



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARCO ANTONIO ROTT DE OLIVEIRA

**MAPEAMENTO DE GENES DE RESISTÊNCIA AO VÍRUS DA
NECROSE DA HASTE DA SOJA UTILIZANDO
MARCADORES MOLECULARES MICROSSATÉLITES**

Londrina
2008

MARCO ANTONIO ROTT DE OLIVEIRA

**MAPEAMENTO DE GENES DE RESISTÊNCIA AO VÍRUS DA
NECROSE DA HASTE DA SOJA UTILIZANDO
MARCADORES MOLECULARES MICROSSATÉLITES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Agronomia.

Orientadora: Profa. Dra. Valéria Carpentieri-Pípolo

Co-Orientador: Prof. Dr. Ivan Schuster

Londrina
2008

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S237i Santos, Esmael Lopes dos.
Influência do genótipo sobre as concentrações de proteína e óleo em
sementes de soja [Glycine max (L.) Merrill] / Esmael Lopes dos
Santos. – Londrina, 2006.
53f.

Orientador: Cássio Egídio Cavenaghi Prete.
Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de
Londrina, 2006.
Bibliografia: f. 15-24; 47-53.

1. Soja – Sementes – Teses. 2. Plantas oleaginosas – Teses. I. Prete,
Cássio Egídio Cavenaghi. II. Universidade Estadual de Londrina. III.
Título.

CDU 633.34

MARCO ANTONIO ROTT DE OLIVEIRA

**MAPEAMENTO DE GENES DE RESISTÊNCIA AO VÍRUS DA
NECROSE DA HASTE DA SOJA UTILIZANDO
MARCADORES MOLECULARES MICROSSATÉLITES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação,
em Agronomia da Universidade Estadual de
Londrina, como requisito parcial à obtenção do
título de Doutor em Agronomia.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Deonísio Destro – UEL

Dra. Elisa Serra Negra Vieira – COODETEC

Dr. Antonio Eduardo Pípolo –
CNPSO/EMBRAPA

Dr. Carlos Alberto Arrabal Arias –
CNPSO/EMBRAPA

Profa. Dra. Valéria Carpentieri-Pípolo
Orientadora – UEL

Londrina, 30 de junho de 2008.

DEDICATÓRIA

A Deus Criador e Pai pela oportunidade do aprendizado.

Aos meus familiares pela compreensão e inestimável incentivo.

Aos meus colegas pelo inestimável auxílio.

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Valéria Carpentieri Pípolo pela orientação, paciência e confiança em mim depositada.

Ao Dr. Ivan Schuster pelo apoio, incentivo e imprescindível co-orientação.

A Universidade Estadual de Londrina, em especial ao Departamento de Agronomia e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia.

A Coodetec – Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola e ao seu Diretor Executivo Dr. Ivo Marcos Carraro pela oportunidade, suporte, compreensão e viabilização desta formação.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da UEL, em especial, Dr. Deonísio Destro e Dr. Ricardo Tadeu de Farias, pelo auxílio e conhecimentos transmitidos.

Ao corpo docente do curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UEL, em especial, Dra. Leda Maria K. Sodré e Dr. Josué Maldonado Ferreira, pelo auxílio e conhecimentos transmitidos.

A colega Tatiane Dalla Nora, pela imprescindível ajuda, sugestões, incentivo, apoio e amizade.

Ao Dr. Álvaro M. R. Almeida (Embrapa Soja) pelas contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dorival Vicente, Marisa Dellagostin e demais colegas da equipe de melhoramento de soja da Coodetec pelo auxílio, incentivo, amizade e suporte em minhas ausências em função do curso.

As equipes de Fitopatologia e Biotecnologia da Coodetec pelo imprescindível auxílio para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus familiares e amigos agradeço por tê-los comigo.

Epígrafe

Se...

Se eu pudesse deixar algum presente a você,
deixaria acesso ao sentimento de amar a vida
dos seres humanos.

A consciência de aprender tudo o que foi
ensinado pelo tempo afora...

Lembraria os erros que foram cometidos para
que não mais se repetissem.

A capacidade de escolher novos rumos.

Deixaria para você, se pudesse, o respeito
àquilo que é indispensável:

Além do pão, o trabalho.

Além do trabalho, a ação.

E, quando tudo mais faltasse, um segredo:

O de buscar no interior de si mesmo
a resposta e a força para encontrar a saída."

(Mahatma Gandhi)

OLIVEIRA, Marco Antonio Rott de. **Mapeamento de genes de resistência ao vírus da Necrose da haste da soja utilizando marcadores moleculares microssatélites.** 2008. 76f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

RESUMO

Identificada pela primeira vez no Brasil na safra 2000/2001, a necrose da haste da soja (NHS) é causada pelo vírus CpMMV – *Cowpea mild mottle virus*, pertencente ao grupo Carlavirus. É uma virose altamente destrutiva, que pode levar à morte das plantas. Essa virose tem se disseminado pelas lavouras de soja do país, por meio da mosca branca (*Bemisia tabaci* biótipo B) a qual é o vetor. Esse inseto está associado a outras culturas importantes no país, e apresenta grande capacidade de desenvolver resistência aos inseticidas. Os objetivos deste trabalho foram estudar a herança da resistência da soja à NHS e mapear o(s) gene(s) de resistência, com o auxílio de marcadores moleculares. Foi obtida uma população F₂ segregante para a resistência à NHS, a partir do cruzamento entre as cultivares BRS 133 (resistente) e CD 206 (suscetível). A avaliação foi realizada em casa-de-vegetação, e a inoculação foi realizada no primeiro trifólio totalmente expandido, e repetida após 10 dias. As avaliações foram realizadas 20 dias após a primeira inoculação, e repetidas 15 dias após. Das 114 plantas F₂ avaliadas, 92 foram resistentes e 22 foram suscetíveis. O resultado é compatível com a herança de um gene dominante ($\chi^2=1,98$, P=15,97%). O mapeamento deste gene de resistência foi realizado pelo método de análise de bulks segregantes (BSA). O gene, denominado *Rssn* (*Resistance to soybean stem necrosis*) foi mapeado no Grupo de Ligação G do genoma da soja, entre os marcadores Sat_308 e Satt303, a 28,87cM do primeiro e 29,64cM do segundo. O mapeamento fino desta região genômica poderá identificar marcadores mais proximamente ligados ao gene *Rssn*, os quais poderão ser utilizados em programas de seleção assistida por marcadores moleculares microssatélites, no melhoramento genético da soja.

Palavras-chave: *Cowpea mild mottle virus*. Herança da resistência. Marcadores microssatélites. BSA. Seleção assistida por marcadores moleculares.

OLIVEIRA, Marco Antonio Rott de. **Mapeamento de genes de resistência ao vírus da Necrose da haste da soja utilizando marcadores moleculares microssatélites**. 2008. 76f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

ABSTRACT

Identified for the first time in Brazil in the 2000/2001 season, the necrosis of the stem of soybean (NHS) is caused by the virus CpMMV - *Cowpea mild mottle virus* belonging to the group Carlavirus. It is a highly destructive virus, which can lead to death of plants. This virus has been spread by the soybean crop in the country, through the vector, the white fly (*Bemisia tabaci* biotype B). This insect is associated with other important crops in the country, and presents a great ability to develop resistance to insecticides. The objectives of this work were to study the inheritance of the resistance of soybeans to the NHS and map (s) gene (s) of resistance, with the help of molecular markers. It obtained a population F₂ segregant for resistance to the NHS, from crossing between the cultivars BRS 133 (resistant) and CD 206 (susceptible). The evaluation was performed in green house, and the inoculation was made in the first trifolium fully expanded, and repeated after 10 days. The assessments were made 20 days after the first inoculation, and repeated 15 days later. Of the 114 plants F₂ assessed, 92 were resistant and 22 were susceptible. The result is compatible with the legacy of a dominant gene ($\chi^2 = 1.98$, P = 15.97%). The mapping of the gene for resistance was made by the method of analysis bulks segregating (BSA). The gene, called *Rssn* (*Resistance to soybean stem necrosis*) was mapped in the Linkage Group G of the soybean genome, between the markers Sat_308 and Satt303, 28.87 cM of the first and second in 29.64 cM. The fine mapping of this region genomic markers can identify more closely linked to gene *Rssn*, which can be used in programs of assisted selection by molecular markers microsatellites in soybean genetic improvement.

Keywords: *Cowpea mild mottle virus*. Inheritance of resistance. Markers microsatellites. BSA. Assisted selection by molecular markers.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 ORIGEM, DISTRIBUIÇÃO E IMPORTÂNCIA DA SOJA	13
2.2 ORGANISMOS PREJUDICIAIS A SOJA	15
2.3 VIROSES EM PLANTAS E EM SOJA.....	17
2.4 NECROSE DA HASTE DA SOJA	19
2.4.1 Vetores	21
2.4.2 Perdas causadas pelas fitoviroses	23
2.4.3 Controle das fitoviroses	24
2.5 ESTUDOS DE HERANÇA GENÉTICA DA RESISTÊNCIA ÀS FITOVIROSES.....	25
2.6 MARCADORES MOLECULARES NO MELHORAMENTO DE PLANTAS	28
2.6.1 Importância.....	28
2.6.2 Tipos de marcadores moleculares	30
2.6.3 Seleção assistida por marcadores moleculares	33
2.7 REFERÊNCIAS.....	36
3 ARTIGO: MAPEAMENTO DE GENES DE RESISTÊNCIA A NECROSE DA HASTE DA SOJA UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES	48
Resumo	48
Abstract.....	49
3.1 INTRODUÇÃO.....	50
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	52
3.2.1 Material vegetal	52
3.2.2 Avaliação da necrose da haste	53
3.2.3 Extração do DNA.....	56
3.2.4 Formação dos bulks de DNA.....	57
3.2.5 Condições de amplificação e de eletroforese.....	57
3.2.6 Análise de dados	58
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
3.3.1 Herança da resistência da necrose da haste da soja.....	59
3.3.2 Mapeamento genético do gene <i>Rssn</i>	63

3.4 CONCLUSÕES.....	71
3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

1 INTRODUÇÃO

O crescimento da população do planeta, o aumento do poder aquisitivo de parte significativa dos trabalhadores a nível mundial, a substituição crescente do farelo de carne pelo farelo de soja, a crescente demanda da matéria prima soja pela indústria de carnes, tintas, lubrificantes, plásticos e biodiesel, entre outras, são fatos que mostram de forma inequívoca os avanços que o mercado da soja terá nos próximos anos (DALL`AGNOL et al., 2007).

