélites e SNPs ligados aos genes de resistência a *P. sojae*, *Rps1k* e *Rps8*, para serem utilizados no programa de seleção assistida ao melhoramento para podridão radicular de fitóftora.

3.2 Objetivos Específicos

- Selecionar marcadores moleculares (microssatélites e SNPs) polimórficos para o cruzamento entre Williams 82 e BRS 133, e o cruzamento entre PI 399073 e MG/BR 46;
- Confirmar e saturar as regiões cromossômicas que contêm os genes de resistência *Rps1k* e *Rps8*, com marcadores moleculares microssatélites e SNPs;
- Validar os marcadores moleculares posicionados próximos aos genes *Rps1k* e *Rps8* em diferentes retrocruzamentos do programa de melhoramento para fitóftora da Embrapa Soja.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A.M.R.; FERREIRA, L.P.; YORINORI, J.T.; SILVA, J.F.V.; HENNING, A.A.; GODOY, C.V.; COSTAMILAN, L.M.; MEYER, M.C. Doenças da soja (*Glycine max*). In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.) **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. Agronômica Ceres. São Paulo, SP, 4ª ed., v. 2, p. 569-588, 2005.

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

ANDERSON, T.R.; BUZZELL, R.I. Inheritance and linkage of the *Rps7* gene for resistance to *Phytophthora* rot of soybean. **Plant Disease**, n. 76, p. 958–959, 1992.

ATHOW, K.L. Fungal Diseases. In: WILCOX, J.R. **Soybeans: improvement, production, and uses**. 2. ed. Madison: American Society of Agronomy. p. 687-727, 1987.

ATHOW, K.L.; LAVIOLETTE, F.A. *Rps6*, a major gene for resistance to *Phytophthora megasperma* sp. *glycinea* in soybean. **Phytopathology**, n. 72, p. 1564–1567, 1982.

ATHOW, K.L.; LAVIOLETTE, F.A.; MUELLER, E.H.; WILCOX, J.R. A new major gene for resistance to *Phytophthora megasperma* var. *sojae* in soybean. **Phytopathology**, n. 70, p. 977–980, 1980.

AUSUBEL, F.M. Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? **Nature Immunology**. n. 6, p. 973-979, 2005.

ASHFIELD, T.; ONG, L.E.; NOBUTA, K.; SCHNEIDER, C.M.; INNES, R.W. Convergent evolution of disease resistance gene specificity in two flowering plant families. **Plant Cell**. n. 16, p. 309-318, 2004.

BERNARD, R.L.; SMITH, P.E.; KAUFMANN, M.J.; SCHMITTHENNER, A.F. Inheritance of resistance to *Phytophthora* root and stem rot in soybean. **Journal of Agronomy**, n. 49, p. 391, 1957.

BECKMANN, J.S.; SOLLER, M. Toward a unified approach to genetic mapping of eukaryotes based on sequence tagged microsatellite sites. **Biotechnology**, n. 8, p. 930-932, 1990.

BHAT, R.G.; MCBLAIN, B.A.; SCHMITTHENNER, A.F. The inheritance of resistance to metalaxil and to fluorophenylalanine in mating of homothallic *Phytophthora sojae*. **Mycological Research**. v. 97, p. 865-870, 1993.

BHATTACHARYYA, M.K.; NARAYANAN, N.N.; GAO, H.; SANTRA, D.K.; SALIMATH, S.S; KASUGA, T.; LIU, Y.; ESPINOSA, B.; ELLISON, L.; MAREK, L.; SHOEMAKER, R.; GIJZEN, M.; BUZZELL, R.I. Identification of a large cluster of coiled coil nucleotide binding site-leucine rich repeat-type genes from the *Rps1* region containing *Phytophthora* resistance genes in soybean. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 111, p. 75- 86, 2005.

BROOKES, A.J. The essence of SNP. **Gene**. n. 234, p. 177-186, 1999.

BRUM, A. **Economia da soja: história e futuro. Uma visão desde o Rio Grande do Sul**. 2005. Disponível em: www.agromil.com.br. Consultado em: 17 de Fevereiro de 2012.

BURNHAM, K.D.; DORRANCE, A.E.; FRANCIS, D.M.; FIORITTO, R.J.; ST. MARTINS, S.K. *Rps8*, a new *locus* in soybean for resistance to *Phytophthora sojae*. **Crop Science**, n. 43, p. 101-105, 2003.

BUZZELL, R.I.; ANDERSON, T.R. Another major gene for resistance to *Phytophthora megasperma* var. *sojae* in soybeans. **Soybean Genetic News**, n. 8, p. 30-33, 1981.

CAB INTERNATIONAL. **Crop Protection Compendium**. 2006. Disponível em: <<http://www.cabi.org/compendia/cpc>>. Consultado em: 13 jul. 2012.

CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYAMA, .S. Tipos de marcadores moleculares. In: BOREM, A.; CAIXETA, E.T. (Ed.) **Marcadores Moleculares**. UFV, Viçosa, MG, p. 9-78, 2006.

CHISHOLM, S.T.; COAKER, G.; DAY, B.; STASKAWICZ, B.J. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. **Cell**. v. 124, p. 803-814, 2006.

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

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Acompanhamento da safra brasileira – Levantamento da Safra 2012/2013. Disponível em: www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_01_09_17_44_20_boletim_graos_janeiro_2013.pdf. Consultado em: 29 de Janeiro de 2013.

COSTAMILAN, L. M.; BERTAGNOLLI, P. F.; MORAES, R. M. A. de. **Podridão radicular de fitóftora em soja**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2007. 23 p. html. (Embrapa Trigo. Documentos Online, 79). Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do79.htm. Consultado em: 8 de Setembro de 2012.

COSTAMILAN, L. M. A podridão radicular de raiz e haste de soja. In: LUZ, E.D.M.N.; SANTOS, A.F. dos; MATSUOKA, K.; BEZERRA, J.L. (Ed). **Doenças causadas por Phytophthora no Brasil**. Campinas: Rural, p. 678-730, 2001.

DA SILVA, P.R.; MILACH, S.C.K.; SORTICA, V.A.; BOFF, T.; BRAMMER, S.P.; FEDERIZZI, L.C. Validação de marcadores moleculares associados a genes de

resistência à ferrugem-da-folha do trigo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, DF, n. 43, v. 10, p. 1357-1363, 2008.

DEMIRBAS, A.; RECTOR, B.G.; LOHNES, D.G.; FIORITTO, R.J.; GRAEF, G.L.; CREGAN, P.B.; SHOEMAKER, R.C.; SPECHT, J.E. Simple Sequence Repeat Markers Linked to the Soybean *Rps* Genes for Phytophthora Resistance. **Crop Science**. v. 41, p.1220–1227, 2001.

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

DORRANCE, S. E.; JIA, H.; ABNEY, T. S. Evaluation of soybean differentials for their interaction with *Phytophthora sojae*. **Plant Health Progress**. doi:10.1094/PHP 2004.0309-01-RS. 2004. Disponível em:

<http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/research/2004/psojae/>.

Consultado em: 10 agosto 2012.

DORRANCE, A. E.; McCLURE, S. A. Beneficial effects of fungicide seed treatments for soybean cultivars with partial resistance to *Phytophthora sojae*. **Plant Disease**. v. 85, p. 1063-1068, 2001.

EDWARDS, D.; FOSTER, J.W.; CHAGNÉ, D.; BATLEY, J. What are SNPs? In: ORAGUZIE, N.C.; RIKKERINK, E.H.A.; GARDNER, S.E.; NIHAL DE SILVA, H. (Ed.) **Association Mapping in Plants**. Springer. New York, p. 41–52, 2007.

EDWARDS, A.; CIVITELLO, A.; HAMMOND, H.A.; CASKEY, C.T. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. **American Journal of Human Genetics**, n. 49, p. 746-756, 1991.

ENKERLI, K; HAHN, M.G; MIMS, C. W. Ultrastructure of compatible and incompatible reactions of soybean roots infected with the plant pathogenic oomycete *Phytophthora sojae*. **Canadian Journal of Botany**, v. 75, p. 1493-1508, 1997.

ERWIN, D.C.; RIBIERO, O.K. **Phytophthora Diseases Worldwide**. St. Paul, MN. APS Press.1996.

FARR, D.F.; ROSSMAN, A.Y.; PALM, M.E.; MCCRAY, E.B. **Fungal databases, systematic mycology and microbiology laboratory, ARS, USDA**. 2007.

FERRAZ, L.C.C.B.; MONTEIRO, A.R. Nematóides. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.) **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. Agrônômica Ceres. São Paulo, SP, 3ª ed., v. 1. p. 168-2001, 1995.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA, CENARGEM, 1998.

GARDNER, M.E.; HYMOWITZ, T.; XU, S.J.; HARTMAN, G.L. Physical map location of the *Rps1-k* allele in soybean. **Crop Science**, n. 41, p. 1435-1438, 2001.

GRIMALDI, M.C.; CROAU-ROY, B. Micosatellite allelic homoplasy due to variable flanking sequence. **Journal of Molecular Evolution**, n. 44, p. 336-340, 1997.

GORDON, S.G.; ST. MARTIN, S.K.; DORRANCE, A.E. *Rps8* maps to a resistance gene rich region on soybean molecular linkage group F. **Crop Science**, n. 46, p. 168-173, 2006.

HAYES, A.J.; JEONG, S.C.; GORE, M.A.; YU, Y.G.; BUSS, G.R.; TOLIN, S.A.; SAGHAI MAROOF, M.A. Recombination within a nucleotide-binding-site/leucine-rich-repeat gene cluster produces new variants conditioning resistance to soybean mosaic virus in soybeans. **Genetics**. v. 166, p. 493-503, 2004.

HE, G.; LUO, X.; TIAN, F.; LI, K.; ZHU, Z.; SU, W.; QIAN, X.; FU, Y.; WANG, X.; SUN, C.; YANG, J. Haplotype variation in structure and expression of a gene cluster associated with a quantitative trait *locus* for improved yield in rice. **Genome Research**. v. 16, p. 618-626, 2006.

KAUFMANN, M. J.; GERDEMANN, J. W. Root and stem rot of soybean caused by *Phytophthora sojae* n. sp. **Phytopathology**, v. 48, p. 201-208, 1958.

KASUGA, T.; SALIMATH, S.S.; SHI, J.; GIJZEN, M.; BUZZELL, R.I.; BHATTACHARYYA, M.K. High Resolution Genetic and Physical Mapping of Molecular Markers Linked to the *Phytophthora* Resistance Gene *Rps1-k* in Soybean. **Molecular Plant Microbe Interactions**. Vol. 10, No. 9, pp. 1035–1044, 1997.

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

KILEN, T.C.; HARTWIG, E.E.; KEELING, B.L. Inheritance of a second major gene for resistance to *Phytophthora* root rot in soybeans. **Crop Science**, n. 14, p. 260–262, 1974.

KIM, M.G.; DA CUNHA, L.; MCFALL, A.J.; BELKHADIR, Y.; DEBROY, S.; DANGL, J.L.; MACKEY, D. Two *Pseudomonas syringae* type III effectors inhibit RIN4-regulated basal defense in *Arabidopsis*. **Cell**. v. 121, p. 749-759, 2005.

KOTA, R.; RUDD, S.; FACIUS, A.; KOLESOV, G.; THIEL, T.; ZHANG, H.; STEIN, N.; MAYER, K.; GRANER, A. Snipping polymorphisms from large EST collections in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Molecular Genetics & Genomics**. v. 270, p. 24-33, 2003.

LEVINSON, G.; GUTMAN, G.A. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. **Molecular and Biology Evolution**, n. 4, p. 203-221, 1987.

LITT, M.; LUTTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, n. 44, p. 397-401, 1989.

LUSAS, E.W. Soybean processing and utilization. p 949-1036. In: BOERMA, H.R.; SPECHT, J.E. (eds.), Soybeans: Improvement, Production, and Uses. **Agronomy Monograph**. 3rd ed. No. 16, ASA- CSSA-SSSA, Madison, WI. 2004.

LUZ, E. D. M. N.; MATSUOKA, K. *Phytophthora*: fungo, protista ou chromista? In: LUZ, E. D. M. N.; SANTOS, A. F. dos; MATSUOKA, K.; BEZERRA, J. L. **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**. Campinas: Livraria e Editora Rural. p. 1-14, 2001.

MACAUBAS, C.; JIN, L.; HALLMAYER, J.; KIMURA, A.; MIGNOT, E. The complex mutation pattern of a microsatellite. **Genome Research**, n. 7, p. 635-641, 1997.

MANAGEMENT of Phytophthora Stem and Root Rot in Wisconsin. **Soybean Plant Health**. 1999. Disponível em: <http://www.plantpath.wisc.edu/soyhealth/prr.htm>. Consultado em: Setembro de 2012.

MCINTOSH, R.A.; APPELS, R.; DEVOS, K.M.; DUBCOVSKY, J.; ROGERS, W.J.; YAMAZAKI, Y. **Catalogue of Gene Symbols for Wheat**, p. 31, 2007. Disponível em: <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/macgene/supplement2007.pdf>. Consultado em: 23 de Agosto de 2012.

MISSÃO, M.R. Soja: origem, classificação, utilização e uma visão abrangente do mercado. **Maringá Management: Revista de Ciências Empresariais**. v. 3, n. 1, p. 7-15, jan./jun. 2006.

MUELLER, E.H.; ATHOW, K.L.; LAVIOLETTE, F.A. Inheritance of resistance to four physiologic races of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. **Phytopathology**, n. 68, p. 1318–1322, 1978.

MULLIS, K.; FALONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase catalyzed chain reaction. **Methods Enzymol**, n. 55, p. 335-350, 1987.

NURNBERGER, T.; BRUNNER, F.; KEMMERLING, B.; PIATER, L. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. **Immunological Reviews**. v. 198, p. 249-266, 2004.

ORTEGA, M.A.; TUCKER, D.M.; BERRY, S.A.; ST. MARTIN, S.K.; SAGHAI MAROOF, M.A.; CREGAN, P.; HYTEN, D.; SHOEMAKER, R.; DORRANCE, A.E. Is *Rps8* alone? evidence for different genes for resistance to *Phytophthora sojae* on the chromosome 13 of soybean PI399073. **Proceedings 2009 APS North Central Division**. p. 10, 2009.

ORTEGA, M.A.; TUCKER, D.M.; PEIFFER, G.; PIPATPONGPINYO, W.; BERRY, S.A.; HYTEN, D.; CREGAN, P.; SHOEMAKER, R.; ST. MARTIN, S.K.; SAGHAI MAROOF, M.A.; DORRANCE, A.E. Development of molecular markers for fine mapping of the *Rps8* gene locus in soybean. **Phytopathology**. v. 98, p.117, 2008.

PATAN, M.S.; SLEPER, D.A. Advances in soybean breeding. In Genetics and genomics of Soybean. STACEY, G. Ed. Columbia. **Springer**. 2008.

POLZIN, K.M.; LORENZEN, L.L.; OLSON, T.C.; SHOEMAKER, R.C. An unusual polymorphic locus useful for tagging *Rps1* resistance alleles in soybean. *Theoretical and Applied Genetics*. v. 89, p. 226-232, 1994.

RAFALSKI, A. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. **Current Opinion in Plant Biology**. n. 5, p. 94-100, 2002.

RAGOUSSIS, J. Genotyping technologies for genetic research. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. v. 10, p. 117-133, 2009.

SANDHU, D.; SCHALLOCK, K.G.; RIVERA-VELEZ, N.; LUNDEEN, P.; CIANZIO, S.; BHATTACHARYYA, M.K. Soybean *Phytophthora* Resistance Gene *Rps8* Maps Closely to the *Rps3* Region. **Journal of Heredity**. v. 96, n. 5, p. 536–541, 2005.

SCHLESINGER, S. Soja: o grão que segue crescendo. Grupo **de Trabalho Sobre Desenvolvimento e Meio Ambiente nas Américas**. Documento de Discussão. n. 21, 23p., 2008.

SCHMITTHENNER, A. F. Phytophthora rot. In: HARTMAN. G. L.; SINCLAIR, J. B.; RUPE, J. C. (Ed.). **Compendium of Soybean Diseases**. 4. ed. Saint Paul: APS Press, p. 39-42, 1999.

SHOEMAKER, R.C.; OLSEN, T.C. Molecular linkage map of soybean (*Glycine max* L. Merr). In O'BRIEN, S.J. (ed.) **Genetic maps: Locus maps of complex genomes**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. p. 6.131–6.138, 1993.

SISTEMAS DE PRODUÇÃO13. Tecnologias de Produção de Soja – Região Central do Brasil 2009 e 2010. Embrapa Soja. Londrina, PR, 2008.

SIM, S.C.; ROBBINS, M.D.; CHILCOTT, C.; ZHU, T.; FRANCIS, D.M. Oligonucleotide array discovery of polymorphisms in cultivated tomato (*Solanum lycopersicum* L.) reveals patterns of SNP variation associated with breeding. **BMC Genomics**. v. 10, p. 466, 2009.

