



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ALEXANDRE GARCIA

**“IDENTIFICAÇÃO E MAPEAMENTO GENÉTICO DE GENES
DE RESISTÊNCIA A FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA”**

Londrina
2007

ALEXANDRE GARCIA

**“IDENTIFICAÇÃO E MAPEAMENTO GENÉTICO DE GENES
DE RESISTÊNCIA A FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA”**

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

Orientador: Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira

Londrina
2007

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

A596c Garcia, Alexandre.

Identificação e mapeamento genético de genes de resistência à ferrugem asiática da soja / Alexandre Garcia. – Londrina, 2007.
87 f.: il.

Orientador: Luiz Gonzaga Esteves Vieira.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2007.

Inclui bibliografia.

1. Soja – Doenças e pragas – Controle – Teses. 2. Plantas – Teses. 3. Genética vegetal – Teses. I. Vieira, Luiz Gonzaga Esteves. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Título.

CDU 581.169

ALEXANDRE GARCIA

**“IDENTIFICAÇÃO E MAPEAMENTO GENÉTICO DE GENES DE
RESISTÊNCIA A FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA”**

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

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. David Pot
CIRAD – França

Profa. Dra. Luzia Doretto Paccola-Meirelles
UEL – Londrina - PR

Prof. Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira
IAPAR – PR

Londrina, 14 de dezembro de 2007.

DEDICO

Ao meu avô Alcindo Malachias
(in memorium)

OFEREÇO

A TMG . Tropical
Melhoramento e Genética Ltda.

AGRADECIMENTOS

A minha família, pois, acima de tudo, foram, são e serão as pessoas mais importantes na minha vida.

A Deus, pela benção.

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

A Universidade Estadual de Londrina e ao Programa de Pós-Graduação de mestrado em Genética e Biologia molecular.

A Empresa TMG - Tropical Melhoramento e Genética Ltda., por fornecer as condições para que o trabalho fosse realizado.

Ao Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira, pela orientação, boa vontade, ensinamentos e “liberdade”.

Ao Dr. Éberson Sanches Calvo, pela orientação, confiança, atenção e grande contribuição neste trabalho. Com certeza é um grande exemplo para a vida.

Aos Doutores Arlindo Harada e Romeu Afonso de Souza Kiihl, por serem os primeiros a me conceder a oportunidade de ingressar na área. Desde então, ambos participam ativamente de muitos momentos da minha vida. Tenho a sorte de poucos de estar entre pessoas como eles.

Aos amigos da TMG, em especial Adriano, Ângelo Marino e Marcelo Soares Baço que contribuíram imensamente para o trabalho e Jair Rogério Unfried e Maria Inez Faraldo pelo apoio. Também ai Dr. Leones Alves de Ameida, Msc. Lucimara koga, Sheila Cardoso, Alessandro Vieira, Rildo Teixeira, Rosângela Batista Nascimento. A todos os que não citei aqui, saibam que são tão importantes quanto.

Aos “irmãos” de Toledo Fabio Xavier, Bruno e Ricardo Della Costa, Marcos Vinícius Rodrigues, Gustavo Takahachi, Luiz Felipe H. Silva, Marcelo Vanzo, Ricardo Guerra e todos os mais que considero. Também aos “irmãos” de longas braçadas Marcos Mafini, Lucas Gusi, Alexandre Moser Silva, Rodrigo Kaviski, Guilherme Nasser e Luiz Fernando Pfaff. Só mesmo quem já participou para entender.

A Hugo da Silva Alves e a todos os amigos que fiz durante a graduação e mestrado. Todos sempre dividiram momentos de alegria, responsabilidade, nervosismo, tristeza, diversão e “insanidade”. Sempre estarão marcados.

Aos Docentes dos programas de Pós-Graduação da Universidade Estadual do Paraná.

A Maria Sueli Trindade Miranda, secretária do Mestrado em Genética e Biologia Molecular, por toda a ajuda e disposição.

A todos aqueles que não foram citados, mas de alguma forma contribuíram para o meu sucesso e felicidade, que sempre me quiseram bem, deram oportunidades, quebraram galhos e se esforçaram para me ajudar.

GARCIA, Alexandre. “Identificação e mapeamento genético de genes de resistência a ferrugem asiática da soja”. 2007. 87 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

RESUMO

A produção da cultura da soja [*Glycine max* (L.) Merrill] nas Américas do Sul e Norte está sendo ameaçada pela recente disseminação da ferrugem asiática da soja (FAS). A doença, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* Sidow, é considerada a doença fúngica mais ameaçadora para a soja nas Américas. Atualmente, a utilização de fungicidas é o único método efetivo no controle da doença, elevando os custos de produção e expondo o ambiente a altos níveis de produtos químicos. Assim, o desenvolvimento de cultivares resistentes ou tolerantes é o objetivo principal em diversos programas de melhoramento de soja. Quatro loci identificados em introduções de plantas (PIs), todas portadoras de alelos dominantes, que conferem o fenótipo de resistência, estão descritos e são denominados: *Rpp1* (PI 200492), *Rpp2* (PI 230970), *Rpp3* (PI 462312) e *Rpp4* (PI 459025). Como primeiro passo em direção ao desenvolvimento de cultivares resistente/tolerantes à FAS, a base genética da resistência foi investigada em sete populações F₂. As populações foram derivadas do cruzamento entre a cultivar brasileira suscetível CD 208 com sete diferentes introduções de plantas (PI 459025 \times *Rpp4*, PI 230970- *Rpp2*, PI 224270, PI 200456, PI 200526, PI 200487, PI 471904) portadoras de resistência à FAS. As análises das segregações fenotípicas (F₂) e genotípicas (F_{2:3}) demonstram que a resistência em cada PI é controlada por um único gene. Em quatro PIs a resistência se comportou como dominante, enquanto que em uma PI a resistência é controlada por um gene com dominância incompleta e em duas outras a resistência é recessiva. Um teste de alelismo demonstrou que tais genes recessivos não são alelos. Este é o primeiro caso de genes recessivos controlando a resistência à ferrugem asiática em introduções de planta de soja e podem representar um novo mecanismo de resistência. O mapeamento genético por marcadores de microssatélites dos genes *Rpp* foi realizado em cinco das PIs estudadas (PI 459025 \times *Rpp4*, PI 224270, PI 200456, PI 200526, PI 471904). Tal mapeamento posicionou dois genes *Rpp* presentes nas fontes originais de *Rpp2* e *Rpp4* nos grupos de ligação (LG) J e G, respectivamente, do mapa de ligação consenso da soja. Ainda, um novo locus de resistência à FAS - *rpp5* \times presente na PI 200456, foi mapeado no LG \times N. Analisados em conjunto, os dados genéticos e moleculares sugerem a existência de alelos múltiplos ou genes intimamente ligados governando a resistência à FAS. Os resultados reportados fornecem novos alelos e ferramentas eficientes para programas de melhoramento que visam o desenvolvimento de cultivares com uma resistência duradoura e de amplo espectro. Além disso, representam uma base para futuros estudos moleculares da interação patógeno-hospedeiro

Palavras chave: Soja. Ferrugem asiática da soja. Resistência genética. Mapeamento molecular.

GARCIA, Alexandre. “**Identification and genetic mapping of genes for resistance to asian soybean rust**”. 2007. 87 f. Dissertation (Mester’s degree in Genetic and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

ABSTRACT

Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] production in South and North America has been recently threatened by the widespread dissemination of the Asian Soybean Rust (ASR). The disease, caused by the fungus *Phakopsora pachyrhiz* Sidow, is considered the most threatening fungal disease in soybean in the Americas. Currently, chemical spray with fungicides is the only effective method to control the disease, increasing production costs and exposing the environment to higher levels of fungicides. Thus, the development of resistant or tolerant cultivars is a major goal in several soybean breeding programs. Four loci identified in plant introductions (PIs), all carrying dominant alleles that confer a resistant phenotype have been described and are named: *Rpp1* (PI 200492), *Rpp2* (PI 230970), *Rpp3* (PI 462312) and *Rpp4* (PI 459025). As a first step towards the development of ASR resistant/tolerant cultivars, the genetic basis of ASR resistance in seven F₂ populations were investigated. The populations were derived by crossing the Brazilian adapted susceptible cultivar CD 208 to each of seven different ASR resistant plant introductions (PI 459025 \times *Rpp4*, PI 230970- *Rpp2*, PI 224270, PI 200456, PI 200526, PI 200487, PI 471904). Phenotypic (F₂) and genotypic (F_{2:3}) segregation showed that the resistance in each PI is controlled by a single gene. In four PIs the resistance behaved as dominant. In one PI the resistance is controlled by a gene with incomplete dominance and in two others the resistance is recessive. Allelism test demonstrated that these recessive genes are non-allelic. This is the first case of recessive genes controlling asian rust resistance in soybean plant introductions and may represent a new type of resistant allele. Molecular mapping of Rpp genes using microsatellites was performed in five of these PIs (PI 459025, PI 224270, PI 200456, PI 200526, PI 471904). Two Rpp genes present on the original sources of *Rpp2* and *Rpp4* mapped on linkage group (LG) J and G, respectively, of the soybean consensus molecular map. Moreover, a new ASR resistance locus-rpp5- present in PI 200456 was mapped in LG-N. Taking together, the genetic and molecular data suggested the existence of multiple alleles or closely linked genes governing ASR resistance. The results reported here provide new alleles and efficient tools for breeding programs aiming the development of more durable and broad spectrum resistance. Besides, these results provide basis for future molecular studies of host-pathogen interactions.

Keywords: Soybean. Asian soybean sust. Genetic resistance. Molecular mapping.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Lista dos loci de microssatélites utilizados no estudo	83
Tabela 2 – Segregação fenotípica da resistência à FAS em duas populações F ₂ (PI 224270 e PI 200456).....	46
Tabela 3 – Segregação “genotípica” da resistência à FAS baseada no teste de progênie (F _{2:3}) para duas populações (PI 224270 e PI 200456) ...	46
Tabela 4 – Teste de alelismo entre a PI 224270 e PI 200456.....	48
Tabela 5 – Segregações fenotípicas e genotípicas de diferentes populações portadoras de resistência à FAZ	58
Tabela 6 – Dados relacionados ao mapeamento genético	59
Tabela 7 – Teste de alelismo entre a PI 230970 e PI 224270.....	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Lesões de resistência e suscetibilidade da soja à FAZ	83
Figura 2 – Comparação de lesões “RB” e “TAN”	84
Figura 3 – “BSA”	86
Figura 4 – Genotipagem de indivíduos F ₂ com marcador de microssatélite.....	86
Figura 5 – Dados de genotipagem codificados para o programa MapMaker/EXP	87
Figura 6 – Mapa de ligação do gene Rpp.....	61
Figura 7 – Mapa de ligação do gene RppJ.....	62
Figura 8 – Mapa de ligação de novos genes no grupo de ligação N.....	63
Figura 9 – Gene de resistência à FAS com dominância incompleta	87

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1	A SOJA	14
2.1.1	Características da Planta	14
2.1.2	Histórico e Economia	15
2.2	MELHORAMENTO GENÉTICO	16
2.3	FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA	18
2.3.1	Histórico e Importância	18
2.3.2	Sintomas e Epidemiologia	20
2.3.3	Resistência Genética a FAZ	21
2.4	MARCADORES MOLECULARES	23
2.4.1	Microsatélites	25
2.5	MAPEAMENTO GENÉTICO	27
2.5.1	BSA – (“Bulk Segregant Analysis”)	28
2.5.2	Mapmaker/EXP	29
2.5.3	Mapeamento de Genes Utilizando Marcadores Moleculares	29
3	OBJETIVOS	32
4	MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1	ESCOLHA DAS FONTES DE RESISTÊNCIA	33
4.2	PLANTIO DAS POPULAÇÕES	33
4.2.1	Plantio das Populações F ₂	34
4.2.2	Plantio das Progênes F _{2:3}	34
4.3	INOCULAÇÃO DO PATÍGENO (PHAKOPSORA PACHYHIZI) E AVALIAÇÃO DOS MATERIAIS PARA A RESISTÊNCIA À DOENÇA	35
4.4	ESTIMATIVA DO TIPO DE HERANÇA DE CADA MATERIAL	36
4.5	TESTES DE ALELISMO	36
4.6	COLETA DE FOLHAS PARA EXTRAÇÃO DE DNA	37
4.7	LIOFILIZAÇÃO E MOAGEM	37
4.8	EXTRAÇÃO DE DNA	38
4.9	ANÁLISES COM MARCADORES MOLECULARES	38

4.10	AMPLIFICAÇÃO DOS LOCI DE MICROSSATÉLITES	40
4.11	SEPARAÇÃO E VISUALIZAÇÃO DOS FRAGMENTOS	40
4.12	CONSTRUÇÃO DO MAPA DE LIGAÇÃO	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1	TWO MAJOR RECESSIVE GENES CONFERRING RUST (PHAKOPSORA PACHYRHIZI S) RESISTANCE IN SOYBEAN (GLYCINE MAX L.)	42
5.1.1	Abstract	42
5.1.2	Introduction	43
5.1.3	Material and Methods	44
5.1.3.1	Plant material.....	44
5.1.3.2	Disease resistance screening.....	45
5.1.3.3	Allelism test	45
5.1.4	Results and Discussion	46
5.2	MOLECULAR MAPPING OF ASIAN SOYBEAN RUST (PHAKOPSORA PACHYRHIZI S) RESISTANCE GENES: NEW LOCUS AND ALLELES	50
5.2.1	Abstract	50
5.2.2	Introduction	50
5.2.3	Materials and Methods	52
5.2.3.1	Plant material and genetic analysis	52
5.2.3.2	Phakopsora pachyrhizi inoculation and phenotyping.....	54
5.2.3.3	DNA isolation.....	55
5.2.3.4	Marker analysis	55
5.2.3.5	Linkage analysis	56
5.2.4	Results.....	57
5.2.4.1	Inheritance of rust resistance.....	57
5.2.4.2	Linkage search	58
5.2.4.3	Genetic mapping	60
5.2.5	Discussion	64
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	69
	REFERÊNCIAS	71
	ANEXOS	82

1 INTRODUÇÃO

A agricultura é, sem dúvida, um dos setores mais significativos no desempenho da economia brasileira. Dentre as espécies vegetais cultivadas a soja ocupa lugar de destaque. Essa leguminosa é cultivada em praticamente todo o território nacional e o Brasil é o segundo maior produtor da oleaginosa, participando com 38% da produção mundial.

Muitos fatores contribuíram para a expansão e o sucesso da cultura no país. No aumento da produção, dentre outros fatores, devemos destacar a melhoria do potencial genético das cultivares, conseguido através dos programas de melhoramento. Contudo, o incremento da produtividade poderia ser ainda maior caso não houvesse problemas como falta de chuvas, manejo inadequado da cultura e principalmente a ocorrência de doenças. Aproximadamente 100 doenças causadas por fungos, bactérias e vírus estão catalogadas no cenário mundial da cultura da soja. Dentre elas, a “ferrugem da soja” ou ferrugem asiática, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, é considerada a doença foliar mais destrutiva.

A ferrugem asiática é uma das doenças mais antigas da soja, mas só foi detectada no Brasil a partir da safra 2000/01 trazendo sérias preocupações devido ao grande potencial de danos. A doença manifesta-se de forma irregular, dependendo das condições ambientais. As lesões causadas pelo patógeno podem culminar em infecções severas, causando amarelecimento e queda prematura das folhas. Plantas suscetíveis apresentam lesões castanho-claras enquanto genótipos resistentes, encontrados naturalmente, possuem uma lesão de coloração marrom-avermelhada.

Ao longo da evolução da agricultura, o uso de cultivares resistentes tem sido uma das melhores estratégias preconizadas para o controle de doenças e pragas. Essa solução facilita o manejo e reduz os custos além de não agredir o ambiente. Tais cultivares são obtidas através dos programas de melhoramento genético e normalmente são desenvolvidas pela transferência de alelos de resistência de fontes exóticas, muitas vezes não adaptadas, para cultivares elite. Visando a obtenção de uma resistência duradoura e de amplo espectro programas de melhoramento adotam a estratégia de piramidação de genes, ou seja, a associação de vários genes de resistência qualitativos em uma única cultivar.

Nos últimos anos, com o advento da biotecnologia, novas metodologias surgiram para auxiliar o melhoramento “clássico”, possibilitando a obtenção dos genótipos desejados com mais eficácia e em menor tempo. Essas técnicas consistem basicamente na utilização das técnicas de cultura de tecidos, transformação genética de plantas e o uso de marcadores moleculares.

Os marcadores moleculares surgiram como uma grande contribuição do desenvolvimento das técnicas moleculares que permitem a análise do genoma. São muitas as aplicações dos marcadores moleculares em plantas, sendo principalmente utilizados no mapeamento de genes e QTLs (“Quantitative Trait Loci”) de interesse. Durante o mapeamento genético, técnicas como a BSA (“Bulk Segregant Analysis”) são estratégias eficazes que facilitam o processo.

Vários tipos de marcadores moleculares estão disponíveis para estudos genéticos sendo que os mais utilizados são as isoenzimas, o RFLP, o RAPD, o AFLP e os microssatélites (SSR – “Simple Sequence Repeats”). Os microssatélites correspondem a seqüências de DNA com poucos (1-6) pares de bases de comprimento repetidas “in tandem” tais como (AT)_n, (ATT), etc. Como o número de repetições “in tandem” é variável, se conhecida a seqüência que flanqueia a região do microssatélite, é possível amplificar os loci pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e os produtos de amplificação dos diferentes indivíduos mostrarão um polimorfismo de tamanho. Atualmente a soja já dispõe de inúmeros “primers” de microssatélites disponíveis.

Este trabalho tem como objetivo buscar novas fontes de resistência à ferrugem asiática e caracterizar a herança genética da resistência. Também visa realizar o mapeamento genético dos genes identificados. Os resultados do trabalho poderão se tornar informações valiosas tanto para programas de melhoramento visando o desenvolvimento de cultivares resistentes quanto para estudos mais aprofundados nas áreas de genética e biologia molecular.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A SOJA

2.1.1 Características da Planta

A soja cultivada [*Glycine max* (L.) Merrill], pertence a família Fabaceae, divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, sub-classe Rosidae e ordem Fabales (CAPELLARI et al. 1999). É uma planta autógama, ou seja, reproduz-se por meio de autofecundação natural (ALLARD 1960). A autofecundação sucessiva leva a homozigose. Assim, genótipos selvagens e cultivares são representados por um genótipo homozigoto (SOUZA, 2001).

O tamanho do seu genoma é de 1,1 a 1,15 Gb (ARUMUGANATHAN & EARLE 1991) e é considerado um tetraplóide diploidizado. O genoma é produto de um ancestral diplóide ($n=11$), que sofreu uma perda aneuplóide ($n=10$), seguida de tetraploidização ($2n=20$) e diploidização ($n=20$) (SINGH; HYMOWITZ 1988).

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

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

Fehr e Caviness (1977) propuseram uma caracterização para os estádios de crescimento de plantas baseado no número de nós, no desenvolvimento das folhas e das flores. Essa classificação é universalmente usada para a soja, que

possui basicamente quatro tipos distintos de folhas durante o seu desenvolvimento: (1) dois cotilédones, que constituem o primeiro par; (2) um par de folhas simples, ou primárias, unifolioladas, que se sucedem aos cotilédones; (3) as folhas trifolioladas que seguem as primárias e constituem todas as demais folhas da planta e (4) os prófilos, pequenos e pouco diferenciados, que se encontram nas bases dos ramos laterais (MULLER, 1981).