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é o quarto maior cultivo a nível mundial e o primeiro entre as oleaginosas, abrangendo uma área de mais de 90 milhões de hectares os quais proporcionaram a produção de 219,7 milhões de toneladas de grãos na safra 2007/2008 (USDA, 2008).

A importância da soja a nível mundial está no incremento da produção, a qual foi de 763% no período compreendido entre 1970 e 2007, correspondendo a um acréscimo de mais de 5 milhões de toneladas anuais. No Brasil, este incremento na produção foi de 39 vezes nos últimos 47 anos, o que possibilitou expandir fronteiras agrícolas, tecnificar cultivos, interiorizar a produção, descentralizar a agroindústria e incrementar o comércio internacional (DALL`AGNOL et al., 2007).

O Brasil é o segundo maior produtor de soja do mundo, com uma área de aproximadamente 21,2 milhões de hectares cultivados na safra 2007/2008, gerando uma produção de 59,5 milhões de toneladas e uma produtividade média de 2.804 kg/ha (CONAB, 2008).

Entre todos os países maiores produtores da oleaginosa, o Brasil é o único passível de atender às futuras demandas mundiais desta matéria prima, em função das excelentes condições edafoclimáticas disponíveis para a cultura, da tecnologia desenvolvida para a produção sustentável em áreas tropicais e pela disponibilidade de significativas áreas que podem ser utilizadas para o seu cultivo, não sendo necessárias ações de desmatamento (DALL`AGNOL et al., 2007).

Os empregos diretos, empregos indiretos e de efeito-renda envolvidos no complexo agroindustrial da soja abrangem entre 4,5 a 5 milhões de pessoas (ROESSING; LAZZAROTTO, 2004). A receita direta gerada pela soja na safra 2006/2007 foi superior a 10 bilhões de dólares, podendo chegar a 50 bilhões

de dólares os benefícios indiretos da produção da soja nacional (DALL`AGNOL et al., 2007).

O número de patógenos associados à cultura da soja nas diversas regiões produtoras dispersas pelo globo chega a 100 diferentes espécies e destas, 35 apresentam importância econômica pelas grandes perdas que podem causar, sendo estas estimadas em 11% ou 15 milhões de toneladas na safra 1994/1995 (HARTMAN et al., 1999).

No Cone Sul foi relacionado 50 diferentes patógenos associados ao cultivo da soja, sendo as perdas estimadas na região na safra 1997/1998 em 1,8 bilhões de dólares (YORINORI, 2002).

No Brasil as perdas por organismos prejudiciais a soja na mesma safra, foram estimadas em 1,6 bilhões de dólares (YORINORI, 1999). Para o período de 1997 a 2000 foram estimadas perdas pela ocorrência de doenças em soja da ordem de 5,2 bilhões de dólares (YORINORI, 2002).

A cultura da soja no país a partir de 2000/2001 passou a associar-se com o vírus *Cowpea mild mottle virus* - CMMV, pertencente ao grupo Carlavirus e agente causal da necrose da haste da soja, podendo causar perdas significativas na produtividade de grãos. As preocupações dos especialistas com essa nova virose são grandes, pelo alto potencial de perdas que podem causar, pela sua rápida e ampla disseminação, pela agressividade e dificuldade de controle do vetor, sendo evidenciada a sua ocorrência nos estados de Goiás, Bahia, Maranhão, Mato Grosso e Paraná (ALMEIDA et al., 2002; ALMEIDA et al., 2003; ALMEIDA et al.; 2005).

A seleção de linhagens de soja para a resistência a necrose da haste da soja não era realizada conscientemente até 2000/2001, pois não havia sido detectada a presença do CMMV no Brasil e nem eram conhecidas as perdas que poderia causar. A partir de testes realizados com genótipos comerciais ficou evidenciado que 26% deles foram resistentes e que os demais apresentaram suscetibilidade ou desuniformidade frente a este organismo (ALMEIDA et al., 2003).

A seleção assistida por marcadores moleculares é um procedimento que pode ser amplamente utilizado nos programas de melhoramento para a geração de genótipos competitivos, com aumento substancial da eficiência da seleção pela superação das barreiras impostas pelas interações com o ambiente (GUIMARÃES et al., 2006).

Os objetivos deste trabalho foram determinar a herança da resistência à necrose da haste da soja e realizar o mapeamento genético por meio do método de análise de bulks segregantes (BSA), identificando marcadores moleculares microssatélites para a seleção assistida da característica, possibilitando auxiliar o desenvolvimento rápido e eficiente de cultivares resistentes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ORIGEM, DISTRIBUIÇÃO E IMPORTÂNCIA DA SOJA

A soja é uma espécie vegetal originária da Ásia, com o centro de origem primário relacionado ao nordeste da China e a Manchúria considerado o centro de origem secundário ou centro de diversidade. Sua domesticação ocorreu por volta do século XI a.C. A espécie *Glycine soja* pode ser considerada a provável ancestral da qual a espécie *Glycine max* poderia ter evoluído, pelo acúmulo de características qualitativas e quantitativas a partir de mutações genéticas em *G. soja*, com a manutenção do número de cromossomos (HYMOWITZ, 1970).

A distribuição desta espécie para cultivo em outras regiões desde a sua domesticação foi lenta até próximo o final do século XIX, ficando a mesma com a sua utilização restrita aos países asiáticos como a China, Coréia e Japão. Ao longo do século XIX o interesse em relação à soja era baseada na curiosidade exótica que despertava e estava presente nos jardins botânicos de várias cidades importantes do velho e novo mundo. A partir da segunda década do século XX, as qualidades apresentadas pela soja como alimento protéico e energético, despertaram interesses crescentes nas indústrias em vários pontos do mundo, embora com tentativas frustradas de introdução comercial do seu cultivo na Rússia, Inglaterra e Alemanha (EMBRAPA, 2008).

Os primeiros materiais genéticos foram introduzidos no Brasil por Gustavo Dutra, por volta de 1882 e foram testados no estado da Bahia (BONETTI, 1981; VERNETTI, 1983). Conforme relato de Verneti (1983), no estado de São Paulo os primeiros experimentos com soja foram conduzidos na estação agrônômica de Campinas em 1891 e nos anos de 1900 e 1901 sementes da oleaginosa foram distribuídas aos agricultores do estado.

No estado do Rio Grande do Sul a soja foi primeiramente cultivada em 1901 no município de Dom Pedrito. O cultivo da soja no Rio Grande do Sul teve um trabalho de incentivo muito importante realizado pelo professor americano E.C. Graig a partir de 1914. A primeira estatística de produção comercial de soja no Rio Grande do Sul data de 1941, informando uma área semeada de 640 hectares,

possibilitando uma produção na ordem de 450 toneladas, gerando o primeiro dado de produtividade média de grãos que foi de 700 kg/ha. Em 1949 foi realizada a primeira exportação de soja pelo Brasil atingindo o montante de 18.704 toneladas e em 1958 era inaugurada a primeira planta destinada a industrialização da soja no Brasil com capacidade de 150 toneladas/dia (BONETTI, 1981; VERNETTI, 1983).

O fato que mais marcou a expansão da soja no Brasil foi quando os investimentos concentrados em pesquisa com esta espécie possibilitaram o desenvolvimento de cultivares de soja adaptadas às regiões de baixas latitudes levando o seu cultivo para as regiões setentrionais do Brasil entre o trópico de Capricórnio e a linha do Equador (EMBRAPA, 2008).

A produção brasileira de soja no final da década de 1970 estava concentrada em torno de 98% na região sul do Brasil. Em 1980 a região sul representava 80% da produção da soja brasileira e em 1990 60%. Em 2007, a produção de soja brasileira passou a ser maior nas regiões de baixas latitudes com 58% em relação às regiões tradicionais do sul com 42% (DALL'AGNOL et al., 2007).

A soja é uma das poucas espécies capazes de disponibilizar grandes quantidades adicionais de matéria prima em menor espaço de tempo, atendendo as demandas futuras mundiais por farelos proteicos, óleos vegetais e biocombustíveis como o biodiesel e o H-Bio (DALL'AGNOL et al., 2007).

A nível mundial a soja é o quarto maior cultivo, abrangendo uma área de mais de 90 milhões de hectares que proporcionaram 219,7 milhões de toneladas de grãos no safra 2007/2008 (USDA, 2008).

A importância da soja é evidente quando se observa os dados de incremento do seu cultivo nos últimos trinta e sete anos, sendo evidenciado um crescimento da produção mundial de 763% no período entre 1970 e 2007, o que corresponde a um total de 192 milhões de toneladas, ou seja, mais de 5 milhões de toneladas ao ano (DALL'AGNOL et al., 2007).

O Brasil, como o segundo maior produtor de soja do mundo, cultivou no safra 2007/2008, uma área de aproximadamente 21,2 milhões de hectares, gerando uma produção estimada de 59,5 milhões de toneladas e uma produtividade média estimada em 2.804 kg/ha, sendo os estados do Mato Grosso com 5,1 milhões de hectares, do Paraná com 3,9 milhões de hectares e do Rio Grande do Sul com 3,8 milhões de hectares, os seus maiores produtores (CONAB, 2008). O Brasil acompanha de perto o maior produtor mundial de soja que é os Estados Unidos com

25,4 milhões de hectares e esta a frente da Argentina, o terceiro maior produtor com 16,8 milhões de hectares, conforme dados do USDA (2008).

Entre os países maiores produtores da oleaginosa, o Brasil é o único passível de atender as demandas futuras mundiais desta matéria prima, em função das excelentes condições edafoclimáticas disponíveis para a cultura, a tecnologia aqui desenvolvida para a produção sustentável em áreas tropicais e pela disponibilidade de significativas áreas que podem ser incrementadas para o seu cultivo, não sendo necessárias ações de desmatamento para este incremento (DALL`AGNOL et al., 2007).

A safra de 2006/2007 propiciou a geração de uma receita com a soja superior a 10 bilhões de dólares representando o percentual significativo de 8% do montante de bens exportados pelo Brasil, como citado por Dall`Agnol et al. (2007). Estes autores salientam também que os benefícios indiretos da produção da soja nacional atingem valores superiores a 50 bilhões de dólares.