SONG, Q.; JIA, G.; ZHU, Y.; GRANT, D.; NELSON, R.T.; HWANG, E.-Y.; HYTEN, D.L.; CREGAN P.B. Abundance of SSR Motifs and Development of Candidate Polymorphic SSR Markers (BARCSOYSSR_1.0) in Soybean. **Crop Science**. v. 50, p. 1950-1960, 2010.

SONKA, S.T.; BENDER, K.L.; FISHER, D.K. Economics and marketing. p. 919-948. In BOERMA, H.R.; SPECHT, J.E. (ed.) Soybeans: **Improvement, production and uses**. 3rd edition. ASA, CSSA, and SSSA. Madison, WI. 2004.

SUN, S.; WU, X. L.; ZHAO, J. M.; WANG, Y. C.; TANG, Q. H.; YU, D. Y.; GAI, J. Y.; XING, H. Characterization and mapping of *RpsYu25*, a novel resistance gene to *Phytophthora sojae*. **Plant Breeding**. n. 130, p. 139-143. 2011.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Researchs**, n. 17, p. 6463-6471, 1989.

TYLER, B.M. *Phytophthora sojae*: root rot pathogen of soybean and model oomycete. Pathogen profile. **Molecular Plant Pathology**. v. 8, n. 1, p. 1–8, 2007.

TYLER, B.M.; TRIPATHY, S.; ZHANG, X.; DEHAL, P.; JIANG, R.H.Y.; AERTS, A.; ARREDONDO, F.D.; BAXTER, L.; BENSASSON, D.; BEYNON, J.L.; CHAPMAN, J.; DAMASCENO, C.M.B.; DORRANCE, A.E.; DOU, D.; DICKERMAN, A.W.; DUBCHAK, I.L.; GARBELOTTO, M.; GIJZEN, M.; GORDON, S.G.; GOVERS, F.; GRUNWALD, N.J.; HUANG, W.; IVORS, K.L.; JONES, R.W.; KAMOUN, S.; KRAMPIS, K.; LAMOUR, K.H.; LEE, M.-K.; MCDONALD, W.H.; MEDINA, M.; MEIJER, H.J.G.; NORDBERG, E.K.; MACLEAN, D.J.; OSPINA-GIRALDO, M.D.; MORRIS, P.F.; PHUNTUMART, V.; PUTNAM, N.H.; RASH, S.; ROSE, J.K.C.; SAKIHAMA, Y.; SALAMOV, A.A.; SAVIDOR, A.; SCHEURING, C.F.; SMITH, B.M.; SOBRAL, B.W.S.; TERRY, A.; TORTO-ALALIBO, T.A.; WIN, J.; XU, Z.; ZHANG, H.; GRIGORIEV, I.V.; ROKHSAR, D.S.; BOORE, J.L. *Phytophthora* genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis. **Science**. n. 313, p. 1261–1254, 2006.

WHATHER, J.A.; STIENSTRA, W.C.; KOENNING, S.R. Soybean diseases loss estimates for the United States from 1996 to 1998. **Canadian Journal of Plant Pathology**. v. 23, p. 122-131. 2001.

YANG, X.B. Fungicide resistance and race test for *Phytophthora*. **Integrated Crop Management**, v. 488, n. 7, p. 59, 2002.

YU, Y.G.; BUSS, G.R.; SAGHAI MAROOF, M.A. Isolation of a superfamily of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*. v. 93, p. 751-711, 1996.

YUAN, C.; ZHOU, G.; LI, Y.; WANG, K.; WANG, Z.; LI, X.; CHANG, R.; QIU, L. Cloning and sequence diversity analysis of *GmHs1 pro-1* in Chinese domesticated and wild soybeans. **Molecular Breeding**. v. 22, p. 593-602, 2008.

ZHANG, Z.; FRIESEN, T. L.; SIMONS, K. J.; XU, S. S.; FARIS, J. D. Development, identification, and validation of markers for marker-assisted selection against the *Stagonospora nodorum* toxin sensitivity genes *Tsn1* and *Snn2* in wheat. **Molecular Breeding**. v. 23. p. 35-49. 2009.

ZIPFEL, C.; KUNZE, G.; CHINCHILLA, D.; CANIARD, A.; JONES, J.D.; BOLLER, T.; FELIX, G. Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. **Cell**. v. 125, p. 749-760, 2006.

ZIPFEL, C.; FELIX, G. Plants and animals: a different taste for microbes? **Current Opinion in Plant Biology**. v. 8, p. 353-360, 2005.

ZIPFEL, C.; ROBATZEK, S.; NAVARRO, L.; OAKELEY, E.J.; JONES, J.D.; FELIX, G.; BOLLER, T. Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. **Nature**. v. 428, p. 764-767, 2004.

ZOLDAN, S.M. **Identificação de genes de resistência à ferrugem-da-folha em cultivares brasileiras de trigo (*Triticum aestivum* L. em Thell)**. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, p. 83, 1998.

CAPÍTULO 2

VALIDAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES EM SOJA LIGADOS A GENES DE RESISTÊNCIA À PODRIDÃO RADICULAR DE FITÓFTORA.

RESUMO

A doença conhecida como podridão radicular de fitóftora, resultante do ataque do patógeno *Phytophthora sojae*, é uma das principais doenças que atacam as lavouras de soja no Brasil e no mundo, causando prejuízos estimados em bilhões de dólares. O objetivo deste trabalho foi validar marcadores moleculares microssatélites e SNPs ligados aos genes de resistência à *P. sojae*, *Rps1k* e *Rps8*, visando a utilização de tais marcadores nos programas de melhoramento de soja por meio da seleção assistida. Duas populações segregantes F₂, BW1 e CP8, consistindo de 138 e 93 indivíduos, respectivamente, foram utilizadas para a confirmação e para a saturação da região cromossômica que contém os genes *Rps1k* e *Rps8* respectivamente. Os marcadores mais próximos aos genes foram selecionados e validados em populações de retrocruzamentos do programa de melhoramento para a fitóftora da Embrapa Soja. Os resultados revelaram oito marcadores moleculares validados na progênie F₂ da população BW1, enquanto que apenas dois marcadores foram validados na progênie F₂ da população CP8. Dos marcadores mapeados nas populações BW1 e CP8, foram selecionados três marcadores ligados a cada gene, e estes foram então testados nas populações segregantes provenientes dos retrocruzamentos. Dois marcadores moleculares, o SNP BARC-064081-18547 e o microssatélite Satt641, foram validados para 12 dos 14 cruzamentos do programa de melhoramento para o gene *Rps1k*. Para o programa de melhoramento para o gene *Rps8*, os SNPs BARC-010279-00575 e BARC-010501-00678, foram validados para 5 dos 12 cruzamentos analisados. Para uma maior eficiência na seleção desses genes *Rps*, e para a realização de trabalhos posteriores, uma maior saturação das regiões cromossômicas que contém os genes *Rps1k* e *Rps8* é necessária. Principalmente para o gene *Rps8*, localizado em uma região que contém um grande número de marcadores SNPs já mapeados e que podem contribuir com novas informações.

Palavras-chave: *Glycine max* 1. *Phytophthora sojae* 2. Gene de resistência 3. Marcadores moleculares 4.

INTRODUÇÃO

A utilização mundial da soja [*Glycine max* (L.) Merrill] como principal oleaginosa comercializada (SONKA *et al.*, 2004), contribuiu para que esse grão se tornasse um dos agroprodutos mais comercializados, responsável por grande parte da receita cambial de muitos países (MISSÃO, 2006). O Brasil se destaca como o segundo maior produtor mundial de soja, com uma estimativa de produção de 82,68 milhões de toneladas para a safra 2012/2013, com produtividade média de 3.023 kg/ha (CONAB, 2013). No entanto, a produção brasileira e mundial de soja é constantemente afetada por fatores abióticos e bióticos que resultam em grandes prejuízos nas safras. A doença conhecida como Podridão Radicular de Fitóftora, causada pelo oomiceto *Phytophthora sojae* (Kauffmann e Gerdemann, 1958), é responsável por grandes perdas na produtividade dessa oleaginosa (ERWIN e RIBIER, 1996), principalmente em anos que apresentam temperaturas mais amenas e um ciclo de chuvas mais intenso (COSTAMILAN, 2007).

Essa doença foi observada pela primeira vez no Brasil na safra de 1994/1995 no Estado do Rio Grande do Sul e hoje, em menos de duas décadas, pode ser também observada nos estados de Santa Catarina, Paraná e Mato Grosso do Sul (SISTEMAS DE PRODUÇÃO 13, 2008). Os sintomas mais comuns observados em decorrência da podridão radicular de fitóftora em plantas adultas se iniciam pelo apodrecimento radicial, seguido por clorose das folhas e murcha da planta; a haste e os ramos laterais apodrecem e assumem coloração marrom-escura, o córtex e os tecidos vasculares tornam-se escuros, a raiz principal e a haste continuam apresentando tecidos firmes e em poucos dias a planta morre (SCHMITTHENNER, 1999; ALMEIDA *et al.*, 2005). O controle químico da doença é considerado difícil e pouco eficiente, uma vez que a maioria dos oomicetos não são afetados por grande parte dos fungicidas, condição que agrava pelo fato de a infecção se iniciar nas raízes, dificultando ainda mais a ação dos compostos químicos sobre o patógeno (TYLER, 2007).

A busca por cultivares que apresentam resistência à *P. sojae* surge como uma estratégia necessária nos programas de melhoramento para podridão radicular de fitóftora, contribuindo para a redução dos prejuízos causados por essa doença. A seleção dos genótipos resistentes a esse patógeno nos programas de melhoramento é baseada em avaliações fenotípicas, observadas nos indivíduos inoculados com o

oomiceto. Porém essa metodologia é trabalhosa, devido a fatores como as diferentes raças do patógeno, herança qualitativa e quantitativa, alta demanda de pessoal qualificado e ao elevado número de plantas que devem ser analisadas (SISTEMAS DE PRODUÇÃO 13, 2008).

Noves loci distintos de resistência completa à podridão radicular de fitófтора foram reportados e descritos até o momento, com uma série alélica em dois destes loci: *Rps1* (BERNARD *et al.*, 1957) (*Rps1a*, *1b*, *1c*, *1d*, *1k*), *Rps2* (KILEN *et al.*, 1974), *Rps3* (MUELLER *et al.*, 1978) (*Rps3a*, *3b* e *3c*), *Rps4* (ATHOW *et al.*, 1980), *Rps5* (BUZZELL e ANDERSON *et al.*, 1981), *Rps6* (ATHOW e LAVIOLETTE *et al.*, 1982), *Rps7* (ANDERSON e BUZZELL *et al.*, 1992; DORRANCE *et al.*, 2004), *Rps8* (BURNHAM *et al.*, 2003; SANDHU *et al.*, 2005; GORDON *et al.*, 2006) e *RpsYu25* (SUN *et al.*, 2011). Para os isolados de *P.sojae* que ocorrem no Brasil, os genes *Rps1k* e *Rps8* são os que apresentam maior efetividade na resposta de resistência contra a infecção do oomiceto, sendo os maiores responsáveis pela manutenção dos mecanismos de resistência nos acessos brasileiros de soja (GARDNER *et al.*, 2001; COSTAMILAN, 2007).

Marcadores moleculares de DNA são segmentos de DNA que estão fisicamente ligados a locos que podem determinar características de interesse, e podem constituir uma ferramenta muito útil nos processos de transferência de alelos de resistência. O grande potencial destas ferramentas moleculares reside no fato de serem praticamente ilimitados em número, de fácil detecção e se comportarem como “caracteres” de herança simples e previsível, não sendo afetados pelo meio ambiente (FERREIRA e GRATTAPAGLIA *et al.*, 1998). Marcadores moleculares microsatélites ou sequências simples repetidas (SSR – *Simple Sequence Repeats*; LITT e LUTTY *et al.*, 1989) estão entre os marcadores mais utilizados, devido a suas características de codominância e a sua ampla distribuição ao acaso no genoma, com frequência relativamente alta (AKKAYA *et al.*, 1992). Os Polimorfismos de Base Única (SNP – *Simple Nucleotide Polimorphism*; COLLINS *et al.*, 1998) se caracterizam como um recente e interessante grupo de marcadores moleculares que indicam alterações em um único par de bases, constituindo uma ferramenta minuciosa para as pesquisas moleculares em desenvolvimento (CAIXETA *et al.*, 2006).

A validação de marcadores moleculares, ligados a genes de resistência, em diferentes cultivares de soja contribui para a utilização efetiva destes marcadores

nos processos de melhoramento por meio da Seleção Assistidas por Marcadores (SAM), e assim aumentar a eficiência da seleção de genótipos resistentes, evitando efeitos ambientais e erros de fenotipagem que podem atrasar e onerar os processos de melhoramento (ALZATE-MARIN *et al.*, 2005). A utilização de marcadores moleculares para seleção indireta de genótipos resistentes à podridão radicular de fitóftora constitui uma estratégia promissora para a obtenção de novas cultivares de soja, resultando em economia de tempo e redução de custos e conduzindo o Brasil rumo a liderança na produção mundial desse grão. Assim, este trabalho teve por objetivo a validação de marcadores moleculares microssatélites e SNPs ligados aos genes de resistência a *P. sojae*, *Rps1k* e *Rps8*, visando a utilização destes marcadores nos programas de seleção assistida ao melhoramento genético da soja visando resistência a podridão radicular de fitóftora.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

Duas populações segregantes de soja foram utilizadas para as análises fenotípicas e para a confirmação e saturação da região cromossômica de *Rps1k* e *Rps8*. A primeira população foi obtida a partir do cruzamento entre a cultivar brasileira BRS 133, suscetível à fitóftora, e a cultivar Williams 82, com resistência dominante para o alelo *Rps1k* (chamada neste trabalho de população BW1). A segunda população foi obtida a partir do cruzamento entre a cultivar MG/BR 46 (Conquista), suscetível à fitóftora, e a Planta Introduzida PI 399073, com resistência dominante para o alelo *Rps8* (chamada neste trabalho de população CP8). Os genótipos parentais usados nos cruzamentos foram fornecidos pelo Banco de Germoplasma (BAG) da Embrapa Soja, localizado em Londrina – PR. Os parentais e as populações F₂ e F_{2:3} de cada cruzamento, foram cultivados em casa-de-vegetação para avaliação de resistência à podridão radicular de fitóftora e para coleta de folhas para extração de DNA (geração F₂). A cultivar BRS 268 foi incluída no experimento como padrão de suscetibilidade para verificação da eficiência do inóculo.

Para a validação dos marcadores moleculares microssatélites e SNPs, selecionados a partir das populações BW1 e CP8, foram utilizados indivíduos resultantes de retrocruzamentos específicos para os genes *Rps1k* e *Rps8*, realizados no programa de melhoramento da Embrapa Soja. As fontes de resistência obtidas nos retrocruzamentos são as mesmas utilizadas nas populações BW1 e CP8, ou seja, Williams 82 e PI 399073 respectivamente. Amostras foliares dos parentais em estudo, assim como dos indivíduos das populações resultantes dos retrocruzamentos, foram coletadas e armazenadas para a extração de DNA.

Instalação e Delineamento do Experimento

Os genótipos parentais e as gerações F₂ e F_{2:3} das populações segregantes BW1 e CP8 foram semeados em vasos contendo substrato composto de solo e areia na proporção 3:1, previamente esterilizado. As populações segregantes F₂ BW1 e CP8 foram constituídas de 138 e 93 indivíduos, respectivamente. As populações

segregantes $F_{2:3}$ de ambos os cruzamentos sofreram uma redução no número de famílias devido a alguns fatores, como morte de alguns indivíduos suscetíveis da população F_2 , antes que estes pudessem atingir o estágio reprodutivo, além de fatores de manejo do experimento. As sementes resultantes das populações segregantes F_2 foram submetidas à pré-germinação, porém mesmo assim, a germinação não foi total e algumas famílias apresentaram número de indivíduos muito reduzido. Conseqüentemente, cada família apresentou um número diferente de indivíduos, e para obter maior confiabilidade na avaliação fenotípica da população segregante $F_{2:3}$, foram avaliadas apenas as famílias que apresentaram entre 5 a 15 indivíduos (Tabela 1). Assim, foram avaliadas fenotipicamente, para as populações BW1 e CP8, 87 e 55 famílias, respectivamente, na geração $F_{2:3}$. O delineamento experimental para as gerações F_2 foi inteiramente casualizado, enquanto que para as gerações $F_{2:3}$, foram utilizados blocos casualizados com 3 repetições. A casa-de-vegetação foi mantida com temperatura e umidade relativa do ar em aproximadamente 22°C e 60%, respectivamente, controladas por um termohigrógrafo.

Tabela 1 - Probabilidade da segregação fenotípica para progênies $F_{2:3}$ com diferentes tamanhos (n), supondo que sejam derivadas de um parental (F_2) heterozigoto.