2.1.2 Histórico e Economia

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

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

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

A partir de 1960, impulsionada pela política de subsídios ao trigo visando auto-suficiência, a soja cresceu em importância. Na década seguinte, a cultura se consolidou como a principal cultura do agronegócio brasileiro e sua produção passou de 1,5 milhões de toneladas (1970) para mais de 15 milhões de toneladas (1979), obtendo uma participação de 16% da produção mundial (BONATO; BONATO 1987). Esse crescimento foi devido não apenas ao aumento da

área cultivada (1,3 para 8,8 milhões de hectares), mas também ao expressivo incremento da produtividade (1.140 para 1.730 kg/ha).

Atualmente, a soja é cultivada em praticamente todo o território nacional sendo os estados do Mato Grosso, Paraná, Goiás, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e Bahia os principais produtores. Não seria exagero comparar a revolução socioeconômica e tecnológica protagonizada pela soja no Brasil Moderno, ao fenômeno ocorrido com a cana de açúcar no Brasil Colônia e com o café no Brasil Império/República que, em épocas diferentes, comandaram o comércio exterior do País.

Dados da ABIOVE (2007) mostram que o Brasil ocupa a posição de segundo maior produtor mundial da oleaginosa, ficando com o primeiro lugar em questão de produtividade. Por consequência, 38% do comércio mundial da soja é dominado pelo país (VISÃO AGRÍCOLA, 2006). Tamanha é a importância da cultura que nos dois últimos anos o “complexo soja” – grão, farelo e óleo bruto, - injetou aproximadamente US\$ 10 bilhões na economia brasileira como resultado das exportações. Esse valor equivale a 40% do total das exportações do agronegócio brasileiro (ABIOVE, 2007).

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

2.2 MELHORAMENTO GENÉTICO

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

Dentre as principais contribuições do melhoramento para o complexo soja no Brasil, devemos destacar o desenvolvimento de variedades com adaptação a latitudes mais baixas e resistência às principais doenças (ARIAS,

2006). O mesmo autor também relata que a resistência genética tem solucionado problemas sérios de doenças como a mancha olho de rã (*Cercospora sojina*), o cancro da haste (*Diaporthe phaseolorum* f.sp. *meridionallis*), o oídio (*Microphaera diffusa*) e o nematóide de cisto (*Heterodera glycines*). Brogin (2005) acrescenta a resistência à pústula bacteriana, ao crestamento bacteriano, à podridão parda da haste, ao vírus da necrose da haste e ao vírus do mosaico comum da soja.

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

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

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

No método da população a condução das gerações segregantes, geralmente de F_2 a F_5 , é feita com a semeadura e colheita de todas as plantas misturadas em uma única população. Portanto, no método da população as sementes utilizadas para o cultivo de cada geração segregante são uma amostra das sementes colhidas na geração anterior. Após cinco gerações de autofecundação as plantas apresentam elevado grau de homozigose e podem ser selecionadas para colheita individual. (SOUZA, 2001)

O método SSD em soja foi inicialmente descrito por Brim (1966) e consiste em avançar gerações segregantes (de F_2 até F_5) colhendo-se uma única vagem (2 a 3 sementes) de cada planta, mas apenas uma planta de cada vagem é utilizada para conduzir a próxima geração. Colhe-se também uma amostra para reserva. Dessa forma, no final do processo cada linhagem corresponde a uma planta

F₂ diferente e, portanto, reduz-se a perda devido à amostragem deficiente ou à ação da seleção natural.

O retrocruzamento não é propriamente um método para condução de populações segregantes. É um método utilizado para melhorar a expressão fenotípica de uma característica deficiente, especialmente se esta característica for de herança qualitativa. Ele permite a transferência de um gene ou de poucos genes de um parental denominado doador (PD) para outro parental denominado recorrente (PR). O parental recorrente geralmente é uma cultivar de grande interesse comercial, mas que apresenta um defeito grave para o seu cultivo. O defeito é corrigido com o gene transferido do PD. O termo retrocruzamento refere-se aos repetidos cruzamentos dos indivíduos da população segregante com o parental recorrente. Cerca de cinco retrocruzamentos já são suficientes para recuperar quase 100% do genótipo do parental recorrente (SOUZA, 2001).

Quando se trata do melhoramento visando resistência a doenças e pragas, existe uma grande preocupação com a diversidade existente dentro das espécies patogênicas bem como com a capacidade ou possibilidade do patógeno desenvolver nossas raças. Isso pelo fato de que genes qualitativos de resistência podem conferir uma resistência limitada a determinadas raças do patógeno ou mesmo ter o mecanismo de resistência superado com a modificação do patógeno. Por isso é muito desejável a piramidação de genes, ou seja, a associação de vários genes de resistência qualitativos independentes, controlando a mesma característica, em uma cultivar. Essa estratégia possibilita a obtenção de uma resistência duradoura e de amplo espectro (KELLY et al. 2003). Contudo, a piramidação é um processo trabalhoso pela dificuldade em se identificar a presença de múltiplos genes, visto que a seleção é feita fenotipicamente via análise de sintomas.

2.3 FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA

2.3.1 Histórico e Importância

Entre os principais fatores que limitam a obtenção de altos rendimentos na cultura da soja estão as doenças. Em escala mundial estão

catalogadas mais de 100 doenças na soja (HARTMAN et al. 1999). No Brasil têm-se conhecimento de 46 doenças (EMBRAPA SOJA, 2006), causando em sua somatória perdas de 20% a 90% da produção. Sendo assim, o controle ou redução dos efeitos das doenças tem reflexo direto no aumento da produtividade (ALMEIDA, 2001).

A ferrugem é a principal doença da soja em áreas tropicais e subtropicais (SINCLAIR; HARTMAN 1999). A doença, na soja, é causada por duas espécies de fungos *Phakopsora meibomiae* e *Phakopsora pachyrhizi*, denominadas ferrugem americana e ferrugem asiática, respectivamente. A primeira não é motivo de preocupação devido ao baixo potencial de dano e fácil controle por fungicidas. Mas Ono et al. (1992) destacam a maior agressividade apresentada por *Phakopsora pachyrhizi*. Além da soja cultivada (*Glycine max*), outras espécies do gênero *Glycine* são infectadas pela ferrugem. Hartman et al. (2005b) relatam que mais de 95 espécies de 42 gêneros da família Fabaceae, são hospedeiras da *P. pachyrhizi*.

A ferrugem asiática da soja (FAS) é uma das doenças mais antigas da soja. Descoberta no Japão em 1902 se disseminou chegando à Ásia e Austrália em 1934 (KOCHMAN, 1977), Índia em 1951 (SHARMA & MEHTA 1996), Hawaii em 1994 (KILLGORE; HEU 1994) e África em 1996 (AKINSANMI et al. 2001). Na América do Sul a doença foi reportada pela primeira vez em 2001 no Paraguai (PAIVA; YORINORI 2002) e Brasil (Oeste e Norte do Paraná) (YORINORI 2004). Nos anos seguintes chegou a Argentina, Bolívia e Colômbia (ROSSI 2003; YORINORI; LAZZAROTTO 2004). Nos Estados Unidos, os primeiros sintomas da doença foram reportados em novembro de 2004 (SCHNEIDER et al. 2005) e em 2005 foi constatada no México (RODRIGUÉZ et al. 2006).

Atualmente, no Brasil, a doença atinge todas as áreas produtoras da oleaginosa. Yorinori et al. (2005) reportam perdas da produtividade variando entre 10% a 90% em regiões em que a doença atacou com maior severidade. Como todas as plantas de soja cultivadas no país são suscetíveis à FAS em todos os estádios de crescimento, o controle é feito quase que exclusivamente pela aplicação de fungicidas (grupos dos triazóis e estrobirulinas). Porém, muitas vezes três aplicações ainda não são efetivas para o controle. Assim, o mercado brasileiro desses químicos saltou de aproximadamente US\$ 100 milhões para US\$ 800 milhões desde o aparecimento da doença (SINDAG 2006 e dados não publicados e

sob direito de consulta das empresas participantes). Considerando os gastos com compra e aplicação de fungicidas e adicionando-se as perdas de produção, o “custo ferrugem” para a safra de 2006/2007 somou um total de U\$ 2,2 bilhões (EMBRAPA, SOJA 2007). Tal valor representa aproximadamente 22% do total arrecado pelo país com as exportações do complexo soja no mesmo período. Nos Estados Unidos, para 2005, estimavam-se perdas de produtividade entre 10% a 50% (DORRANCE, 2005). Contudo, devido às condições ambientais desfavoráveis ao patógeno a doença não atingiu tais níveis (SCONYERS, et al. 2006).

Devido à agressividade da doença e dificuldades em detectar a presença do fungo em estádios precoces do ciclo epidemiológico, os sojicultores dispõem de um curto período para controlar a doença. Apesar da aplicação de fungicidas, perdas de produtividade são frequentes com a ocorrência da FAS. Soma-se ainda o aumento do custo da produção e os danos ambientais são acentuados com o aumento do uso de fungicidas. Em função disso, a estratégia mais eficiente e sustentável para o controle da FAS é o uso de variedades resistentes e/ou tolerantes e com alta produtividade.

2.3.2 Sintomas e Epidemiologia

A doença manifesta-se de forma irregular dependendo das condições ambientais. Segundo Yuyama e Suzuki (2005) o sintoma da doença é caracterizado por pequenos pontos com menos de 1 mm de diâmetro, de coloração pardo-avermelhada, na superfície adaxial da folha. Com o desenvolvimento da doença as lesões adquirem formato poligonal, com tamanho variando entre 2 e 5mm. Pecíolos, vagens, hastes e até cotilédones podem ser atingidos, mas as lesões são mais abundantes nas folhas e por isto a FAS é considerada uma doença foliar.

As lesões podem culminar em infecções severas, formando grandes manchas castanhas, causando amarelecimento e queda prematura das folhas. Quanto maior a quantidade de lesões, maior e mais rápida será a desfolha das plantas. Conseqüentemente, haverá um encurtamento de aproximadamente 10 a 15 dias no ciclo da lavoura em relação ao ciclo normal (UNFRIED, 2007). Ataques no

florescimento e no período de enchimento das vagens reduzem mais severamente a produtividade (KAWUKI et al. 2003).

Na parte inferior da folha, a lesão é de coloração castanha-clara a castanha escura. Nessa face, depois de 10 a 14 dias após a infecção, são evidenciadas estruturas reprodutivas em formato de vulcão, chamadas urédias, onde os uredósporos são produzidos (MARCHETTI et al. 1975). As urédias possuem uma pequena elevação no centro, de coloração mais clara. A parte mais clara constitui a cutícula que cobre a massa de uredósporos produzida no interior do tecido da folha. Uma lesão da FAS pode conter várias urédias.

Os sintomas da FAS assemelham-se aos observados em septoriose (*Septoria glycines*), crestamento bacteriano (*Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*) e o crestamento foliar de cercospora (*Cercospora kikuchii*). Contudo, diferem da primeira por apresentar coloração mais avermelhada e ausência de halo amarelado ao redor das lesões e das demais pela ausência de halo amarelado.

Segundo Bromfield (1984) a FAS ocorre em folhas como lesões de cor palha (“TAN”) a marrom-escuras ou marrom-avermelhadas (RB – “Reddish-Brown”). Genótipos considerados resistentes apresentam uma lesão de coloração RB e a esporulação pode variar entre nenhuma a abundante. Os suscetíveis possuem lesões “TAN” e abundante esporulação na face abaxial das folhas.

O fungo causador da FAS é um organismo essencialmente biotrófico, ou seja, só se desenvolve em tecido vivo. De maneira geral, temperaturas que favorecem o crescimento e desenvolvimento da cultura da soja também favorecem o desenvolvimento da ferrugem (UNFRIED, 2007). O desenvolvimento de *P. pachyrhizi* é favorecido por temperaturas entre 15°C e 29°C e alta umidade. Nessas condições os sintomas podem ser detectados 5 a 8 dias após a infecção da planta pelos uredósporos (MARCHETTI et al. 1976; MELCHING et al. 1989). Condições distantes dessas, em temperatura e/ou umidade, retardam o desenvolvimento da doença.

2.3.3 Resistência Genética à FAS

Apesar da aplicação adequada de fungicidas conseguir amenizar as perdas, o uso de cultivares resistentes e/ou tolerantes é a melhor alternativa para

controlar a doença. Um aspecto chave para o desenvolvimento de tais cultivares é entender a base genética da resistência ou tolerância (SHIN; TSCHANZ 1986; HARTMAN, 1996).

Pierozzi (2007) estudou componentes genéticos da tolerância e Unfried (2007) propôs estratégias para avaliação de linhagens tolerantes. Contudo, em curto prazo, a utilização da resistência qualitativa é a melhor estratégia para a obtenção de cultivares resistentes.

A resistência qualitativa ao fungo ocorre naturalmente em genótipos do gênero *Glycine* e é conferida pela reação imune de hipersensibilidade. Esse é um tipo comum de resposta desencadeada quando genes de resistência (R-genes) da planta são desafiados por genes de avirulência do patógeno (genes Avr) (MCDOWELL; SIMON 2006).

Para a soja cultivada (*Glycine max*), estão descritos quatro genes qualitativos dominantes de resistência : *Rpp1* identificado na PI 200492 (MCLEAN & BYTH 1980), *Rpp2* identificado na PI 230970 (BROMFIELD; HARTWIG 1980) , *Rpp3* (PI 462312) (BROMFIELD; MELCHING 1982) e *Rpp4* (PI 459025) (HARTWIG 1986).

Entretanto, cada gene apresenta a resistência limitada a raças específicas do patógeno (BONDE et al. 2006) e a diversidade de raças de *P. pachyrhizi* é grande. Yamaoka et al. (2002) identificaram 18 raças diferentes presentes no Japão. No Brasil, Kato e Yorinori (2006) confirmaram a ocorrência de diferentes raças do fungo realizando a inoculação de esporos coletados em campo em diferentes genótipos de soja. Contudo, trabalhos para isolar as raças específicas ainda estão sendo conduzidos. McDowell e Simon (2002) explicam que a resistência raça-específica pode ser superada em um curto período devido à co-evolução da resistência do hospedeiro e à virulência do patógeno. Miles et al. (2005) já reportaram a quebra da resistência de todos os quatro genes *Rpp* em diferentes partes do mundo.

No Brasil, na safra 2001/2002, todos os quatro genes de resistência à FAS eram efetivos, além da resistência conferida pela cultivar FT-2 (ARIAS et al. 2003) e vários genótipos descendentes dela. Porém, na safra seguinte, com o aparente surgimento de uma nova raça do patógeno no Mato Grosso, a resistência conferida por *Rpp1*, *Rpp3* e FT-2 foi simultaneamente superada. Essa raça (ou

mistura de raças) é agora aparentemente prevalente no território nacional e das fontes descritas na literatura, apenas *Rpp2* e *Rpp4* continuam efetivas. Portanto, a descoberta e utilização de novas fontes de resistência à doença, e o desenvolvimento de ferramentas que facilitem o processo de melhoramento genético são objetivos para geneticistas e melhoristas de soja e uma necessidade para aqueles que estão envolvidos com a oleaginosa.

Um esquema de melhoramento que está sendo muito utilizado para incorporar a resistência à ferrugem envolve a hibridação artificial, feita entre fontes exóticas de resistência e materiais de elite adaptados, seguidos de retrocruzamentos sucessivos ou o avanço das gerações pelos métodos da população e SSD. Como os programas iniciais de melhoramento visando o desenvolvimento de cultivares resistentes estavam fundamentados nos genes de FT-2, os esforços em controlar a FAS com o uso de cultivares resistentes tiveram seu sucesso adiado.

Devido a todos os fatos, a melhor estratégia para desenvolver cultivares resistentes à FAS é a utilização de combinações entre os genes qualitativos disponíveis em fontes de tolerância ou resistência horizontal e para tanto, os marcadores moleculares são indispensáveis.

2.4 MARCADORES MOLECULARES

Os marcadores surgiram como uma grande contribuição ao desenvolvimento de técnicas que permitem a análise do genoma. Como o próprio termo já indica, têm como função marcar e identificar. Eles são classificados como morfológicos ou moleculares. Os marcadores moleculares são marcações ao longo do DNA, que utilizam as diferenças nas sequências de nucleotídeos para distinguir DNA de diferentes origens. O grande potencial do uso dos marcadores moleculares reside no fato de eles serem praticamente ilimitados em número e de fácil detecção. Além disso, não são influenciados pelo ambiente e são transmitidos mendelianamente (FUGANTI et al. 2004).

No melhoramento de plantas, marcadores do DNA foram primeiramente utilizados no início da década de 80 (SOLLER; BECKMANN 1983) e eles vem sendo utilizados principalmente em análises de diversidade genética, na

caracterização de germoplasma, seleção de genitores e certificação de cruzamento. Também são utilizados no mapeamento de genes e QTLs (“Quantitative Trait Loci”) de interesse, na recuperação do genótipo recorrente em retrocruzamentos, na análise de pureza genética e caracterização de cultivares. Também são importantes no entendimento de como os genomas evoluíram e das relações entre diferentes genes (KANAZIN et al. 1996; SCHOEMAKER et al. 1996)

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

No início dos anos 70, descobriu-se que o princípio da eletroforese, utilizado com proteínas, poderia ser usado também para moléculas de DNA, já que estas possuem carga elétrica negativa e, em um gel, migram do pólo negativo em direção ao pólo positivo (ALBERTS et al. 2004). Através dessa técnica os marcadores moleculares distinguem sequências de nucleotídeos pelo polimorfismo de tamanho observado. Assim, surgiu a possibilidade da utilização de marcadores de DNA como ferramenta para a análise direta do DNA, não sofrendo influência do ambiente, nem estando sujeita a variações do estágio de desenvolvimento do organismo em questão (PUTERKA et al. 1993).

A reação de PCR, ou reação em cadeia da polimerase, foi uma das técnicas desenvolvidas para a análise de DNA e RNA que teve mais impacto. É uma técnica de procedimento simples que vem sendo extensivamente utilizada. Desenvolvida na década de 80 por Kary Mullis, a PCR possibilitou a produção de múltiplas cópias de seqüências específicas de DNA in vitro, sem a necessidade de clonar estas seqüências.

A PCR baseia-se na amplificação de um segmento de DNA flanqueado por dois oligonucleotídeos iniciadores (“primers”). Esses oligonucleotídeos iniciadores hibridizam com seqüências de DNA através da complementariedade de bases e disponibilizam uma extremidade 3'-OH livre, permitindo o início da amplificação de um segmento de DNA pela enzima DNA polimerase. Os “primers” podem ser específicos para uma região única do genoma ou amplificar regiões ao acaso. A principal DNA polimerase utilizada para a PCR é a Taq DNA polimerase, que é termoestável e resiste à alta temperatura necessária

para a desnaturação do DNA dupla fita. Entretanto, várias outras DNA polimerases estão disponíveis. Ciclos repetidos de desnaturação, hibridação dos “primers” (anelamento) e síntese enzimática do fragmento (polimerização) resultam numa amplificação exponencial do DNA alvo.

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

2.4.1 Microssatélites

Dentre os marcadores moleculares, os microssatélites são de grande interesse, principalmente na associação de marcadores com características de interesse. Isso porque cada microssatélite corresponde a uma posição única no genoma, mas possui inúmeros alelos, gerando um alto grau de polimorfismo (CREGAN et al. 1999). Além disso, são de fácil utilização por serem baseados na técnica de PCR, produzem resultados consistentes e são acessíveis a quase todos os laboratórios de biotecnologia.