Para Roessing e Lazzarotto (2004), a quantidade de empregos diretos, empregos indiretos e de efeito-renda envolvidos com todo este complexo agroindustrial da soja, abrange entre 4,5 a 5 milhões de pessoas, montante este correspondente a 6,5 a 7,5% da população economicamente ativa do Brasil.

2.2 ORGANISMOS PREJUDICIAIS A SOJA

O rendimento de grãos em soja pode sofrer perdas significativas pela associação da planta com fatores abióticos, como a ocorrência de estresse por deficiência ou excesso de água em determinados estádios de desenvolvimento da cultura, valores extremos de temperaturas, excessos ou deficiências de nutrientes, fitotoxicidade de ingredientes ativos e danos físicos dentre outras. Estas perdas poderão também ser importantes quando fatores bióticos passam a interagir com a cultura ao longo do ciclo, como a ocorrência de organismos prejudiciais, entre eles os fungos, as bactérias, os fitoplasmas, os nematóides e os vírus.

O cultivo da soja no Brasil ocupa uma extensa faixa que vai desde a latitude de 32° Sul até a latitude de 4° Norte, graças à adaptação da cultura a regiões mais setentrionais como a delimitada pelo Trópico do Capricórnio e a Linha

do Equador. A extensa região que atualmente é ocupada pelo cultivo da soja no Brasil expõe as plantas a uma crescente interação com os mais diferentes organismos que podem ser prejudiciais a cultura, podendo chegar a comprometer, em alguns casos, o seu cultivo econômico. O cultivo da soja de forma contínua em sistema de monocultura agrava em muito as interações com organismos prejudiciais que reduzem significativamente a produtividade de grãos, passando estes organismos a se constituírem em um dos principais fatores limitantes a produtividade de grãos e à estabilidade produtiva da soja.

O número de patógenos associados à cultura da soja nas diversas regiões produtoras dispersas pelo globo chega a 100 diferentes espécies e destas, 35 apresentam importância econômica pelas grandes perdas que podem causar tanto pela redução do rendimento de grãos como pela perda da qualidade do produto (HARTMAN et al., 1999). São em 50 os diferentes patógenos associados ao cultivo da soja nos quatro principais países produtores do Cone Sul (YORINORI, 2002).

As perdas causadas por patógenos associados à cultura da soja ocorrentes na safra 1994/1995, foram estimadas de forma conservadora a nível mundial em 11% do total estimado de produção, o que equivaleu a 15 milhões de toneladas (HARTMAN et al., 1999). Os mesmos autores relataram que só nos Estados Unidos as perdas atingiram quatro milhões de toneladas, sendo que, entre os principais patógenos, o nematóide de cisto da soja foi o que mais comprometeu a produção.

As perdas causadas por doenças ocorrentes em soja no Brasil na safra 1997/1998 foram na ordem de 1,6 bilhões de dólares o que representou significativa redução do rendimento potencial da soja (YORINORI, 1999). As perdas chegaram no mesmo ano a 1,8 bilhões de dólares quando computados as perdas dos principais países produtores do Cone Sul, ou seja, o Brasil, a Argentina, a Bolívia e o Paraguai (YORINORI, 2002). Destes relatos, pode-se projetar que as perdas no Brasil são significativamente superiores às estimadas para os demais países do Cone Sul, considerando a proporção das dimensões das áreas que envolvem cada um desses países. No período de quatro safras correspondendo de 1997 a 2000, Yorinori (2002) estimou perdas acumuladas de aproximadamente 5,2 bilhões de dólares, fato este que evidencia a grande importância econômica das perdas que os organismos prejudiciais ocasionam à cultura da soja.

Conforme estimativas de Balardin (2002), as perdas causadas somente pelo conjunto de doenças foliares na região sul do Brasil reduzem em 11% o rendimento de grãos, correspondendo a aproximadamente 163 milhões de dólares.

2.3 VIROSES EM PLANTAS E EM SOJA

A soja durante a sua expansão passou a se associar com muitas outras espécies de plantas diferentes daquelas que eram nativas no seu centro de origem, o que levou ao incremento de interações com os mais diferentes patógenos (ALMEIDA, 1994).

As partículas virais que infectam as plantas são chamadas de fitovírus e a associação delas com as mais diferentes espécies de plantas são muito comuns. Os fitovírus sobrevivem dentro de algumas células vivas como parasitas obrigatórios, utilizando toda a energia e o aparato celular do hospedeiro para a sua replicação. Essas partículas virais são submicroscópicas com dimensões inferiores aos pequenos protozoários, fitoplasmas e bactérias (ZAMBOLIM, 2002).

Os fitovírus de uma maneira geral são formados por uma ou mais moléculas do ácido ribonucléico (RNA) ou do ácido desoxirribonucléico (DNA). Esta molécula é envolvida por uma capa protéica ou lipoprotéica, com capacidade de multiplicação exclusiva no interior da célula do hospedeiro, com a perda parcial ou total da capa, o material genético é liberado para dentro da célula, desencadeando assim a infecção (ZAMBOLIM, 2002).

Foram descritas vinte e quatro diferentes fitoviroses de importância econômica relacionadas à cultura da soja (HARTMAN et al., 1999). O número de viroses que ocorrem naturalmente em soja é de 46, pertencentes a 27 diferentes grupos taxonômicos relacionados a doenças nesta espécie, nas mais diversas áreas de cultivo da soja pelo mundo (TOLIN; LACY, 2004).

A penetração e saída dos fitovírus nas células vegetais não são realizadas por mecanismos próprios, estando estes organismos dependentes na maior parte das vezes, de ferimentos realizados pelos mais diferentes vetores naturais. Os principais vetores de fitoviroses em soja são afídios (dezenove

fitovirose), besouros (cinco fitovirose), tripes (quatro fitovirose), mosca branca (sete fitovirose) e nematóides (três fitovirose). Além disso, foi demonstrada a transmissão de oito fitovirose também por sementes, e nem todas as virose que ocorrem naturalmente em soja já possuem os vetores identificados (TOLIN; LACY, 2004).

Os virologistas utilizam como principais métodos para a detecção e identificação de fitovirose os métodos biológicos (patogenicidade do vírus transmitido mecanicamente frente a um grupo de diferentes espécies hospedeiras), sorológicos (antisoro policlonal específico ou anticorpos monoclonais), métodos baseados nos ácidos nucléicos (seqüências e genomas, RT-PCR e hibridização), métodos baseados nos caracteres físicos e morfológicos das virose (caracterização de partículas purificadas) e de estudos envolvendo vetores, sementes dos hospedeiros e transmissão mecânica.

Os sintomas mais comuns de fitovirose em soja são o nanismo das plantas, necroses de folhas e hastes, folhas enrugadas, com mosaico, amareladas ou avermelhadas, além de algumas fitovirose apresentarem infecção latente não evidenciando nenhum sintoma aparente. A infecção simultânea da mesma planta por diferentes fitovirose determinam efeitos que poderão ser aditivos, sinérgicos ou de proteção cruzada. Nestes casos a identificação das fitovirose por meio da sintomatologia é ainda mais complexa (HARTMAN et al., 1999).

A mais importante fitovirose, anteriormente reconhecida, associada à cultura da soja no Brasil, era o vírus do mosaico comum da soja (VMCS), relatado pela primeira vez nos Estados Unidos em 1915. Esta fitovirose causa a redução do porte das plantas de soja, afetando tamanho e formato dos folíolos, com escurecimento da folha e enrugamento, podendo em alguns casos haver a formação de bolhas no limbo foliar e o prolongamento do ciclo vegetativo das plantas ou haste verde. As vagens podem ser reduzidas como também as sementes podem apresentar o sintoma denominado de “mancha café”. A transmissão do vírus ocorre por pulgões e por sementes.

Outras fitovirose ocorrentes no Brasil são o vírus da necrose branca do fumo – VNBF, o vírus do mosaico amarelo do feijoeiro – VMAF e o vírus do mosaico da alfafa – MVA (EMBRAPA, 2006).

2.4 NECROSE DA HASTE DA SOJA

A Necrose da Haste da Soja foi identificada no Brasil pela primeira vez na safra 2000/2001, nas regiões de Goiatuba e Morrinhos, em Goiás (ALMEIDA et al., 2002). Em 2001/2002 a virose já havia se espalhado por outras regiões de Goiás, e da Bahia. Em 2002/2003 foi identificada também no Mato Grosso e Maranhão (ALMEIDA et al., 2003), e no Paraná (HOFFMANN et al., 2003).

O agente causal da necrose da haste da soja foi relacionado à espécie *Cowpea mild mottle virus* – CpMMV, pertencente ao gênero viral Carlavirus, da Família Flexiviridae (ALMEIDA et al. 2002, 2003 e 2005). Esta constatação foi possível após grande número de avaliações envolvendo a utilização de microscopia eletrônica, método de análise molecular RT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase por Transcriptase Reversa), inoculação mecânica em hospedeiros alternativos, testes de transmissibilidade, análise eletroforética para quantificação da massa molecular e análise de imunoadsorção em microscopia eletrônica.

Os fitovirus pertencentes ao gênero Carlavirus apresentam em comum algumas características como a forma alongada e flexuosa das partículas, com 10-15 nm de diâmetro e 610-700 nm de comprimento, o ácido ribonucléico (RNA) apresenta-se monopartido e em fita única, com o seu conteúdo variando entre 5% a 8,5% e o seu peso molecular variando de 2,3 a 3,0 x 10⁶ (6,4 a 8,6 kb), a massa molecular da proteína do capsídio estimada em 31 a 39 KDa; o coeficiente de sedimentação entre 157 S e 172 S; o coeficiente de extinção variando de 2,1 a 2,3 e o peso molecular da partícula viral estimado em 50-60 x 10⁶ Da, e cada partícula viral contendo de 1600 a 1800 subunidades protéicas (ALMEIDA et al., 2003).

O primeiro relato da espécie *Cowpea mild mottle virus* – CpMMV em plantas foi realizado por Brunt e Kenten (1973), estando associado a caupi (*Vigna unguiculata*) em Gana. A partir deste primeiro relato outros foram realizados para a mesma espécie em diferentes partes do mundo e associado às mais diversas culturas, como a ocorrência em tomate na Nigéria (BRUNT; PHILLIPS, 1981), em soja na Tailândia (IWAKI et al., 1982), em soja na Costa do Marfim (THOUVENEL et al., 1982), em amendoim na Índia (LIZUKA et al., 1984; NAIDU et al., 1998), em feijão e feijão mungo na Tanzânia (MINK; KESWANI, 1987), em soja na Índia (SURYAWANSHI et al., 1989), em amendoim no Sudão (EI-HASSAN et al., 1997),

em soja no Brasil (ALMEIDA et al., 2002), em feijão na Argentina (RODRIGUEZ-PARDINA et al., 2004) e em soja na Argentina (LAGUNA et al., 2006).