Tamanho da Progênie $F_{2:3}$	$P = (0,75)^n + (0,25)^n$	Probabilidade de Segregação Fenotípica	
		Não Dominante (%) ^a	Dominante (%) ^b
n= 1	1,0000	100,00	0,00
n= 2	0,6250	62,50	37,50
n= 3	0,4375	43,75	56,25
n= 4	0,3203	32,03	67,97
n= 5	0,2383	23,83	76,17
n= 6	0,1782	17,82	82,18
n= 7	0,1335	13,35	86,65
n= 8	0,1001	10,01	89,99
n= 9	0,0751	7,51	92,49
n= 10	0,0563	5,63	94,37
n= 11	0,0422	4,22	95,78
n= 12	0,0317	3,17	96,83
n= 13	0,0238	2,38	97,62
n= 14	0,0178	1,78	98,22
n= 15	0,0134	1,34	98,66

^a= Probabilidade de segregação para herança que não apresenta o caráter monogênico de dominância esperado.

^b= Probabilidade de segregação para herança monogênica dominante.

Inoculação

As populações em estudo e os genótipos parentais foram inoculados pelo método de palito de dente colonizado com *P. sojae*. O isolado utilizado, coletado na cidade de Passo Fundo (RS) e registrado na micoteca da Embrapa Soja com o código MES526, é compatível com os genes *Rps1d*, *Rps2* e *Rps7*, e foi obtido junto ao laboratório de Fitopatologia da Embrapa Soja. O patógeno foi incubado durante 15 dias à temperatura de 25°C, em placas de petri contendo meio de cultura V8 (250g de extrato de tomate sem sal, 0,6g de CaCO₃, 1g de sacarose, 0,2g de extrato de levedura, 20g de Agar e 1000mL de água destilada), e uma base de papel filtro com pontas de palito de dente na vertical (ALFENAS *et al.*, 2007). O patógeno *P. sojae* foi inoculado 7 dias após a emergência da plântula, diretamente na haste por meio da incisão de palitos contendo suspensão do inóculo (aproximadamente 10³ esporos/mL) (FREITAS *et al.*, 2007). A inoculação foi realizada introduzindo uma ponta de palito colonizado no hipocótilo de cada plântula aproximadamente um centímetro abaixo dos cotilédones e com angulação aproximada de 45° entre o palito e a porção superior da haste (COSTAMILAN, 2007). Essas pontas do palito permaneceram na plântula até o dia da avaliação.

Avaliação Fenotípica

A intensidade da infecção causada pelo patógeno *P. sojae* foi detectada mediante avaliação visual da extensão da lesão no lenho, descoloração vascular, sintomas de murcha ou morte da planta. A avaliação dos sintomas foi realizada sete dias após a inoculação, baseando-se no seguinte critério: a) planta sadia (PS), quando não apresenta os sintomas característicos da doença, com formação de um “calo” (reação de hipersensibilidade que impede a multiplicação e disseminação do oomiceto no interior da haste) no local onde o palito foi espetado possibilitando seu desenvolvimento natural; b) planta infectada (PI), quando apresenta lesões (necrose) ao redor e no local no qual o palito foi espetado, acompanhada de escurecimento no interior da haste resultante do desenvolvimento e disseminação do oomiceto, o que acaba por afetar seu desenvolvimento natural; c) planta morta (PM), quando a infecção causada pelo patógeno é muito severa e resulta na morte da planta (Figura 3). As plantas avaliadas como PS são consideradas resistentes ao

passo que as plantas avaliadas como PI e PM são consideradas suscetíveis (ALFENAS *et al.*, 2007).

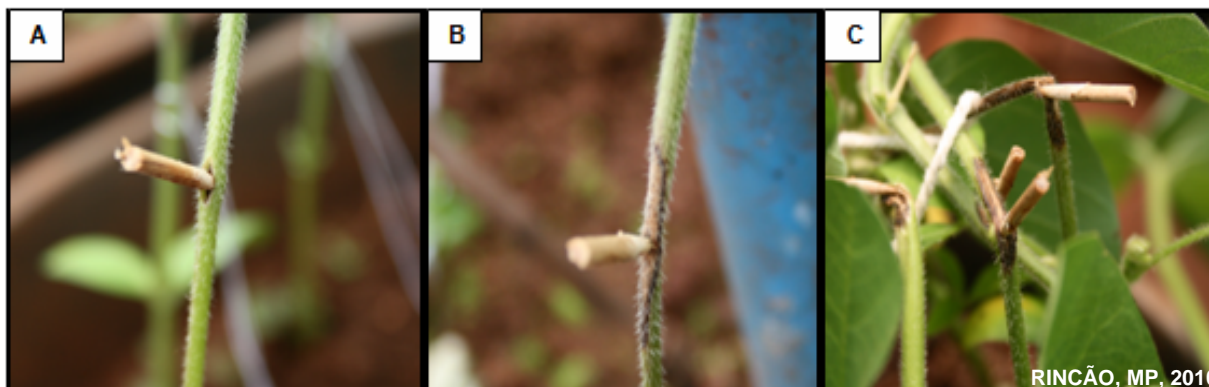


Figura 3 - Foto ilustrativa das lesões típicas de resistência (A – planta sadia), e suscetibilidade (B – planta infectada e C – planta morta) à podridão radicular de fitóftora.

Extração de DNA

Amostras de folhas dos genótipos parentais e de cada indivíduo da geração F₂ das populações BW1 e CP8, assim como dos indivíduos das populações de retrocruzamentos para fitóftora da Embrapa Soja, foram utilizadas para extração de DNA com base no procedimento descrito por KEIM *et al.* (1988), com algumas modificações.

Análises Moleculares

Os marcadores moleculares utilizados nesse trabalho foram selecionados com base nos trabalhos de mapeamento dos genes *Rps1k* e *Rps8* utilizando marcadores moleculares (DEMIRBAS *et al.*, 2001; SANDHU *et al.*, 2005; GORDON *et al.*, 2006), e também com base no mapa genético da soja (SONG *et al.*, 2004) disponíveis no “Soybase” (<http://soybase.agron.iastate.edu/resources/ssr.php>). Os marcadores microssatélites foram inicialmente testados para a seleção dos marcadores polimórficos entre os parentais. Após a seleção, os marcadores polimórficos entre os parentais foram amplificados para as respectivas populações. Os *loci* de microssatélite foram amplificados de acordo com a metodologia descrita por AKKAYA *et al.* (1995), com modificações.

Adicionalmente aos marcadores microssatélites, foram utilizados também marcadores SNPs. Recentemente, vários SNPs foram posicionados no mapa genético da soja (HYTEN *et al.*, 2010) e foram selecionados para este estudo com base na proximidade dos genes *Rps1k* e *Rps8*. Inicialmente os SNPs foram amplificados para os genótipos parentais. Os fragmentos resultantes da amplificação foram purificados (kit de purificação de DNA *Wizard SV Gel and PCR Clean Up System – Promega*) e sequenciados (*Macrogen - Advancing Through Genomics*) para verificação de polimorfismo entre os genótipos. Para os SNPs detectados como polimórficos entre os parentais, a genotipagem foi realizada no equipamento *StepOnePlus™ (Applied Biosystems)* mediante PCR em Tempo Real (RT-PCR) a partir da técnica de Discriminação Alélica, segundo o protocolo descrito no manual do fabricante, utilizando-se primers e sondas TaqMan®MGB marcadas com fluoróforos, desenhados com base no programa *Primer Express 2.0 (Applied Biosystems)*.

Análises Estatísticas

Para as populações BW1 e CP8, a razão de segregação para as análises fenotípicas e para os marcadores moleculares, microssatélites e SNPs, foi submetida ao teste de aderência ao modelo como um único loco, utilizando o teste do Qui-quadrado (χ^2). O χ^2 foi calculado através da equação proposta por Karl Pearson, segundo FERREIRA (2005):

$$\chi^2 = \sum \frac{(\text{Observado} - \text{Esperado})^2}{\text{Esperado}}$$

As análises de ligação foram realizadas com o auxílio do programa MAPMAKER/EXP 3.0 (LANDER *et al.*, 1987) utilizando a função de mapeamento de Kosambi (KOSAMBI, 1944). O critério de ligação utilizou LOD score 3,0 a uma distância máxima de 37,2 cM.

Para que as análises estatísticas pudessem refletir com maior confiabilidade os resultados observados na casa de vegetação, os seguintes códigos foram atribuídos aos indivíduos fenotipados para a utilização do programa MAPMAKER/EXP 3.0:

- (i) famílias que apresentaram de 10 a 15 indivíduos avaliados como PS (plantas saudas), receberam o código “A” (homozigoto para o genótipo dominante);
- (ii) famílias que apresentaram de 5 a 15 indivíduos avaliados como PI ou PM (plantas infectadas ou mortas), receberam o código “B” (homozigoto para o genótipo recessivo);
- (iii) famílias que apresentaram de 5 a 15 indivíduos, avaliados como PS e, como PI ou PM, com probabilidade $P < 0,01$ (Tabela 2), receberam o código “C” (não homozigoto para o parental dominante);
- (iv) famílias que apresentaram de 5 a 10 indivíduos avaliados como PS, receberam o código “D” (não homozigoto para o parental recessivo);
- (v) famílias que apresentaram 5 a 15 indivíduos, avaliados como PS e como PI ou PM, com probabilidade $P > 0,01$ (Tabela 2), receberam o código “H” (heterozigoto).

Tabela 2 - Distribuição de probabilidades para progênies $F_{2:3}$ com diferentes tamanhos ($n=5$; $n=10$ e $n=15$), supondo que sejam derivadas de um parental (F_2) heterozigoto e que apresentem herança de dominância completa.

A ou H ^a (x)	B ou R. ^b (y)	(Potência(0,75;X)).(Potência(0,25;Y)) (z)	C _{5, x} (w)	Prob. ^c (z.w)
n=5				
0	5	0,0010	1	0,0010
1	4	0,0029	5	0,0146
2	3	0,0088	10	0,0879
3	2	0,0264	10	0,2637
4	1	0,0791	5	0,3955
5	0	0,2373	1	0,2373
n=10				
0	10	9,5367 ⁻⁰⁷	1	9,5367 ⁻⁰⁷
1	9	2,8610 ⁻⁰⁶	10	2,8610 ⁻⁰⁵
2	8	8,5831 ⁻⁰⁶	45	3,8624 ⁻⁰⁴
3	7	2,5749 ⁻⁰⁵	120	3,0899 ⁻⁰³
4	6	7,7248 ⁻⁰⁵	210	1,6222 ⁻⁰²
5	5	2,3174 ⁻⁰⁴	252	5,8399 ⁻⁰²
6	4	6,9523 ⁻⁰⁴	210	1,4600 ⁻⁰¹
7	3	2,0857 ⁻⁰³	120	2,5028 ⁻⁰¹
8	2	6,2571 ⁻⁰³	45	2,8157 ⁻⁰¹
9	1	1,8771 ⁻⁰²	10	1,8771 ⁻⁰¹
10	0	5,6314 ⁻⁰²	1	5,6314 ⁻⁰²
n=15				
0	15	9,3132 ⁻¹⁰	1	9,3132 ⁻¹⁰

1	14	2,7940 ⁻⁰⁹	15	4,1910 ⁻⁰⁸
2	13	8,3819 ⁻⁰⁹	105	8,8010 ⁻⁰⁷
3	12	2,5146 ⁻⁰⁸	455	1,1441 ⁻⁰⁵
4	11	7,5437 ⁻⁰⁸	1365	1,0297 ⁻⁰⁴
5	10	2,2631 ⁻⁰⁷	3003	6,7961 ⁻⁰⁴
6	9	6,7893 ⁻⁰⁷	5005	3,3981 ⁻⁰³
7	8	2,0368 ⁻⁰⁶	6435	1,3107 ⁻⁰²
8	7	6,1104 ⁻⁰⁶	6435	3,9320 ⁻⁰²
9	6	1,8331 ⁻⁰⁵	5005	9,1748 ⁻⁰²
10	5	5,4994 ⁻⁰⁵	3003	1,6515 ⁻⁰¹
11	4	1,6498 ⁻⁰⁴	1365	2,2520 ⁻⁰¹
12	3	4,9494 ⁻⁰⁴	455	2,2520 ⁻⁰¹
13	2	1,4848 ⁻⁰³	105	1,5591 ⁻⁰¹
14	1	4,4545 ⁻⁰³	15	6,6817 ⁻⁰²
15	0	1,3363 ⁻⁰²	1	1,3363 ⁻⁰²

^a= A ou H: genótipo homozigoto equivalente ao da linhagem parental resistente ou genótipo heterozigoto.

^b= B ou R: genótipo homozigoto equivalente ao da linhagem parental suscetível ou genótipo recombinante.

^c= Probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Confirmação e Saturação das Regiões Cromossômicas que Contém os Genes de Resistência *Rps1k* e *Rps8*

O método de inoculação utilizando palitos colonizados com o patógeno, utilizado para avaliar a reação dos genótipos de soja à podridão radicular de fitóftora, foi eficiente para causar a infecção das plantas, confirmando as reações esperadas na cultivar BRS 268, utilizada como padrão de suscetibilidade. Para a geração F_2 e $F_{2:3}$, cinco vasos de BRS 268, contendo 5 plantas cada, foram dispostos aleatoriamente entre cada população, BW1 e CP8, sendo que, 100% de plantas mortas foram verificadas para os dois experimentos. Este método se mostrou eficiente para acessar a variabilidade genética desta característica nas populações segregantes em estudo.

As plantas com sintomas de fitóftora foram avaliadas sete dias após a inoculação. Os genótipos Williams 82 (que contém o gene de resistência *Rps1k*) e PI 399073 (gene de resistência *Rps8*) não apresentaram sintomas, confirmando sua resistência ao patógeno, enquanto os genótipos BRS 133 e MG/BR 46, suscetíveis, apresentaram os sintomas característicos desta doença, com 100% de plantas mortas para ambos os genótipos. Com base na análise dos dados das avaliações fenotípicas das gerações F_2 e $F_{2:3}$ de cada cruzamento, foi verificado, pelo teste de χ^2 , correspondência com a segregação de um único loco, com ação dominante aos genes *Rps1k* e *Rps8* (Tabela 3).

Assim, na geração F_2 , dos 138 indivíduos da população BW1, 108 foram avaliados como resistentes e 30 apresentaram reação de suscetibilidade. Já para a população CP8, dos 93 indivíduos, 71 foram resistentes e 22 foram suscetíveis. O modelo genético com um gene dominante segregando na geração F_2 , produzindo a proporção de 3 resistente: 1 suscetível, se adequou satisfatoriamente aos dados, apresentando valores de χ^2 não significativos para as populações BW1 e CP8 (Tabela 3). A avaliação da população segregante $F_{2:3}$ BW1 mostrou que, das 87 famílias avaliadas, 30 foram homozigotas resistentes, 36 foram heterozigotas resistentes e 21 foram homozigotas suscetíveis. Para a população segregante $F_{2:3}$ CP8, das 55 famílias avaliadas, 10 foram homozigotas resistentes, 25 foram heterozigotas resistentes e 20 foram homozigotas suscetíveis. Apesar da redução do

número de famílias, o modelo genético com um gene dominante segregando na geração $F_{2:3}$, produzindo a proporção de 1:2:1, também se adequou satisfatoriamente aos dados, apresentando valores de χ^2 não significativos para as populações BW1 e CP8 (Tabela 3).

Tabela 3 - Análise de Qui-quadrado para segregação das gerações F_2 e $F_{2:3}$ nas populações BW1 e CP8.

Gerações	Proporção Observada ^a			Proporção Esperada ^a			Qui-quadrado ^b	Prob. (%) ^c
	A	H	B	A	H	B		
População BW1								
F_2	108	30		103.5	34.5		0,7826 ^{ns}	37,63
$F_{2:3}$	30	36	21	21.75:	43.5:	21.75	4,4482 ^{ns}	10,82
População CP8								
F_2	71	22		69.75	23.25		0,0896 ^{ns}	76,47
$F_{2:3}$	10	25	20	13.75:	27.5:	13.75	4,0909 ^{ns}	12,93

^a= A H e B: genótipo homozigoto equivalente ao da linhagem parental resistente, genótipo heterozigoto e genótipo homozigoto equivalente ao da linhagem parental suscetível, respectivamente.

^b= ns - não significativo ao nível de significância de 5%.

^c= Probabilidade.

Em condições ideais de experimentação, espera-se que nenhuma planta resistente desenvolva a doença e que nenhuma planta suscetível apresente-se sadia. Porém, alguns fatores relacionados ao método de inoculação utilizado dificultam a avaliação precisa de alguns indivíduos. Um fator que deve ser considerado são os chamados “escapes” de inoculação (plantas com genótipo suscetível que são avaliadas como plantas resistentes), que podem ser decorrentes da má fixação dos palitos na haste da planta, ou da falta de umidade necessária e temperatura ótima para o desenvolvimento e manutenção do oomiceto, que muitas vezes podem sofrer alterações dentro da casa-de-vegetação.

O genótipo utilizado como padrão de suscetibilidade (BRS 268) e os genótipos parentais suscetíveis (BRS 133 e MG/BR 46) não apresentaram escapes. Porém, na avaliação das gerações $F_{2:3}$ foram observados alguns escapes nas gerações F_2 , mais especificamente 3 escapes para a população BW1 e 5 escapes para a população CP8, resultando ao todo em 3,46% de escape para as duas populações na geração F_2 . Assim, neste trabalho a taxa de escape foi considerada

irrelevante, ficando abaixo de 10%, o que é normalmente observado nos experimentos de inoculação com fitóftora na Embrapa Soja.