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

É um marcador do tipo co-dominante e vem sendo amplamente usado em estudos de doenças em humanos (O’DONNELL; WARREN 2002), testes de paternidade (WRIGHT; BENTZEN 1994), construção de mapas genéticos (CREGAN et al. 1999; SONG et al. 2004) e em diversos programas de melhoramento vegetal. Zhang et al. (2005) e Yang et al. (2006) também utilizaram microssatélites para analisar a diversidade genética e calcular o índice de similaridade entre indivíduos e populações.

As regiões de microssatélites têm o atributo particular de sofrer altas taxas de mutação, quando comparadas com o resto do genoma (JARNE; LAGODA 1996). Sendo assim, para um mesmo locus indivíduos podem ter diferentes números de repetições “in tandem”, variando de um par de bases a dezenas deles. Dessa forma, no mesmo locus, uma população pode conter inúmeros alelos com diferentes números de repetições, gerando um alto índice de polimorfismo. Tal fato torna os marcadores SSR muito úteis para distinguir indivíduos (OLIVEIRA et al. 2006) e ideais para o mapeamento genético (SONG et al. 2004).

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

Estudos feitos por Morgante et al. (2002) demonstram a grande freqüência da ocorrência dos microssatélites em plantas. O número de microssatélites por Mb é em torno de 1844 em *Arabidopsis thaliana*, 2757 em arroz, 1470 em milho, 1796 em trigo e de 2000 na soja.

Na soja, devido à falta de polimorfismo de RFLP e a complexidade da técnica, marcadores de microssatélites foram inicialmente propostos para o mapeamento genético por Akkaya et al. (1992). Atualmente, a soja dispõe de um conjunto de marcadores de microssatélites de acesso público para a utilização em estudos genéticos. Nessa leguminosa, os marcadores de microssatélites têm sido muito utilizados para o mapeamento de genes específicos que determinam características agronomicamente importantes, como a resistência genética a pragas e doenças. Também estão sendo utilizados para a identificação de QTLs que exercem um controle de herança complexo (SCHUSTER et al. 2001).

2.5 MAPEAMENTO GENÉTICO

Um mapa genético de ligação é um mapa que demonstra as posições relativas entre genes e/ou marcadores. O mapa genético é construído a partir da frequência de recombinação entre locus e não representa necessariamente a distância física específica entre tais locus. De acordo com os princípios propostos por Thomas H. Morgan e seus estudantes, locus localizados no mesmo cromossomo estão fisicamente ligados e por isto tendem a segregar juntos durante a meiose. Mas, devido à ocorrência de “crossing over” durante a fase paquíteno da meiose I, locus do mesmo cromossomo podem ser separados. Então, a distância relativa entre dois locus pode ser calculada de acordo com a porcentagem de recombinação entre eles. A unidade de distância em mapas genéticos é conhecida como centiMorgan (cM) e equivale à porcentagem de recombinação observada (ex. 1% de recombinação equivale a 1 cM). Quanto maior a frequência de recombinação, maior a distância genética entre dois locus e normalmente considera-se segregação independente para locus com recombinação entre si acima de 50%. O conjunto de todos os loci geneticamente ligados forma um grupo de ligação (LG) que muitas vezes pode ser equivalente a um cromossomo ou representar parte de um.

Para se realizar o mapeamento genético é necessário se obter uma população segregante para os loci que se deseja mapear (sejam eles genes ou marcadores moleculares). Para que se possa identificar a co-segregação entre locus é fundamental que essa população esteja em desequilíbrio de ligação. A população mais usada é uma população F_2 , resultante do cruzamento de pais preferencialmente em homozigose e contrastantes para os loci que serão mapeados. Pereira e Pereira (2006) citam que populações F_2 são interessantes por serem de rápida obtenção e estarem no máximo de desequilíbrio de ligação. Porém, outras populações podem ser utilizadas.

Os indivíduos da população segregante são então genotipados ou fenotipados (de acordo com o caráter analisado). Os dados são submetidos a análises dos padrões de segregação e os locus são mapeados. A informação da taxa de recombinação é dependente do tipo de segregação observada. Caracteres co-dominantes (segregação 1:2:1) são os mais informativos. Devido à quantidade de

cálculos necessários, usualmente são usados programas de computador para realizar o mapeamento.

A soja possui um denso mapa de ligação integrado construído por Song et al. (2004). Esse mapa possui 20 grupos de ligação, que representam os 20 cromossomos da soja ($n=20$) e nele estão integrados locus de marcadores de microssátelites, RAPD, RFLP, genes, entre outros.

2.5.1 BSA α (“Bulk Segregant Analysis”)

O método de BSA proposto por Michelmore et al. (1991), é uma estratégia rápida e eficiente para identificar ligação entre marcadores moleculares e características qualitativas. Contudo, o método não permite determinar a distância entre os loci. Mas, quando se deseja realizar o mapeamento de regiões delimitadas do genoma, a estratégia de BSA é de extrema utilidade. Através dela é possível detectar o desequilíbrio de ligação e selecionar grupos de loci ligados sem a necessidade de cálculos, tornando o mapeamento mais rápido e eficiente.

Por essa técnica, os indivíduos de uma população F_2 segregando para dois alelos de um único gene são reunidos, após caracterização pelo teste de progênie $F_{2:3}$, em dois grupos (“bulks”) de genótipos homozigotos contrastantes. Já que a divisão dos “bulks” é feita levando em conta apenas a característica de interesse, todos os outros genes são agrupados ao acaso. Assim, o “background” genético se iguala entre os dois grupos e eles se diferem apenas na região selecionada. Com isso, um marcador polimórfico entre os parentais contrastantes que mantiver o mesmo polimorfismo entre os dois “bulks” tem uma grande possibilidade de estar associado ao gene de interesse. Os autores da técnica ressaltam que as marcas precisam estar mais próximas que 15 cM do locus de interesse para serem efetivas pois com esta distância, mesmo com a ocorrência de recombinação, eles tendem a ficar juntos. Contudo, a distância limite para detecção da ligação parece ser de 25 cM.

Para a construção dos “bulks”, o número mínimo de indivíduos utilizados é determinado pela frequência com que se espera encontrar polimorfismo de marcas não ligadas ao gene de interesse entre os “bulks”. Isso reflete o tipo de

marcador usado (dominante ou co-dominante). Para um marcador dominante, por exemplo, a probabilidade de um “bulk” de n indivíduos ter uma banda e um segundo “bulk” com o mesmo número de indivíduos não ter esta banda é de $2(1 - [1/4]^n)(1/4)^n$ quando a marca não está ligada ao gene alvo. Ou seja, para dois “bulks” contrastantes de 10 indivíduos, a probabilidade de uma marca não ligada ao gene alvo ser polimórfica entre os dois “bulks” é de 2×10^{-6} . Sendo assim, com poucos indivíduos em cada “bulk” e mesmo quando muitas marcas estão sendo utilizadas, a chance de detectar marcas não ligadas é pequena (MICHELMORE et al. 1991).

2.5.2 Mapmaker/EXP

Mapmaker (LANDER et al. 1987) é um software interativo para a construção de mapas genéticos de ligação. O programa usa um algoritmo eficiente para realizar análises de ligação de dois, três e multipontos (o que é uma estimação simultânea de todas as frações de recombinação entre os dados) entre diversos loci, podendo trabalhar com caracteres dominantes, recessivos ou co-dominantes. Os dados utilizados podem ser provenientes de retrocruzamentos, populações F_2 ou F_3 resultantes de intercruzamentos e linhas congênicas recombinantes.

A construção de mapas de ligação é dificultada pela ocorrência de erros de genotipagem. Baixas taxas de erro já causam uma expansão do mapa e interferem na determinação da ordem genética correta. Por isso, a versão atual MapMaker/EXP 3.0 (LINCOLN; LANDER 1993) incorporou um algoritmo para a detecção de potenciais erros de genotipagem (LINCOLN; LANDER 1992). O método detecta a grande maioria de erros e usando tal função é possível construir mapas precisos.

2.5.3 Mapeamento de Genes Utilizando Marcadores Moleculares

A utilização de marcadores moleculares é uma estratégia efetiva e rápida na identificação e transferência de genes (TANSKLEY 1983; TANSKLEY; MCCOUCH 1997). Na cultura da soja, associação de genes a marcadores moleculares seguida de mapeamento genético está sendo amplamente realizada (ex: POLZIN et al. 1994; MIAN et al. 1999; BACHMAN et al. 2001; DEMIRBAS et al. 2001; YANG et al. 2001; ATIBALETJA et al. 2005; SHAWN et al. 2007).

O mapeamento de genes com a utilização de marcadores possibilita a seleção assistida por marcadores (SAM), identificando indiretamente indivíduos em populações segregantes (KELLY et al. 2003). A SAM possibilita a seleção de indivíduos em estádios precoces de desenvolvimento da planta, poupando tempo, espaço e recursos. Em situações em que o fenótipo é de difícil mensuração e exige custos elevados ou em situações em que a avaliação exige o desgaste/destruição da planta (ex. avaliação para nematóides de cisto em soja), a SAM possui papel relevante. Ainda, em alguns casos, a SAM elimina a necessidade de se inocular o patógeno durante a seleção de genótipos com resistência qualitativa à doenças.

A piramidação de genes é outra estratégia facilitada pela associação de genes a marcadores moleculares (LIU et al. 2000). Tal associação possibilita o monitoramento da introdução dos diferentes genes ao longo do processo, mesmo na ausência de raças diferenciadoras do patógeno, no caso de genes de resistência a doenças. Além disso, é possível realizar a clonagem posicional (KILIAN et al. 1997; YAHIAOUI et al. 2004). Com a clonagem, a estrutura, organização e funcionamentos dos genes pode ser melhor compreendida (YAN; CHEN 2006), surgindo novas possibilidades para o melhoramento.

Para a FAS, Brogin et al. (2004) mapearam o gene de resistência da cultivar FT-2 entre marcadores de SSR do grupo de ligação C2 do mapa de ligação consenso da soja. Contudo, não foi possível em seu trabalho constatar se se tratava de *Rpp1*, *Rpp3* ou de um novo gene. Recentemente, Hyten et al. (2007) posicionaram o gene *Rpp1*, presente em PI 200492 (MCLEAN; BYTH 1980) entre um grupo de marcadores de SSR do grupo de ligação G do mapa de ligação da soja. Já Monteros et al. (2007) mapearam o gene de resistência da cultivar Hyuuga na mesma região relatada por Brogin et al. (2004). Como no Brasil tanto *Rpp1*,

quanto *Rpp3* e o gene da cultivar FT-2 tiveram sua resistência superada ao mesmo tempo e o gene presente em FT-2 é distinto de *Rpp1*, os dados indicam que esse gene está no locus *Rpp3*.

3 OBJETIVOS

- Identificar novas fontes de resistência à ferrugem asiática da soja e estudar a herança genética da resistência visando o desenvolvimento de cultivares resistentes ao patógeno.
- Encontrar marcadores moleculares de SSR ligados ao(s) gene(s) de resistência à doença através da técnica de “BSA”.
- Utilizar marcadores moleculares de SSR para posicionar os genes de resistência no mapa de ligação consenso da soja e definir as distâncias genéticas entre os genes e os marcadores.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A parte experimental do trabalho foi desenvolvida na empresa TMG ð Tropical Melhoramento e Genética Ltda. e no laboratório de Biotecnologia Vegetal do Instituto Agronômico do Paraná.

4.1 ESCOLHA DAS FONTES DE RESISTÊNCIA

Genótipos resistentes à ferrugem asiática da soja foram identificados com base nas informações disponíveis na literatura e também a partir de avaliações quanto à resistência dos acessos do banco de germoplasma da soja da empresa Tropical Melhoramento e Genética Ltda. Dentre os materiais avaliados, sete introduções de plantas (PIs) denominadas PI 459025 (Bing nan), PI 230970, PI 224270, PI 200456, PI 200487 (Kinoshita), PI 200526 (Shira Nuhi) e PI 471904 (Orba) mostraram-se mais promissoras e foram selecionadas para o estudo. A PI 459025 e PI 230970 já estão descritas como portadoras de gene de resistência no locus *Rpp4* e *Rpp2*, respectivamente (HARTWIG 1986; BROMFIELD; HARTWIG 1980).

Análises genéticas e moleculares foram realizadas nas populações resultantes do cruzamento de todas PIs resistentes com a cultivar de elite CD 208 que sempre foi utilizada como parental feminino. Essa cultivar possui alto valor agrônômico, porém, é suscetível à ferrugem asiática da soja.

4.2 PLANTIO DAS POPULAÇÕES

Todos os ensaios genéticos foram realizados em casa-de-vegetação, com temperatura controlada entre $25^{\circ}\text{C}/20^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, e luz natural. Foram utilizados vasos de 4 ou 8 litros. O substrato utilizado para manter as plantas nos vasos foi preparado com solo da camada superficial (até 20 cm), com pH

aproximado de 6,5 (ideal para a soja). A cada 100 litros de solo foram adicionados 30 litros de matéria orgânica (estrume de frango curtido), 20 litros de areia grossa e lavada para melhorar a aeração e fertilizante químico na formulação NPK de 00-20-20, conforme análise do solo.

4.2.1 Plantio das Populações F_2

Para o plantio das populações F_2 foram separadas 204 (102 de cada planta F_1) sementes resultantes da autofecundação das plantas F_1 de cada cruzamento. As sementes resultantes da uma mesma planta F_1 foram plantadas em seqüência, mas as populações foram distribuídas ao acaso ao longo da casa de vegetação. Os parentais de cada conjunto, bem como as sementes F_1 remanescentes foram plantados no início e no fim de cada seqüência. Em cada vaso foram semeadas quatro sementes e cada planta germinada foi identificada individualmente. A inoculação do patógeno e avaliação fenotípica quanto à resistência foram realizadas de acordo com o processo descrito abaixo. Após a avaliação a doença foi controlada com a aplicação de fungicida, as plantas F_2 foram mantidas para se autofecundarem e então colhidas e trilhadas individualmente.

4.2.2 Plantio das Progênes $F_{2:3}$

Um teste de progênie $F_{2:3}$ foi conduzido com o objetivo de confirmar o fenótipo e determinar o genótipo (homozigoto resistente, heterozigoto ou homozigoto suscetível) das plantas F_2 . Essa genotipagem é fundamental para a realização do mapeamento genético utilizando marcadores co-dominantes. Para o teste foram utilizadas 20 sementes de cada uma das plantas F_2 . Cada progênie foi semeada no mesmo vaso que estava identificado com o número de sua planta F_2 genitora.

As plantas foram inoculadas com uredosporos de *Phakopsora pachyhizi* e foram avaliadas observando-se a segregação da resistência dentro de

cada progênie. Progênies não segregantes para a resistência ou suscetibilidade indicavam plantas F_2 homozigotas resistentes ou suscetíveis respectivamente. Progênies segregantes indicavam plantas F_2 heterozigotas. Depois de feitas as avaliações a doença foi controlada e as gerações avançadas pelo método SSD.

Considerando que a resistência seja governada por um único gene, de acordo com a equação $n = \log(1-P)/\log(1-p)$, eram necessárias no mínimo 11 plantas para

o teste de progênie ser realizado com confiança. Esse número garante um nível de confiança (P) de 95% de que o evento de menor probabilidade (p) iria ocorrer ao menos uma vez. Assim, apenas as progênies com mais de 11 indivíduos foram avaliadas e portanto os dados finais foram obtidos de aproximadamente 180 plantas F_2 (variando entre as diferentes populações).

4.3 INOCULAÇÃO DO PATÓGENO (PHAKOPSORA PACHYHIZI) E AVALIAÇÃO DOS MATERIAIS PARA A RESISTÊNCIA DOENÇA

O isolado do patógeno utilizado no estudo foi obtido a partir de esporos coletados da cultivar suscetível BRSMS Bacuri durante o verão de 2004 no município de Cambé. As plantas estavam mantidas em casa de vegetação e haviam sido naturalmente infectadas pelo fungo. Essa cultivar é portadora do gene de resistência presente na cultivar FT-2, que teve a sua resistência superada durante a safra 2003/2004. Os esporos foram mantidos em nitrogênio líquido e usados para as inoculações. A inoculação do patógeno foi realizada nas plantas em estágio de desenvolvimento vegetativo V2/V3 (FEHR; CAVINESS 1977).

No dia da inoculação, uredósporos foram coletados lavando-se a superfície abaxial das folhas infectadas com água destilada e ajuda de pincel. Os uredósporos coletados foram suspensos em água destilada contendo o surfactante Tween 20 (0,02% v/v) e a solução foi ajustada para uma concentração de 50×10^3 esporos/mL e pulverizada manualmente sobre as plantas até o “ponto de gotejo”. A inoculação do patógeno foi realizada ao anoitecer, período em que as condições ambientais são mais propícias para o desenvolvimento do fungo (alta umidade e

temperaturas amenas). Durante os três primeiros dias após a inoculação, a superfície foliar das plantas foi mantida úmida através de irrigações regulares realizada por sistema de irrigação automatizado,

Aos 14 dias após a inoculação as plantas foram individualmente avaliadas visualmente de acordo com os sintomas de resistência ou suscetibilidade propostos por Bromfield (1984). Plantas suscetíveis desenvolveram o tipo de lesão castanho-claro ('tanish'-TAN) seguida de esporulação enquanto plantas resistentes apresentaram a lesão castanho-avermelhada ("reddish-brown" – RB) com pouca ou nenhuma esporulação. As figura 1 e 2 (anexo) ilustram as diferenças entre os dois tipos de lesões.

Depois de feitas as avaliações para reação à ferrugem, a doença foi controlada com o uso de fungicida (Flutriafol 125g/L, IMPACT[®], Cheminova), diluído em água destilada na proporção (0,03% v/v) e aplicado cerca de 10 mL por vaso. As plantas foram conduzidas até a maturidade para produzirem sementes.

4.4 ESTIMATIVA DO TIPO DE HERANÇA DE CADA MATERIAL

O controle genético do caráter resistência foi hipotetizado observando-se os dados da segregação das populações F_2 , e dos dados do teste de progênie $F_{2:3}$. Como as fontes de resistência são distintas, foi formulada uma hipótese de herança para cada caso. As segregações fenotípicas (F_2) e genotípicas ($F_{2:3}$) foram analisadas através do teste do qui-quadrado para verificar se as proporções observadas se adequavam a algum modelo esperado. Foi estabelecido um grau de confiança de 95%.

4.5 TESTES DE ALELISMO

Foram conduzidos testes de alelismo para o cruzamento entre a PI 224270 e PI 200456 e para o cruzamento entre a PI 230970 (fonte de *Rpp2*) e PI 224270. Para o teste entre as PI 224270 e PI 200456, 72 plantas F_2 foram avaliadas

para a resistência de acordo com o procedimento descrito acima. No teste entre as PI 230970 e PI 224270 foram avaliadas 430 plantas F_2 .

Os testes de alelismo foram realizados apenas com o intuito de verificar se o(s) gene(s) responsável pela resistência nessas PIs estava localizado no mesmo locus ou em loci diferentes. Portanto, a preocupação foi de encontrar ou não recombinantes na população F_2 e os dados foram verificados pelo teste do qui-quadrado testando-se a hipótese de 1:0.

4.6 COLETA DE FOLHAS PARA EXTRAÇÃO DE DNA

Folhas saudáveis, jovens, e sem a presença de lesões foram coletadas dos parentais e de todas as plantas das populações F_2 . As folhas coletadas foram inseridas com a devida identificação em embalagens próprias para liofilização, feitas em tela com poros finos o suficiente para permitir a saída da água, mas evitar eventual mistura dos materiais. Logo após coletadas, foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80° C.