O modo de replicação dos vírus do gênero Carlavirus nas plantas hospedeiras não é ainda integralmente conhecido e a determinação da estrutura do genoma destes fitovírus são muito importante para a compreensão das estratégias de replicação dos mesmos (ALMEIDA et al., 2002).

Muitos vírus do gênero Carlavirus tiveram a seqüência do seu genoma parcialmente determinada. A seqüência completa do genoma foi determinada para outros vírus como o *Potato virus M* – PVM com 8.534 nucleotídeos (ZAVRIEV et al., 1991), o *Blueberry scorch virus* – BBScV com 8.514 nucleotídeos e o *Aconitum latent virus* – AcLV com 8.657 nucleotídeos (FUJI et al., 2002).

Os fitovírus quando em multiplicação nas células e tecidos do hospedeiro, causam alterações a nível celular e de tecidos levando ao aparecimento de características morfológicas ou funcionais que podem ser comprometedoras (ZAMBOLIM, 2002).

Os sintomas descritos inicialmente por Almeida et al. (2002 e 2003), para as plantas infectadas nas regiões de Goiás, na safra de 2000/2001, nas regiões de Goiás e em Barreiras no estado da Bahia, na safra 2001/2002 foram o nanismo, a severa necrose da haste, do pecíolo, do broto, o mosaico e bolhas no limbo foliar e morte de plantas, podendo esta descrição coincidir com os sintomas de outros organismos prejudiciais a cultura da soja, como é o caso dos sintomas descritos por Costa e Carvalho (1955), para a virose transmitida por tripes e causada pelo vírus *Tobacco streak virus* – TSV. Além desta dificuldade, é muito comum diferentes genótipos desenvolverem diferentes sintomas frente ao mesmo agente causal viral, conforme observado por Almeida (1983) e Almeida et al. (2002).

Os sintomas aparentes de uma virose vão depender da estirpe do vírus, do genótipo do hospedeiro, das condições ambientais e da presença de outras viroses que possam estar presentes (ALMEIDA et al., 1994).

A infecção simultânea da mesma planta por diferentes fitoviroses determina efeitos que poderão ser aditivos, sinérgicos ou de proteção cruzada, tornando nesses casos a identificação das fitoviroses por meio da sintomatologia ainda mais complexa. A identificação de um vírus em particular como agente causal de uma determinada doença é uma tarefa desafiadora, embora haja disponibilidade de provas específicas imunológicas e baseadas nos ácidos nucléicos que possam

diminuir os erros e aumentar a velocidade de diagnósticos de doenças de origem virótica (HARTMAN et al., 1999).

2.4.1 Vetores

Os fitovírus encontram-se na natureza na sua maior parte associados a células de plantas suscetíveis das culturas de importância econômica e nas células de plantas hospedeiras, entre estas as plantas daninhas. Os aspectos relacionados a epidemiologia dos fitovírus envolvem três diferentes enfoques, que são o hospedeiro, o agente causal e as condições ambientais (ZAMBOLIM, 2002).

A transmissão de viroses para os seus hospedeiros pode ocorrer por meio de ferimentos causados por vetores como os artrópodos, os nematóides, os fungos, a inoculação mecânica e as práticas agrícolas em geral (HARTMAN et al., 1999). O grão de pólen e as sementes quando infectados poderão também transmitir as fitovirose.

A maior parte dos fitovírus é transmitida por artrópodos e entre esses predominam os insetos, sendo os afídeos responsáveis por 55% das transmissões de fitovirose, seguidos pelas cigarrinhas, mosca branca, besouros e tripes. Além destes artrópodos, os nematóides, os fungos, os ácaros, as sementes e os grãos de pólen também podem ser agentes de transmissão (ZAMBOLIM, 2002).

A transmissão do *Cowpea mild mottle virus* – CpMMV para a soja é realizada pela mosca branca *Bemisia tabaci* biótipo B igual a *B. argentifolii* Bellows & Perring (ALMEIDA et al., 2002 e 2003). A mosca branca também é responsável pela transmissão de outras viroses importantes envolvendo o grupo Carlavirus (IWAKI et al., 1982; COSTA et al., 1983; MUNIYAPPA; REDDY, 1983; ANNO-NYAKO et al., 1986; ALEGBEJO et al., 2001; MARUBAYASHI, 2006). Outros resultados descrevem o insucesso da transmissão do CpMMV por pulgões (BRUNT; KENTEN, 1973; BRUNT; PHILLIPS, 1981). Segundo Jones (2003), 111 viroses possuem a mosca branca como vetor, mas entre os membros do grupo Carlavirus, menos de 4% estão associados a este inseto.

A transmissão do CpMMV por sementes não foi evidenciada em soja e amendoim na Índia (LIZUKA et al., 1984), em soja e em amendoim na Indonésia

(HORN et al., 1991) e em soja (ROSSEL; THOTTAPPILLY, 1993; ALMEIDA et al., 2003). Por outro lado, foi relatada a transmissão do CpMMV por sementes, a uma baixa taxa em caupi, feijão e soja por Brunt e Kenten (1973) em caupi por Allen et al. (1982) e em soja por EL-Hammady et al. (2004).

O vetor do CpMMV pode ser tanto a *Bemisia tabaci* biótipo A como a *Bemisia tabaci* biótipo B igual a *B. argentifolii* Bellows & Perring, sendo este último o biótipo mais agressivo (comunicação pessoal Dr. Álvaro M. R. Almeida).

A mosca branca é um dos insetos mais comuns no Brasil e apresenta uma associação preferencial com plantas de algodoeiro, de feijoeiro e de soja, embora esteja também associada às plantas daninhas, tomate, berinjela, abóbora, brócolis, melancia, videira, plantas ornamentais entre outras (OLIVEIRA, 2003).

A aceitação do hospedeiro pelos adultos e pelas ninfas da mosca branca se dará após a penetração e prova dos tecidos da planta com o aparelho bucal sugador, que passam a partir daí a alimentarem-se através dos feixes do floema das folhas. Conforme Anno-Nyako et al. (1983), as fêmeas da mosca branca são vetores mais eficientes do que os machos.

Em algodoeiro, características físicas da superfície da folha como presença de tricomas glandulares viscosos e folhas okras e característica química como o pH da seiva, são fatores que podem estar relacionados a resistência das plantas à mosca branca (BERLINGER et al., 1996). Berlinger et al. (1996), relataram ainda que não houve sobrevivência de adultos da mosca branca por mais de duas horas quando os insetos foram expostos a 41^o C e 20% de umidade relativa, o que indicou que altas temperaturas e umidade relativa baixa podem controlar a população desse inseto praga.

Conforme a descrição de Gallo et al. (2002), o novo biótipo identificado para a *Bemisia tabaci*, conhecido como *B. tabaci* biótipo B igual a *B. argentifolii* Bellows & Perring, apresenta maior potencial como inseto praga de ação toxicogênica e como transmissor de viroses. Ainda salientando que as fêmeas deste biótipo colocam em média três vezes mais o número de ovos que a tradicional *B. tabaci*. No estado do Paraná, a presença deste biótipo B está restrita mais a região norte (MARTINEZ et al., 2000).

A relação vírus-vetor para o vírus CpMMV e mosca branca, foi relatada por Muniyappa e Reddy (1983), Zambolim (2002) e Marubayashi (2006)

como do tipo não-persistente, isto é, o vírus não circula no inseto e para este continuar disseminando o vírus terá que se alimentar de nova planta infectada. Por outro lado para Anno-Nyako (1986) e Hartman et al. (1999) a mosca branca transmite o CpMMV de uma maneira semi-persistente, ou seja, a aquisição ocorre em alguns minutos e o inseto retém a capacidade de transmissão por algumas horas.

A espécie *Cowpea mild mottle virus* – CpMMV, pertencente ao gênero viral Carlavirus, está associada a diversas espécies de plantas na África, Ásia, América do Sul, América do Norte e Oceânia. As principais famílias de plantas que apresentam espécies hospedeiras ao CpMMV são Amaranthaceae, Chenopodiaceae, Leguminosae-Papilionoideae, Solanaceae, Sterculiaceae e Tetragoniaceae. As espécies que apresentaram maior suscetibilidade frente à infecção experimental com o CpMMV foram *Arachis hypogaea*, *Beta vulgaris*, *Browallia demissa*, *B. speciosa*, *Cajanus cajan*, *Canavalia ensiformis*, *Chenopodium amaranticolor*, *Chenopodium foetidum*, *Chenopodium murale*, *Chenopodium quinoa*, *Glycine max*, *Gomphrena globosa*, *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana clevelandii*, *Nicotiana megalosiphon*, *Penstemon hirsutus*, *Phaseolus lunatus*, *Phaseolus vulgaris*, *Sesamum indicum*, *Solanum carolinense*, *Spinacia oleracea*, *Tetragonia tetragonioides*, *Theobroma cacao*, *Trifolium incarnatum*, *Vigna subterranea* e *Vigna unguiculata* (BRUNT; KENTEN, 1973; BRUNT; PHILLIPS, 1981; THOUVENEL et al., 1982; LIZUKA et al.; 1984; JEYANADARAJAH; BRUNT, 1993; ALMEIDA et al., 2003; MARUBAYASHY, 2006; ICTVdB MANEGEMENT, 2006).

2.4.2 Perdas causadas pelas fitoviroses

Dados sobre perdas relacionadas à necrose da haste no Brasil ainda não são disponíveis, mas relatos quando da identificação dos primeiros sintomas em 2000/2001, demonstram perdas totais de lavouras que foram infectadas pelo *Cowpea mild mottle virus* – CpMMV (ALMEIDA et al., 2002).

A infecção pelo CpMMV reduziu significativamente a estatura, o número de vagens e o número de sementes das plantas de soja, além de reduzir de

27% a 36% o peso de cem sementes em dois diferentes genótipos de soja como observado por El-Hammady et al. (2004).

Em caupi foram observadas perdas de 13% a 87% pela infecção com *Cowpea aphid-borne virus* – CABMV, pertencente ao gênero viral Potyvirus (BASHIR et al., 2002).