Com o objetivo de saturar a região que contém o gene *Rps1k*, um total de 14 marcadores microssatélites (Anexo A) e nove SNPs (Anexo C) foram testados na população BW1, dos quais oito microssatélites e três SNPs se mostraram polimórficos entre os genitores e em desequilíbrio de ligação, ou seja, ligados ao gene *Rps1k*. Para a população CP8, foram testados 13 microssatélites (Anexo B) e 16 SNPs (Anexo D), sendo cinco microssatélites e três SNPs polimórficos entre os genitores e ligados ao gene *Rps8*.

Os marcadores polimórficos foram testados nos indivíduos das populações F_2 e, dentre todos os locos dos marcadores microssatélites e SNPs, apenas o loco do Sat_154 apresentou distorção de segregação significativa, de acordo com o teste do χ^2 ($P < 0,05$) (Tabela 2). É importante ressaltar que a população segregante $F_{2:3}$ CP8 sofreu uma drástica redução do número de famílias, o que, por sua vez, casualmente, elevou o número de indivíduos suscetíveis dentro desta população (Tabela 3). Assim é possível observar que a maioria dos marcadores moleculares testados na população CP8, em comparação com os marcadores testados na população BW1, apresentaram valores elevados de χ^2 (Tabela 4). A observação destes fatores pode auxiliar na compreensão do resultado obtido para o Sat_154, com segregação significativa, que não era esperado para este loco, uma vez que, a partir da mesma fonte de resistência, já foi descrito como ligado ao gene *Rps8* (SANDHU *et al.*, 2005).

Todos os marcadores moleculares microssatélites e SNPs testados que apresentaram segregação não significativa, se enquadraram satisfatoriamente à razão esperada para a herança co-dominante (1: 2: 1) nas populações segregantes $F_{2:3}$ BW1 e CP8 (Tabela 4), exceto o microssatélite Satt009 que apresentou uma segregação semelhante à esperada para a herança dominante (3: 1). Em um trabalho anterior em que o gene *Rps1* foi mapeado, o marcador Satt009 também foi observado com herança dominante (DEMIRBAS *et al.*, 2001). Assim, o marcador Satt009, por apresentar característica de dominância, não constitui, por si só, uma ferramenta muito eficiente para a seleção de genótipos resistentes à fitóftora, uma vez que não é possível a discriminação dos indivíduos heterozigotos. Porém, como o Satt009 foi mapeado a apenas 4,3 cM do gene *Rps1k* (Figura 4), sua utilização pode

contribuir para a seleção assistida, especialmente se utilizado juntamente com outros marcadores co-dominantes.

Tabela 4 - Análise de Qui-quadrado da segregação dos marcadores moleculares microssatélites e SNPs (geração F₂) nas populações BW1 e CP8.

Marcadores Moleculares	Proporção Observada ^a			Proporção Esperada ^a			Qui-quadrado ^b	Prob. (%) ^c
	A	H	B	A	H	B		
População BW1 (cromossomo 3)								
BARC-041781-08094	27	41	19	21.75: 43.5:21.75			1,7586 ^{ns}	41,51
Satt159	26	41	20	21.75: 43.5:21.75			1.1149 ^{ns}	57,27
Satt152	26	41	20	21.75: 43.5:21.75			1.1149 ^{ns}	57,27
Sat_186	26	41	20	21.75: 43.5:21.75			1.1149 ^{ns}	57,27
BARC-031833-07221	26	41	20	21.75: 43.5:21.75			1,1149 ^{ns}	57,27
Satt009	67		20	65.25:		21.75	0.1877 ^{ns}	66,48
Satt641	24	44	19	21.75: 43.5:21.75			0,5862 ^{ns}	74,59
BARC-064081-18547	24	43	20	21.75: 43.5:21.75			0,3793 ^{ns}	82,72
Satt530	24	42	21	21.75: 43.5:21.75			0.3103 ^{ns}	85,63
Satt675	24	44	19	21.75: 43.5:21.75			0.5862 ^{ns}	74,59
Satt683	23	46	18	21.75: 43.5:21.75			0.8621 ^{ns}	64,98
População CP8 (cromossomo 13)								
Satt519	13	24	18	13.75: 27.5:13.75			1,8000 ^{ns}	40,66
Satt425	14	21	20	13.75: 27.5:13.75			4,3818 ^{ns}	11,18
Satt595	14	22	19	13.75: 27.5:13.75			3,1091 ^{ns}	21,13
Sat_229	10	32	13	13.75: 27.5:13.75			1,8000 ^{ns}	40,66
Sat_154	11	22	22	13.75: 27.5:13.75			6,6000 [*]	3,69
BARC-010279-00575	12	23	20	13.75: 27.5:13.75			3,8000 ^{ns}	14,96
BARC-010501-00678	12	24	19	13.75: 27.5:13.75			2,6727 ^{ns}	26,28
BARC-017917-02451	11	24	20	13.75: 27.5:13.75			3,8364 ^{ns}	14,69

^a= A H e B: genótipo homozigoto equivalente ao da linhagem parental resistente, genótipo heterozigoto e genótipo homozigoto equivalente ao da linhagem parental suscetível, respectivamente.

^b= ns - não significativo ao nível de significância de 5%, * - significativo ao nível de significância de 5%;

^c= Probabilidade.

Os mapas de ligação gerados neste estudo mostraram consistência com o mapa de ligação consenso (SONG *et al.*, 2004), com algumas diferenças entre as distâncias e pequena inversão na ordem dos marcadores moleculares (Figura 4). As diferenças encontradas em relação às distâncias genéticas e em relação à posição dos marcadores são esperadas nas análises de ligação nas quais as populações utilizadas são distintas. Porém as posições dos marcadores moleculares observadas no mapa genético resultante deste trabalho refletem de maneira muito similar às posições físicas dos mesmos marcadores quando observados no mapa físico da soja (Figuras 5 e 6).

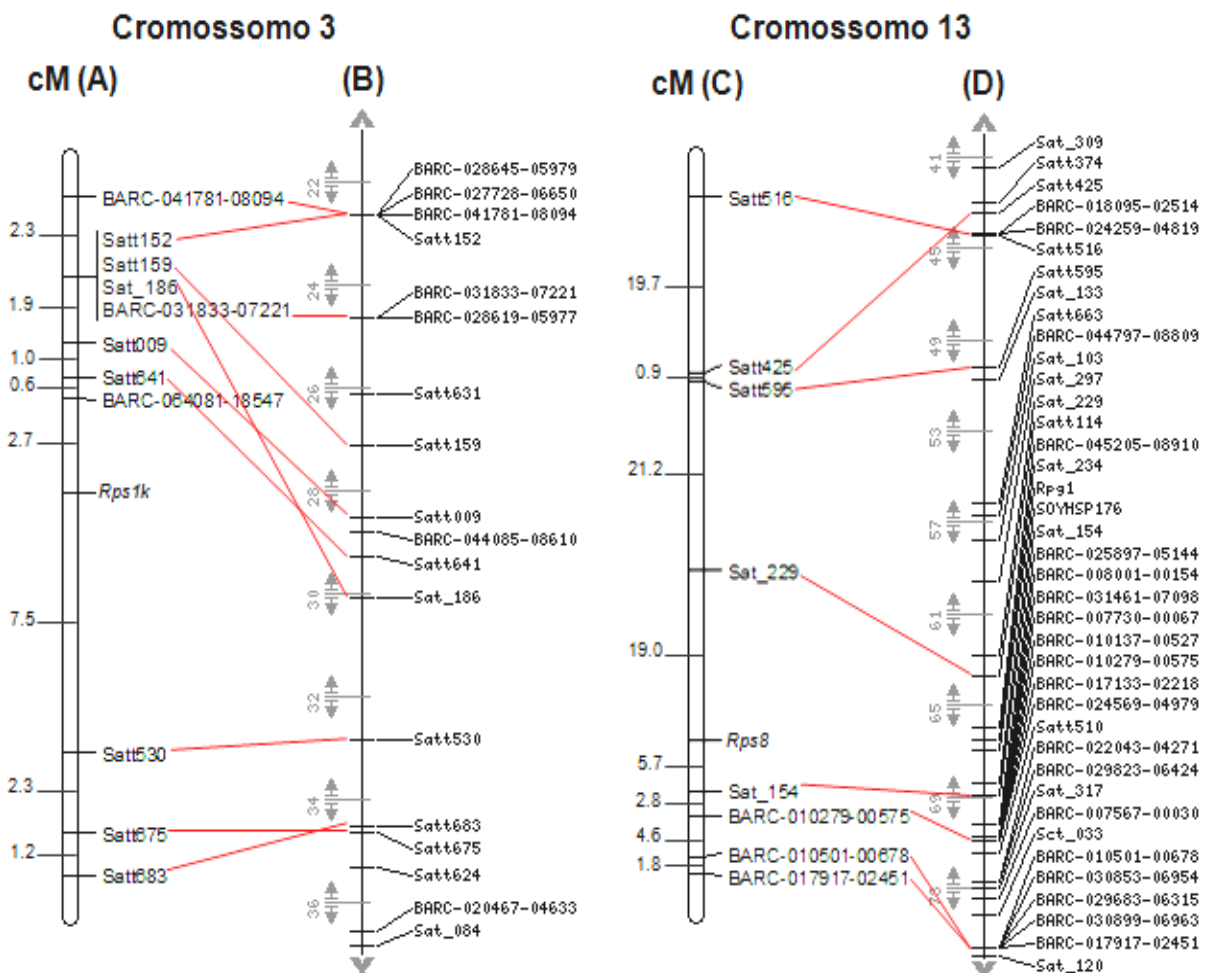


Figura 4 - (A) Mapa de ligação da região genômica do gene *Rps1k*, e seus respectivos marcadores mapeados na região com distâncias em cM. (B) Mapa consenso da soja da região do cromossomo 3 (GL N) que contém o gene *Rps1k*. (C) Mapa de ligação da região genômica do gene *Rps8*, e seus respectivos marcadores mapeados na região com distâncias em cM, (D) Mapa consenso da soja da região do cromossomo 13 (GL F) que contém o gene *Rps8*. Fonte: SOYBASE, 2012. Os mapas consenso da soja B e D estão representados em diferentes escalas para tornar possível a visualização da região que este estudo abrangeu.

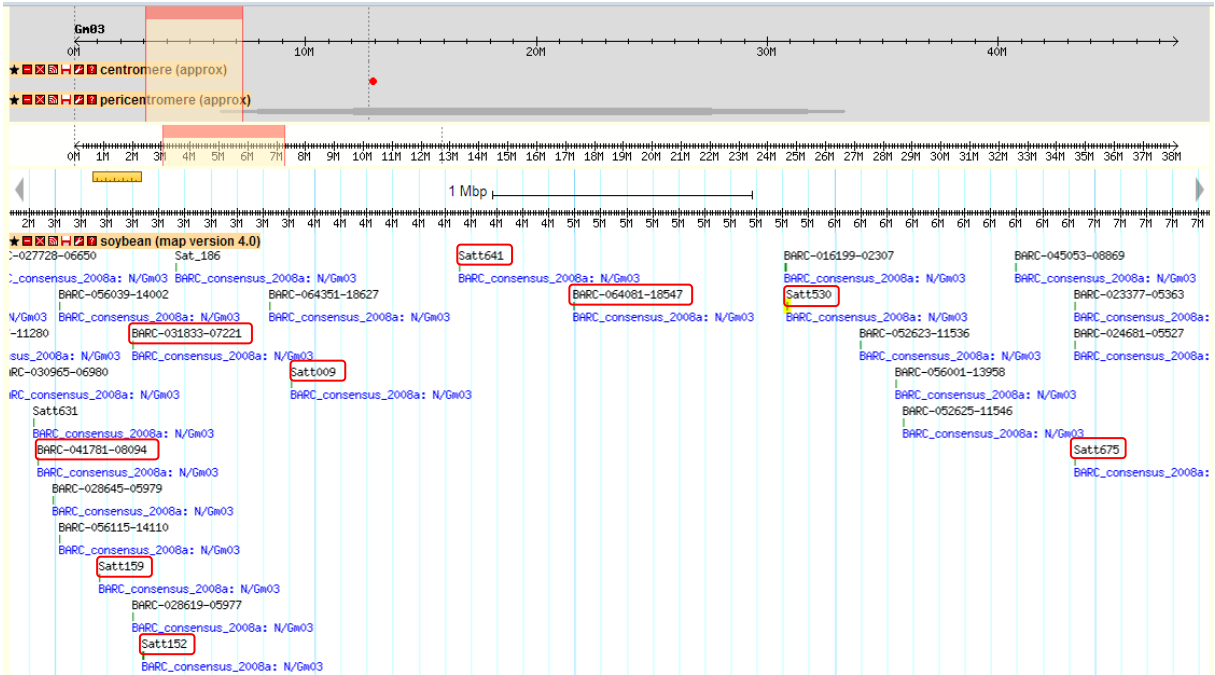


Figura 5 - Representação do painel do SoyBase Browser mostrando a região do genoma da soja referente ao cromossomo 3 (GL N), e que engloba a maioria dos marcadores microssatélites e SNPs (circulados em vermelho), utilizados neste trabalho para a confirmação e saturação da região do gene *Rps1k*, bem como suas respectivas distâncias físicas em Mbp. (<http://www.soybase.org/gb2/gbrowse/gmax1.01/>).

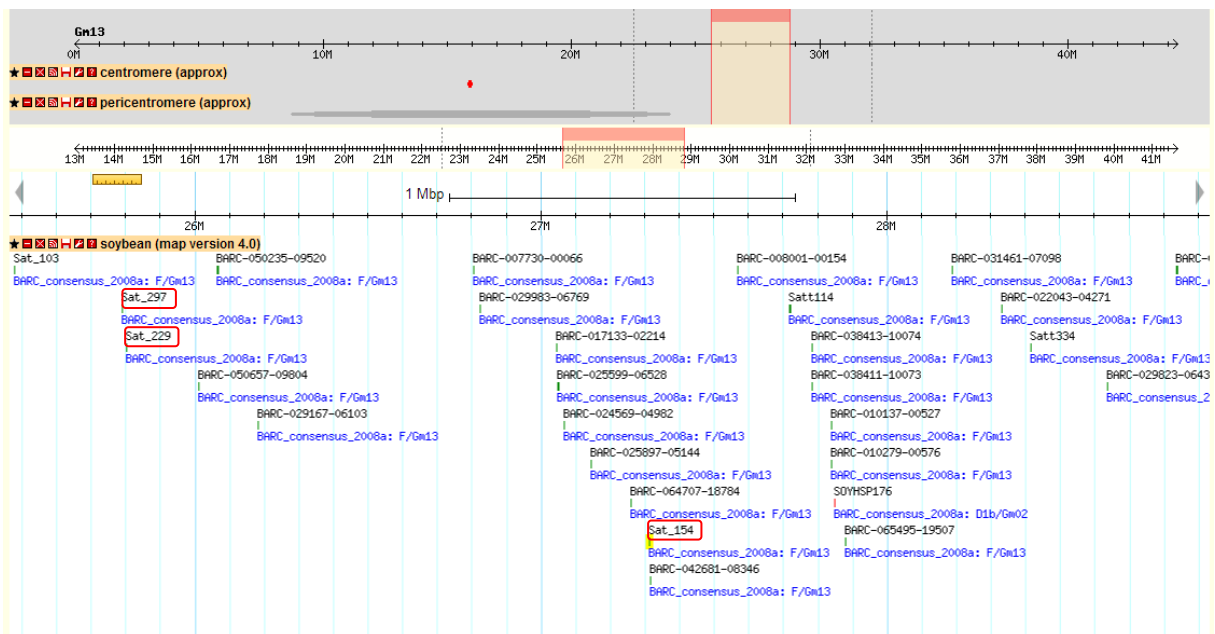


Figura 6 - Representação do painel do SoyBase Browser indicando a região do genoma da soja referente ao cromossomo 13 (GL F), e que engloba os marcadores microssatélites circulados em vermelho utilizados neste trabalho para a confirmação e saturação da região do gene *Rps8*, bem como suas respectivas distâncias físicas em Mbp. (<http://www.soybase.org/gb2/gbrowse/gmax1.01/>).

Ao se selecionar os marcadores moleculares para compor este estudo foram utilizadas informações tanto do mapa genético (CHOI *et al.*, 2007), quanto do mapa genômico (Soybase). Observa-se, no entanto, que alguns marcadores moleculares presentes no mapa físico, como o SNP BARC-084081-18547, não estavam presentes no mapa genético consenso da soja (SONG *et al.*, 2004), ao mesmo passo que alguns marcadores que estão dispostos no mapa genético consenso não foram encontrados no mapa físico, como é o caso dos SNPs BARC-010279-00575 e BARC-010501-00678 (Figuras 4, 5 e 6).