4.7 LIOFILIZAÇÃO E MOAGEM

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

Depois de liofilizadas, as folhas foram trituradas a um fino pó em triturador A-10 mill (IKA) e armazenadas em frascos de polietileno, protegidas da umidade e mantidas em câmara fria a 10° C até que fossem utilizadas nas análises moleculares.

4.8 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA foi realizada de acordo com o método de extração de tecido foliar liofilizado proposto por Shagai-Marroof et al. (1984), com algumas modificações.

Cerca de 30 mg de amostra liofilizada foram transferidas para microtubos com capacidade para 2 mL. Foram adicionados 0,9 mL de tampão de extração [100 mM tris, pH 7,5, 700 mM NaCl, 50 mM EDTA pH 8,0, 1% (m/v) brometo de trimetil N-cetil amônio (CTBA), 140 mM β -mercaptoetanol] previamente aquecido a 68 °C. A suspensão foi incubada a 65 °C por 60 min, com agitação moderada e contínua. Após o período de incubação foi adicionado 0,45 mL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e as amostras foram gentilmente agitadas por 5 min e em seguida centrifugadas a 12.000 rpm por 10 min. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e a extração com clorofórmio repetida. Novamente transferiu-se a fase aquosa para um novo tubo contendo 2 μ L de RNase A (10 mg/mL) e as amostras foram mantidas por 30 min a temperatura ambiente. O DNA foi então precipitado com a adição de 0,6 mL de isopropanol gelado e a solução foi centrifugada a 7000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” lavado com 0,5 mL de etanol 70%. Depois de seco, o DNA precipitado foi ressuspendido em 0,1 mL de TE 1x (10 mM Tris/ 1 mM EDTA pH 7,5).

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

4.9 ANÁLISES COM MARCADORES MOLECULARES

Após a conclusão dos estudos genéticos foram realizadas as análises moleculares. Marcadores moleculares de microssatélites foram utilizados para o estudo. As marcas foram escolhidas a partir do mapa de ligação integrado da soja proposto por Song et al. (2004). Para tentar garantir uma cobertura completa do genoma, aproximadamente a cada 25 cM foram selecionados 2 marcadores. Os 20

grupos de ligação da soja foram representados. As sequências de “primers” específicos para cada marcador selecionado foram obtidas através do Soybase (2007). Os marcadores utilizados no trabalho estão listados na Tabela 1 (anexo).

Aproximadamente 180 marcadores foram testados para evidenciar polimorfismo entre os parentais resistentes e o parental suscetível. Foi estabelecido um conjunto de marcadores polimórficos para cada cruzamento. Os conjuntos de marcadores não foram necessariamente o mesmo em cada caso.

Evidências de ligação entre marcadores de microssatélites e o locus de resistência à ferrugem asiática da soja de cada PI foram obtidos através da análise de “bulks” segregantes (BSA) proposta por Michelmore et al. (1991). Foram preparados dois “bulks” para cada uma das populações F_2 , combinando-se amostras iguais de DNA de 10 indivíduos homocigotos resistentes (Bulk R) e 10 homocigotos suscetíveis (Bulk S). Os marcadores polimórficos entre os parentais de cada população foram amplificados nos “bulks”. Quando o polimorfismo evidenciado entre “bulks” mantinha o padrão observado entre os parentais, o marcador era considerado como possivelmente ligado ao gene de interesse. O padrão de amplificação de marcas ligadas e não ligadas ao locus de interesse está representado na figura 3 (anexo). Dessa forma foi delimitada no mapa de ligação integrado da soja (Song et al. 2004) a região do gene de resistência cada introdução de planta (PI).

Uma vez evidenciada a ligação, um número maior de marcadores de SSR existentes na região de cada gene foram selecionados e avaliados para polimorfismo entre os parentais. Aqueles polimórficos foram então utilizados para realizar o mapeamento genético e posicionar o locus de resistência em um ponto específico do mapa. Para tanto, os marcadores foram amplificados em todos os indivíduos, previamente caracterizados pelo teste de progênie $F_{2:3}$, das populações F_2 correspondentes. Os dados das segregações entre gene/marcador bem como marcador/marcador foram comparados para determinar a frequência de recombinação e conseqüentemente a distância genética.

4.10 AMPLIFICAÇÃO DOS LOCI DE MICROSSATÉLITES

As PCRs (“Polimerase Chain Reaction”) para amplificação dos locus de microssatélites (SSR) foram realizadas em termociclador PTC -200 (Bio-Rad). O volume final de reação foi de 20 μ L, contendo 30 ng de DNA molde, 0,25 μ M de cada primer, 0,15 μ M de cada dNTP, 1,5 U de Taq DNA polimerase, 2,5m M de MgCl₂ e 1 x PCR buffer (20 mM Tris-HCl pH 8,3; 50 mM KCl). O programa de amplificação foi composto por 1 ciclo inicial de 95°C por 3 min seguidos de 35 ciclos de 94°C por 30s para desnaturação do DNA; 55 -60°C (dependendo de T_M de cada “primer”) por 30 s para anelamento do “primer”; 72°C por 45 s para extensão do segmento. Foi realizado um ciclo final de extensão a 72°C por 10 min.

4.11 SEPARAÇÃO E VISUALIZAÇÃO DOS FRAGMENTOS

Os produtos de PCR foram separados em gel de agarose MetaPhor[®] (Lonza Bioscience) 3% ou 4% - dependendo do tamanho do fragmento de SSR descrito no mapa - preparado em tampão TBE 1x. Esse gel permite visualizar produtos que diferem em tamanho por 2%, em uma extensão de 50 pb a 800 pb. Dessa forma, por exemplo, um fragmento de DNA 200 pb pode ser separado de um fragmento de 204 pb. Os géis foram corados adicionando-se 1 μ L de solução de brometo de etídio (10 mg/mL) a cada 10 mL de solução de agarose.

A eletroforese foi realizada a uma voltagem constante de 120 V e o tempo de corrida foi de 1h e 30 min. Uma visualização prévia dos géis era feita em transiluminador UV para confirmar a amplificação dos locus e a aquisição das imagens para análise foi realizada através do scanner Typhoon (GE Healthcare).

4.12 CONSTRUÇÃO DO MAPA DE LIGAÇÃO

Antes de realizar o mapeamento genético, testes de qui-quadrado foram realizados para verificar se as segregações genotípicas dos marcadores de

microssatélites usados no mapeamento não diferiam significativamente do esperado (1:2:1). O programa MAPMAKER/EXP 3.0 (LINCOLN; LANDER et al. 1993) foi utilizado para analisar as freqüências de recombinação realizando inicialmente testes de dois pontos para identificar os loci ligados e posteriormente testes de multiponto para determinar a ordem e distância entre as marcas. Para que os dados pudessem ser analisados, tanto os dados da genotipagem da resistência feita pelo teste de progênie $F_{2:3}$ quanto da genotipagem dos indivíduos feita através dos marcadores, foram convertidos em uma planilha de acordo com a linguagem do programa. Um exemplo de genotipagem por marcadores esta representado na figura 4 (anexo) e a conversão dos dados está ilustrada na figura 5 (anexo).

O LOD score de 3.0, e a função de Kosambi com uma distância máxima de 50 cM foram utilizados para a construção do mapa de ligação. Os mapas obtidos foram comparados com o mapa de ligação consenso da soja (SONG et al. 2004).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para a identificação e mapeamento genético de genes de resistência à ferrugem asiática da soja serão apresentados nos artigos "TwoMajor Recessive Genes Conferring Rust (Phakopsora pachyrhizi) Resistance In Soybean (Glycine max L.)" e "Molecular Mapping of Asian Soybean Rust (Phakopsora pachyrhizi) Resistance Genes: New Locus and Alleles". Os artigos estão submetidos para publicação nos periódicos "Crop Science" e "Theoretical and Applied Genetics", respectivamente.

5.1 TWO MAJOR RECESSIVE GENES CONFERRING RUST (PHAKOPSORA PACHYRHIZI) RESISTANCE IN SOYBEAN (GLYCINE MAX L.)

5.1.1 Abstract

Asian soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* Sidow is currently the most threatening fungal disease in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] in the Americas. The development of resistant or tolerant cultivars is a major goal in several soybean breeding programs. Four loci, all carrying dominant alleles, that confer a resistant phenotype, have been described. We investigated the genetic basis of the resistance in two different PIs (PI 200456 and PI 224270) by crossing each of them with an Brazilian adapted susceptible parent (CD 208). Phenotypic (F_2) and genotypic ($F_{2:3}$) segregation data analysis showed that the resistance in each PIs is controlled by a single recessive gene. Allelism tests demonstrated that these genes are non-allelic. This is the first report of recessive genes controlling Asian rust resistance in soybean and may represent a new type of resistant allele for breeding programs aiming the development of more durable resistance.

Keywords: Soybean. Asian soybean rust. Rust resistance. Genetic analysis. Recessive genes.

5.1.2 Introduction

Asian rust is a very aggressive soybean disease caused by the fungus *Phakopsora pachyrhizi*. Although it was first described in Japan over 100 years ago (BROMFIELD & HARTWIG 1980) and has been reported to damage soybean crops in several countries in Asia, Australia and Africa (KOCHMAN 1977; SHARMA & MEHTA 1996; AKINSANMI et al. 2001) the disease has captured much attention from the soybean production chain after it was first reported in South America in 2001 (PAIVA & YORINORI 2002) and more recently in 2004 in North America (SCHENEIDER et al. 2005). Crop damage potential is very high if we consider that these two continents account for more than 70% of the world soybean production and the fact that the disease can cause yield losses that varies between 20 and 80% (YORINORI et al. 2005).

In Brazil, the disease was first reported in the Southern region in 2001 and rapidly moved to Central Brazil in the following year (YORINORI et al. 2005). Today it is found in all soybean production areas of the country and is controlled mainly through the spray of triazol and strobirulin based fungicides. Soybean fungicide market in Brazil has jumped from approximately US\$ 100 million to almost US\$ 800 million since the appearance of the disease (SINDAG 2006 & unpublished data and under consult rights of the participant companies). Due to its aggressiveness and the difficulties in spotting the fungus early in the epidemic cycle, farmers have a very narrow application window to control the disease. Therefore, even under fungicide applications, yield losses are frequently associated with rust occurrence. Latest estimates suggests that Asian rust has caused over US\$ 2.2 billion in economical losses during the 2006/07 growing season in Brazil (EMBRAPA SOJA 2007). In addition are the environmental issues that come with the increase in fungicide use.

One of the approaches to help solving the problem is the breeding of soybean cultivars with tolerance and/or resistance to the fungus. A key aspect to both approaches is the understanding of the genetic basis of the resistance or tolerance. Although the screening of tolerant lines has been pursued (SHIN & TSCHANZ 1986; HARTMAN 1996), there are no reports on the genetic basis of the tolerance in the literature. On the other hand, resistant *Glycine max* germplasm has been found in

several countries and the genetic basis of the resistance has been reported. In summary, four different loci (*Rpp1*, *Rpp2*, *Rpp3*, *Rpp4*) were described (MCLEAN & BYTH 1980; BROMFIELD & HARTWIG 1980; BROMFIELD & MELCHING 1982; HARTWIG 1986), all of them with dominant alleles. Moreover, studies in other pathosystems have shown that single R-gene mediated resistance is also a key component even in the polygenic, quantitative disease tolerance (LI et al. 2001).

As part of an ongoing breeding program we have been screening soybean germplasm for rust resistance and tolerance. This paper reports the genetic analysis of rust resistance in two soybean populations derived from crossing resistant vs. susceptible lines. To our knowledge this is the first case of recessive alleles leading resistance to Asian rust in soybean plant introductions.

5.1.3 Material and Methods

5.1.3.1 Plant material

As a result of a routine screening procedure in soybean exotic germplasm collection, several accessions showing either resistance or tolerance to Asian rust were identified. Two of them, named PI 200456 and PI 224270, have been identified as resistant according to our screening procedures (see below) and were crossed to the susceptible Brazilian cultivar CD 208. The F_1 seeds were obtained and two seeds of each cross combination were grown to produce the F_2 seeds.

A total of 204 (102 from each F_1 plant) F_2 seeds were sown in 8 L pots filled with a mixture of soil, manure and sand (10:3:2) in the greenhouse. Seeds from both parents as well as remnant F_1 seeds were also sown. Plants were evaluated for rust resistance and allowed to set seeds. Plants were individually trashed to obtain the $F_{2:3}$ progeny. Twenty seeds from each $F_{2:3}$ progeny and the parents were sown in the greenhouse and evaluated for rust resistance as described below.

5.1.3.2 Disease resistance screening

The rust resistance screening was performed by spraying a water solution containing 50×10^3 spores per mL supplemented with 0.02 % (v/v) of Tween 20. Spores were collected at the day of inoculation from a susceptible cultivar ('Bacuri') naturally infected with rust. The first spray was done at the V2 stage (FEHR & CAVINESS 1977) followed by two other sprays 6 and 12 days after the first one.

Fourteen days after the last inoculation, F_2 plants were individually scored as susceptible (S) or resistant (R). Susceptible plants developed the 'tanish' (TAN) type of lesions followed by sporulation, while the resistant plants showed the typical dark 'reddish-brow' (RB) lesion with no or little sporulation (BROMFIELD 1984). Phenotypic (F_2) and genotypic segregation hypothesis were tested with a Chi-Square (χ^2) test.

The inoculations were made with spores produced from greenhouse grown plants naturally infected by rust and they may not represent a specific race but rather a population or race that is occurring during the soybean season. However, the fact that the parents were grown along with the segregating population during the screening procedures ensured that no "race shift" occurred between the two evaluations (F_2 and $F_{2:3}$) performed in different time.

5.1.3.3 Allelism test

An allelism test was conducted by crossing PI 200456 and PI 224270. The F_1 seeds were planted and the resulting F_2 seeds were harvested. A total of 72 F_2 seeds were planted and the F_2 plants were screening for rust resistance as described above.

5.1.4 Results and Discussion

Resistance was scored by the presence of RB lesions. Plants with mixed (both RB and TAN) reaction types on both populations were not detected. The results on table 2 show that 53 out of 201 F₂ plants derived from PI 200456 x 'CD 208' population were resistant to Asian soybean rust. Similarly, out of 195 of the F₂ PI 224270 x 'CD 208' population, 43 developed the resistant RB lesion. The phenotypic segregation of the resistance in both F₂ populations fit a 1:3 ratio (Table 2), indicating that a recessive gene controls the resistance phenotype. This hypothesis of a single recessive gene controlling Asian soybean rust resistance in PI 200456 and in PI 224270 was further confirmed by the F_{2:3} progeny tests performed for the two populations where a 1:2:1 genotypic proportion was observed (Table 3).

Table 2 – Rust resistance phenotypic segregation analysis in two different F₂ populations. 'CD 208' was used as the susceptible parent.

Cross	N° of Plants			Expected ratio	χ ²
	R	S	Total		
PI 200456 X 'CD 208'	53	148	201	1:3	0,201 NS
PI 224270 X 'CD 208'	43	152	195	1:3	0,904 NS

Table 3 – Rust resistance genotypic segregation analysis based on progeny test (F_{2:3}) in two different populations. 'CD 208' was used as the susceptible parent.

Cross	N° of Plants				Expected ratio	χ ²
	R	H	S	Total		
PI 200456 X 'CD 208'	41	80	52	173	1: 2: 1	2,376 NS
PI 224270 X 'CD 208'	34	87	53	174	1: 2: 1	4,149 NS

Genetic studies of Asian rust resistance in soybean have been previously performed in both the cultivated *Glycine max* as well as in its wild perennial relative *Glycine canescens* (BURDON 1988). Four different loci, *Rpp1*, *Rpp2*, *Rpp3* and *Rpp4* were found in *G. max* PI 200492, PI 230970, PI 462312 and PI 459025, respectively (MCLEAN & BYTH 1980; BROMFIELD & HARTWIG 1980; BROMFIELD & MELCHING 1982; HARTWIG 1986). At least four loci were also found in *G. canescens* genome (BURDON 1988). The relationship between the resistance loci present in the *G. max* and *G. canescens* genotypes is unknown because hybrids between these two species are not fertile, but all loci, in both species, carry dominant alleles. The results shown here represent the first report of recessive alleles conferring resistant to Asian soybean rust.

Due to the economic importance of soybean, several disease resistance genes have been studied in the species (PALMER et al. 2004). Out of 45 loci encoding disease resistance genes for which gene symbols have been assigned, in only six of them α *Rxp* (*Xanthomonas campestris* pv. *glycines*); *Rpv2* (peanut mottle virus); *Rhg1*, *Rhg2*, *Rhg3* (cyst nematode) and *Rrn* (reniform nematode) α the resistance is encoded by a recessive allele. Although *rpv2* and *rrn* have not been largely used, *rxp* and *rhg1-3* alleles have been widely employed in breeding programs around the world and remain effective against its pathogens for more than 40 years.

More than 20 dominant disease resistance genes (R-genes), present in different plant species and conferring resistance to different kind of pathogens have been cloned. The characterization of these genes suggests that they all encode protein that act as receptors in triggering the disease resistance response in the cells (MCDOWELL & SIMON 2006). On the other hand, only three recessive genes have been cloned: *mlo* (BÜSCHGES et al. 1997), *edr-1* (FRYE et al. 2001) and *RRS1-R* (DESLANDES et al. 2002). They all seem to encode proteins with functional domains different from the common NBS-LRR domain present in almost all dominant R genes (CHU et al. 2004). Therefore, the recessive genes presented here may help in the understanding of the function of recessive genes in disease resistance.

Because of the recessive nature of the resistance in PI 200456 and PI 224270, we investigated whether they were allelic. As shown in table 4, the *Rpp* gene present in PI 224270 is unrelated to the one in PI 200456 since genetic

segregation was observed in the F₂ population of this cross. It will be interesting to verify if these genes are allelic to any of the four (*Rpp1*, *Rpp2*, *Rpp3*, *Rpp4*) resistant dominant genes previously reported or if they reside at a new locus.

Table 4 – Rust resistance phenotypic segregation for the F₂ population obtained by crossing PI 200456 X PI 224270.

F ₂ Population	N° of Plants			Expected ratio	χ ²
	Resistant	Susceptible	Total		
PI 200456 x PI 224270	52	20	72	1:0	5,556 *

The pathogen genotype can affect the dominance relationship of the host disease resistance genes (KOLMER 1996). By studying several host resistance-pathogen avirulence gene combinations in the wheat leaf rust pathosystem, Kolmer and Dick (1994) observed that the expression of disease resistance genes varied from completely dominant to recessive, depending if the pathogen was homozygous or heterozygous for the avirulence gene.

Also, in a study with wheat, Dyck and Samborski (1974) have shown that the genetic background may determine the type of gene action in leaf rust resistance genes. This does not appear to be the case with the *rpp* alleles presented here since we have been using this PIs as parents in our soybean breeding program and their segregation is always consistent with a recessive gene (data no shown).

One of the key issues in the development of resistant cultivars is the possibility of the pathogen to overcome the host resistance. In fact, several races of *Phakopsora pachyrhizi* have been described (YAMAOKA et al. 2002). Soybean Asian rust was first reported in Brazil over wintering in soybean plants in 2001 (PAIVA & YORINORI 2002). In the 2001/2002 growing season a small number of resistant commercial cultivars were found. Preliminary analysis of race specificity at that time using the differential soybean genotypes indicated that all previously reported *G. max* *Rpp* genes (*Rpp1*, *Rpp2*, *Rpp3*, *Rpp4*) conferred resistance to that rust “race”

(YORINORI et al. 2005). A resistance gene present in the cultivar FT-2 was also effective. However, in the following growing season (2002/2003) a new “race” that overcame the *Rpp1*, *Rpp3* and FT-2 based resistance appeared in Central Brazil. Apparently this “race” is now prevalent since we have not been able to detect RB lesions in genotypes that carry the *Rpp1* and/or *Rpp3* and FT-2 allele in our screenings.