Em soja, um acentuado efeito sinérgico foi observado pela associação do Vírus do mosaico da soja e o Vírus do mosaico-em-desenho do feijoeiro, provocando a redução da matéria seca em 82,6% e da área foliar em 82,2%. A intensidade do sinergismo foi maior quanto menor era a idade das plantas (MARTINS et al., 1994).

As infecções múltiplas de fitovirose em caupi ocasionaram maiores perdas no rendimento de grãos e causaram uma redução acentuada da viabilidade das sementes quando comparadas com infecções isoladas, sendo as maiores perdas relacionadas às infecções mais iniciais (TAIWO et al., 2007).

A interação de diferentes viroses com diferentes cultivares de caupi, evidenciaram respostas diferenciais e significativas no rendimento de grãos e no crescimento das plantas quando eram inoculadas aos dez e aos trinta dias após a semeadura. Foi observado também que a associação de duas a três fitovirose inoculadas na mesma planta podem levar a perdas totais no rendimento de grãos (KAREEM; TAIWO, 2007).

2.4.3 Controle das fitovirose

O controle das fitovirose não é uma tarefa fácil, pois as estratégias preconizadas envolvem desde a planta hospedeira, até as fontes de inóculo e os agentes de transmissão que são os vetores. A forma mais fácil e de menor custo com certeza é a utilização de cultivares resistentes.

As práticas culturais contribuem de forma significativa no manejo integrado de insetos vetores como a *B. tabaci*, sendo estas práticas eficientes se tiverem uma utilização regional, o que vai requerer mudanças significativas nas práticas de cultivo convencionais (HILJE et al., 2001).

As principais ações de controle de viroses associadas às plantas consistem em eliminar toda e qualquer fonte de inoculo, evitar a associação da cultura com o vetor e empregar plantas resistentes, sendo que, a utilização combinada destas ações levam ao controle integrado de viroses. Além disso, medidas integradas como a utilização de sementes e órgãos de propagação vegetativa livres de vírus, escolha adequada de local e de época de semeadura, barreiras vivas de proteção, armadilhas coloridas, erradicação de plantas silvestres e de plantas voluntárias, controle químico de vetores para viroses que não sejam disseminados de forma não-circulativa, controle biológico propiciado pela proteção cruzada, uso de cultivares resistentes entre outros também são recomendadas para o controle das fitoviroses (ZAMBOLIM, 2002).

Os trabalhos conduzidos para a identificação de genótipos de soja resistentes a necrose da haste da soja, no Brasil, identificaram 49 cultivares resistentes em um total de 168 genótipos comerciais avaliados (ALMEIDA et al., 2003).

A engenharia genética possibilita o desenvolvimento de uma prática de grande eficiência para o controle de fitoviroses, que é a obtenção de plantas transgênicas com a incorporação do gene que expressa a capa protéica do fitovírus que se quer controlar. Di et al. (1996), obtiveram a resistência da soja ao *Bean pod mottle virus* – BPMV, após a transformação das plantas via *Agrobacterium tumefaciens*, com o gene pCP que codifica a capa protéica deste fitovírus. Reddy et al. (2001), obtiveram também a resistência de plantas de soja ao BPMV, utilizando o método de biobalística para a transformação com o gene pCP.

O desenvolvimento de plantas transgênicas objetivando a resistência a fitoviroses já é realidade para as espécies mamoeiro, alfafa, batata, fumo, tomateiro e cucurbitáceas (ZAMBOLIM, 2002).

2.5 ESTUDOS DE HERANÇA GENÉTICA DA RESISTÊNCIA AS FITOVIROSES

O estudo de fitoviroses em geral é complexo, pois envolve interações entre um vetor, uma espécie hospedeira e um agente causal, estando à expressão dos sintomas dependente das condições ambientais, da estirpe do fitovírus, da

ocorrência concomitante de mais de um fitovírus, do estágio fisiológico da planta quando da inoculação e do background genético da planta.

A redução da multiplicação do agente causal e da sua disseminação no ambiente é desejável para o controle a longo prazo das fitoviroses. O uso de cultivares resistentes é a maneira mais eficiente e econômica de controlar fitoviroses (TOLIN; LACY, 2004).

A definição do padrão de herança das diversas fitoviroses associadas às culturas é um dos conhecimentos mais importantes, pois possibilitam o desenvolvimento de estratégias alternativas para a seleção de genótipos resistentes em programas de melhoramento.

A maior ou menor dificuldade na determinação do padrão de herança genética de uma característica vai depender do número de genes envolvidos. Quando a característica for dependente da expressão de um a poucos genes ou qualitativa o estudo da herança será de relativa simplicidade, sendo testadas diversas hipóteses baseadas na segregação observada ajustada a frequência esperada. Quando a característica for quantitativa, ou seja, condicionada por um grande número de genes de diferentes e pequenos efeitos na característica, o estudo será mais complexo e exigirá a utilização de modelos de genética quantitativa.

A maior parte dos trabalhos consultados que envolveram estudos de herança da resistência a diferentes fitoviroses nas mais diversas espécies de plantas, apresentaram um padrão de herança simples ou qualitativa, onde são envolvidos poucos genes na característica.

Um dos principais fitovírus associados à soja é o *Soybean mosaic virus* – SMV, cujo primeiro estudo de herança foi realizado por Kiihl e Hartwig (1979). A partir do uso de dois isolados (SMV-1 e SMV-1-B) foi evidenciado dois tipos de resistência, um alto nível de resistência as duas estirpes (SMV-1 e SMV-1-B) que foi simbolizada por *Rsv Rsv* e um nível intermediário que conferiu resistência a estirpe (SMV-1) que foi descrita por *rsv[†] rsv[†]*. As plantas suscetíveis foram associadas ao *rsv rsv*. Os alelos *Rsv*, *rsv[†]* e *rsv* formam uma série alelomórfica, onde o alelo *Rsv* é dominante sobre *rsv[†]* e este sobre *rsv*.

Silva et al. (2004), também realizaram um estudo de herança a partir de uma nova estirpe de *Soybean mosaic vírus* - SMV que quebrou a resistência da cultivar FT-10 no Brasil. Estes autores identificaram mais um alelo alternativo para o

locus *Rsv₁*, sendo denominado de *Rsv₁^d* e diferente daqueles encontrados nas fontes de resistência Epps e Ogden utilizadas.

A resistência ao *Soybean mosaic vírus* – SMV na cultivar de feijoeiro Great Northern 1140 foi relacionada por um único gene (*Smv*) que apresentava dominância incompleta (PROVVIDENTI et al., 1982).

Kyle e Provvidenti (1987) relataram dois alelos dominantes de locos independentes associados à resistência do feijoeiro ao *Watermelon mosaic vírus 2* – WMV 2, um dos alelos foi designado de *Wmv* que impedia a disseminação sistêmica do vírus embora a replicação viral ocorresse no tecido inoculado. Outro alelo foi descrito como *Hsv* que conferia resistência tanto local como sistêmica ao WMV 2.

Um gene dominante *Hss* foi identificado em cultivar de feijoeiro BT-1, que condicionava uma rápida resposta letal com necrose ao *Soybean mosaic vírus* – SMV. Foi evidenciado que este gene *Hss* era ligado aos genes *I*, *Bcm*, *Cam* e *Hsw* presentes na cultivar BT-1 conferindo resistência a membros pertencentes ao gênero Potyvirus. Este trabalho demonstrou que a combinação de um gene ou mais genes com o *Hss* que condiciona resposta sistêmica letal pode resultar em um fenótipo resistente (KYLE; PROVVIDENTI, 1993).

O estudo da herança para determinar a resistência ou a inibição do movimento sistêmico em soja quando associada ao *Cowpea chlorotic mottle vírus* – CpCMV, evidenciou a presença de dois genes recessivos responsáveis pela característica (GOODRICK et al., 1991).

Maluf et al. (1997), conduziram estudo para determinar a herança da resistência ao *Watermelon mosaic vírus 1* – WMV 1 nas cultivares de abóbora ABL-010 e Redlands Trailblazer. A resistência na cultivar ABL-010 foi condicionada pela ação de três genes com dominância parcial e na cultivar Redlands Trailblazer estavam envolvidos dois genes com efeitos aditivos.

Em algodoeiro, a resistência à doença azul, causada pelo *Cotton leaf roll dwarf virus* – CLRDV também é condicionada por um gene dominante (PUPIM JÚNIOR, 2007).

O estudo realizado por Ayala et al. (2002), com o objetivo de identificar QTLs (Quantitative Trait Loci) para a tolerância ao *Barley yellow dwarf* – BYDV em trigo, evidenciou um grande número de QTLs com pequenos efeitos e uma distribuição contínua para todos os caracteres avaliados, confirmando a natureza poligênica e a complexidade da tolerância ao BYDV em trigo.

O controle genético da resistência do genótipo de melancia PI 595201 ao *Watermelon mosaic virus* – WMV, foi relacionada a um controle oligogênico ou poligênico (BESERRA JÚNIOR et al., 2006).

O conhecimento das relações genéticas entre as diversas fontes de resistência é de fundamental importância, pois foi possível observar nos trabalhos descritos anteriormente que, em diferentes genótipos, poderiam estar associados diferentes genes para a resistência e apresentando diferentes tipos de ação gênica. O uso mais eficiente do germoplasma disponível em um programa de melhoramento passa sem dúvida, pelo conhecimento antecipado da herança do caráter de cada fonte de genes para a resistência.

2.6 MARCADORES MOLECULARES NO MELHORAMENTO DE PLANTAS

2.6.1 Importância

A utilização de marcadores associados a características morfológicas sempre foi uma ferramenta importante no melhoramento de plantas. Os marcadores morfológicos são de fácil identificação, mas são restritos em número e limitados a pequeno grupo de espécies, sendo limitada, portanto a sua associação com genes que expressam características de importância econômica. A disponibilidade de grande número de marcadores genéticos a partir da década de setenta tornou mais freqüente o uso de marcadores. Estes marcadores genéticos apresentam características importantes como a não interação com o ambiente, a ausência de efeito epistático e pleiotrópico, o alto polimorfismo presente para cada loco e à co-dominância (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996).

Os marcadores moleculares hoje disponíveis são utilizados nos programas de melhoramento nas etapas que antecedem a criação e exploração da variabilidade criada pela hibridação, nas etapas que envolvem a criação de variabilidade e seleção, e nas etapas posteriores ao desenvolvimento de linhagens competitivas passíveis de serem lançadas como cultivares comerciais (PEREIRA; PEREIRA, 2006; GUIMARÃES et al., 2006; SCHUSTER et al., 2006).