Neste estudo foi possível saturar com maior intensidade a região genômica que contém o gene *Rps1k* em comparação a região do gene *Rps8* (Figuras 4, 5 e 6). Este resultado foi decorrente principalmente da dificuldade de amplificação obtida para a maioria dos marcadores moleculares, microssatélites e SNPs, testados para a população CP8, e que não foi observada para a população BW1. Essa dificuldade de amplificação dos fragmentos para estes marcadores, em parte pode ser compreendida pela diversidade genética existente entre os genitores utilizados como fonte de resistência. A cultivar Williams 82, genótipo parental resistente da população BW1, é amplamente conhecida e utilizada em grande parte dos estudos que compreendem a cultura da soja. O sequenciamento do genoma da soja foi realizado utilizando a cultivar Williams 82 (SCHMUTZ *et al.*, 2010), e a maioria dos primers de marcadores moleculares, como no caso dos marcadores utilizados neste trabalho, foram desenvolvidos a partir da Williams 82, ou mesmo da cultivar Williams, progenitor que veio a originar a Williams 82, que apresentam igualdade genômica de cerca de 99,7% e com elevado grau de alinhamento (CREGAN *et al.*, 1999; SONG *et al.*, 2004; SONG *et al.*, 2010).

Assim a saturação da região que contém o gene *Rps1k*, no cromossomo 3, na população BW1 se torna mais simples, uma vez que os primers microssatélites foram desenvolvidos com base no genótipo de um dos seus genitores; ao contrário do que ocorreu na população CP8, em que a saturação da região que contém o gene *Rps8*, no cromossomo 13, apresentou algumas limitações, como por exemplo, o não anelamento, completo ou parcial, dos primers utilizados devido às possíveis diferenças genéticas entre a PI 399073, genótipo parental resistente da população CP8, e a cultivar Williams 82, a partir da qual os primers foram desenvolvidos.

Neste trabalho, o gene *Rps1k* foi mapeado no cromossomo 3 da soja, flanqueado pelos marcadores BARC-084081-18547 e Satt530, à distâncias de 2,7 e

7,5 cM, respectivamente (Figura 4). Anteriormente, DEMIRBAS *et al.* (2001) havia mapeado o gene *Rps1*, que teve como fonte de resistência a cultivar Clark, na mesma região cromossômica, entre os microssatélites Satt159 e Satt152, a uma distância de 0,16 e 0,13 cM, respectivamente, também no cromossomo 3 da soja.

Como *Rps1k* é considerado um alelo de *Rps1*, entende-se que todo marcador que esteja ligado a *Rps1* também estará ligado a *Rps1k*, mesmo que estas distâncias apresentem variações entre populações diferentes, como observado neste trabalho. O genótipo parental resistente utilizado no nosso trabalho (Williams 82) é distinto do genótipo parental utilizado por DEMIRBAS *et al.* (2001) e, conseqüentemente, a população segregante também, o que explica as diferenças observadas quanto a posição do gene em relação aos marcadores e suas respectivas distâncias genéticas. Porém, podemos observar neste trabalho que os mesmos marcadores encontrados por DEMIRBAS *et al.* (2001), Satt152 e Satt159, apesar de não serem os mais próximos e de não estarem flanqueando o gene, também foram posicionados próximos ao gene *Rps1k*, a uma distância de 6,2 cM. Assim as distâncias genéticas podem sofrer alterações entre diferentes populações analisadas e ainda entre diferentes condições ambientais, uma vez que os sintomas podem sofrer influência de fatores climáticos e resultarem em avaliações fenotípicas imprecisas.

Os marcadores moleculares BARC-084081-18547 e Satt530, que neste trabalho flanquearam o gene *Rps1k*, e ainda outros marcadores que também podem ser considerados próximos como Satt641, Satt009, BARC-031833-07221, Satt159, Sat_186 e Satt152, posicionados a 3,3 cM, 4,3 cM e a 6,2 cM, respectivamente de *Rps1k* (Figura 4), podem ser considerados marcadores potenciais para uso em seleção assistida nos programas de melhoramento para fitóftora. As baixas distâncias observadas refletem baixas taxas de recombinação entre *Rps1k* e estes marcadores, aumentando a probabilidade de co-segregação. Assim, as baixas taxas de recombinação podem constituir uma forma de inferir a eficiência de seleção de cada marcador molecular.

A distância em centiMorgan entre dois *loci*, como por exemplo um gene e um marcador molecular, é equivalente à porcentagem de recombinação existente entre estes, assim, para o SNP BARC-084081-18547, que está a 2,7 cM de *Rps1k*, a porcentagem de recombinação entre o gene e esse marcador é de 2,7%. Portanto, ao utilizar esse marcador como uma marca de seleção para o gene *Rps1k*, existe

2,7% de probabilidade de que ocorram recombinações e 97,3% de probabilidade de que ocorra co-segregação, ou seja, a eficiência de seleção calculada com base nas taxas de recombinação para esse marcador é de 97,3%. Assumindo esse raciocínio para o cálculo da eficiência de seleção, podemos inferir que no caso dos marcadores próximos a *Rps1k*, a eficiência de seleção é de 97,3% para BARC-084081-18547, como mencionado acima, 96,7% para Satt641, 95,7% para Satt009, 93,8% para BARC-031833-07221, Satt159, Sat_186 e Satt152, e 92,5% para Satt530.

Para o gene *Rps8* SANDHU *et al.* (2005) mapeou o *locus* de resistência no cromossomo 13 da soja, por meio de duas populações segregantes, posicionando-o entre os marcadores microssatélites Sat_154 e Satt510, a 4,0 e 6,4 cM, respectivamente, em uma das populações. Na outra população, o gene foi mapeado a 9,3 cM do marcador Sat_154 e a 13,2 cM do Sat_120. Em outro estudo, GORDON *et al.* em 2006 mapeou o gene *Rps8* na mesma região, entre os microssatélites Satt425 e Satt114, à 20.9 e 10.1 cM, respectivamente. Os resultados observados em ambos os estudos (SANDHU *et al.*, 2005; GORDON *et al.*, 2006) corroboram os resultados obtidos em nosso trabalho, no qual o gene *Rps8* foi flanqueado entre os marcadores Sat_154 e Sat_229, na mesma região genômica. Os resultados obtidos por SANDHU *et al.* (2005), em relação ao microssatélite Sat_154, ressalta a importância deste marcador e sua proximidade ao gene *Rps8*, de tal modo que, mesmo tendo apresentado segregação significativa neste trabalho, este marcador deve ser considerado como potencial para a utilização em trabalhos de seleção assistida por marcadores.

As diferenças entre as distâncias encontradas nesses três trabalhos de mapeamento do *locus Rps8* podem ser explicadas pelos mesmos motivos citados anteriormente para *Rps1k*. Mesmo que a fonte de resistência utilizada seja a mesma, PI 399073, o genitor com genótipo suscetível é diferente, e, conseqüentemente, diferentes populações segregantes são geradas proporcionando diferentes frequências de recombinação na região.

A distância genética obtida em nosso trabalho, mais especificamente entre o gene *Rps8* e os SNPs BARC-010279-00575 e BARC-010501-00678, de 8,5 e 13,1 cM respectivamente, faz com que estes marcadores também constituam uma interessante ferramenta para a seleção assistida ao melhoramento. Apesar de ser um importante marcador molecular já comprovadamente ligado ao gene *Rps8* (SANDHU *et al.*, 2005), como o microssatélite Sat_154 apresentou segregação

significativa, sua distância genética do gene, de 5,7 cM, deve ser ignorada. Já o microssatélite Sat_229, que flanqueou o gene *Rps8*, encontra-se a uma distância muito elevada, de 19 cM, e desse modo não constitui um marcador potencial para o melhoramento via SAM.

Para o gene *Rps8*, de forma semelhante ao que foi apresentado para o gene *Rps1k*, a baixa taxa de recombinação entre o gene e o marcador, pode inferir a eficiência de seleção. No caso do microssatélite Sat_154, a segregação significativa poderia super ou subestimar a eficiência de seleção, portanto, assim como a distância genética, a eficiência de seleção para este loco deve ser ignorada. Já para o microssatélite Sat_229, a eficiência de seleção foi de apenas 81%, não sendo, portanto, muito eficiente para seleção em programas de melhoramentos via SAM, como mencionado anteriormente. Assim, outros marcadores mais próximos, como os SNPs BARC-010279-00575 e BARC-010501-00678, podem ser preferencialmente utilizados nos processos de seleção assistida, visto que apresentaram eficiências de seleção de 91,5% e 86,9%, respectivamente.

Embora alguns dos marcadores mapeados nestas populações não estejam estreitamente ligados aos *locus* de resistência, outros marcadores localizados na mesma região podem ser úteis em outras populações com *background* genético diferente.

Validação de Marcadores Moleculares Próximos aos Genes *Rps1k* e *Rps8*.

Com o objetivo de confirmar a utilidade dos marcadores moleculares identificados na seleção assistida para resistência a fitóftora, várias populações de retrocruzamentos, envolvendo os genes de resistência *Rps1k* e *Rps8* foram avaliadas com alguns marcadores selecionados. A genotipagem dos parentais recorrentes, bem como dos indivíduos resultantes dos retrocruzamentos do programa de melhoramento para fitóftora, foi realizada utilizando três marcadores moleculares, microssatélites e SNPs, posicionados próximos de cada gene, *Rps1k* e *Rps8*, selecionados com base nos resultados de mapeamento obtidos neste trabalho e em trabalhos anteriores. O microssatélite Sat_154, apesar do resultado obtido em nosso mapeamento na população segregante CP8, foi utilizado nas análises de validação, visto sua importância em trabalhos previamente desenvolvidos (SANDHU *et al.*, 2005). Assim, dois fatores foram avaliados em relação à validação dos

marcadores moleculares: as taxas de polimorfismo observadas entre os genótipos parentais, e a segregação desses marcadores moleculares para cada população gerada a partir dos retrocruzamentos.

Para ser útil como ferramenta de seleção, o marcador deve apresentar polimorfismo na população a ser avaliada. Neste trabalho foi analisada a presença de polimorfismo em 26 cruzamentos, sendo 14 cruzamentos envolvendo a fonte de resistência para *Rps1k*, Williams 82, e 12 cruzamentos utilizando a fonte de resistência para *Rps8*, PI 399073.

Todos os marcadores utilizados foram eficientes para amplificar todos os genótipos parentais analisados. O polimorfismo observado nas populações de retrocruzamentos envolvendo o gene *Rps1k* foi maior do que o observado entre os cruzamentos utilizados no programa de melhoramento para o gene *Rps8* (Tabela 3). Dos cruzamentos analisados para *Rps1k*, o microsatélite Satt641 apresentou polimorfismo para todos os cruzamentos, o SNP BARC-064081-18547 foi polimórfico para 13 cruzamentos, enquanto que o microsatélite Satt530 foi polimórfico para apenas cinco cruzamentos. Para os cruzamentos analisados para *Rps8*, o microsatélite Sat_154 foi o marcador que apresentou maior polimorfismo entre o parental resistente e os parentais recorrentes, sendo polimórfico para oito dos 12 cruzamentos (Tabela 5). Já os SNPs BARC-010279-00575 e BARC-010501-00678 foram polimórficos para apenas cinco cruzamentos.

Tabela 5 - Análise de polimorfismo entre os genótipos parentais do programa de melhoramento para fitóftora da Embrapa Soja para os genes *Rps1k* e *Rps8*.

Retrocruzamentos		Marcadores Moleculares		
Fonte Resistente	Parental Recorrente	Satt530	BARC-064081-18547	Satt641
<i>Rps1k</i>				
Williams 82	BRS 282	+	+	+
Williams 82	BRS 232	-	+	+
Williams 82	BRS 239	-	+	+
Williams 82	BRS Invernada	+	+	+
Williams 82	Embrapa 48	-	+	+
Williams 82	BRS 133	+	+	+
Williams 82	BRS 268	-	+	+
Williams 82	BRI 04-02935	+	-	+
Williams 82	BRS 230	-	+	+
Williams 82	BRS Raimunda	-	+	+
Williams 82	BRS/GO Iara	+	+	+
Williams 82	BRS/GO Luziânia	-	+	+
Williams 82	BRS/MG 68	-	+	+
Williams 82	MG/BR 46	-	+	+
Fonte Resistente	Parental Recorrente	Sat_154	BARC-010279-00575	BARC-010501-00678
<i>Rps8</i>				
PI 399073	BRS 239	+	+	+
PI 399073	PC 1107	+	-	-
PI 399073	Emgopa 302RR	+	+	-
PI 399073	BRS FavoritaRR	+	+	+
PI 399073	BRS Invernada	+	-	-
PI 399073	BRS 232	-	-	-
PI 399073	BRS 282	-	-	+
PI 399073	BRS 245RR	-	-	-
PI 399073	BR 01-69311	-	-	-
PI 399073	BRS/MG 68	-	-	-
PI 399073	MG/BR 46	+	+	+
PI 399073	BRS ValiosaRR	+	+	+

+ = Presença de polimorfismo entre os genótipos parentais.

- = Ausência de polimorfismo entre os genótipos parentais.

Os indivíduos das populações de retrocruzamentos foram então avaliados para cada marcador selecionado. Os resultados obtidos a partir das análises realizadas para as populações BW1 e CP8, além da confirmação e saturação da região gênica dos genes *Rps1k* e *Rps8*, também validaram os marcadores posicionados próximos aos genes, para os cruzamentos que originaram as populações segregantes, ou seja, para os cruzamentos entre Williams 82 e BRS 133 e entre PI 399073 e MG/BR 46.

As análises moleculares realizadas para os demais cruzamentos testados (retrocruzamentos) quanto à segregação dos marcadores, fornecem dados interessantes sobre a aplicação destes marcadores para a seleção indireta dos genes *Rps*. Porém de modo um pouco diferente do que foi realizado para as populações BW1 e CP8, a segregação dos marcadores moleculares para as populações resultantes dos retrocruzamentos, não foi submetida à análise de χ^2 devido ao tamanho reduzido das populações utilizadas. O pequeno tamanho das populações é decorrente de fatores como a seleção dos genótipos resistentes (homozigotos dominantes e heterozigotos) e a eliminação dos genótipos suscetíveis (homozigotos recessivos), mediante a inoculação do patógeno; e ainda, pelo fato de que a maioria das populações se encontrava na geração RC_1F_1 .

Nos estudos de validação de marcadores moleculares é comum a utilização de populações que se encontram em gerações avançadas, o que aumenta a proporção de homozigose entre os indivíduos (GREWAL *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2009), ou mesmo na geração F_2 ou F_3 , sendo possível acompanhar a segregação esperada para estas gerações (SHEEBA *et al.*, 2009). Neste trabalho foram avaliados alguns indivíduos derivados de programas de retrocruzamentos, nos quais, de modo geral, a proporção de genes provenientes do parental recorrente aumenta a cada retrocruzamento, sendo possível estimar as proporções esperadas de cada genótipo mesmo que as populações estejam na geração RC_1F_1 . Como as análises de χ^2 não puderam ser realizadas, as proporções de segregação observadas para cada população foram comparadas às proporções de segregação esperadas em duas condições: em desequilíbrio de ligação entre o marcador e o gene, e em equilíbrio de ligação entre o marcador e o gene (Tabelas 6 e 7).

Tabela 6 - Proporções esperadas e observadas após a seleção dos genótipos resistentes, para a segregação dos marcadores moleculares posicionados próximos ao gene *Rps1k*.

Cruzamentos com Williams 82	Nº indivíduos	Proporção						Proporção					
		Esperada (%)						Observada (%) ^c					
		Em			Em			Satt530		BARC-		Satt641	
		desequilíbrio ^a			equilíbrio ^b			A	H	A	H	A	H
A	H	B	A	H	B	A	B	A	B	A	B		
BRS 282 (RC ₂ F ₂)	10	33.12:	66.87:	0	6.25:	12.5:0:	0:10:	90:20:	80:				
					81.25	100	0	0	0				
BRS 232 (RC ₂ F ₁)	2	0:	100:	0	0:	25:100:	0:0:	100:0:	100:				
					75	0	0	0	0				
BRS 232 (RC ₃ F ₁)	3	0:	100:	0	0:	12.5:100:	0:0:	100:0:	100:				
					87.5	0	0	0	0				
BRS 239 (RC ₁ F ₁)	9	0:	100:	0	0:	50:100:	0:0:	100:0:	100:				
					50	0	0	0	0				
BRS Invernada (RC ₁ F ₁)	5	0:	100:	0	0:	50:0:	0:0:	100:0:	100:				
					50	100	0	0	0				
Embrapa 48 (RC ₂ F ₁)	3	0:	100:	0	0:	25:100:	0:0:	100:0:	100:				
					75	0	0	0	0				
BRS 133 (RC ₂ F ₁)	7	0:	100:	0	0:	25:0:	0:0:	100:0:	100:				
					75	100	0	0	0				
BRS 268 (RC ₂ F ₁)	3	0:	100:	0	0:	25:100:	0:0:	100:0:	100:				
					75	0	0	0	0				
BRI 04-02935 (RC ₂ F ₁)	5	0:	100:	0	0:	25:0:	0:100:	0:0:	100:				
					75	100	0	0	0				
BRS 230 (RC ₂ F ₁)	5	0:	100:	0	0:	25:100:	0:0:	100:0:	100:				
					75	0	0	0	0				
BRS Raimunda (RC ₂ F ₁)	3	0:	100:	0	0:	25:100:	0:0:	67.5:0:	67.5:				
					75	0	32.5	32.5					
BRS/GO Iara (RC ₁ F ₁)	7	0:	100:	0	0:	50:0:	45:0:	55:0:	55:				
					50	55	45	45					
BRS/GO Luziânia (RC ₁ F ₁)	2	0:	100:	0	0:	50:100:	0:0:	100:0:	100:				
					50	0	0	0	0				
BRS/MG 68 (RC ₂ F ₁)	2	0:	100:	0	0:	25:100:	0:0:	100:0:	100:				
					75	0	0	0	0				
MG/BR 46 (RC ₂ F ₁)	4	0:	100:	0	0:	25:100:	0:0:	100:0:	100:				
					75	0	0	0	0				

^a= Proporção esperada para a segregação de um marcador molecular que está em desequilíbrio de ligação com o gene *Rps1k*.