The utilization of rust isolates obtained from single lesions should reveal if in fact a mixture of races occurs in Brazil, especially in the inoculum used during this study. Nevertheless, the fact that a monogenic segregation to the resistance and no mixed (RB/TAN) lesion types were observed in homozygous resistant plants suggests that, if the inoculum is comprised by a mixture of races, these races are very similar since they are behaving identically on the genotypes used in the present study.

It seems that the Asian soybean rust fungus has an ability to accumulate genes for virulence (BONDE et al. 2006). It will be interesting to compare the response of the recessive and dominant genes across a diversity of isolates obtained in Brazil and in countries where the disease have been present for a long period, such as Japan, Australia and China. This will also shed some light whether the recessive alleles reported in this paper may represent a more durable source of resistance. At least in some pathosystems the recessive R-genes appear to confer durable broad-spectrum disease resistance (DESLANDES et al. 2002). In spite of it, the new genes described here shall contribute to the development of rust resistant soybean varieties.

5.2 MOLECULAR MAPPING OF ASIAN SOYBEAN RUST (PHAKOPSORA PACHYRHIZI) RESISTANCE GENES: NEW LOCUS AND ALLELES

5.2.1 Abstract

Soybean production in South and North America has recently been threatened by the widespread dissemination of Soybean Rust (SBR) disease caused by the fungus *Phakopsora pachyrhizi*. Currently, chemical spray containing fungicides is the only effective method to control the disease. This strategy increases production costs and exposes the environment to higher levels of fungicides. As a first step towards the development of SBR resistant/tolerant cultivars, we studied the genetic basis of SBR resistance in five F₂ populations derived from crossing the Brazilian-adapted susceptible cultivar CD 208 to each of five different plant introductions (PI 200487, PI 200526, PI 230970, PI 459025, PI 471904) carrying SBR-resistant genes (*Rpp*). Molecular mapping of *Rpp* genes was performed in three of these PIs (PI 459025, PI 200526, PI 471904), and also in two other PIs (PI 200456 and 224270) carrying recessive genes. The genetic mapping strategy allowed us to map two genes present in the original sources of *Rpp2* and *Rpp4* of the previously described *Rpp* genes in soybean to linkage groups (LG) J and G, respectively, of the soybean consensus molecular map. Moreover, a new SBR resistance locus, *rpp5* was mapped in the linkage group LG-N. Together, the genetic and molecular analysis suggested that multiple alleles or closely linked genes that govern SBR resistance exist in soybean.

Keywords: Soybean. Soybean rust. Rust resistance. Genetic analysis. Molecular mapping.

5.2.2 Introduction

Soybean rust (SBR) caused by *Phakopsora pachyrhizi* is considered to be the most destructive foliar disease in soybeans (MILES 2003). The disease is disseminated through urediniospores carried by the wind and can develop rapidly, causing loss of foliar area and a severe reduction in grain yield.

SBR disease was reported for the first time in 1902 in Japan, and was then described in other parts of Asia and Australia in 1934 (KOCHMAN 1977), India in 1951 (SHARMA & MEHTA 1996), Hawaii in 1994 (KILLGORE & HEU 1994), and Africa in 1996 (AKINSANMI et al. 2001). In South America, the disease was first reported in 2001 in Paraguay (PAIVA & YORINORI 2002) and Brazil (YORINORI et

al. 2005), and in the following years, reached Argentina, Bolivia and Colombia (ROSSI 2003). These authors estimated that the disease caused yield losses varying from 10 to 80 %. In the United States, the disease appeared for the first time in November 2004 (SCHNEIDER et al. 2005), but environmental conditions have proven to be unfavorable to fungus growth and therefore, considerable crop damages have been avoided so far (SCONYERS et al. 2006).

Phakopsora pachyrhizi development is favored by a temperature range of 15 to 29°C and high humidity. Under these conditions, disease symptoms can be detected between 5 and 8 days after infection (MARCHETT et al. 1976; MELCHING et al. 1989). Lesions initially show a polygonal shape measuring 2 to 5 mm and are tan colored. After 10-14 days, the reproductive structures appear on the abaxial face of the leaf. These are characterized by volcano-shaped growths, known as uredinia, where the urediniospores are produced (MARCHETT et al. 1975). The disease progression culminates with premature defoliation.

Although fungicide applications are able to reduce losses in yield, the use of resistant or tolerant cultivars is seen as the best alternative for disease control due to factors such as reductions in cost, management facility and environmental concerns. Resistance to *Phakopsora pachyrhizi* occurs naturally in species of the genera *Glycine* and is conferred by a hypersensitive reaction (HR). This is a common type of response triggered when plant resistance genes (R-genes) are challenged by pathogen avirulence genes (Avr- genes) (McDOWELL & SIMON 2006). Resistant genotypes show red-brown (RB) lesions and a spectrum ranging from no to high levels of sporulation can occur depending on the genotype. Susceptible genotypes are characterized mostly by light brown (TAN) lesions with profuse sporulation.

Resistance genes have also been described in cultivated soybeans (*Glycine max*). Presently, four different loci carrying dominant alleles have been reported: *Rpp1* identified in PI 200492 (McLEAN & BYTH 1980), *Rpp2* from PI 230970 (BROMFIELD & HARTWIG 1980), *Rpp3* (PI 462312) (BROMFIELD & MELCHING 1982) and *Rpp4* (PI 459025) (HARTWIG 1986). An immune response has also been described for PI 200492 when it is inoculated with a particular type of *P. pachyrhizi* isolate (BONDE et al. 2006).

Although the use of resistance genes may offer an opportunity for disease control in soybeans, their "race specific" nature may pose problems

(YAMAOKA et al. 2002; BONDE et al. 2006). For instance, in 2001 when SBR occurred for the first time in Brazil, all four of the resistance genes were effective against the disease, but in the following year, only *Rpp2* and *Rpp4* conferred resistance (YORINORI et al. 2005). Therefore, the discovery of new resistance genes is vital and stacking multiple resistance genes in a single cultivar (pyramiding) (LIU et al. 2000) could contribute to the sustainable development of SBR resistant cultivars.

The use of molecular markers is an effective tool for gene identification and transfer (TANSKLEY 1983; TANSKLEY & MCCOUCH 1997), and can speed up the development of soybean cultivars carrying single or multiple resistance genes. Soybeans have a reasonably dense molecular-marker linkage map (SONG et al. 2004), and the association of markers to known genes has been pursued by many groups. Molecular mapping of *Rpp* genes in soybeans has previously been reported. Brogin et al. (2004) identified Single Sequence Repeat (SSR) markers linked to rust resistance in the linkage group (LG)-C2, but unfortunately the locus could not be identified. More recently, the same region has been found to confer resistance in the cultivar Hyuuga (MONTEROS et al. 2007), and the *Rpp1* locus has been mapped to LG-G (HYTEN et al. 2007).

The current study analyzed the genetic basis of SBR resistance in five distinct soybean genotypes. Three genes behaved as dominant genes and one showed incomplete dominance. The fifth genotype showed segregation distortion and the SBR resistance could not be determined. Molecular mapping of the SBR resistance genes in these populations as well as in two other populations carrying recessive resistance genes allowed us to identify at least three distinct loci conferring rust resistance in soybeans.

5.2.3 Materials and Methods

5.2.3.1 Plant Material and Genetic Analysis

Genetic analysis was performed in five populations obtained by crossing a rust resistant parent with a susceptible parent. The resistant genotypes

were chosen based on information in the literature, as well as on our preliminary allelism tests. The genotypes selected were: PI 200487 (Kinoshita), PI 200526 (Shira Nuhi); PI 230970, PI 459025 (Bing nan) and PI 471904 (Orba). PI 200487, PI 200526 and PI 230970 were collected in Japan in 1952, 1952 and 1956, respectively. PI 459025 was collected in China in 1981 and PI 471904 was collected in Indonesia in 1982. PI 230970 and PI 459025 were previously described as having dominant genes at the *Rpp2* and *Rpp4* loci, respectively (BROMFIELD & HARTWIG 1980; HARTWIG 1986). The susceptible parent in every cross was the cultivar CD 208 and it was always used as the female parent. In spite of the large morphological differences of the exotic genotypes when compared with the Brazilian-adapted cultivar, the hybrid nature of the F₁ was confirmed by molecular marker analysis.

A portion of the F₁ seeds were planted and allowed to set seeds. Two hundred and four F₂ seeds from each cross were sowed (four plants per pot) in the greenhouse along with the parents and the remaining F₁ seeds. Experiments were performed during September 2005 (F₂ populations) and March 2006 (F_{2:3} progeny test). F₂ plants were inoculated with *Phakopsora pachyrhizi*, as described below. After phenotype scoring, the plants were sprayed with fungicide (Flutriafol 125g/L, IMPACT[®], Cheminova) and allowed to set seeds. A progeny test was performed in F_{2:3} plants in order to confirm the phenotype and assign the genotype of the F₂ plants. Since a minimum of 11 plants (calculated according to the equation $n = \frac{\log(1-P)}{\log(1-p)}$) were needed to perform the progeny test with an acceptable confidence level (P 0.95), final data was obtained for approximately 180 F₂ plants (varying with different populations). A Chi-Square (χ^2) test was performed using the data set to verify whether the genetic segregation fit any expected model. Molecular analysis was conducted only for tested progeny F₂ plants. Two other populations studied by Éberson Sanches Calvo, Ph.D. (TMG Tropical Melhoramento e Genética Ltda., Brazil) were kindly given to us and were also used in molecular analyses. These populations carry recessive resistance genes and were obtained by the cross between resistant parents (PI 200456 and PI 224270) and the susceptible parent 'CD 208'.

An allelism test was conducted only on the cross between PI 224270 and PI 230970. F₁ plants were self-crossed and 430 F₂ seeds were planted and evaluated for rust resistance as described below.

5.2.3.2 Phakopsora Pachyrhizi Inoculation and Phenotyping

The isolate used in this study was obtained by collecting spores from naturally infected greenhouse plants of the susceptible cultivar BRSMS Bacuri, during the summer of 2004 in Cambé-PR, Brazil. This cultivar carries a rust resistance gene from 'FT-2' that had its resistance broken during the summer of 2003, shortly after the first appearance of the disease in Brazil (winter of 2001). Samples of the original isolate have been maintained in liquid N₂ (available upon request) and were used to infect greenhouse plants ('BRSMS Bacuri'). Since the isolate did not originate from a single lesion, it is possible that it represents a mixture of more than one race. Therefore, all multiplications of the isolate, as well as screening procedures, were monitored for the appearance of mixed (TAN and RB) types of lesion. Currently, no mixed lesion types have been observed in our greenhouse inoculations.

Phenotypic data from F₁, F₂ and F_{2:3} plants were obtained by spraying the plants in the V3 developmental stage (FEHR & CAVINESS 1977) with an aqueous solution containing 50x10³ *P. pachyrhizi* urediniospores per mL and Tween 20 (0.01% v/v). Urediniospores were collected from the abaxial leaf face of the susceptible cultivar BRSMS Bacuri by simply washing the leaf surface with water. Plants were sprayed with the spore solution at the end of the day, between 5:00 and 7:00 pm, and were kept in the greenhouse under 25°C/20°C ± 3°C night/day temperature and natural light. During the first three days after inoculation, the leaf surface was kept wet by regular spraying (mist) with an automated irrigation system.

Two weeks after inoculation, the plants were scored for the presence of disease or resistance symptoms. Plants were considered resistant when they showed a red-brown (RB) lesion type and susceptible if they showed a TAN lesion. After scoring, plants were sprayed with fungicide (Flutriafol 125g/L, IMPACT[®], Cheminova) to control the disease and were grown to maturity.

5.2.3.3 DNA Isolation

Healthy leaf tissue was collected from the parents and F₂ plants. Tissue was frozen in liquid nitrogen, freeze-dried, and ground to a fine powder with an A-10 mill (Janke & Kunkel IKA). DNA was extracted from the resulting powder using the protocol described by Shagai-Marroof et al. (1984).

5.2.3.4 Marker Analysis

SSR markers were used for mapping studies. In order to ensure complete genome coverage, markers were chosen based on their distribution throughout the integrated molecular linkage map of soybean (SONG et al. 2004). The sequence for each specific primer chosen for the study was retrieved from Soybase (2007). Each SSR marker was tested for polymorphism between the parental lines.

Linkage of a SSR marker to the resistance trait in each F₂ population was initially obtained through bulk analysis according to the methods of Michelmore et al. (1991). Two different bulk groups were formed for each of the seven populations studied. The bulk groups were obtained by pooling an equal amount of DNA from 10 different homozygous plants, which were either resistant (Bulk R), or susceptible (Bulk S) to SBR. Polymorphic SSR markers were tested and those markers that showed a polymorphic pattern between the R and S bulks were considered to be potentially linked to the resistance gene and were further evaluated within individual F₂ plants from the corresponding bulk groups. Once a linkage event was confirmed, the segregation of a new set of SSR loci in the same genomic region was evaluated in the entire F₂ population in order to locate the resistance locus on the map to a finer degree.

PCRs were performed in a PTC-200 (Bio-Rad) thermocycler in a 20 µL reaction containing approximately 30 ng of template DNA, 0.25 µM of each primer, 0.15 µM dNTPs, 1.5 U of Taq DNA polymerase, 2.5 mM MgCl₂ and 1x PCR buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.3; 50 mM KCl). Amplification cycling conditions were: an initial cycle of 95 °C for 3 min followed by 35 cycles of 94 °C for 30 s for primer

denaturing; 55–60 °C (depending on the annealing temperature of each primer pair) for 30 s for primer annealing; 72 °C for 45 s for primer extension and a final cycle at 72 °C for 10 min. PCR products were fractionated in a 3–4 % MetaPhor (Lonza Bioscience) agarose gel and stained by adding 1 µL of ethidium bromide solution (10 mg/mL) to every 10 mL of gel solution. Gel images were obtained with a Typhoon (GE Healthcare) scanner.

5.2.3.5 Linkage Analysis

The phenotypic SBR response was converted to data suitable for mapping according to the resistance gene action on each PI (dominant or recessive). The resistance in the incomplete dominance case was considered to be dominant. The data was based on the genotyping (homozygous dominant, recessive or heterozygous for the resistance) of the F₂ individuals with the F_{2:3} test.

Before mapping, a Chi-Square (χ^2) test was performed on the dataset to determine whether or not the markers were segregating according to expectations

(1:2:1 ratio). All markers segregated correctly (data not shown). MAPMAKER/EXP 3.0 (LINCOLN & LANDER 1993) was used for linkage analysis and map construction. A LOD score of 3.0 and Kosambi's mapping function with a maximum of 50 cM distance threshold were used for linkage confirmation. The maps obtained were compared to the soybean consensus map (SONG et al. 2004).

5.2.4 Results

5.2.4.1 Inheritance of rust resistance

The results of rust resistance segregation for the different F₂ and F_{2:3} populations are shown in table 5. The segregation ratios for the PI 459025 population

are suggestive of the presence of a single dominant gene. This PI is the source of *Rpp4*, as previously reported (HARTWIG 1986) and it is possible that the gene present in this population is indeed *Rpp4*. However, due to the fact that the *P. pachyrhizi* isolate used for our resistance screening was different from those isolates used by Hartwig (1986), the SBR resistance gene found in this PI may represent a locus unrelated to *Rpp4*. The segregation ratios in F₂ and F_{2:3} also indicate that a single dominant gene is responsible for resistance in the PI 200487 and PI 200526 populations.

Close inspection of the phenotypic segregation for PI 459025 and PI 200526 shows that the data also fits the 13:3 ratio ($\chi^2 = 0.22$; $P > 0.05$ and $\chi^2 = 2.583$; $P > 0.05$, respectively). These results indicate the epistatic action of two independent genes. However, the BSA data (see below) for these populations, as well as for all other populations showed that only one genomic region was involved in resistance. In addition, a previous allelism test between PI 200526 and PI 200487 (data not shown) did not show any evidence of a second gene. For these reasons, we discarded the possibility that two independent genes are involved in disease resistance in these PIs.

Genetic segregation for the PI 471904 population also suggested the presence of a single gene based on the F_{2:3} progeny test (Table 5). However, unlike the other three PIs (PI 459025, PI 200487 and PI 200526), this population showed a phenotypic segregation in the F₂ plants of 103 R: 91 S that fits into a 1:1 ratio. This can be explained by the presence of incomplete dominance at this locus.

The data for PI 230970, which has been previously described to carry a dominant allele at the *Rpp2* locus (BROMFIELD & HARTWIG 1980) showed a distorted segregation pattern that did not fit a 3:1 (Table 5), a 9:7 ($\chi^2 = 6,895$; $P < 0,05$) or any other clear ratio. Therefore, we could not conclusively determine the genetic basis of SBR resistance inheritance in this population.

Table 5 – Phenotypic and genotypic segregation from populations derived by crossing different resistant parents with the susceptible parent ‘CD 208’

Resistant parent	F ₂ Test					F _{2:3} Test					
	N° of Plants					N° of Plants					
	R	S	Total	Expected ratio	χ ²	R	H	S	Total	Expected ratio	χ ²
PI 200526 (Shira Nuhi)	156	47	203	3:1	0.369	48	85	44	177	1: 2: 1	0.458
PI 200487 (Kinoshita)	150	49	199	3:1	0.015	45	69	36	150	1: 2: 1	2.040
PI 459025 (Bing nan)	158	43	201	3:1	1.395	53	88	34	175	1: 2: 1	4.131
PI 471904 (Orba)	103	91	194	1:1	0.742	39	101	34	174	1: 2: 1	4.793
PI 230970	123	64	187	3:1	8.487*	19	108	73	200	1: 2: 1	30.44*
PI 200456**	53	148	201	1:3	0.201	41	80	52	173	1: 2: 1	2.376
PI 224270**	43	152	195	1:3	0.904	34	87	53	174	1: 2: 1	4.149

*, statistical significance of the Chi- square value (p=0,05) **, **, population also used in the study by Éberson Sanches Calvo, Ph.D. ∅ TMG Tropical Melhoramento e Genética Ltda., Brazil.

5.2.4.2 Linkage Search

The number of primers evaluated for each population and the polymorphism frequencies are shown in table 6. In the PI 459025 population that carries a dominant resistance gene and is the original source of *Rpp4* locus (HARTWIG, 1986), the BSA analysis only showed linkage with molecular markers from linkage group G. Since a *Phakopsora pachyrhizi* isolate different from the one used by Hartwig (1986) was used in the present study, we can not be certain that the locus identified here is indeed *Rpp4*. Therefore, we are temporarily designating this locus as RppG.

Table 6 – For each cross, the correspondent allele, the number of SSR loci tested, the percentage that were parentally polymorphic, the number of SSR used for map construction and the number of individuals genotyped in the mapping.