Os marcadores moleculares são utilizados nas etapas que antecedem a criação de variabilidade ou no pré-melhoramento, em estudos da diversidade genética, caracterização dos bancos de germoplasma e mapeamento genético entre outras (PEREIRA; PEREIRA, 2006).

Os marcadores moleculares podem ser utilizados também nos programas de melhoramento nas etapas que envolvem a criação de variabilidade e seleção de plantas e linhagens, por meio da certificação de hibridações, da predição do desempenho de híbridos simples, da seleção assistida por marcadores moleculares e de retrocruzamentos assistidos por marcadores moleculares (GUIMARÃES et al., 2006).

A utilização de marcadores moleculares em programas de melhoramento de plantas possibilita a realização de análises genéticas mais detalhadas, principalmente quando envolve a introgressão de características de herança simples, onde têm demonstrado vários resultados positivos. Já em relação à seleção assistida por marcadores que envolvem características quantitativas, pouco tem sido feito em termos de aplicação prática (YOUNG, 1999).

A utilização de germoplasma não adaptados tem sido intensa pelos programas de melhoramento com o objetivo de introduzir características de herança simples, como resistência a patógenos e pragas pelo método de retrocruzamento. O uso de marcadores moleculares ligados aos genes de resistência é de grande importância na seleção de genótipos resistentes, principalmente quando o programa de melhoramento tem como objetivo a introdução de dois ou mais genes de resistência, quando o fenótipo é de determinação complexa ou quando o processo de avaliação requer a destruição da planta. A progênie de cada ciclo de cruzamento é avaliada com base na presença de uma marca associada à característica de interesse. Este procedimento mascara o efeito de alelos dominantes, elimina a variabilidade devido a efeitos ambientais e pode simplificar padrões de herança para características complexas (RAFALSKI; SCOTT, 1993). Estes mesmos autores ressaltam que muitos dos problemas encontrados em um programa de melhoramento baseado na estimativa fenotípica de uma característica agrônômica tais como efeitos ambientais ou herança quantitativa podem ser eliminados por diagnósticos baseados na análise do DNA. A cada geração de retrocruzamento, os indivíduos cuja composição genômica mais se aproxima do parental recorrente são selecionados e utilizados para o próximo cruzamento, permitindo com isto acelerar a

introgressão de características de fontes de germoplasma exóticas (OPENSHAW et al., 1994).

Michelmore et al. (1991), desenvolveram a técnica de bulks segregantes - BSA (Bulked Segregant Analysis), que tem revolucionado a identificação de regiões genômicas associadas a caracteres de herança simples. Essa metodologia baseia-se na construção de dois bulks de DNA contrastantes para uma característica fenotípica entre os indivíduos de uma população segregante. Cada bulk é constituído de uma mistura de DNA de indivíduos de uma população segregante com fenótipo semelhante para a característica de interesse. Desta forma todos os indivíduos que compõem um bulk compartilham uma mesma região genômica que contém o gene de interesse e segregam para as demais regiões. Assim, o marcador que co-segregar com os bulks tem uma grande probabilidade de estar ligado à característica avaliada, sem necessitar da genotipagem de um grande número de indivíduos nem da construção de um mapa genético saturado.

Os marcadores moleculares podem ainda ser amplamente utilizados no pós-melhoramento, ou seja, nas etapas posteriores ao desenvolvimento de linhagens competitivas passíveis de serem lançadas como cultivares comerciais, como na caracterização de cultivares, certificação da pureza de sementes genéticas e da identificação de genealogias entre outras (SCHUSTER et al., 2006).

2.6.2 Tipos de marcadores moleculares

Marcador molecular pode ser definido como qualquer característica molecular que correspondam a regiões expressas ou não do genoma, permitindo diferenciar dois indivíduos com base no seu genoma, sendo herdáveis, mas não sofrendo interação com o ambiente (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996).

A seleção de indivíduos a partir de diferenças a nível de DNA detectadas por marcadores moleculares é muito mais eficiente e segura se comparada com a seleção fenotípica, pois os marcadores independem do ambiente, não variam ao longo do ciclo de vida do indivíduo e são eficientes para as características de alta ou baixa herdabilidade (MARCELINO et al., 2007).

Os principais marcadores moleculares utilizados na análise genética de plantas são as isoenzimas, RFLPs, RAPDs, microssatélites, AFLPs e SNPs (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996; CAIXETA et al., 2006).

As isoenzimas abrangem um grupo de múltiplas formas moleculares da mesma enzima ocorrente em uma espécie. Tal marcador utiliza eletroforese em gel de amido para visualização do produto enzimático. As diferenças observadas na mobilidade de isoenzimas em um campo elétrico definem as diferenças ao nível de seqüência de DNA que codificam estas enzimas. O padrão de expressão das isoenzimas é de co-dominância, sendo os dois alelos de um loco expressos e visualizados (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996).

O marcador de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism ou Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição) descrito por Botstein et al. (1980), é uma técnica baseada no princípio que diferenças no DNA resultam em corte diferenciado por enzimas de restrição, resultando fragmentos de DNA de diferentes tamanhos que serão detectados por sondas específicas, que vão se parear ou hibridar a estas seqüências complementares do DNA do indivíduo em estudo, sendo as sondas marcadas por radiatividade ou fluorescência para visualização. Este tipo de marcador é co-dominante e foi utilizado por Helentjaris et al. (1986), na construção de mapas de ligação genética para as espécies de milho e de tomate.

A técnica de PCR (Polimerase Chain Reactions ou Reação da Polimerase em Cadeia) se baseia na amplificação de fragmentos específicos de DNA, utilizando a DNA polimerase e iniciadores que serão os pontos de partida para a polimerase copiar o DNA, resultando em milhões de cópias de um determinado fragmento de DNA. Segundo Ferreira e Grattapaglia (1996), a utilização da técnica PCR para obtenção de marcadores foi limitada inicialmente, pois a construção dos iniciadores a serem utilizados na amplificação via PCR dependiam do conhecimento prévio da seqüência de nucleotídeos que flanqueiam a seqüência de DNA de interesse, sendo necessários então a clonagem e seqüenciamento da região.

O marcador de RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA ou Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso) é uma técnica que utiliza a reação de amplificação por PCR e apenas um iniciador curto com cerca de dez nucleotídeos, que irá então se parear em diversos pontos do genoma, não exigindo o conhecimento prévio da seqüência que esta sendo amplificada, portanto muitas

regiões do DNA repetitivo podem ser amostradas (WILLIAMS et al. 1990; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996; CAIXETA et al., 2006). Estes marcadores RAPD são dominantes, não sendo possível distinguir indivíduos homozigotos dominantes de indivíduos heterozigotos em uma população, pois apenas um alelo é detectado pela amplificação do fragmento (CAIXETA et al., 2006).

A baixa capacidade de reproduzirem-se os resultados quando se utiliza marcadores RAPD levou esta técnica a ter a sua confiabilidade questionada. Essa limitação pode ser contornada com a transformação dos marcadores RAPD em marcadores denominados de SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions ou Regiões Amplificadas Caracterizadas por Seqüências), onde o fragmento de DNA que corresponde ao marcador de DNA é clonado e seqüenciado, sendo sintetizados dois iniciadores mais longos do que era o original, passando a amplificar o mesmo marcador (PARAN; MICHELMORE, 1993).

Marcadores Microsatélites ou SSR (Simple Sequence Repeats ou Seqüência Simples Repetidas ou Seqüências de DNA Microsatélites) têm sido um dos mais usados no melhoramento de plantas e é baseado na técnica de PCR. Os microsatélites consistem de unidades núcleo de 2-5 nucleotídeos tais como (CA), (ATT) ou (ATGT) que são repetidas em tandem no genoma (LITT; LUTY, 1989). As repetições em tandem destas pequenas seqüências podem ocorrer de dezenas a centenas de vezes (GUPTA et al., 1996; MÖRCHEN et al., 1996). As regiões que flanqueiam um microsatélite são geralmente únicas e conservadas entre genótipos da mesma espécie e iniciadores são construídos para estas regiões e utilizados para amplificar fragmentos de DNA contendo o microsatélite. Polimorfismo de comprimento é criado quando produtos de PCR de diferentes alelos variam no comprimento, como resultado da variação do número de unidades repetidas no microsatélite, podendo então ser analisados por eletroforese em gel de acrilamida ou gel de agarose. O alto nível de informação e a co-dominância de marcadores microsatélites, sua grande ocorrência em genomas eucarióticos e sua fácil amplificação via tecnologia padrão de PCR, tornou os microsatélites marcadores preferidos para várias espécies (RUSSEL et al., 1997, LANZA et al, 2000). Neste sentido, marcadores microsatélites têm sido amplamente utilizados na caracterização e avaliação da diversidade genética de genótipos de soja (RONGWEN et al., 1995; NARVEL et al., 2000; ALCÂNTARA NETO, 2001; TANYA et al., 2001).

O marcador AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms ou Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados) consiste inicialmente da clivagem com duas enzimas de restrição do total do DNA genômico. Posteriormente ocorre a ligação de adaptadores específicos nos terminais dos fragmentos genômicos que foram gerados quando da clivagem, amplificação pela técnica de PCR de pequena fração dos fragmentos gerados utilizando-se iniciadores específicos que reconhecem seqüências nos adaptadores e é finalizada com a separação em gel de alta resolução das pequenas frações dos fragmentos amplificados (VOS et al., 1995; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996). Segundo estes mesmos autores a técnica de AFLP pode ser utilizada para DNA de qualquer origem e complexidade, inclusive para espécies que apresentam uma baixa taxa de polimorfismo, isto é, uma estreita base genética.

Os marcadores SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms ou Polimorfismos de um Único Nucleotídeo) são mutações de ponto, inserções ou deleções em regiões expressas ou não do genoma, sendo baseados em polimorfismos resultantes de alterações de uma única base entre fragmentos homólogos de DNA. A alteração deve ocorrer em pelo menos 1% da população para ser considerada um marcador SNP (Caixeta et al., 2006). Estes autores salientam que os marcadores SNPs apresentam o maior nível de informação entre os marcadores genéticos, simplicidade, reprodutibilidade, podendo a distinção entre os alelos ser totalmente automatizada.