^b= Proporção esperada para a segregação de um marcador molecular que está em equilíbrio de ligação com o gene *Rps1k*.

^c= Proporção observada nos indivíduos resultantes dos retrocruzamentos para *Rps1k*.

RC= retrocruzamento, F= geração.

Tabela 7 - Proporções esperadas e observadas após a seleção dos genótipos resistentes, para a segregação dos marcadores moleculares posicionados próximos ao gene *Rps8*.

Cruzamentos com PI 399073	Nº Individuos	Proporção Esperada (%)					Proporção Observada (%) ^c				
		Em <u>desequilí</u> <u>brio</u> ^a		Em <u>equilíbrio</u> ^b		Sat_154	BARC-010279-00575		BARC-010501-00678		
		A	H	A	H		A	H	A	H	B
BRS 239 (RC ₁ F ₂)	10	33.75:	66.25:	12.5:	25:	50:	50:	50:	50:	50:	0
PC 1107 (RC ₃ F ₁)	4	0:	100:	0:	12.5:	0:	0:	100:	0:	100:	0
PC 1107 (RC ₂ F ₁)	11	0:	100:	0:	25:	0:	0:	100:	0:	100:	0
Emgopa 302RR (RC ₁ F ₃)	11	55.62:	44.37:	12.5:	18.75:	45.62:	0:	63.75:	36.25:	100:	0
BRS Favorita (RC ₂ F ₁)	3	0:	100:	0:	50:	0:	100:	0:	100:	0:	0
BRS Invernada (RC ₁ F ₁)	4	0:	100:	0:	50:	0:	25:	100:	0:	100:	0
BRS 232 (RC ₁ F ₁)	8	0:	100:	0:	50:	100:	0:	100:	0:	100:	0
BRS 282 (RC ₁ F ₂)	10	33.75:	66.25:	12.5:	25:	100:	0:	100:	0:	20:	80:
BRS 245RR (RC ₂ F ₁)	2	0:	100:	0:	25:	100:	0:	100:	0:	100:	0
BR 01-69311 (RC ₂ F ₁)	10	0:	100:	0:	25:	100:	0:	100:	0:	100:	0
BRS/MG 68 (RC ₂ F ₁)	5	0:	100:	0:	25:	100:	0:	0:	100:	0:	0
MG/BR 46 (RC ₂ F ₁)	2	0:	100:	0:	25:	0:	50:	0:	50:	0:	50
BRS ValiosaRR (RC ₃ F ₁)	1	0:	100:	0:	12.5:	0:	100:	0:	100:	0:	100:

^a= Proporção esperada para a segregação de um marcador molecular que está em desequilíbrio de ligação com o gene *Rps8*.

^b= Proporção esperada para a segregação de um marcador molecular que está em equilíbrio de ligação com o gene *Rps8*.

^c= Proporção observada nos indivíduos resultantes dos retrocruzamentos para *Rps8*.

RC= retrocruzamento, F= geração.

Os retrocruzamentos foram realizados a partir do cruzamento de um indivíduo da geração F₁, resultante do cruzamento simples entre a fonte resistente e a fonte suscetível, com o parental recorrente (susceptível). Após o retrocruzamento, as populações RC₁F₁, foram submetidas à inoculação do patógeno para a seleção dos indivíduos resistentes. Os indivíduos RC₁F₁ selecionados foram então retrocruzados novamente com o parental recorrente, e assim sucessivamente a cada retrocruzamento. Quando não foi possível realizar os retrocruzamentos nas gerações RCF₁, as gerações foram avançadas até RCF₂ ou mesmo até RCF₃, mantendo a exposição ao patógeno para a seleção dos indivíduos resistentes em

cada geração. Assim, os cruzamentos utilizados para a validação dos marcadores moleculares passaram por diferentes números de retrocruzamentos e se encontram em diferentes gerações.

O número de retrocruzamentos e a geração de cada população são necessários para o cálculo das proporções esperadas para a segregação dos marcadores. Assim, considerando a seleção realizada para os indivíduos resistentes, é esperado, uma vez que o marcador esteja ligado ao gene, que não sejam observados indivíduos com genótipo suscetível (proporção esperada para desequilíbrio de ligação entre o gene e o marcador). Porém, para um loco não ligado ao marcador, espera-se uma segregação normal, observada como se não houvesse a seleção para os indivíduos resistentes (proporção esperada para equilíbrio de ligação entre o gene e o marcador).

Analisando os resultados observados nas tabelas 5, 6 e 7, podemos inferir sobre a aplicação dos marcadores utilizados nos programas de melhoramento via SAM. O microssatélite Satt530, apesar de ter sido posicionado flanqueando o gene *Rps1k* na população BW1, se mostrou pouco polimórfico para os cruzamentos realizados. Os cinco cruzamentos para os quais este marcador foi polimórfico, apresentaram segregação semelhante à esperada para equilíbrio de ligação, ou seja, para as cinco populações o marcador mostrou-se não ligado ao alelo de resistência do gene *Rps1k*. Um fato interessante a ser observado sobre o marcador Satt530, é que este segregou não ligado ao gene para a população resultante do retrocruzamento utilizando o parental recorrente BRS 133, mesmo parental suscetível utilizado na população BW1. Como este marcador se mostrou ligado ao gene *Rps1k* na população BW1, um possível evento de recombinação deve ter ocorrido na população do retrocruzamento em questão, interferindo assim na segregação deste marcador. Devido aos resultados discutidos anteriormente, o microssatélite Satt530 pode ser considerado um marcador pouco eficiente para a utilização nos programas de seleção assistida ao melhoramento de fitóftora para as populações utilizadas neste trabalho.

Já o SNP BARC-064081-18547 e o microssatélite Satt641 apresentam elevado potencial para utilização nos programas de melhoramento por meio de seleção assistida. Além de terem sido posicionados mais próximos ao gene *Rps1k* na população BW1, do que o Satt530, estes marcadores apresentaram elevado polimorfismo entre os parentais utilizados nos retrocruzamentos, além de

segregarem em ligação com o gene para a maioria das populações. O BARC-064081-18547 apresentou segregação semelhante à esperada para desequilíbrio de ligação, para 12 das 15 populações analisadas. Apenas duas populações apresentaram segregação esperada para equilíbrio de ligação, resultantes dos retrocruzamentos utilizando os parentais recorrentes BRS Raimunda e BRS/GO Iara. Os resultados obtidos para o Satt641 foram ainda mais promissores, apresentando segregação semelhante à esperada para desequilíbrio de ligação, para 13 populações, e semelhante ao observado para BARC-064081-18547, apenas as populações provenientes dos retrocruzamentos utilizando os parentais recorrentes BRS Raimunda e BRS/GO Iara, segregaram em equilíbrio de ligação.

As análises de segregação para os retrocruzamentos do programa de melhoramento para *Rps8* revelaram que os marcadores selecionados próximos a este gene na população CP8, foram menos eficientes que os marcadores selecionados próximos ao gene *Rps1k*. Dos três marcadores moleculares testados nos retrocruzamentos, o Sat_154, apesar de apresentar maior taxa de polimorfismo entre os parentais, segregou em ligação com o gene *Rps8* em apenas três das 13 populações segregantes. Por outro lado, os SNPs BARC-010279-00575 e BARC-010501-00678, posicionados mais distantes do gene e com menor taxa de polimorfismo do que o Sat_154 apresentaram segregações semelhantes à segregação esperada em desequilíbrio de ligação para quatro populações, três das quais foram comuns aos dois SNPs.

O SNP BARC-010279-00575 também apresentou um fato interessante quanto à genotipagem dos parentais e da população segregante do cruzamento entre PI 399073 e BRS/MG 68. Para este cruzamento não foi detectado polimorfismo entre os parentais, os quais ambos apresentaram o alelo característico da PI399073, ou seja, o alelo do parental resistente. Porém, os cinco indivíduos da população segregantes, RC₂F₁, apresentaram outro alelo, sendo genotipados como indivíduos suscetíveis. Considerando que os cinco indivíduos genotipados realmente sejam descendentes da fonte de resistência PI 399073 e do parental recorrente BRS/MG 68, uma explicação possível para o resultado observado pode se basear no fato de que em algum dos cruzamentos realizados, cruzamento simples ou retrocruzamento, tenha ocorrido recombinação desigual e que esta se manteve nos cruzamentos seguintes, contribuindo assim para o resultado que observamos para estes indivíduos. Além de recombinação desigual, mutação por substituição

sinônima também poderia constituir uma hipótese para este resultado, uma vez que nesse tipo de substituição o polipeptídeo transcrito não é alterado, mantendo assim o mesmo fenótipo. Desse modo, podemos ver que a eficiência do marcador está estritamente relacionada à distância do mesmo ao gene de resistência, visto que quanto mais próximo do gene, menores seriam as chances de que uma recombinação ocorresse entre esses dois *loci*.

É importante compreender que os marcadores que não se mostraram eficientes neste trabalho, podem apresentar comportamento diferente em outros trabalhos que utilizem, além de um background diferente, outros alelos e mesmo diferentes genes que possam estar localizados na mesma região genômica. Já para os resultados obtidos neste trabalho, algumas estratégias podem solucionar ou ainda reduzir os problemas encontrados. Com o sequenciamento do genoma da soja (SCHMUTZ *et al.*, 2010), o desenvolvimento de primers para regiões específicas se tornou uma estratégia mais simples e viável. No caso da região que contém o gene *Rps8*, que foi menos saturada, existe ainda uma gama de SNPs já mapeados na mesma região e que podem contribuir com informações mais precisas quanto à localização do gene.

A região gênica que contém o gene *Rps1k* é mais conhecida, e alguns trabalhos descrevem genes candidatos já conhecidos para esse loco. Quatro genes candidatos, agrupados em duas classes, foram localizados na região do loco de *Rps1k* (BHATTACHARYYA *et al.*, 2005; GAO *et al.*, 2005). Estes genes, de modo geral, apresentam regiões repetidas ricas em leucina (CC-NB-LRR *coiled coil-nucleotide binding-leucine rich repeat*), também muito comuns em genes de resistência, e alguns desses genes contribuem de forma efetiva para a resistência à podridão radicular de fitóftora em plantas de soja transgênicas (BHATTACHARYYA *et al.*, 2005; GAO *et al.*, 2005; GAO e BHATTACHARYYA, 2008). Os genes candidatos descritos encontram-se posicionados na mesma região em que o *Rps1k* foi posicionado no presente trabalho. Assim, é possível desenvolver primers específicos, com base nas sequências dos genes candidatos, para serem testados em futuros trabalhos de validação. Adicionalmente, como a principal fonte de resistência do gene *Rps1k* é a Williams 82, e o sequenciamento do genoma da soja se baseou nessa cultivar, o desenvolvimento de primers específicos torna-se mais confiável e viável.

Ambos os *loci* estudados neste trabalho estão localizados em regiões que abrangem grande número de genes já identificados e em sua maioria, relacionados à resistência a doenças. O loco de *Rps1k*, localizado no cromossomo 3, assim como muitos genes de resistência, é descrito como um *cluster*, constituído por um gene maior, *Rps1k*, e alguns genes menores que atuam, direta ou indiretamente, para gerar os mecanismos de defesa que são observados contra a ação do patógeno *P. sojae*. Dentre os genes de resistência já mapeados e identificados na mesma região cromossômica do cluster *Rps1*, como o gene *Rpp5* (GARCIA *et al.*, 2008), que confere resistência à ferrugem asiática da soja, cerca de 10 genes apresentam grande similaridade com o gene *Rps1k* (BHATTACHARYYA *et al.*, 2005).

A região que contém o gene *Rps8*, também próxima à região do gene *Rps3*, no cromossomo 13 (GL F) da soja, contém pelo menos mais 10 *loci*, genes maiores e QTLs, mapeados e ligados à resistência a doenças (SANDHU *et al.*, 2005). Além dos loci *Rps*, genes de resistência à bactérias, como o gene *Rpg1* (ASHFIELD *et al.*, 1998), de resistência a vírus, como o gene *Rsv1* (YU *et al.*, 1994), agentes patogênicos e QTLs de resistência a insetos (RECTOR *et al.*, 1999), além de outros, foram previamente mapeados no cromossomo 13 da soja. Adicionalmente aos genes já descritos e identificados molecularmente, esta região também compreende genes relacionados aos mecanismos de resistência os quais ainda possuem função ou especificidade indefinida (JEONG *et al.*, 2001).

O estudo molecular detalhado destes *loci*, como suas reais posições físicas no genoma da soja, suas rotas metabólicas e mecanismos responsáveis pelas respostas de defesa ao patógeno *P. sojae*, bem como a identificação de marcadores moleculares eficientes na seleção dos genótipos resistentes, constitui uma ferramenta útil que se torna a cada dia, mais necessária nos programas de melhoramento.

CONCLUSÕES

Neste trabalho o método de inoculação utilizando palitos colonizados com o patógeno mostrou-se eficiente para ambas as populações. Oito marcadores moleculares foram validados na progênie F_2 da população BW1, enquanto que apenas dois marcadores foram validados na progênie F_2 da população CP8. Para o cruzamento entre Williams 82 e BRS 133, que originou a população segregante BW1, a eficiência de seleção dos marcadores validados é de 97,3% para BARC-084081-18547, 96,7% para Satt641, 95,7% para Satt009, 93,8% para BARC-031833-07221, Satt159, Sat_186 e Satt152, e 92,5% para Satt530. Para o cruzamento entre PI 399073 e MG/BR 46 (Conquista), que originou a população segregante CP8, a eficiência de seleção dos marcadores validados é de 91,5% para BARC-010279-00575 e de 86,9% para BARC-010501-00678.

Os resultados obtidos para as análises de validação envolvendo os retrocruzamentos do programa de melhoramento para o gene *Rps1k*, nos permite concluir que, dos três marcadores utilizados, apenas dois foram eficientes para o uso em seleção assistida nas populações estudadas. O SNP BARC-084081-18547 foi validado para os cruzamentos entre a fonte de resistência Williams 82, e os seguintes parentais suscetíveis: BRS 232, BRS 239, BRS Invernada, Embrapa 48, BRS 133, BRS 268, BRS 230, BRS/GO Luziânia, BRS/MG 68 (Vencedora) e MG/BR 46 (Conquista). O microssatélite Satt641 foi validado para os cruzamentos entre a fonte de resistência Williams 82, e os seguintes parentais suscetíveis: BRS 232, BRS 239, BRS Invernada, Embrapa 48, BRS 133, BRS 268, BRI 04-02935, BRS 230, BRS/GO Luziânia, BRS/MG 68 (Vencedora) e MG/BR 46 (Conquista).

Em contrapartida, a partir das análises de validação envolvendo os retrocruzamentos do programa de melhoramento para o gene *Rps8*, conclui-se que os três marcadores utilizados foram eficientes para o uso em seleção assistida, porém para um número reduzido de cruzamentos em comparação com os resultados obtidos para *Rps1k*. O microssatélite Sat_154 foi validado para os cruzamentos entre a fonte de resistência PI 399073 e os parentais suscetíveis BRS 239, BRS Favorita e BRS ValiosaRR. O SNP BARC-010279-00575 foi validado para os cruzamentos entre a fonte de resistência PI 399073 e os parentais suscetíveis BRS 239, Emgopa 302RR, BRS Favorita e BRS ValiosaRR. O SNP BARC-010501-00678 foi validado para os cruzamentos entre a fonte de resistência

PI 399073 e os parentais suscetíveis BRS 239, BRS Favorita, BRS 282 e BRS ValiosaRR.

Os marcadores microssatélites e SNPs validados nos cromossomos 3 e 13 da soja, poderão auxiliar outros trabalhos de melhoramento, servindo como material para o estudo de Seleção Assistida por Marcadores Moleculares (SAM). Assim, para a realização de trabalhos posteriores, faz-se necessário uma maior saturação da região cromossômica na qual, ambos os genes de resistência à podridão radicular de fitóftora foram identificados, principalmente em relação ao gene *Rps8* que apresentou menor saturação e maiores distâncias genéticas em relação aos marcadores moleculares. Deste modo, visando, entre outras características, as novas tecnologias de genotipagem, sugere-se a utilização de marcadores SNPs, que se encontram em grande abundância nas regiões genômicas nas quais os genes *Rps1k* e *Rps8* foram mapeados.