Resistant Parent x 'CD 208'	<i>Rpp</i> allele	N° of SSRs tested	% of Polymorphic SSRs	N° of markers used for mapping	N° of individuals used for mapping
PI 224270	<i>rppJ</i>	177	38	10	174
PI 230970	<i>RppJ</i>	175	36	-	-
PI 459025 (Bing nan)	<i>RppG</i>	169	41	06	175
PI 200456	<i>rppN</i>	182	40	08	173
PI 200526 (Shira Nuhi)	<i>RppN</i>	192	43	04	177
PI 200487 (Kinoshita)	<i>RppN</i>	190	42	-	-
PI 471904 (Orba)	<i>RppN</i>	177	40	06	174

The populations derived from the crosses with PI 230970 (*Rpp2*; BROMFIELD & HARTWIG 1980) and PI 224270 showed evidence of linkage to the same group of markers located in a region of linkage group J. Therefore, we decided to perform an allelism test between these two PIs to provide further evidence for this result. As shown in table 7, no segregation occurred in the F₂ progeny of the cross PI 224270 X PI 230970, indicating that the SBR resistance in these two cultivars is conferred by alleles of the same locus (possibly *Rpp2*). We designated the resistance allele in PI 224270 as *rppJ* since this PI carries a recessive SBR resistance gene. Due to the segregation distortion observed in the cross 'CD-208' X PI 230970 (Table 5), this population was not used for mapping purposes. Instead, we chose to use the population derived from the cross 'CD-208' X PI 224270 for mapping analyses.

Table 7 – Results of the allelism test performed between PI 230970 (*Rpp2*; Bromfield and Hartwig 1980) and PI 224270.

Cross	N° of Plants			Expected Ratio	χ^2
	R	S	Total		
PI 230970 x PI 224270	430	0	430	1:0	0.000 NS

Resistance in all the remaining PIs evaluated (PI 200456, PI 200487, PI 200526 and PI 471904) was associated with primers that mapped to a specific genomic region from linkage group N. Preliminary allelism tests indicated that PI 200487 and PI 200526 carry the same allele (data not shown). Since the population derived from PI 200526 had a larger number of individuals, this population was chosen for mapping. PI 200456 and PI 471904 were also selected for mapping due to the distinct (recessive and incomplete dominance, respectively) nature of the resistance genes and because no allelism tests were available for these two parents.

5.2.4.3 Genetic mapping

Molecular mapping was performed after genotyping individual F_2 plants from each population. The number of SSR markers and individuals used for mapping, as well as the corresponding *Rpp* locus (if any) is shown on table 6.

The resistant *RppG* locus from PI 459025 (original source of *Rpp4*) was mapped at 2.8 cM from Satt288 and 31.3 cM from Satt191 in linkage group G (Figure 6). Based on the consensus map (SONG et al. 2004), other SSR markers exist in this interval but unfortunately they were not polymorphic in this population. The agreement with the consensus map was verified further by mapping three other SSR markers (Sat_199, Satt517 and Sat_143) in the vicinity. As shown in figure 6, the order of the markers is in good agreement with the consensus map.

The recessive gene from PI 224270, which is a possible recessive allele of *Rpp2*, was mapped to linkage group J between the SSR loci Satt215 (4.3 cM) and Sat_361 (4.7 cM), as shown in figure 7. The recessive gene from PI 200456, the dominant gene from PI 200526 (Shira Nuhi) and the incompletely dominant gene from PI 471904 (Orba) all mapped to the same region in linkage group N of the soybean consensus map, although the distances between the SSR loci varied among the three populations (Figure 8). The gene from PI 200456 was mapped at

1.6 cM from primer Sat_275 and 7.2 cM from primer Sat_280, while in the PI 471904 (Orba) population, these distances were 0.6 cM and 3.6 cM and 4.3 cM and 6.5 cM for the PI 200526 (Shira Nuhi) population. Since no allelism tests are available for these populations, we cannot conclusively determine if they are alleles

of the same locus or closely linked genes. For the purposes of this paper, this locus will be temporarily referred to as RppN.

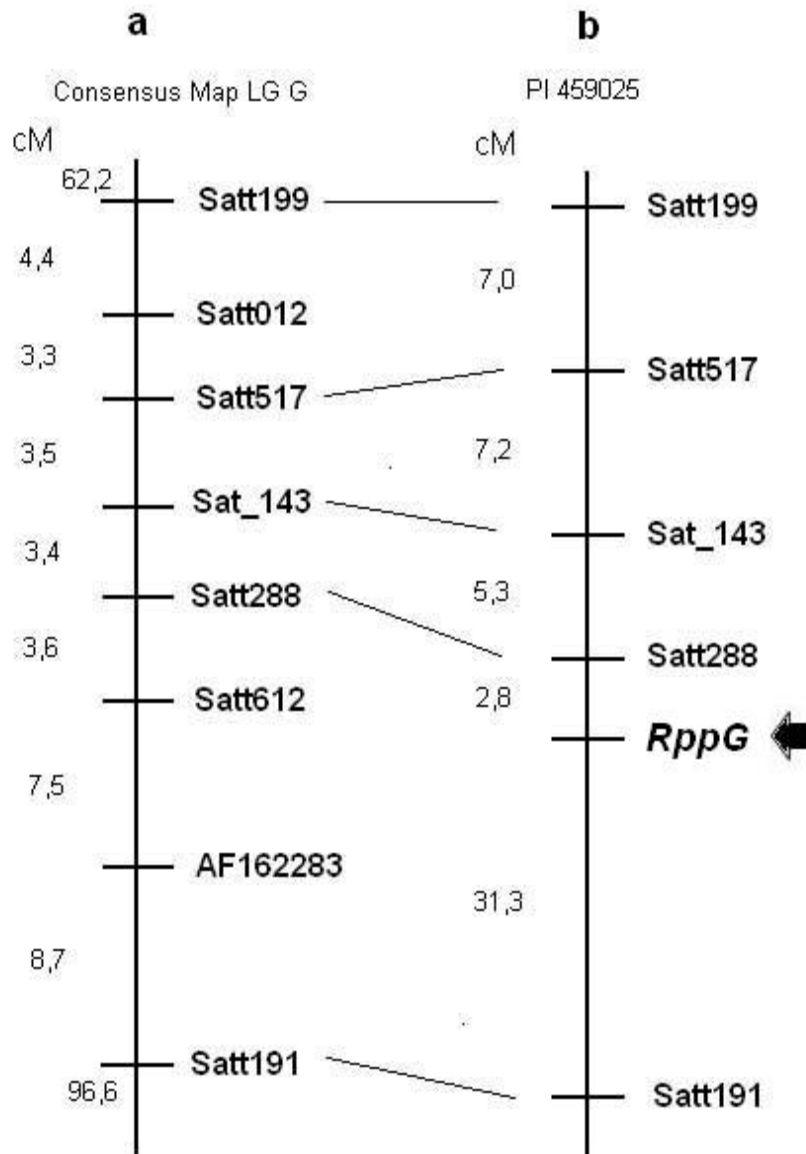


Figure 6 – Genetic linkage map constructed with SSR markers. a represents a fragment of the consensus soybean linkage group G (Song et al. 2004). b illustrates the map derived from the F₂ population ‘CD 208’ X PI 459025. The lines indicate the corresponding position of the markers between the two maps. The arrow shows the position of the soybean rust resistance gene RppG. The genetic distances (cM) are shown on the left side. Only the markers closest to the gene are shown in the figure.

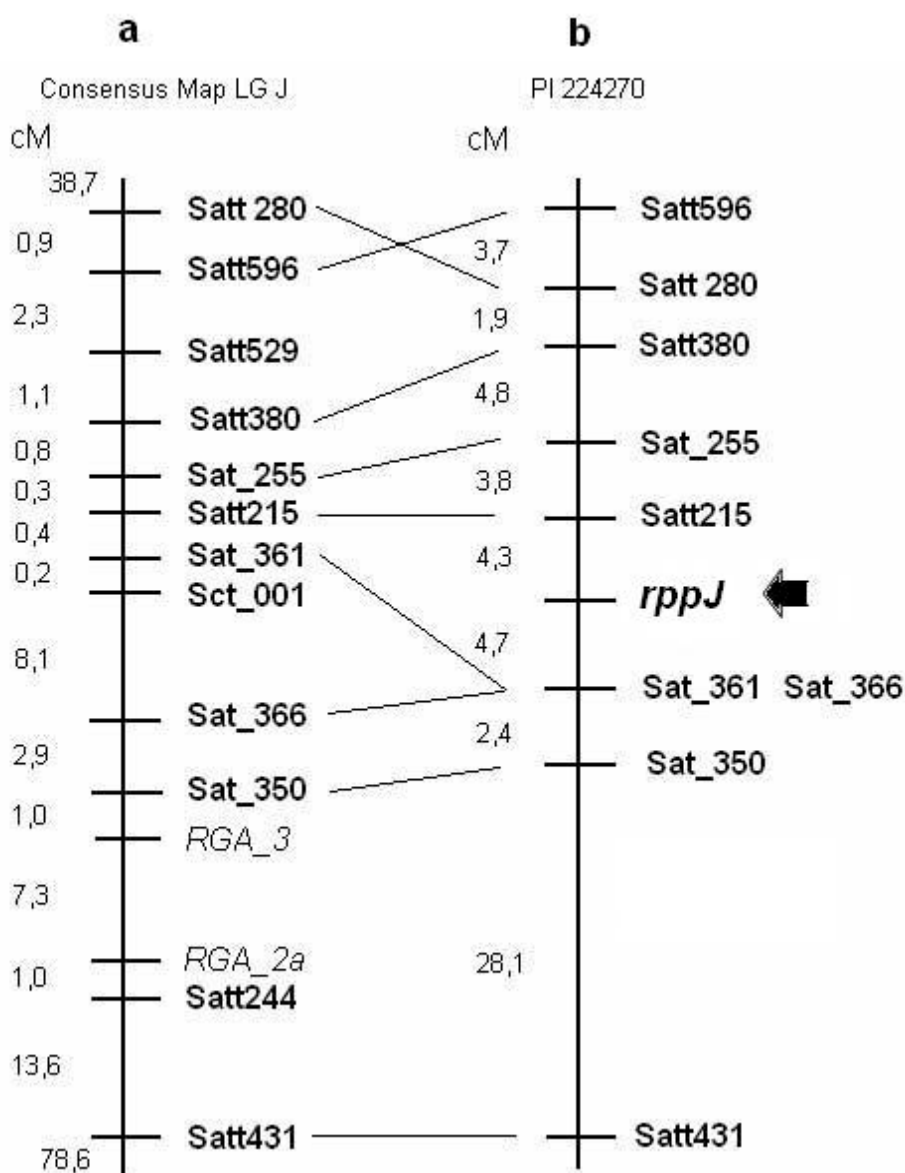


Figure 7 – Genetic linkage map constructed with SSR markers. a represents a fragment of the consensus soybean linkage group J (Song et al. 2004). b illustrates the map derived from the F_2 population 'CD 208' X PI 224270'. The lines indicate the corresponding position of the markers between the two maps. The arrow shows the position of the soybean rust resistance gene *rppJ*. The genetic distances (cM) are shown on the left.

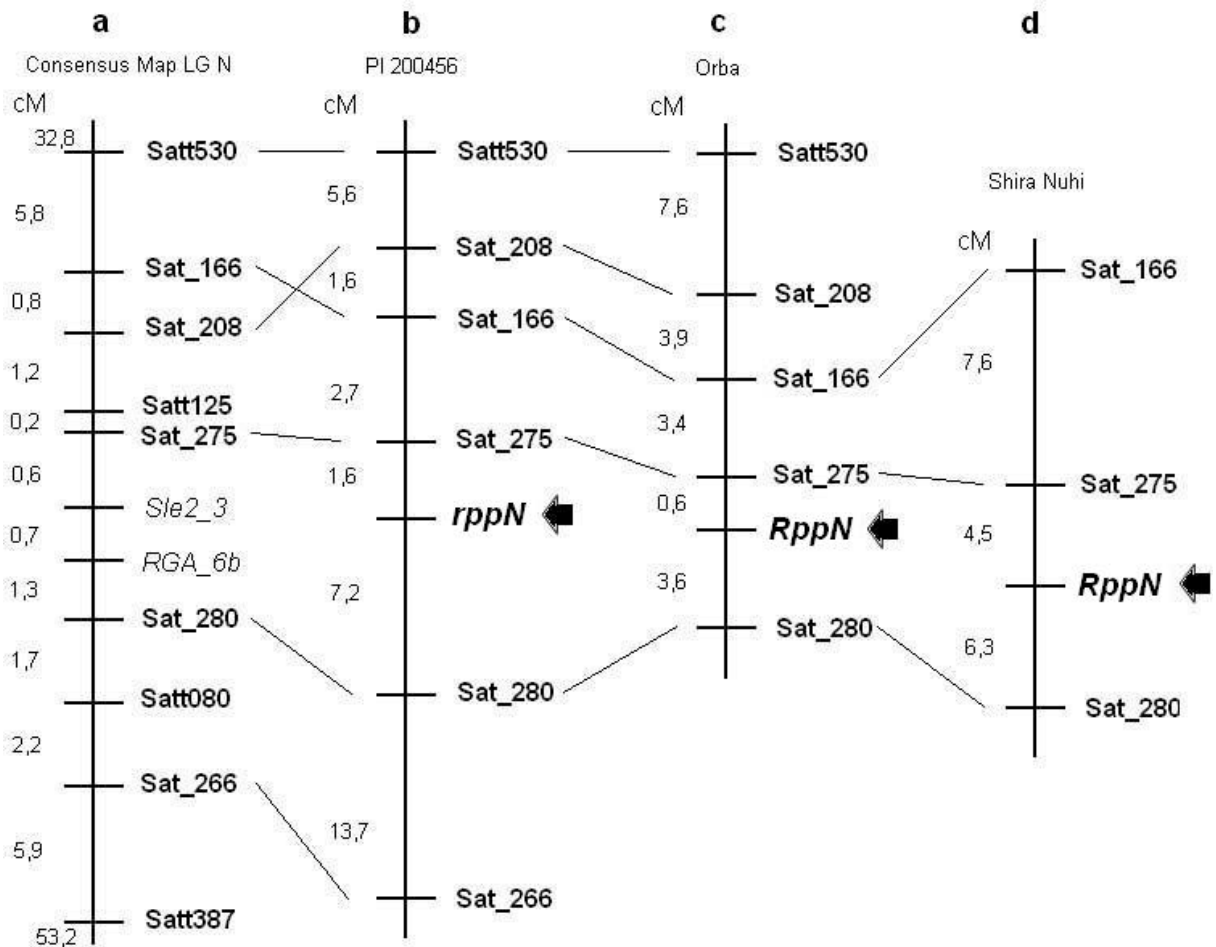


Figure 8 – Genetic linkage map constructed with SSR markers. a represents a fragment of the consensus soybean linkage group N (Song et al. 2004). b illustrates the map derived from the F_2 population ‘CD 208’ X PI 200456. c shows the map derived from the F_2 population ‘CD 208’ X PI 471904 (Orba). d illustrates the map derived from the F_2 population ‘CD 208’ X PI 200526 (Shira Nuhi). The lines indicate the corresponding position of the markers between the four maps. The arrows show the position of the soybean rust resistance genes. The genetic distances (cM) are shown on the left.

The maps created from the five populations (PI 200456, PI 200526, PI 224270, PI 459025 and PI 471904) differ with regard to the distances between each marker in each population and from the consensus map created by Song et al. (2004). A phenotypic mistake during the SBR resistance screening or a genotypic error for the SSR screening could account for these differences. However, control maps were constructed removing either the *Rpp* genes or each SSR marker used for the mapping on an individual basis, and the results remained almost the same. For this reason, we discarded the possibility of mistakes being made during map

construction. Rather, similarities between parental genotypes, population sizes, differences in the frequency of recombination among the populations, and the different number of markers used for mapping each population (see table 6) are some of the reasons that could account for the observed variance. Hyten et al. (2007) and Monteiro et al. (2007) also found differences in the distance and order of markers between the soybean consensus map and the maps made for the rust resistance genes.

The soybean consensus map (SONG et al. 2004) is based on a JoinMap analysis of five distinct map populations. The JoinMap (VAN OOIJEN & VOORRIPS 2001) combined the data from map populations where not all the markers are in common in order to obtain combined estimates of recombination. The genotypic data from each individual population used to create the consensus map also shows a high level of discrepancy with regard to the distance and order of the markers in each population (CREGAN et al. 1999; SONG et al. 2004). The variation in distance and order of markers in the consensus map is likely to be caused by the discrepancies in the JoinMap analysis of multiple populations.

5.2.5 Discussion

SBR is currently the most damaging disease for soybean production in Brazil. As a first step towards the development of long lasting SBR rust resistant soybean cultivars, we are carrying out studies to increase our understanding of the genetic basis of this trait. Since *Rpp1* and *Rpp3* do not confer resistance to the *P. pachyrhizi* “race” used in our study, we were unable to conduct genetic and mapping studies for these loci.

PI 230970 is the source of the *Rpp2* reference allele initially described by Bromfield and Hartwig (1980). We were not able to confirm the presence of a single resistance gene because the segregation of the PI 230970 derived population did not fit any clear ratio. Difficulties in the genetic analysis of rust resistance have been previously reported (BURDON 1988). We currently do not have a clear explanation for this discrepancy. One possibility may be that we worked with a

different isolate from the ones (India-73-1; Philippines-77-1 and Taiwan-72-1) used by Bromfield and Hartwig (1980). Moreover, distinct genetic behavior of rust resistance genes has been reported in wheat when challenged with different rust isolates and different conditions, including temperature and genetic background (KOLMER et al. 1996).

The allelism test between PI 230970 and PI 224270 indicated that the SBR resistance genes are located in the same locus and the *rppJ* allele from PI 224270 was mapped to LG-J. Interestingly, this genomic region also hosts several other disease resistance genes including *Rps2*, *Rmd* and *Rjs2* (POLZIN et al. 1994), *Rbs1*, *Rbs3*, *Rcs3* and QTLs for cyst nematode resistance (SOYBASE 2007).

We detected a single genomic region in LG-G associated with resistance in PI 459025 (source of *Rpp4*). Although the Chi-Square test also fits the ratio for two independent loci controlling SBR resistance in PI 459025, we were unable to detect two genomic regions associated with the trait using our BSA approach. Since the consensus molecular map (SONG et al. 2004) that we used to select evenly distributed markers also has errors associated with the distances between markers, we cannot be certain that we have complete genomic coverage in our evaluation. Nevertheless, we think that this is unlikely due to the number of markers used in the analysis that were apparently located less than 30 cM apart from each other, and therefore, these markers would likely be within the 25 cM limit of linkage detection suggested by Michelmore et al. (1991). Taking the genetic and mapping data together, our data indicate that a single dominant locus controls SBR resistance in PI 459025, as proposed by Hartwig (1986). Recently, the *Rpp1* locus was also mapped to this same linkage group, although in another genomic region (HYTEN et al. 2007).

Since we have used a different isolate from the one used by Bromfield and Hartwig (1980) and Hartwig (1986), we cannot rule out the possibility that the SBR resistance genes mapped in PI 224270 and PI 459025 are allelic to *Rpp2* and *Rpp4*, respectively. However, for the time being, we have designated the loci present on these PIs as *rppJ* and *RppG*, respectively. Kato and Yorinori (2006) have studied the virulence of eight single lesion rust isolates collected from different parts of Brazil. Although they were able to show pathogenic differences among the isolates upon their inoculation into 14 different genotypes (including PI 230970, PI

459025, PI 200492 and Shira Nuhi), all of the isolates behaved identically (RB lesion) in PI 230970 (*Rpp2*), PI 459025 (*Rpp4*), and Shiranui (*RppN*). Therefore, the virulence diversity of the isolates was more related to the *Rpp1* (PI 200492) and *Rpp3* ('Ankur') loci, that had their resistance broken in Brazil during the summer of 2003.

SBR resistance in three different PIs (PI 200525 \times Shira Nuhi, PI 471904 \times Orba, and PI 200456 showing three distinct types of gene action (dominance, incomplete dominance and recessive) mapped to the same genomic region of LG-N.