2.6.3 Seleção assistida por marcadores moleculares

A utilização de marcadores moleculares ligados a genes de importância auxiliam na seleção indireta de genótipos desejados com segurança e eficiência, pois não são influenciados pelo ambiente (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996; MARCOLINO et al., 2007).

A utilização como rotina da seleção assistida para características de interesse em programa de melhoramento deve considerar que o gene ou QTL já tenha sido previamente mapeado, a natureza qualitativa ou quantitativa da característica, o modo de ação gênica, o efeito do gene na expressão do fenótipo, a

complexidade da avaliação do fenótipo e a eficiência com que o marcador pode discriminar a característica (GUIMARÃES et al., 2006). Estes autores salientam que a utilização se torna mais necessários quando a determinação do fenótipo é de grande complexidade, a planta necessita ser destruída nesta determinação, a análise fenotípica deve ser realizada em planta adulta, a determinação envolve altos custos, quando se objetiva introduzir várias características simultaneamente, entre outras.

Vários autores têm identificado marcadores moleculares associados a genes de interesse, utilizando a técnica de bulks segregantes ou BSA (Michelmore et al., 1991). Paran e Michelmore (1993) identificaram marcadores RAPD e RFLP ligados a genes de resistência ao míldio em alface. Alzate-Marin (1996), utilizando a análise de bulks segregantes, identificou marcadores RAPD ligados em fase de acoplamento e de repulsão a genes de resistência a *Colletotrichum lindemuthianum*, agente causal da antracnose do feijoeiro. De forma similar, foi identificado um marcador RAPD co-dominante, ligado ao gene que confere resistência ao cancro da haste da soja (CARVALHO et al., 2002).

Regiões genômicas que controlam outras características importantes como amadurecimento do fruto e abscisão do pedicelo em tomate, foram também detectadas utilizando essa estratégia (GIOVANNONI et al., 1991).

A estratégia de bulks segregantes ou BSA também pode ser utilizada na identificação de locos controladores de caracteres quantitativos (QTLs – Quantitative Trait Loci) que possuam grande efeito sobre a característica de interesse (QTLs de efeito maior). Utilizando esta estratégia, Schuster (1999) e Schuster et al. (2001) identificaram marcadores moleculares RAPD e SSR que explicaram 56% da resistência da soja ao nematóide de cisto (NCS), raça 9, e 39% da resistência a raça 14. Cervigni (1999) identificou marcadores SSR que explicaram 30% da resistência da soja à raça 3 do NCS.

Yongguo et al. (2000) trabalhando com marcadores RFLP descobriram dois QTLs de efeito oposto quanto a estatura em milho, um deles explicou 51,8% do aumento da estatura das plantas e o outro explicou 38,6% da redução da estatura das plantas.

Marcadores AFLP derivados de RFLP foram identificados ligados ao gene Rsv3 em soja, que confere resistência ao fitovírus *Soybean mosaic virus* – SMV, a uma distância de 0,9 cM (KRISTIPATI, 1996). Wang et al. (2000),

identificaram dois marcadores AFLP flanqueando o gene de resistência a murcha de fusarium em melão a 1,7cM e 3,3 cM. Teixeira (2004) identificou marcador AFLP associado ao gene de resistência ao fitovírus *Papaya ringspot vírus* – PRSV-W em melão a uma distância de 0,526 cM.

Wang e Roberts (2006), utilizando a análise de bulks segregantes ou BSA identificaram marcadores AFLP associados ao gene *rkn1* que confere resistência ao *Meloidogyne incognita* em algodoeiro. Wang et al. (2006), identificaram marcadores SSR associados ao gene *rkn1* que confere resistência ao *Meloidogyne incognita* em algodoeiro.

Marcadores moleculares podem ser utilizados ainda para avaliar a estrutura das populações segregantes. Pupim (2007) descreveu a utilização de marcadores moleculares para a identificação e eliminação de plantas descendentes da autofecundação do parental feminino em uma população supostamente F_2 , evitando a tomada errônea de decisões em estudos de herança.

2.7 REFERÊNCIAS

ALCÂNTARA NETO, F. **Marcadores microssatélites na identificação de cultivares de soja**. 2001. 46p. **Dissertação Mestrado em Fitotecnia** – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

ALEGBEJO, M. D. Whitefly transmitted plant viruses in Nigeria. **Journal of Sustainable Agriculture**, v.18, p.99-109, 2001.

ALLEN, D. J.; THOTTAPPILLY, G.; ROSSEL, H. W. Cowpea mottle virus: field resistance and seed transmission in virus-tolerant cowpea. **Annals of Applied Biology**, v.100 (2): p.331-336, 1982.

ALMEIDA, A. M. R. Distribuição e prevalência de estirpes do vírus do mosaico comum da soja no Estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, v.8(2): p.349-352, 1983.

ALMEIDA, A. M. R. Virus diseases. In: EMBRAPA. National Soybean Research Center. **Tropical soybean: improvement and production**. Rome: FAO. 1994. p.65-73. (FAO, Plant Production and Protection Series, 27), 1994.

ALMEIDA, A. M. R.; MARIN, S. R. R.; VALENTIN, N.; BITTNECK, E.; NEPOMUCENO, A. L.; BENATO, L. C.; VAN DER VLIET, H.; KITAJIMA, E. W.; PIUGA, F. F. **Necrose da haste: nova virose da soja no Brasil**. Londrina, PR: Embrapa/CNPSo, Circular Técnica, 36, 2002. 11p.

ALMEIDA, A. M. R.; PIUGA, F. F.; KITAJIMA, E. W.; GASPAR, J. O.; VALENTIN, N.; BENATO, L. C.; MARIN, S. R. R.; BINNECK, E.; OLIVEIRA, T. G. de, BELINTANI, P.; GUERZONI, R. A.; NUNES JUNIOR, J.; HOFFMANN, L.; NORA, P. S.; NEPOMUCENO, A. L.; MEYER, M. C.; ALMEIDA, L. A. **Necrose da haste da soja**. **Documentos / Embrapa Soja, nº 221**, Londrina: Embrapa Soja, 2003. 44p.

ALMEIDA, A. M. R.; PIUGA, F. F.; MARIN, S. R. R.; KITAJIMA, E. W.; GASPAR, J. O.; OLIVEIRA, T. G. de; MORAES, T. G. de. Detection and partial characterization of a Carlavirus causing stem necrosis of soybean in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v.30(2): p.191-194, 2005.

ALZATE-MARIN, A. L. Resistência à antracnose do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.): diversidade genética de raças de *Colletotrichum lindemuthianum*, herança da resistência e identificação de marcadores moleculares. 1996. 65p. **Tese Doutorado em Genética e Melhoramento** – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

ANNO-NYAKO, F. O.; VETTEN, H. J.; ALLEN, D. J.; THOTTAPPILLY, G. The relation between cowpea golden mosaic and its vector, *Bemisia tabaci*. **Annals of Applied Biology**, v.102(2): p.319-323, 1983.

ANNO-NYAKO, F. O. Semipersistent transmission of an "extra mild" isolate of cowpea mild mottle virus on soybean by the withefly *Bemisia tabaci* Genn. in Nigeria. **Tropical Agriculture**, v.63(3): p.193-194, 1986.

AYALA, L.; HENRY, M.; VAN GINKEL, M.; SINGH, R.; KELLER, B.; KHAIRALLAH, M. Identification of QTLs for BYDV tolerance in bread wheat. **Euphytica**, v.128: p.249-259, 2002.

BALARDIN, R. S. **Doenças da soja**. Santa Maria: Editora do Autor, 2002. 100p.

BASHIR, M.; AHMAD, Z.; GHAFOOR, A. Cowpea aphid-borne mosaic potyvirus: a review. **International Journal of Pest Management**, V.48(2): p.155-168, 2002.

BERLINGER, M. J.; LEHMANN-SIGURA, N.; TAYLOR, R. A. J. Survival of *Bemisia tabaci* adults under different climatic conditions. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.80(3): p.511-519, 1996.

BESERRA JR, J. E. A.; MALUF, W. R.; FIGUEIRA, A. R.; BARGUIL, B. M. Herança da resistência ao *Watermelon mosaic virus* em melancia (*Citrullus lanatus* L.). **Fitopatologia Brasileira**, v.31(3): p.302-305, 2006.

BONETTI, L. P. Distribuição da soja no mundo. In: Miyasaka, S.; Medina, J. C. (eds). **A soja no Brasil**, p.1-6, 1981.

BORDIGNON, J. R. e MANDARINO, J. M. G. Soja: composição química, valor nutricional e sabor. **Documentos / Embrapa Soja, nº 70**, Londrina: Embrapa Soja, 1994. 31p.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **Am. J. Hum. Genetics**, v.32: p.314-331, 1980.

BRUNT, A. A., KENTEN, R. H. Cowpea mild mottle, a newly recognized virus infecting cowpeas (*Vigna unguiculata*) in Gana. **Annals of Applied Biology**, v.74: p. 67-74, 1973.

BRUNT, A. A.; PHILLIPS, S. "Fuzzi vein", a disease of tomato (*Lycopersicon esculentum*) in Western Nigeria induced by cowpea mild mottle virus. **Tropical Agriculture (Trinidad)**, v.58(2): p.177-180, 1981.

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

CARVALHO, G. A.; SEDIYAMA, T.; MARIN, A. L. A.; BARROS, E. G. e MOREIRA, M. A. Identificação de marcadores RAPD ligados a um gene de resistência ao cancro da haste da soja. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, n.5, p.474-478, 2002.

CERVIGNI, G. D. L. Mapeamento de genes de resistência à raça 3 do nematóide de cisto da soja (*Heterodera glycines* Ichinohe). 1999. 52p. **Dissertação Mestrado em Genética e Melhoramento** – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Soja: comparativo de área, produtividade e produção de grãos safras 2006/07 e 2007/08 – Oitavo Levantamento maio 2008**. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br>. Acesso em: 18 maio de 2008.

CORRÊA, R. X.; GOOD-GOD; P. I. V.; OLIVEIRA, M. L. P.; NIETSCHKE, S.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Herança da resistência a mancha angular do feijoeiro e identificação de marcadores moleculares flanqueando o loco de resistência. **Fitopatologia Brasileira**, v.26(1): p.27-32, 2001.

COSTA, A. S.; CARVALHO, A. M. B. Studies on Brazilian tobacco streak. **Phytopathologische Zeitschrift**, v.42, n.1, p.113-138, 1955.