REFERÊNCIAS

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

AKKAYA, M.S.; BHAGWAT, A.A.; CREGAN, P.B. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. **Genetics**, n. 132, p. 1131-1139, 1992.

ALFENAS, A.C.; FERREIRA, A.F. Inoculação de fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. (Ed.) **Métodos em fitopatologia**. UFV, Viçosa, DF, p. 117-138, 2007.

ALMEIDA, A.M.R.; FERREIRA, L.P.; YORINORI, J.T.; SILVA, J.F.V.; HENNING, A.A.; GODOY, C.V.; COSTAMILAN, L.M.; MEYER, M.C. Doenças da soja (*Glycine max*). In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.) **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. Agronômica Ceres. São Paulo, SP, 4ª ed., v. 2, p. 569-588, 2005.

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

ANDERSON, T.R.; BUZZELL, R.I. Inheritance and linkage of the *Rps7* gene for resistance to *Phytophthora* rot of soybean. **Plant Disease**, n. 76, p. 958-959, 1992.

ASHFIELD, T.; DANZER, J. R.; HELD, D., CLAYTON, K.; KEIM, P.; SAGHAI MAROOF, M. A.; WEBB, D. M.; INNES, R. W. *Rpg1*, a soybean gene effective against races of bacterial blight, maps to a cluster of previously identified disease resistance genes. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 96, p. 1013-1021. 1998.

ATHOW, K.L.; LAVIOLETTE, F.A. *Rps6*, a major gene for resistance to *Phytophthora megasperma* sp. *glycinea* in soybean. **Phytopathology**, n. 72, p. 1564-1567, 1982.

ATHOW, K.L.; LAVIOLETTE, F.A.; MUELLER, E.H.; WILCOX, J.R. A new major gene for resistance to *Phytophthora megasperma* var. *sojae* in soybean. **Phytopathology**, n. 70, p. 977–980, 1980.

BERNARD, R.L.; SMITH, P.E.; KAUFMANN, M.J.; SCHMITTHENNER, A.F. Inheritance of resistance to *Phytophthora* root and stem rot in soybean. **Journal of Agronomy**, n. 49, p. 391, 1957.

BHATTACHARYYA, M.K.; NARAYANAN, N.N.; GAO, H.; SANTRA, D.K.; SALIMATH, S.S.; KASUGA, T.; LIU, Y.; ESPINOSA, B.; ELLISON, L.; MAREK, L.; SHOEMAKER, R.; GIJZEN, M.; BUZZELL, R.I. Identification of a large cluster of coiled coil nucleotide binding site-leucine rich repeat-type genes from the *Rps1* region containing *Phytophthora* resistance genes in soybean. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 111, p. 75- 86, 2005.

BURNHAM, K.D.; DORRANCE, A.E.; FRANCIS, D.M.; FIORITTO, R.J.; ST. MARTINS, S.K. *Rps8*, a new *locus* in soybean for resistance to *Phytophthora sojae*. **Crop Science**, n. 43, p. 101-105, 2003.

BUZZELL, R.I.; ANDERSON, T.R. Another major gene for resistance to *Phytophthora megasperma* var. *sojae* in soybeans. **Soybean Genetic News**, n. 8, p. 30–33, 1981.

CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYAMA, .S. Tipos de marcadores moleculares. In: BOREM, A.; CAIXETA, E.T. (Ed.) **Marcadores Moleculares**. UFV, Viçosa, MG, p. 9-78, 2006.

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

COLLINS, F.S.; BROOKS, L.D.; CHARKRAVARTI, A. A DNA polymorphisms discovery resource for are search on human genetic variation. **Genome Research Journal**, n. 8, p. 1229–1231, 1998.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Acompanhamento da safra brasileira – Levantamento da Safra 2012/2013. Disponível em: www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_01_09_17_44_20_boletim_graos_janeiro_2013.pdf. Consultado em: 29 de Janeiro de 2013.

COSTAMILAN, L. M.; BERTAGNOLLI, P. F.; MORAES, R. M. A. de. **Podridão radicular de fitóftora em soja**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2007. 23 p. html. (Embrapa Trigo. Documentos Online, 79). Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do79.htm

CREGAN, P.B.; JARVIK, T.; BUSH, A.L.; SHOEMAKER, R.C.; LARK, K.G.; KAHLER, K.G.; KAYA, N.; VAN TOAI, T.T.; LOHNES, D.G.; CHUNG, J.; SPECHT, J.E. An integrated genetic linkage map of the soybean genome. **Crop Science**, n. 39, p. 1464–1490, 1999.

DEMIRBAS, A.; RECTOR, B.G.; LOHNES, D.G.; FIORITTO, R.J.; GRAEF, G.L.; CREGAN, P.B.; SHOEMAKER, R.C.; SPECHT, J.E. Simple Sequence Repeat Markers Linked to the Soybean *Rps* Genes for Phytophthora Resistance. **Crop Science**. v. 41, p.1220–1227, 2001.

DORRANCE, S. E.; JIA, H.; ABNEY, T. S. Evaluation of soybean differentials for their interaction with *Phytophthora sojae*. **Plant Health Progress**. doi:10.1094/PHP 2004. 0309-01-RS. 2004. Disponível em: <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/research/2004/psojae/>. Consultado em: 10 agosto 2011.

ERWIN, D.C.; RIBIERO, O.K. **Phytophthora Diseases Worldwide**. St. Paul, MN. APS Press. 1996.

FERREIRA, D.F. **Estatística Básica**. Lavras: Editora UFLA, 664p. 2005.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA, CENARGEM, 1998.

FREITAS, L.G.; NEVES, W.S.; OLIVEIRA, R.D.L. Métodos em nematologia vegetal In: ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. (Ed.) **Métodos em fitopatologia**. UFV, Viçosa, DF, p. 253-292, 2007.

GAO, H.; BHATTACHARYYA, M.K. The soybean-*Phytophthora* resistance *locus Rps1-k* encompasses coiled coil-nucleotide binding-leucine rich repeat-like genes and repetitive sequences. **BioMed Central Plant Biology**. v. 8, p. 1471-2229, 2008.

GAO, H.; NARAYANAN, N.N.; ELLISON, L.; BHATTACHARYYA, M.K. Two Classes of Highly Similar Coiled Coil-Nucleotide Binding-Leucine Rich Repeat Genes Isolated from the *Rps1-k* Locus Encode *Phytophthora* Resistance in Soybean. **MPMI**. v. 18, n. 10, p. 1035–1045, 2005.

GARCIA, A.; CALVO, E. S.; KIIHL, R. A. S.; HARADA, A.; HIROMOTO, D. M.; VIEIRA, L. G. E. Molecular mapping of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) resistance genes: discovery of a novel locus and alleles. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 117, n. 4, p. 545-553, August. 2008.

GARDNER, M.E.; HYMOWITZ, T.; XU, S.J.; HARTMAN, G.L. Physical map location of the *Rps1-k* allele in soybean. **Crop Science**, n. 41, p. 1435-1438, 2001.

GORDON, S.G.; ST. MARTIN, S.K.; DORRANCE, A.E. *Rps8* maps to a resistance gene rich region on soybean molecular linkage group F. **Crop Science**, n. 46, p. 168-173, 2006.

GREWAL, T.S.; ROSSNAGEL, B.G.; SCOLES, G.J. Validation of molecular markers for covered smut resistance and marker-assisted introgression of loose and covered smut resistance into hulless barley. **Molecular Breeding**, n. 21, p. 37–48, 2008.

HYTEN, D.L.; CANNON, S.B.; SONG, Q.; WEEKS, N.; FICKUS, E.W.; SHOEMAKER, R.C.; SPECHT, J.E.; FARMER, A.D.; MAY, G.D.; CREGAN, P.B.

High-throughput SNP discovery through deep resequencing of a reduced representation library to anchor and orient scaffolds in the soybean whole genome sequence. **BMC Genomics**. v. 11, n. 38, 8p. 2010.

JEONG, S. C.; HAYES, A. J.; BIYASHEV, R. M.; SAGHAI-MAROOF, M. A. Diversity and evolution of a non-TIR-NBS sequence family that clusters to a chromosomal hotspot for disease resistance genes in soybean. **Theoretical and Applied Genetics**. n. 103, p. 406-414. 2001.

KAUFMANN, M. J.; GERDEMANN, J. W. Root and stem rot of soybean caused by *Phytophthora sojae* n. sp. **Phytopathology**, v. 48, p. 201-208, 1958.

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

KILEN, T.C.; HARTWIG, E.E.; KEELING, B.L. Inheritance of a second major gene for resistance to *Phytophthora* root rot in soybeans. **Crop Science**, n. 14, p. 260–262, 1974.

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

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

LITT, M.; LUTTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, n. 44, p. 397-401, 1989.

MISSÃO, M.R. Soja: origem, classificação, utilização e uma visão abrangente do mercado. **Maringá Management: Revista de Ciências Empresariais**. v. 3, n. 1, p. 7-15, jan./jun. 2006.

MUELLER, E.H.; ATHOW, K.L.; LAVIOLETTE, F.A. Inheritance of resistance to four physiologic races of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. **Phytopathology**, n. 68, p. 1318–1322, 1978.

RECTOR, B.G.; ALL, J. N.; PARROTT, W. A.; BOERMA, H. R.. Quantitative trait loci for antixenosis resistance to corn earworm in soybean. **Crop Science**. n. 39, p. 531–538. 1999.

SANDHU, D.; SCHALLOCK, K.G.; RIVERA-VELEZ, N.; LUNDEEN, P.; CIANZIO, S.; BHATTACHARYYA, M.K. Soybean *Phytophthora* Resistance Gene Rps8 Maps Closely to the Rps3 Region. **Journal of Heredity**. v. 96, n. 5, p. 536–541, 2005.

SCHMITTHENNER, A. F. *Phytophthora rot*. In: HARTMAN, G. L.; SINCLAIR, J. B.; RUPE, J. C. (Ed.). **Compendium of soybean diseases**. 4. ed. Saint Paul: APS Press, p. 39-42, 1999.

SCHMUTZ, J.; CANNON, S. B.; SCHLUETER, J.; MA, J.; MITROS, T.; NELSON, W.; HYTEN, D. L.; SONG, Q.; THELEN, J. J.; CHENG, J.; XU, D.; HELLSTEN, U.; MAY, G. D.; YU, Y.; SAKURAI, T.; UMEZAWA, T.; BHATTACHARYYA, M. K.; SANDHU, D.; VALLIYODAN, B.; LINDQUIST, E.; PETO, M.; GRANT, D.; SHU, S.; GOODSTEIN, D.; BARRY, K.; FUTRELL-GRIGGS, M.; ABERNATHY, B.; DU, J.; TIAN, Z.; ZHU, L.; GILL, N.; JOSHI, T.; LIBAULT, M.; SETHURAMAN, A.; ZHANG, X.; SHINOZAKI, K.; NGUYEN, H. T.; WING, R. A.; CREGAN, P.; SPECHT, J.; GRIMWOOD, J.; ROKHSAR, D.; STACEY, G.; SHOEMAKER, R. C.; JACKSON, S. A. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. **Nature**. v. 463. p. 178-183. 2010.

SISTEMAS DE PRODUÇÃO13. Tecnologias de Produção de Soja – Região Central do Brasil 2009 e 2010. Embrapa Soja. Londrina, PR, 2008.

SHEEBA, N. K.; VIRAKTAMATH, B. C.; SIVARAMAKRISHNAN, S.; GANGASHETTI, M. G.; PAWAN KHERA; SUNDARAM, R. M. Validation of molecular markers linked to fertility restorer gene(s) for WA-CMS lines of rice. **Euphytica**. v. 167, p. 217-227. 2009.

SONG, Q.; JIA, G.; ZHU, Y.; GRANT, D.; NELSON, R.T.; HWANG, E.-Y.; HYTEN, D.L.; CREGAN P.B. Abundance of SSR Motifs and Development of Candidate Polymorphic SSR Markers (BARCSOYSSR_1.0) in Soybean. **Crop Science**. v. 50, p. 1950-1960, 2010.

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**, n. 109, p. 122-128, 2004.

SONKA, S.T.; BENDER, K.L.; FISHER, D.K. Economics and marketing. p. 919-948. In BOERMA, H.R.; SPECHT, J.E. (ed.) Soybeans: **Improvement, production and uses**. 3rd edition. ASA, CSSA, and SSSA. Madison, WI. 2004.

SUN, S.; WU, X. L.; ZHAO, J. M.; WANG, Y. C.; TANG, Q. H.; YU, D. Y.; GAI, J. Y.; XING, H. Characterization and mapping of *RpsYu25*, a novel resistance gene to *Phytophthora sojae*. **Plant Breeding**. n. 130, p. 139-143. 2011.

TYLER, B.M. *Phytophthora sojae*: root rot pathogen of soybean and model oomycete. Pathogen profile. **Molecular Plant Pathology**. v. 8, n. 1, p. 1–8, 2007.

YU, Y.G.; SAGHAI-MAROOF, M. A.; BUSS, G. R.; MAUGHAN, P. J.; TOLIN, S. A. RFLP and microsatellite mapping of a gene for soybean mosaic virus resistance. **Phytopathology**. n. 84, p. 60–64. 1994.

ZHANG, Z.; FRIESEN, T. L.; SIMONS, K. J.; XU, S. S.; FARIS, J. D. Development, identification, and validation of markers for marker-assisted selection against the *Stagonospora nodorum* toxin sensitivity genes *Tsn1* and *Snn2* in wheat. **Molecular Breeding**. v. 23, p. 35-49. 2009.

ANEXOS

ANEXO A

. Marcadores microssatélites selecionados para análise molecular na geração F₂ da população BW1.

Marcador	Tipo	Sequência do primer Forward	Sequência do primer Reverse	GL ^a	Motif	Íncio	Fim	TF ^b	Genótipo Utilizado
Sct_195	SSR	gcgctatgcaag gtctaactaca	gcgaaaccgct acacagtctctg	N	(GA)11	324 506	324527	154	Willia ms82
Sat_379	SSR	gcgtttggtctatc ttcttta	gcggccctaagc acaactgaacct at	N	(TA)10	462 846	462865	246	Willia ms82
Satt631	SSR	gtagatccagg agcttgagtcag	gcgcatctcactg cacttgat	N	(AAT)1 6	291 645 0	291649 7	152	Willia ms82
Satt159	SSR	gaaatgccaga aaaacctaataa c	tgaagcaacaa aatagaggaat agag	N	(AAT)1 4	317 012 1	317016 2	285	Willia ms82
Satt152	SSR	gcgctattcctatc acaacaca	tagggtgtcact gtttgttctaa	N	(ATA)2 1	333 862 0	333868 2	251	Willia ms82
Sat_186	SSR	gggaagtataag cagat	gggaatccattc ctgatgagt	N	(AT)19 (AG)17	346 543 6	346550 7	289	Willia ms82
Satt009	SSR	ccaactgaaatt actagagaaa	cttactagcgtatt aacctt	N	(AAAT) 3 (AAT)1 3	391 026 0	391030 7	162	Willia ms82
Satt641	SSR	gcggaacatcac ggttata	gcgggaggctct gtctcttaga	N	(AAT)4 9 (ATA)1 7	455 464 5	455470 8	338	Willia ms82
Satt530	SSR	catgcatattgact tcattatt	ccaagcgggtg aagagggtttt	N	(ATT)1 2 (TTTA) 3	- -	- -	220	Willia ms82
Satt675	SSR	gcgctattccgtc ctattatcatttcgt c	gcgctaacacg tatttattattggc aatt	N	(TTA)1 4 (AT)19 (ATAC) 3	692 317 4	692322 4	143	Willia ms82
Sat_084	SSR	aaaaaagtatcc atgaaacaa	ttgggaccttaga agcta	N	(AT)19 (ATAC) 3	864 021 9	864026 6	158	Willia ms82
Satt683	SSR	gcggtgtgggtc ctcaattaata	gcggtttcccta aactaacctaac	N	(ATT)8	905 819 0	905821 3	256	Willia ms82
Satt584	SSR	gcgcccaacct attaaggtatgaa ca	gcggtcagaa gatgctacaaa ctct	N	(TAT)2 4	975 811 0	975818 1	196	Willia ms82
Satt624	SSR	gcgatggctgtg ggaacactaat	gcggacgtggg accaacacacta a	N	(ATA)2 4gtaata ataattg (TTA)5	206104 16	206104 16	20600416	Willia ms82

^a= GL – Grupo de Ligação

^b= TF – Tamanho aproximado do fragmento.

ANEXO B.

Marcadores microssatélites selecionados para análise molecular na geração F₂ da população CP8.