These data, along with our discovery of the *rppJ* allele in PI 224270 and PI 230970 (source of *Rpp2*) have led us to speculate that there are multiple alleles or closely linked genes at the LG-N and LG-J SBR resistance loci. We are currently conducting allelism tests in very large F_2 populations to confirm this hypothesis.

Indirect evidence that different alleles of the same (or closely linked) locus may confer distinct resistance properties has been provided by a recent publication by Monteros et al. (2007). These authors were able to map the SBR resistance locus present in the cultivar Hyuuga to the same genomic region that Brogin et al. (2004) mapped the SBR resistance locus of the cultivar FT-2 to LG-C2. In our screenings 'Hyuuga' confers a RB type lesion while 'FT-2' is completely susceptible to the SBR race prevalent in Brazil.

It will be interesting to see whether the different alleles behave differently when challenged with distinct rust isolates or on different genetic backgrounds. The diversity in *Rpp* genes revealed by the gene action types also explains some of the variation that we see in the performance of the sources of resistance. Although all of the resistant germplasm carrying *Rpp* genes triggers a HR response, the intensity of the reaction and the behavior through the developmental stage of the plant vary considerably among the different genotypes (Bonde et al. 2006).

Since *Rpp1* (HYTEN et al. 2007), *rppJ*, present on the original source of *Rpp2*, and *RppG*, present on the original source of *Rpp4*, have been mapped to different genomic regions, the locus mapped here in LG-N could potentially be a new locus. In support of this hypothesis is the fact that the resistance

reported for *Rpp3* was effective in Brazil at the same time as Brogin et al. (2004) mapped the resistance found in cultivar FT-2 at LG-C2, and the resistance was also overcome in both genotypes at the same time. Therefore, it is possible that the locus at LG-C2 is indeed *Rpp3*. We propose that this locus should be designated *rpp5* in PI 200456.

In spite of being closely linked genes or alleles of the same gene, the existence of the new alleles reported here provide novel genetic variability for breeding programs in order to develop rust resistant soybean cultivars. From a plant breeding perspective, one important issue regarding rust resistance is its duration in the field. Although some rust resistance genes have lasted over 20 years in barley, this is not always the case. For instance, wheat leaf rust resistance conditioned by single race-specific genes in Brazil does not last more than two years on average (BARCELOS et al. 1997). The fact that the resistance conferred by the *Rpp1* and *Rpp3* loci has been simultaneously broken only two years after the first appearance of SBR in Brazil illustrates the difficulties associated with breeding for SBR rust resistance.

However, unlike *Rpp1* and *Rpp3*, the *Rpp2* and *Rpp4* loci remain effective in Brazil six years after SBR appearance in the country and there are no signs of “breakage” of resistance for these alleles so far. In Asia, the resistance conferred by *Rpp4* lasts approximately 20 years (HARTMAN et al. 2005a), which is a good length of time from a breeding perspective. The combination of genetic approaches with other measures of controlling SBR may certainly help to extend the lifetime of SBR resistance genes in Brazil. For instance, adoption of “empty convenience” has considerably delayed the occurrence of the SBR epidemic in Mato Grosso state, consequently reducing the number of fungicide applications required for disease control in susceptible soybean cultivars.

Another alternative for extending the effectiveness of resistance genes would be to associate (“pyramid”) genes conferring resistance to different races of the pathogen within the same genotype. The availability of molecular markers linked to the different *Rpp* loci as shown here should make this task more feasible. In addition, it should provide soybean breeders with the ability to select resistant plants at an early point in any stage of plant development, even in the absence of the pathogen.

The results of our study indicate that there is a complex arrangement (multiple alleles and/or very close genes with different modes of gene action) of Rpp loci in soybean. This is in agreement with observations that the R genes in soybean also occur in clusters (KANAZIN et al. 1996; GRAHAM et al. 2002; ASHFIELD et al. 2003). The molecular mapping of the Rpp genes presented here may also help lay the foundations for map-based cloning of these genes in soybean.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Foram identificadas cinco novas fontes portadoras de genes de resistência à ferrugem asiática da soja, diferentes das fontes originais em que foram relatados os genes *Rpp1*; *Rpp2*; *Rpp3* e *Rpp4*.
- A resistência é governada por um único gene qualitativo em todos os genótipos estudados, exceto para a PI 230970, reportada como fonte de *Rpp2*. Para essa PI os dados não foram conclusivos.
- A resistência nas PIs 224270 e 200456 é governada por genes recessivos não alélicos. Essa é a primeira descrição de genes de resistência recessivos controlando a resistência à ferrugem asiática da soja em Introduções de Plantas (PIs)
- O mecanismo de ação de genes de resistência recessivos aparentemente é diferente do mecanismo observado nos genes de resistência dominantes e, por isso, podem representar uma esperança de resistência duradoura e de amplo espectro.
- O teste de alelismo entre a PI 230970 (fonte original de *Rpp2*) e a PI 224270 (gene recessivo) sugere que o gene destas PIs são alelos do mesmo locus
- O gene da PI 471904 comportou-se com ação de dominância incompleta (figura 9- anexo) e tal ação também ainda não havia sido reportada.
- O gene da PI 224270 (possível alelo de *Rpp2*) foi mapeado no grupo de ligação J do mapa de ligação consenso da soja. O gene dominante presente na PI 459025 (fonte original de *Rpp4*) foi mapeado no grupo de ligação G do mapa de ligação consenso da soja.
- Os genes das demais PIs estudadas (PI 200456; PI 200526; PI 200457 e PI 471905) foram mapeados entre os mesmos marcadores de microssatélites do grupo de ligação N do mapa de ligação consenso da soja. Até o momento não foi reportado nenhum gene de resistência à ferrugem asiática da soja localizado no grupo de ligação N. Portanto, o(s) gene(s) dessas PIs representa um locus distinto da série *Rpp1* a *Rpp4*. Sendo assim, estamos propondo a designação *rpp5* para o gene de resistência recessivo da PI 200456.
- Os dados do teste de alelismo entre PI 230970 (*Rpp2*) e a PI 224270 e o mapeamento das populações do grupo de ligação N indicam casos de alelos múltiplos nos loci de resistência à ferrugem asiática da soja. Contudo, a natureza diferente dos genes (dominantes, dominância incompleta e recessivos), bem como

estudos relatando a evolução, distribuição e organização no genoma de plantas dos genes de resistência (R-Gene) sugerem que esses genes estão organizados em “cluster”.

- Ainda serão necessários estudos mais detalhados para corroborar se estamos trabalhando com alelos múltiplos ou locus intimamente ligados. Entretanto, é provável que os dois casos sejam verdadeiros.
- A associação dos marcadores moleculares de SSR aos genes de resistência à ferrugem asiática da soja permitirá a seleção assistida por marcadores e será uma importante ferramenta no processo de piramidação desses genes. Ainda, fornece bases para estudos futuros visando à clonagem posicional dos genes de resistência e melhor entendimento da interação planta-patógeno.

REFERÊNCIAS

ABIOVE - Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais (2007). **Dados do Complexo Soja**. Disponível em: <<http://www.abiove.com.br>> (acessado dia 08 fev. 2007, verificado dia 01 nov 2007).

AKINSANMI OA, LADIPO JL, OYEKAN PO (2001). First report of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Nigeria. **Plant Disease**, 85:97.

AKKAYA MS, BRAGWAT AA, CREGAN PB (1992). Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. **Genetics**, 132: 1131-9.

ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, Walter P (2004). **Biologia Molecular da Célula**. 4ªed. Porto Alegre: Artmed Editora.

ALLARD R W (1960). **Principles of Plant Breeding**. John Wiley and Sons, New York.

ALMEIDA, AMR (2001). Observação de resistência parcial A *Septoria glycines* em soja. **Fitopatologia Brasileira**, 6(2).

ARIAS CAA (2006). Melhoramento e biotecnologia: ferrugem da soja. In: **IV Congresso Brasileiro de Soja**. Realizado entre 05 e 08 de junho de 2006. Londrina. [Resumos].

ARIAS CAA, BROGIN RL, YORINORI JT, KIIHL RA de S, TOLEDO JFF (2003). Um gene dominante determinando a resistência da cultivar FT-2 à ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi*) In: **II Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas**. Realizado entre 23 e 26 de abril de 2006. Porto Seguro. [Resumos].

ARUMUGANATHAN K, EARLE ED (1991). Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. **Plant Molecular Biology Reporter**, 9: 229-41.

ASHFIELD T, BOCIAN A, HELD D, HENK AD, MAREK LF, DANESH D (2003). Genetic and Physical localization of the soybean Rpg-1 disease resistance gene reveals a complex locus containing several tightly linked families of NBS-LRR genes. **Molecular Plant Microbe Interactions**, 16: 817-826.

ATIBALENTJA N, BEKAL S, DOMIER LL, NIBLACK TL, NOEL GR, LAMBERT KN (2005). A genetic linkage map of the soybean cyst nematode *Heterodera glycines*. **Molecular Genetics and Genomics**, 273: 273-81.

BACHMAN MS, TAMULONIS JP, NICKELL CD, BENT AF (2001). Molecular markers linked to brown stem rot resistance genes [Rbs.sub.1] and [Rbs.sun.2], in soybean. **Crop Science**, 41: 527-35.

BARCELLOS AL, MORAES-FERNANDES MIB, ROELFS AP (1997) Ferrugem da folha do trigo (*Puccinia recondita*): durabilidade da resistência. **Summa Phytopathologica**, 23: 101-117

BONATO ER, BONATO ALV (1987). **A Soja No Brasil: História e Estatística**. Londrina: EMBRAPA, CNPSo, 1987. 61p (Documentos, 21).

BONDE MR, NESTER SE, AUSTIN CN, STONE CL, FREDERICK RD, HARTMAN GL, MILES MR (2006). Evaluation of virulence of *Phakopsora pachyrhizi* and *P. Meibomia* isolates. **Plant Disease**, 90: 708-16.

BRIM CA (1966). A modified pedigree method of selection in soybeans. **Crop Science** 6: 20.

BROGIN RL, ARIAS CAA, VELLO NA, TOLEDO JFF, PIPOLO AE, CATELLI LL, MARIN SRR (2004). Molecular mapping of a gene conferring resistance to soybean rust. In: **III Congresso Mundial de Soja**, 2004, Foz do Iguaçu. Abstracts of contributed papers and posters / VII World Soybean Research Conference / IV International Soybean Processing and Utilization Conference / III Congresso Mundial de Soja.. Londrina : Embrapa Soja, 2004. p. 318.

BROGIN RL (2005). **Mapeamento de genes de resistência à ferrugem e de QTL's envolvidos na resistência à septoriose**. 93p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) œ Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, ESALQ/USP, Piracicaba, SP.

BROMFIELD KR (1984). **Soybean Rust**. Monogr. n.11. Am. Phytopathol. Soc., St. Paul, MN.

BROMFIELD KR, HARTWIG EE (1980). Resistance to soybean rust and mode of inheritance. **Crop Science**, 20: 254-5.

BROMFIELD KR, MELCHING JS (1982). Sources of specific resistance to soybean rust. (Abstr.) **Phytopatology**, 72:706.

BURDON JJ (1988). Major gene resistance to *Phakopsora pachyrhizi* in *Glycine canescens*, a wild relative of soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, 75: 923-8.

BÜSCHGES RK, HOLLRICHER R, PANSTRUGA G, SIMONS M, WOLTER A, FRIJTERS R, VAN DAELEN, T VAN DER LEE, P, DIERGAARDE J. GROENENDIJK et al. (1997). The barley Mlo gene: a novel control element of plant pathogen resistance. **Cell**, 88: 695-705.

CAPELLARI JRL, RODRIGUES RR, SOUZA VC (1999). **Apostila de Botânica Sistemática**. Piracicaba: Departamento de Botânica, ESALQ/USP..

CHU ZHBY, FU ZK, LI QF, ZHANG SP, WANG (2004). Targeting the recessive rice gene, xa13, for bacterial blight resistance to a 14.8-kb DNA fragment. In: **IV Proceedings of the International Crop Science Congress**, Brisbane, Australia, 26 Sep.-1 Oct. 2004. Disponível em <http://www.cropscience.org.au/icsc2004/poster/3/2/1/1906_chuz.htm> (acessado dia 19 jun 2007; verificado dia 10 out 2007).

CONAGIN A, AMBROSANO GMB, NAGAI V (1997). Poder discriminativo da posição de classificação de dos testes estatísticos na seleção de genótipos. **Bragantia**, 56 (2): 403-17.

CREGAN PB, JARVIK TAL, BUSH AL, SHOEMAKER RC, LARK KG, KAHLER AL et al. (1999). An integrated genetic linkage map of the soybean. **Crop Science**, 39: 1464-90.

DEMIRBAS A, RECTOR BG, LOHNES DG, FIORITTO RJ, GRAEF GL, CREGAN PB, SHOEMAKER RC, SPECHT JE (2001). Simple sequence repeat markers linked to the soybean Rps genes for Phytophthora resistance. **Crop Science**, 41: 1220-7.

DESLANDES L, OLIVIER J, THEULIERES F, HIRSCH J, FENG DX, BITTNER-EDDY P, BEYNON J, MARCO Y (2002) Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive RRS1-R gene, a member of a novel family of resistance genes. **Proceedings of the National Academy of Science of United States of America**, 99: 2404-2409.

DORRANCE AE (2005) Using foliar fungicides to manage soybean rust. In: Draper MA, Hershman DE. (eds.) **Bulletin SR-2005**. NC-504 Land Grant Universities Cooperating, 48p.

DYCK PL, SAMBORSKI EDJ (1974). Inheritance of virulence in *Puccinia recondite* on alleles at the Lr2 locus for resistance in wheat. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, 16: 323-32.

EMBRAPA SOJA (2006). Doenças e Medidas de Controle. In: **Tecnologias de Produção de Soja Região Central do Brasil 2007**. Londrina: Embrapa Soja, Embrapa Cerrados, Embrapa Agropecuária Oeste, p. 169-218.

Embrapa Soja - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (2007). **Prejuízo com a ferrugem asiática da soja se mantém estável nesta safra**. Disponível em <www.cnpso.embrapa.br/noticia/ver_noticia.php?cod_noticia=380> (acessado 15 maio 2007; verificado 10 out 2007). Centro Nacional de Pesquisa de Soja, Londrina, Brasil.

FEHR WR, CAVINESS CE (1977). Stages of soybean development. **Special Report 80**. Coop. Ext. Serv., Iowa State Univ., Ames, IA.

FRYE CA, TANG D, INNE RW. (2001). Negative regulation of defense responses in plants by a conserved MAPKK kinase. **Proceedings of the National Academy of Science of United States of America**, 98: 373-378.

FUGANTI R, BENEVENTI MA, VELOSO JF, ARIAS CAA et al. (2004). Identificação de Marcadores Moleculares de Microsatélites para Seleção de Genótipos de Soja Resistentes a *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, 28(2): 125-130.

GRAHAM MA, MAREK LF, SHOEMAKER RC (2002). Organization, expression and evolution of a disease resistance gene cluster in soybean. **Genetics**, 162: 1961-1977.

HARTMAN GL (1996). I-B. Highlights of soybean rust research at the Asian Vegetable Research and Development Center. In JB Sinclair, GL Hartman (ed.) **Soybean Rust Workshop**. 9-11 August 1995. College of Agriculture Consumer and Environmental Sciences, National Soybean Research Laboratory Publ. no.1, Urbana, IL.

HARTMAN GL, MILES MR, FREDERICK RD (2005a) Breeding for resistance to soybean rust. **Plant Disease**, 89: 664-665 (Symposium) HARTMAN GL, MILES MR, FREDERICK RD (2005b). Soybean rust: is the U.S. soybean crop at risk? In: **APSnet Feature, American Phytopathological Society**. Disponível em <http://apsnet.org/online/feature/rust/top.asp> (acessado dia 19 jun 2006, verificado dia 01 nov 2007).

HARTMAN GL, SINCLAIR JB, RUPE JC (1999) **Compendium of soybean diseases**. 3.ed. St. Paul: American Phytopathological Society, 100 p.

HARTWIG EE (1986) Identification of a fourth major gene conferring to rust in soybeans. **Crop Science**, 26:1135-136

HYTEN DL, HARTMAN GL, NELSON RL, FREDERICK RD, CONCIBIDO VC, NARVEL JM, CREGAN PB (2007). Map location of the *Rpp1* locus that confers resistance to soybean rust in soybean. **Crop Science**, 47:837-840

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

KANAZIN V, MAREK L F, SHOEMAKER R C, (1996) Resistance genes analogs are conserved and clustered in soybean. **Proceedings of the National Academy of Science of United States of America**, 93: 11745-11750

KATO M, YORINORI J T (2006). Variabilidade Patogênica da *Phakopsora pachyrhizi* no Brasil. In: **Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil**, 28, 2006, Londrina. [Anais] Londrina: Embrapa Soja - Fundação Meridional - Fundação Triângulo, 2006. p.147-149.

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

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

KILIAN A, CHEN J, HAN F, STEFFENSON B, KLEINHOF S A (1997). Towards map-based cloning of the barley stem rust resistance genes *Rpg1* and *rpg4* using rice as an intergenomic cloning vehicle. **Plant Molecular Biology**, 35:187-195.

KILLGORE E, HEU R (1994). First report of soybean rust in Hawaii. **Plant Disease** 78:1216.

KOCHMAN J K (1977) Soybean rust in Australia. In: Ford R E, Sinclair J B (eds.) **Rust of soybean-the problem and research needs**. International Agricultural Publications, Manila, The Philippines, p. 44-48.

KOLMER J A (1996). Genetics of resistance to wheat leaf rust. **Annual Review of Phytopathology** 34: 435-455.

KOLMER J A, DYCK P L (1994). Gene expression in the *Triticum aestivum*-*Puccinia recondita* sp. *tritici* gene-for-gene system. **Phytopathology**, 84: 437-440.

LANDER E S, GREEN P, ABRAHAMSON J, BARLOW A, DALY M J, LINCOLN S E, NEWBURG L, (1987). Mapmaker: an interactive computer package for constructing genetic linkage maps of experimental and natural populations. **Genomics**, 1: 174-181.

LI ZK, SANCHEZ A, ANGELES E, SINGH S, DOMINGO J, HUANG N, KHUSH GS (2001). Are the dominant and recessive plant disease resistance genes similar?: a case study of rice R genes and *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* races. **Genetics**, 159: 757-765.

LINCOLN SE, LANDER SL (1992). Systematic detection of errors in genetic linkage data. **Genomics**, 14: 604-610.

LINCOLN SE, LANDER SL (1993). Mapmaker/exp 3.0 and Mapmaker/QTL 1.1. Whitehead Inst. of Med. Res. **Technical Report**, Cambridge, MA.

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

MARCHETTI MA, MELCHING JS, BROMFIELD KR (1976). The effects of temperature and dew period on germination and infection by uredospores of *Phakopsora pachyrhizi*. **Phytopathology**, 66: 461-463.

MARCHETTI MA, UECKER FA, BROMFIELD KR (1975). Uredial development of *Phakopsora pachyrhizi* in soybeans. **Phytopathology**, 65: 822-823.

MCDOWELL JM, SIMON SA (2006). Recent insights into R gene evolution. **Molecular Plant Pathology**, 7: 437-448.

MCLEAN RJ, BYTH DE (1980). Inheritance of resistance to rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in soybeans. **Australian Journal of Agricultural Research**, 31: 951-956.

MEDINA, J.C. (1891) Introdução e evolução da soja no brasil: primeiras notícias da soja no brasil. In. Miyasaka S, Medina JC (eds.). **A Soja no Brasil**. Campinas: ITAL, 1981. p.17-24.