Marcador	Tipo	Sequência do primer Forward	Sequência do primer Reverse	GL ^a	Motif	Ínicio	Fim	TF ^b	Genótipo Utilizado
Satt516	SSR	gcgtagcacta ttttttacaaga	gcgccgtcctctt actttat	F	(TAA) 19	209 337 87	209338 43	253	Williams8 2
Sat_309	SSR	gcgaacggata tatacccataaa ttttcatg	gcgtcatccaat aacaattgttaaag tca	F	(TA)3 1	221 281 61	221282 22	300	Williams8 2
Satt425	SSR	gcgcaattaag atccactaagtg att	gcggctttcactctt ctttattatt	F	(ATT) 12	228 740 22	228740 57	144	Williams8 2
Satt374	SSR	aacattgccga aaaaataact atgatg	gcgtatcaattaag atccattaagtg	F	(ATT) 12	-	-	202	Williams8 2
Satt595	SSR	gatgggaagca aacaagaag	aacccctccct aaat	F	(AAC) 5 (AAT) 9	231 150 23	231150 64	215	Williams8 2
Sat_133	SSR	gcgcacatcta actcaaataatt gataaag	gcgtcaattggatt tgatgaaattttaa t	F	(AT)2 7	234 626 23	234626 76	256	Williams8 2
Satt663	SSR	gcgtcatgcaat gttgataat	gcgactgcagata actgactggtagt	F	(TTA) 27ctat tactatt ac (TAT) 4	244 513 47	244514 52	252	Williams8 2
Sat_103	SSR	actgggaatcc atttctgtta	aaagaacttcaat caaatgtgtg	F	(AT)3 0	254 783 07	254783 66	216	Williams8 2
Sat_297	SSR	gcgtgaaaata aatacatagac atccaccat	gcgtttaacacgc atcaacactcttc	F	(AT)2 3	257 891 42	257891 87	170	Williams8 2
Sat_229	SSR	gcgtgtgctcctt cacatctgaga gaaaga	gcgagggttaga aaaagattcacca aatat	F	(AT)2 1	-	-	260	Williams8 2
Sat_154	SSR	gcgtcagggtc aagtcataaac a	gcggacgcatttcc tattgatcaag	F	(TA)2 5	273 124 36	273124 85	137	Williams8 2
Satt114	SSR	gggttatcctccc caata	atatgggatgataa ggtgaaa	F	(AAT) 17	277 187 78	277188 28	108	Williams8 2
Satt334	SSR	gcgttaagaatg catttatgttagt c	gcgagttttggtg gattgagtg	F	(ATA) 10 (TAA) 6	284 159 74	284160 21	204	Williams8 2

^a= GL – Grupo de Ligação

^b= TF – Tamanho aproximado do fragmento.

ANEXO C.

Marcadores SNPs selecionados para análise molecular na geração F₂ da população BW1.

Marcador	Tipo	Sequência do primer <i>Forward</i>	Sequência do primer <i>Reverse</i>	GL ^a	SNP	Posição	TF ^b	Tipo de SNP	Genótipo Utilizado
BARC-044643-08745	SNP	catgctacatagttt tacaccttg	acctgaccgtga aacagttac	N	C/T	460 307	354	Transição	Williams8 2
BARC-042969-08479	SNP	gccacatgcaagt atccataata	gaaaacgacaag gtggaagag	N	C/T	199 983 2	587	Transição	Williams8 2
BARC-027728-06650	SNP	acctaattccactg tgacagaccta	tgaagatgatgag gattcgctacca	N	C/G	274 139 4	658	Transversão	Williams8 2
BARC-041781-08094	SNP	cgtattgttagtag catgacatcg	aaactttgttcca attaatacatg	N	A/G	293 363 9	252	Transição	Williams8 2
BARC-028645-05979	SNP	aatcccaaattccc aatcgaagga	cctccattctgccc tatccagg	N	C/T	299 378 4	516	Transição	Williams8 2
BARC-031833-07221	SNP	gccacaacacac agaggattcttc	gattgcacttacc gcaccactac	N	C/T	329 919 2	353	Transição	Williams8 2
BARC-028619-05977	SNP	cccaacacacag aggattcttctt	aatctgggcatg actgaactaat	N	A/G	329 919 2	550	Transição	Williams8 2
BARC-064081-18547	SNP	cgatgtttatgtgca cgatggt	catgtctaaagcc atgcaacattga	N	C/T	-	327	Transição	Williams8 2
BARC-052623-11536	SNP	ccttctatgaagat ccaaaaggagctt	gttagccagacgc tcaaattcg	N	A/G	-	454	Transição	Williams8 2

^a= GL – Grupo de Ligação

^b= TF – Tamanho aproximado do fragmento.

ANEXO D

Marcadores SNPs selecionados para análise molecular na geração F₂ da população CP8.

Marcador	Tipo	Sequência do primer Forward	Sequência do primer Reverse	GL ^a	SNP	Posição	TF ^b	Tipo de SNP	Genótipo Utilizado
BARC-044797-08809	SNP	cgaaccctttga agatgatgttg	gaaagagaaggc taacagctagc	F	A/G	23987 522	363	Transição	Williams 82
BARC-045205-08910	SNP	ggttggaatcagt ctagaaacaggtt	gcaccaggcgag tagggagg	F	C/T	24710 778	711	Transição	Williams 82
BARC-017133-02218	SNP	ccgctcgcaaata accttaatg	gccaaccccttga aattcttacc	F	C/G	-	-	Transversão	Williams 82
BARC-010279-00575	SNP	gccaacgtcttcg atccattctc	gcggcttctaacc tcttcc	F	A/G	-	-	Transição	Williams 82
BARC-031461-07098	SNP	tgacatcaaaca caacctcccaaa	gtgtggttcagtag gaaggtagt	F	C/T	28187 997	616	Transição	Williams 82
BARC-022043-04271	SNP	agctagacaact cagtcgcatatt	ccacttggttcaca gaggaagat	F	C/T	28329 680	662	Transição	Williams 82
BARC-029823-06424	SNP	actgacctcatac atgtccccttc	agtggaaccgac ggtggc	F	C/G	-	-	Transversão	Williams 82
BARC-017917-02451	SNP	gcgaacctatagg caacagcaaatac at	gcgggaagacaa caaggaagaag tg	F	G/T	30457 450	405	Transversão	Williams 82
BARC-030853-06954	SNP	accaactgaattg gacctttggt	aacatcctaatac aaaagggaggt	F	A/G	30581 811	616	Transição	Williams 82
BARC-018521-02929	SNP	tcttgacctatgctc actgtatgc	ggcttgcggacttg gatgtatc	F	A/T	30619 983	646	Transversão	Williams 82
BARC-013633-01184	SNP	ccccacgagac gagaagagaca c	ccgtccagcagg caagcgatgtg	F	C/T	30771 524	593	Transição	Williams 82
BARC-015903-02010	SNP	gggctcctcaaa actcttctaatac	ggcaacggcaaa aaggttctt	F	A/-	-	-	ID	Williams 82
BARC-010501-00678	SNP	gcgaggttatggt ctactgag	gccccattccatcc cattgtaccac	F	C/T	-	-	Transição	Williams 82
BARC-015435-01966	SNP	ggctccaccacc acaaccacaag at	ggcgttccttcttc gttctcttc	F	A/C	31395 148	218	Transversão	Williams 82
BARC-050657-09804	SNP	ggttcaatccagg gtcatttcaaaa	tgagatgaatgcg agaaaaggatag g	F	A/G	26009 841	513	Transição	Williams 82
BARC-042681-08346	SNP	catttgatagtttct aacattttcttctct tcaaattttt	gaaagctggaatt gaattggcagaa	F	A/G	27315 939	123 9	Transição	Williams 82

^a= GL – Grupo de Ligação

^b= TF – Tamanho aproximado do fragmento.

ANEXO E

Protocolos

EXTRAÇÃO DE DNA

Procedimento descrito por KEIM *et al.* (1988) com algumas modificações.

Aproximadamente, 1g de tecido foliar congelado foi pulverizado, utilizando-se almofariz, e então transferido para microtubos com capacidade para 1,5 mL. Em cada microtubo foi adicionado tampão de extração na proporção de quatro vezes o volume da amostra [100 mM Tris, pH 8,0, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 1% (m/v) brometo de trimetil N-cetil amônio (CTAB), 0,1% (v/v) 2-mercaptoetanol]. A suspensão foi incubada a 65° C por 60 minutos, com agitação manual a cada 15 minutos. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 6000 rpm por 10 minutos, com transferência da fase aquosa para outro microtubo. Foi adicionado igual volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), o qual foi misturado à solução por inversões e então centrifugado a 6000 rpm por 15 minutos. Estes últimos passos foram repetidos. O DNA foi precipitado com a adição de isopropanol (2/3 do volume) e, posteriormente, a solução foi centrifugada a 14000 rpm por 10 minutos, descartando-se o sobrenadante e adicionando-se 0,5 mL de etanol 70%. Uma nova centrifugação foi realizada e o sobrenadante foi descartado, para diluição do DNA, precipitando em 0,4 mL de 10 mM tris/1 mM EDTA, pH 8,0. Para finalizar, foi adicionada a enzima RNase A na proporção de 40 µg/mL, com incubação a 37° C, por pelo menos 30 minutos.

CONDIÇÕES PARA AMPLIFICAÇÃO DE MICROSSATÉLITES

Componentes do Mix	Volume para 1 reação	Final
Água MilliQ®	3,00 µL	-
Tampão 10X	1,00 µL	1X
MgCl ₂ (50 mM)	0,30 µL	1,5 mM
dNTP's (10 mM)	0,52 µL	0,52 mM
Primer Forward (2 mM)	1,00 µL	0,2 mM
Primer Reverse (2 mM)	1,00 µL	0,2 mM
Taq (5 U/mL)	0,20 µL	1U
DNA (20 ng/µL)	3,00 µL	60 ng
Volume total da reação	10,00 µL	-

Montar o *mix* multiplicando o volume de cada componente pelo número total de reações mais uma, o volume final de cada reação é de 10 µL. Quando o experimento envolve a análise de vários indivíduos com o mesmo *primer*, o *primer* é adicionado no *mix*. Se por outro lado a análise envolve poucos indivíduos com muitos *primers*, o DNA é incluído no *mix* – mas normalmente o DNA é adicionado separadamente. O componente que não for adicionado ao *mix* será adicionado separadamente em cada tubo antes da adição do *mix*. Após adição do *mix* os tubos são fechados e levados para o termociclador.

Condições de termocilagem:

Holding Stage: 94°C - 1 minutos

	94°C - 40 segundos	} 35 ciclos
Amplificação:	55°C - 40 segundos	
	72°C - 40 segundos	

72°C - 1 minutos

4°C - *forever*

CONDIÇÕES PARA AMPLIFICAÇÃO DE SNPs

Componentes do Mix	Volume para 1 reação
TaqMan® Universal PCR Master Mix (2 X)	6.25 µL
SNP Assay Mix (20 X)	1.00 µL
Água MilliQ®	4.25 µL
DNA (20 ng/µL)	1.00 µL
Volume total da reação	12.50 µL

Montar o *mix* multiplicando o volume de cada componente pelo número total de reações mais uma, o volume final de cada reação é de 12.5 µL. Quando o experimento envolve a análise de vários indivíduos com o mesmo *SNP Assay Mix*, o *SNP Assay Mix* é adicionado no *mix*. Se por outro lado a análise envolve poucos indivíduos com muitos *SNP Assay Mix*, o DNA é incluído no *mix* – mas normalmente o DNA é adicionado separadamente. O componente que não for adicionado ao *mix* será adicionado separadamente em cada tubo antes da adição do *mix*. Após adição do *mix* os tubos são fechados e levados para o termociclador.

Condições de termociclagem:

Pré PCR Read: 60°C - 30 segundos

Holding Stage: 95°C - 10 minutos

Amplificação: 95°C - 15 segundos

60°C - 1 minuto

} **40 ciclos**

Post PCR Read: 60°C – 30 segundos

GEL DE POLIACRILAMIDA 10%

Adicionar os componentes, temed e persulfato de amônia somente no final da preparação, aplicando imediatamente nas placas, que já devem estar devidamente limpas e montadas.

Gel-Separador

Componentes	Volume final (1 placa)
Acrilamida-Bis (29:1)	8,9mL
Água destilada	3,3mL
1,5 M Tris-HCl (pH8,8)	4,2mL
Persulfato de Amônia 10%	63,8µl
Temed	15,8µl
Total	16,4mL

Gel-Concentrador

Componentes	Volume final (1 placa)
Acrilamida-Bis (29:1)	8,9mL
Água destilada	3,3mL
1,5 M Tris-HCl (pH6,8)	4,2mL
Persulfato de Amônia 10%	63,8µl
Temed	15,8µl
Total	16,4mL

Obs.: Usar luvas na preparação do gel

GEL DE AGAROSE/SYNERGEL 3%

Cuba grande (*Life Technologies*): capacidade para 2 pentes de 30, 21, 20 ou 15 posições.

- Synergel.....2,88 g
- Agarose.....1,75 g
- TBE 1X250 mL

Fundir a Agarose + Synergel no microondas. Esfriar até que suporte a temperatura na parte interna do antebraço.

Adicionar Brometo de Etídio (10mg/mL).....3,5 µL.

GEL DE AGAROSE 1%

Cuba grande (*Life Technologies*): capacidade para 4 pentes de 52 posições.

- Agarose.....3,0 g
- SB 1X300 mL

Fundir a Agarose no microondas. Esfriar até que suporte a temperatura na parte interna do antebraço.

Adicionar Brometo de Etídio (10mg/mL).....3,5 µL

ANEXO F
Soluções

Tampão de Extração

Componentes	Concentração final	Volume Final (10ml)
CTAB 5%	1%	2,0 mL
NaCl 5M	1,4 M	2,8 mL
Tris-HCl 1M pH 8,0	100 mM	1,0 mL
EDTA 0,5M	20 mM	0,4 mL
Mercaptoetanol	0,1%	0,01 mL
Água destilada		3,7 mL

Obs: o mercaptoetanol deve ser adicionado somente no momento do uso do tampão

TBE (10X)

- 108g Tris base
- 55g ácido bórico
- 40mL EDTA (0,5 M pH 8,0)
- Completar com água destilada para o volume final de 1L.

Tampão de Amostra – 40 % sacarose

- 4g sacarose
- 0,025g de azul de bromofenol
- Solubilizar a sacarose em 10mL de água destilada. Acrescentar o azul de bromofenol e agitar. Manter em geladeira.

TE pH 8,0

- 10 mM Tris-HCl pH 8,0 (500 µL Tris-HCl 1M pH 8,0)
- 1 mM EDTA pH 8,0 (100 µL EDTA 0,5M pH 8,0)
- Completar com água MilliQ® para o volume final de 50 mL.

Tampão para RNase A

- 10 mM Tris-HCl pH 7,5
- 15 mM NaCl.

Tampão de Reação 10X

- 100mM Tris-HCl pH 8,3 (100µl tris-HCl 1M pH 8,3)
- 500mM Cloreto de Potássio (500µl KCl 1M)
- 400µl água MilliQ®.

Cloreto de Magnésio 50mM

- 50µl MgCl₂ 1M
- 950µl água MilliQ®.

dNTP's 2,5mM

- 25µl de cada nucleotídeo
- 900µl de água MilliQ®.

Diluição de primers SSR

- Os primers fornecidos na concentração de 20µM, são diluídos para a concentração de 2µM.

Diluir 20 µL de *primer* em 180 µL de água MilliQ®.

- Os primers fornecidos na concentração de 100µM, são diluídos para a concentração de 2µM.

Diluir 4 µL de *primer* em 196 µL de água MilliQ®.

Solução de acrilamida 40% (29:1)

Solução 40% - 40g de acrilamida + bis-acrilamida em 100mL de água

Em 40g, adicionar 29 parte de acrilamida e 1 parte de bis-acrilamida:

- 36,67g de acrilamida
- 1,33g de bis-acrilamida
- Em um becker, pesar a acrilamida e a bis-acrilamida, adicionar 50 mL de água destilada, colocar no agitador com aquecimento para dissolver. Em um balão volumétrico, completar com o volume para 100mL com água destilada.

Solução de persulfato de amônia 10%

- 0,15g de persulfato de amônia
- 1,5mL de água destilada.

Tampão- 1,5M Tris-HCl pH8,8

- diluir 189,65 de Tris em 1000mL de água destilada

Obs: Ajustar o pH.

Tampão- 0,5M Tris-HCl pH6,8

- diluir 30,27 de Tris em 500mL de água destilada

Obs: Ajustar o pH.

Tampão 10x de eletroforese-Tris-glicina

- Tris 30,9g
- Glicina 144,1g
- Dissolver em 800mL de água e completar para 1L.

Solução de Brometo de Etídio 10mg/mL (Estoque)

- 0,1g de Brometo de Etídio
- 10ml de água destilada
- Armazenar em local escuro e manipular com luvas.

Solução de Brometo de Etídio para corar gel

- 40uL de Brometo de Etídio 10mg/mL
- 800mL de água
- Manter o gel mergulhado na solução de brometo de etídio sob agitação lenta por 20 minutos, retirar o gel e transferir para recipiente contendo água e manter sob agitação lenta por 5 minutos, para descorar, retirando o excesso de brometo.