MELCHING JS, DOWLER WM, KOOGLE DL, ROYER MH (1989) Effects of duration, frequency, and temperature of leaf wetness periods on soybean rust. **Plant Disease**, 73: 117-122

MIAN MAR, WANG TY, PHILLIPS DV, ALVERNAZ J, BOERMAN HR (1999). Molecular mapping of the *Rcs3* gene for resistance to frogeye leaf spot in soybean. **Crop Science**, 39: 1687-1691.

MICHELMORE RW, PARAN I, KESSELI RV (1991) Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proceedings of the National Academy of Science of United States of America**, 88: 9828-9832.

MILES MR, FREDERICK RD, HARTMAN G (2003) Soybean rust: Is the U.S. soybean crop at risk? In: **APSnet Feature. American Phytopathological Society**. Disponível em <http://www.apsnet.org/online/feature/rust/> (acessado dia 11 jul 2007, verificado dia 01 nov 2007).

MILES M, HARTMAN G, FREDRICK R (2005) **Update on sources of host resistance**. Nashville: University of Illinois at Urbana-Champaign, 20 diapositivos: color.

MONTEROS MJ, MISSAOUI AM, PHILLIPS DV, WALKER DR, BOERMA HR (2007) Mapping and confirmation of the 'Huuuga' red-brown lesion resistance gene for asian soybean rust. **Crop Science**, 47: 829-836.

MORGANTE M, HANAFEY M, POWELL W (2002) Microsatellites are preferentially associated with non repetitive DNA in plant genomes. **Nature Genetics**, 30:194-200.

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

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

OLIVEIRA EJ, PÁDUA JG, ZUCCHI MI, VENCOSKY R, VIEIRA MLC (2006) Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, 29: 294-307.

OLIVEIRA JED (1981). Valor da Soja como Alimento. In: MIYASAKA S.; MEDINA. J.C. **A Soja no Brasil**, Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, p. 820 -823.
ONO Y, BURITICA P, HENNEN JF (1992). Delimitation of *Phakopsora*, *Physopella* and *Cerotelium* and their species on Leguminosae. **Mycological Research**, 96: 825-850.

PAIVA W.M, YORINORI JT (2002) Situacion de la roja de la soja en el Paraguay. **Bol. de Diulgacion N°. 44**. Ministerio de Agricultura y Granaderia, Centro Regional de Investigacion Agricola, Capitan Miranda, Paraguay.

PALMER RG, PFEIFFER TW, BUSS GR, KILEN TC (2004). Qualitative Genetics. p. 137-234. In: Spect JE, Boerna HR (eds.) **Crop Science Society of America Monographs**, Madison, WI.

PEREIRA MG, PEREIRA TNS (2006). Marcadores Moleculares no Pré-Melhoramento de Plantas In: Bórem A, Caixeta TE (eds.) **Marcadores Moleculares**. Viçosa, MG, 2006

PIEROZZI PHB (2007). **Controle genético da resistência da soja à ferrugem asiática: avaliações de severidade em campo experimental**. 123p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

POLZIN KM, LOHNES DG, NICKELL CD, SHOEMAKER RC (1994) Integration of Rps2, Rmd and Rj2 into linkage group J of the soybean molecular map. **Journal of Heredity**, 85: 300-303.

PUTERKA GJ, BLACK WC, STEINER WM, BURTON RL (1993). Genetic variation and phylogenetic relationships among worldwide collections of the russian wheat aphid, *Duraphis noxia* (MORKVILKO), inferred from allozyme and RAPD-PCR markers. **Heredity**, 70: 604-618.

RODRÁGUEZ, AC, RIOS JA, HERNÁNDEZ JR (2006) First Report of Asian Soybean Rust Caused by *Phakopsora pachyrhizi* from Mexico. **Plant Disease** 90: 1260.

ROSSI RL (2003). First report of *Phakospora pachyrhizi*, the causal organism of soybean rust in the Province of Misiones, Argentina. **Plant Disease**, 87:102.
SCHNEIDER RW, HOLLIER CA, HITAM HK (2005) First report of soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* in the continental United States. **Plant Disease**, 89: 774

SCHOEMAKER RC, POLZIN K, LABATE J, SPECHT JE, BRUMMER EC, OLSON T, YOUNG N, CONCIBIDO V, WILCOX J, TAMULONIS JP, KOCHERT G, BOERMA HR (1996) Genome Duplication in Soybean (*Glycine* subgenus *soja*). **Genetics**, 144: 329- 338.

SCHUSTER I, ABDELNOOR RV, MARIN SRR, CARVALHO VP, KIIHL RAS, SILVA JFV, SEDIYAMA CS, BARROS EG, MOREIRA MA (2001). Identification of a new QTL associated with resistance to soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*). **Theoretical and Applied Genetics**, 102: 91-96.

SCONYERS LE, KEMERAIT RC, BROCK J, PHILLIPS DV, JOST PH, SIKORA EJ, et al. (2006) Asian soybean rust development in 2005: a perspective from the southeastern united states. In: **APSnet Feature, American Phytopathological**

Society. Disponível em <http://www.apsnet.org/online/feature/sbr/> (acessado dia 20 jun 2006, verificado dia 11 jul 2007)

SEDIYAMA T, PEREIRA MG, SEDIYAMA CS, GOMES JL (1985). **Cultura da Soja, parte 1**. Minas Gerais: UFV . 96p.

SHAGAI-MAROOF MA, SOLIMAN KM, JORGENSEN RA, ALLARD RW (1984) Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal locations, and populations dynamics. **Proceeding of the National Academy of Science of United States of America**, 81: 8014-8018.

SHARMA ND, MEHTA SK (1996) Soybean rust in Madhya Pradesh. **Acta Botanica Indica**, 24: 115-116 SHAWN MJW, BARRY JS, TERRY RA, TOM WW, ISTVAN R (2007) QTL associated with horizontal resistance to soybean cyst nematode in Glycine soja PI 464925B. **Theoretical and Applied Genetics**, 114:461-472.

SHIN DC, TSCHANZ AT (1986). Studies on physiological reactions of soybean cultivars tolerant and susceptible to rust (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.). **Korean J Crop Science**. 31: 440- 446.

SINCLAIR JB, HARTMAN GL (1999). Soybean diseases In: Hartman GL, Sinclair JB, Rupe JC (eds.) **Compendium of Soybean Diseases**. St. Paul. American Phytopathological Society, 4ed. p.3-4.

SINGH RJ, HYMOWITZ T (1988). The genomic relationship between *Glycine max* L. Merr. and *G. soja* Sieb. and Zucc. as revealed by pachytene chromosome analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, 76: 705-711.

SOLLER M, BECKMANN JS (1983). Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, 67: 25-33.

SONG QJ, MAREK LF, SHOEMAKER RC, LARK KG, CONCIBIDO VC, DELANNAY X, SPECHT JE, CREGAN PB (2004) A new integrated genetic linkage map of the soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, 109:122-128.

SOUZA AP (2001) *Biologia Molecular Aplicada ao Melhoramento*. In: Nass LL, Valois ACC, Melo IS, Valadares-Inglis MC (eds.) **Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas**. 1 ed. Rondonópolis,

SOYBASE (2007) - USDA, Washington; Iowa State University, Ames. Disponível em <http://www.soybase.org/> (acessado regularmente, verificado dia 01 nov 2003).

TANSKLEY SD (1983) Molecular markers in plant breeding. **Plant Molecular Biology**, 1: 3-8.

TANSKLEY SD, MCCOUCH SR (1997) See banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. **Science** 277: 1063-1066.

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

UNFRIED JR (2007). **Estratégias para seleção de linhagens experimentais de soja para tolerância à ferrugem e associações com outras doenças**. 220p. Tese (Doutorado em Agronomia. Área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas) œ Universidade de São Paulo œ Escolha Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, SP.

VIDOR C, FONTOURA JUG, MACEDO J (2006) A soja no Brasil In: **Embrapa - Tecnologias de Produção de Soja Região Central do Brasil 2004**. Disponível em < <http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/SojanoBrasil.htm>> (acessado dia 15 fev 2006, verificado 01 nov 2007).

VAN OOIJEN JW, VOORRIPS RE (2001). JoinMap 3.0 software. **Plant Research International**, Wageningen, the Netherlands.

VISÃO AGRÍCOLA (2006). **Brasil é responsável por 38% do comércio mundial de soja**. Piracicaba, n. 5, p. 73-74

WRIGHT JM, BENTZEN P (1994). Microsatellites: Genetic Markers of the Future. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, 4: 384-388.

XU B, ZHEN H, LU Q, ZHAO S (1989). Three new evidences of the original area of soybean. IN: **World Soybean Research Conference**, 4. Proceedings, Buenos Aires, p.124-128,

YAHIAOUI N, SRICHUMPA P, DUDLER R, KELLER B (2004). Genome analysis at different ploidy levels allows cloning of the powdery mildew resistance gene Pm3b from hexaploid wheat. **Plant Journal**, 37: 528-538.

YAMAOKA Y, FUJIWARA Y, KAKISHIMA M, KATSUYA K, YAMADA K, HAGIWARA H (2002). Pathogenic races of *Phakopsora pachyrhizi* on soybean and wild host plants collected in Japan. **Journal of General Plant Pathology**, 68: 52-56.

YAN GP, CHEN XM (2006). Molecular mapping of a recessive gene for resistance to stripe rust in barley. **Theoretical and Applied Genetics**, 113; 529-537.

YANG R-W, ZHOU Y-H, ZHANG Y, ZHENG Y-L, DING C-B, (2006). The genetic diversity among *Leymus* species based on random amplified microsatellite polymorphism (RAMP). **Genetic Resources and Crop Evolution**, 53: 139-144.

YANG W, WEAVER DB, NIELSEN BL, QIU J (2001). Molecular mapping of a new gene for resistance to frogeye leaf spot of soya bean in "Peking". **Plant Breeding**, 120: 73-78.

YORINORI JT (2004) Ferrugem "asiática" da soja no Brasil: evolução, importância econômica e controle. In: Junior JN, Lazzarotto JJ (eds.) **Documentos 247**. Embrapa, Londrina, Brazil, 36p (Documentos, 27)

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

YORINORI JT, PAIVA WM, FREDERICK RD, COSTAMILAN LM, BERTAGNOLLI PF, HARTMAN GL et al. (2005). Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. **Plant Disease**, 89: 675-677.

YUYAMA MM, SUZUKI S (2005). Doenças da Soja. In: Suzuki S, Yuyama MM; Camacho SA (eds.) **Boletim de pesquisa de soja 2005**. 9 ed. Rondonópolis.

ZHANG L, ZHENG Y-L, WEI Y-M, LIU S-G, ZHOU Y-H, (2005). The genetic diversity and similarities among *Kengyilia* species based on random amplified microsatellite polymorphism (RAMP). **Genetic Resources and Crop Evolution**, 52: 1011-7.

ANEXOS



Figura 1 – Lesões de resistência e suscetibilidade da soja à FAS na. **A** ilustra lesões de resistência (“RB”). **B** ilustra lesões de suscetibilidade



Figura 2 – Comparação de lesões RB (A) e TAN (B) na superfície abaxial de genótipos de soja resistente e suscetível, respectivamente.

Tabela 1 – Lista dos loci de microssatélites utilizados durante o estudo. Os loci estão distribuídos entre os 20 grupos de ligação da soja proposto por Song et al., (2004) e a sequência de cada primer pode ser obtida em www.soybase.org.

Satt276	Sat_036	Satt292	Satt456	Sat_143
Satt042	Satt071	Satt354	Satt529	Satt612
Satt155	Satt129	Satt440	Satt620	Sat_164
Satt050	Satt216	Satt451	Satt547	Satt215
Satt385	Satt095	Satt587	Satt431	Sat_255
Satt225	Satt157	Satt244	AF162283	
Satt390	Satt296	Satt285	Satt191	
Satt589	Satt290	Satt405	Satt199	
Satt315	Satt546	Sct_065	Satt012	
Satt187	Satt274	Sct_001	Satt503	
Satt341	Satt271	Sat_043	Satt517	
Satt377	Satt135	Satt102	Satt159	
Satt327	Satt372	Satt196	Satt631	
Satt470	Satt154	Satt247	Sat_186	
Satt455	Satt447	Satt499	Sat_166	
Satt409	Satt461	Satt539	Satt530	
Satt538	Sat_001	Satt559	Sat_208	
Satt429	Satt186	Satt588	Sat_266	
Satt426	Satt386	Sat_099	Satt125	
Satt197	Satt212	Satt229	Satt080	
Satt519	Sat_112	Satt388	Sat_379	
Satt444	Satt384	Satt481	Satt152	
Satt359	Satt573	Satt495	Satt009	
Satt453	Satt204	Satt497	Satt641	
Satt577	Satt369	Satt513	Satt683	
Satt126	Satt230	GMSC514	Satt624	
Satt467	Satt146	Satt150	Satt393	
Satt416	Satt160	Satt306	Satt485	
Satt601	Satt516	Satt336	Sat_166	
Satt066	Satt114	Satt346	Sat_275	
Satt063	Satt334	Satt463	Sat_280	
Satt565	Satt510	Satt536	Satt387	
Satt396	Sct_188	Satt551	Sat_244	
Satt578	Satt144	Satt567	Sat_396	
Satt399	Satt218	Sat_033	Sctt011	
Sat_042	Sat_074	Satt159	Sat_350	
Satt524	Satt038	Satt584	Sat_361	
Satt164	Satt131	Satt521	Sat_093	
Sat_130	Satt394	Satt091	Satt380	
Sat_062	Satt303	Satt410	Satt622	
Satt291	Satt505	Sat_132	Sct_193	
Satt170	Satt288	Satt492	Satt686	
Satt332	Satt472	Satt259	Sat_342	
Satt450	Satt119	Satt420	Sat_287	
Satt286	Satt181	Satt478	Sat_177	
Satt319	Satt192	Satt477	Satt307	
Satt460	Satt253	Satt581	Sat_252	
Satt202	Satt302	Satt153	Sct_028	
Satt357	Satt434	Sat_109	Satt708	
Satt184	Satt541	Sat_366	Sat_139	
Satt368	Satt568	Satt406	Satt041	
Satt321	Satt162	Satt280	Satt644	
Satt203	Satt270	Satt596	Sat_169	



Figura 3 – “BSA”. Satt288 representa o padrão de amplificação de um marcador ligado ao gene. A banda observada no bulk suscetível (BS) apresenta a mesma banda do parental suscetível (PS). O mesmo ocorre para o parental resistente (PR) e o bulk resistente (BR). Satt302 representa o padrão de amplificação de um marcador não ligado ao gene. As bandas do PS e PR são evidenciadas nos 2 bulks.

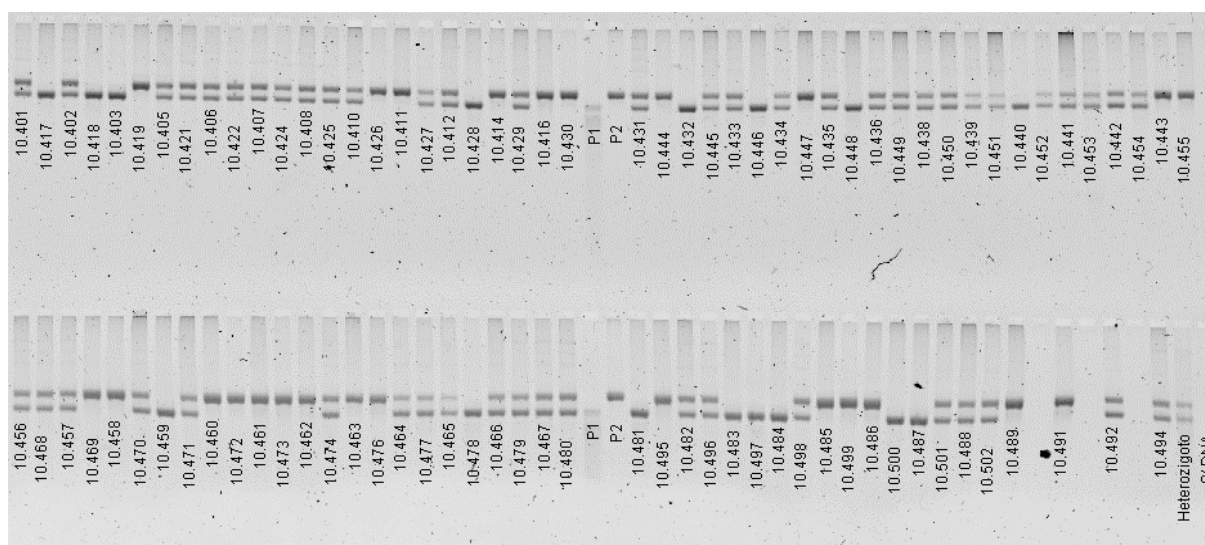


Figura 4 – Genotipagem de indivíduos F_2 com um marcador de microssatélite. Os parentais - P1 e P2 -representam genótipos homocigotos suscetível recessivo e resistente dominante, respectivamente à FAS. Cada indivíduo é avaliado de acordo com a banda amplificada se homocigoto dominante, recessivo ou heterocigoto, após comparação com o parental.

	401	402	403	405	406	407	408	410	412	414	416	417	418	419	421	422	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	438	439	440	441	442
Gene	H	H	B	A	B	H	H	H	H	H	H	H	B	A	A	H	H	H	A	H	B	B	A	H	B	H	H	H	H	B	H	H	H	H
Primer 157	A	H	B	H	H	H	H	A	H	H	A	H	B	A	A	H	H	H	A	A	B	B	A	H	B	H	H	H	H	B	H	H	H	H
Primer 159	H	H	H	A	A	H	H	H	H	H	A	H	B	H	A	A	H	H	A	H	H	H	A	B	B	A	H	H	H	B	H	A	H	H
Primer 160	H	H	H	A	A	H	A	H	H	H	H	H	B	H	A	A	A	H	A	H	H	H	A	B	B	A	H	H	H	B	H	A	H	H
Primer 165	H	H	B	H	H	H	H	H	H	A	A	B	B	A	H	H	H	H	A	H	B	H	A	H	B	H	H	H	H	H	H	B	H	H
Primer 196	A	H	B	H	H	H	H	A	H	H	A	H	B	A	A	H	H	H	A	A	B	H	A	H	B	H	H	H	H	B	H	H	H	H
Primer 197	A	H	B	H	H	H	H	A	H	H	A	H	H	A	A	H	H	H	A	A	B	B	A	H	B	H	H	H	H	H	H	H	A	H
Primer 199	H	H	H	A	A	H	H	H	H	H	A	H	B	H	A	A	H	H	A	H	H	H	A	B	B	A	H	H	H	B	H	A	A	H
Primer 218	H	H	H	A	A	H	H	H	H	-	A	H	B	H	A	A	H	H	A	H	H	H	A	B	B	A	H	B	B	B	H	H	-	H
Primer 217	H	H	H	A	A	H	H	A	H	H	A	H	B	A	A	H	H	A	H	B	H	A	H	B	A	H	H	H	B	H	H	-	H	

Figura 5 – Dados para serem “rodados” no programa MapMaker/EXP. Após a genotipagem de cada indivíduo F_2 com um grupo de marcas, a segregação entre elas é comparada. Na codificação, A representa homocigoto recessivo, B homocigoto dominante e H heterocigoto



Figura 9 – Gene de resistência à FAS com dominância incompleta. **A** ilustra um genótipo homocigoto suscetível. **B** indica o genótipo heterocigoto, com coloração de lesão intermediária. **C** corresponde ao genótipo homocigoto resistente, com lesão “RB” evidente.