COSTA, A. S.; GASPAR, J. O.; VEGA, J. Mosaico angular do feijoeiro Jalo causado por um "carlavírus" transmitido pela mosca branca *Bemisia tabaci*. **Fitopatologia Brasileira**, v.8(2): p.325-337, 1983.

DALL`AGNOL, A.; ROESSING, A. C.; LAZZAROTTO, J. J.; HIRAKURI, M. H.; OLIVEIRA, A. B. de. **O complexo agroindustrial da soja brasileira**. Londrina, PR: Embrapa/CNPSo, Circular Técnica, 43, 2007. 11p.

DI, R.; PURCELL, V.; COLLINS, G. B.; GHABRIAL, S. A. Production of transgenic soybean lines expressing the bean pod mottle virus coat protein precursor gene. **Plant Cell Reports**, v.15(10): p.746-750, 1996.

EL-HAMMADY, M.; ALBRECHTSEN, S. E.; ABDELMONEM, A. M.; EL-ABBAS, F. M. A.; GAZALLA, W. Seed-borne cowpea mild mottle virus on soybean in Egypt. **Arab Universities Journal of Agricultural Sciences**, v.12(2): p.839-850, 2004.

EL-HASSAN, S.M.; NAIDU, R.A.; AHMED, A.H.; MURANT, A.F. A serious disease of groundnut caused by cowpea mild mottle virus in the Sudan. **Journal of Phytopathology**, v.147: n.7: p.301-304, 1997.

EMBRAPA SOJA, **A soja**. Disponível em <www.cnpso.embrapa.br> Acesso em maio de 2008.

EMBRAPA SOJA, **Tecnologias de Produção de soja - Região central do Brasil 2007**. Londrina: 225p. 2006.

FERREIRA, M. E. e GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2 ed. Brasília: MA/EMBRAPA/CENARGEN. 220p. 1996.

FUJI, S.; YAMAMOTO, H.; INOUE, M.; YAMASHITA, K.; FUKUI, Y.; FURUYA, H.; NAITO, H. Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of Aconitum Latent Virus (genus Carlavirus) isolated from *Delphinium* sp. **Archives of Virology**, v.147 (4): p.865-870, 2002.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C. DE; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba, SP: FEALQ, 920p, 2002.

GIOVANNONI, J. J.; WING, R. A.; GANAL, M. W.; TANKSLEY, S. D. Isolation of molecular markers from specific chromosomal intervals using DNA pools from existing mapping populations. **Nucleic Acids Research**, v.19: p.6553-6558, 1991.

GOODRICK, B. J.; KUHN, C. W.; BOERMA, H. R. Inheritance of nonnecrotic resistance to cowpea chlorotic mottle virus in soybean. **The Journal of Heredity**, v.82(6): p.512-514, 1991.

GUIMARÃES, C. T.; SCHUSTER, I.; MAGALHÃES, J. V.; SOUZA JÚNIOR, C. L. Marcadores moleculares no melhoramento de plantas. In: Borém, A.; Caixeta, E. T. (Eds). **Marcadores Moleculares**. Viçosa, MG, p.107-144, 2006.

GUPTA, P. K.; BALYAN, K. S.; CHARMA, P. C.; RAMESH, B. Microsatellites in plants: A new class of molecular markers. **Current Science**, v.70(1). p.45-54, 1996.

HARTMAN, G. L.; SINCLAIR, J. B.; RUPE, J. C. **Compendium of soybean diseases**. The American Phytopathological Society, Fourth edition, 1999. 100p.

HELENTJARIS, T.; SLOCUM, M.; WRIGHT, S.; SCHAEFER, A.; NIENHUIS, J. Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. **Theoretical and Applied Genetics**, v.72(6): p.761-769, 1986.

HILJE, L.; COSTA, H. S.; STANSLY, P. A. Cultural practices for managing *Bemisia tabaci* and associated viral diseases. **Crop Protection**, v.20: p.801-812. 2001.

HOFFMANN, L. L., OLIVEIRA, M. A. R. de, ALMEIDA, A. M. R. Ocorrência de CMMV (*Cowpea mild mottle virus*) em soja no Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28 (Suplemento), p.249-250, 2003.

HORN, N. M.; SALEH, N.; BALIADI, Y. Cowpea mild mottle virus could not be detected by ELISA in soybean and groundnut seeds in Indonesia. **European Journal of Plant Pathology**, v.97(2): p.125-127, 1991.

HYMOWITZ, T. On the domestication of the soybean. *Economic Botany*, Lawrance, v.24: p.408-421, 1970.

ICTVdB Management 2006. 00.056.0.04.031. **Cowpea mild mottle virus**. In: ICTVdB – The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA.

IWAKI, M.; THONGMEEARKON, P.; PROMMIN, M.; HONDA, Y.; HIBI, T. Whitefly transmission and some properties of Cowpea mild mottle virus on soybean in Thailand. **Plant Disease**, v.66(5): p.365-368, 1982.

JEYANANDARAJAH, P.; BRUNT, A. A. The natural occurrence, transmission, properties and possible affinities of cowpea mild mottle virus. **Journal of Phytopathology**, v.137(2): p.148-156, 1993.

JONES, D. R. Plant viruses transmitted by whiteflies. **European Journal of Plant Pathology**, v.109, n.3, p.195-219, 2003.

KAREEM, K. T.; TAIWO, M. A. Interactions of viruses in Cowpea: effects on growth and yield parameters. **Virology Journal**, v.4: p.1-5. 2007.

KIIHL, R. A. S.; HARTWIG, E. E. Inheritance of reaction to soybean mosaic virus in soybeans. **Crop Science**, v.19: p.372-375, 1979.

KRISTIPATI, S. S. V. Molecular mapping of a soybean mosaic virus (SMV) resistance gene in soybean (*Glycine max*). **Thesis of Master of Science**. Virginia Polytechnic Institute and State University. 42p. 1996.

KYLE, M. M.; PROVVIDENTI, R. Inheritance of resistance to potato Y viruses in *Phaseolus vulgaris* L. **Theoretical and Applied Genetics**, v.74, p.595-600, 1987.

KYLE, M. M.; PROVVIDENTI, R. Inheritance of resistance to potyviruses in *Phaseolus vulgaris* L. II. Linkage relations and utility of a dominant gene for lethal systemic necrosis to soybean mosaic virus. **Theoretical and Applied Genetics**, v.86, p.189-196, 1993.

LAGUNA, I. G.; ARNEODO, J. D.; RODRÍGUEZ-PARDINA, P.; FIORONA, M. cowpea mild mottle virus infecting soybean crops in Northwestern Argentina. **Fitopatologia Brasileira**, v.31(3): p.317, 2006. Notas Fitopatológicas.

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

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

LIZUKA, N.; RAJESHWARI, R.; REDDY, D. V. R.; GOTO, T., MUNITYAPPA, V., BHARATHAN, N. GHANEKAR, A. M. Natural occurrence of a strain of cowpea mild mottle virus on groundnut (*Arachis hypogaea*) in India. **Phytopathol. Z.**, v.109(3): p.245-253, 1984.

MALUF, W. R.; PEREIRA, J. J.; FIGUEIRA, A. R. Inheritance of resistance to the papaya ringspot virus-watermelon strain from two different accessions of winter squash *Cucurbita maxima* Duch. **Euphytica**, v.94: p.163-168, 1997.

MARCELINO, F. C.; BINNECK, E.; ABDELNOOR, R. V.; NEPOMUCENO, A. L. **Ferramentas biotecnológicas aplicadas a cultura da soja**. Londrina, PR: Embrapa/CNPSo, Circular Técnica, 47, 2007. 5p.

MARTINEZ, S. S.; CARVALHO, A. O. R.; VIEIRA, L. G.; NUNES, L. M.; BIANCHINI, A. Identification, geographical distribution and host plants of *Bemisia tabaci* (Genn.) biotypes (Homoptera: Aleyrodidae) in the state of Paraná, Brazil. **Anais da Sociedade Entomológica Brasileira**, v.29(3): p597-603, 2000.

MARTINS, T. R.; ALMEIDA, A. M. R.; ALMEIDA, L. A.; NEPOMUCENO, A.; CHAGAS, C. M.; TOLEDO, J. F. F. de. Sinergismo observado em plantas de soja infectadas pelos vírus do mosaico comum da soja e do mosaico-em-desenho do feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.19(3): p.430-436, 1994.

MARUBAYASHI, J. M. Cowpea mild mottle virus: Transmissão, círculo de hospedeiras e resposta a infecção de cultivares IAC de feijão e soja. 2006. 29p. **Dissertação de Mestrado** – Instituto Agrônômico Curso de Pós-Graduação, Campinas, SP. ou **Dissertação de Mestrado**. Instituto Agrônômico, Pós-Graduação, Campinas, 29p. 2006.

MEHTA, Y. R. e ARIAS, C. A. A. Herança da resistência à *Stemphylium solani* e intensidade a sua fitotoxina em cultivares de algodoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.26(4): p.761-765, 2001.

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

MINK, G. I.; KESWANI, C. L. First report of cowpea mild mottle virus on bean and mung bean in Tanzania. **Plant Disease**, v.71: p.557, 1987. Disease notes.

MÖRCHEN, M.; CUGUEN, J.; MICHAELIS, G.; HÄNNI, C.; SAUMITOU-LAPRADE, P. Abundance end length polymorphism of microsatellite repeats in *Beta vulgaris* L. **Theoretical and Applied Genetics**, v.92(3-4), p.326-333, 1996.

MUNIYAPPA, V.; REDDY, D. V. R. Transmission of Cowpea mild mottle virus by *Bemisia tabaci* in a nonpersistent manner. **Plant Disease**, v.67, n.4, p.391-393, 1983.

NAIDU, R. A.; GOWDA, S.; SATYANARAYANA, T.; BOYKO, V.; REDDY, A. S.; DAWSON, W. O.; REDDY, D. V. R. Evidence that whitefly-transmitted cowpea mild mottle virus belongs to the genus Carlavirus. **Archives of Virology**, v.143(4): p.769-780, 1998.

NARVEL, J. M.; FEHR, W. R.; CHU, W. C.; GRANT, D.; SHOEMAKER, R. C. Simple sequence repeat diversity among soybean plant introductions and elite genotypes. **Crop Science**, v.40, n.5, p.1452-1458, 2000.

OLIVEIRA, M. R. V. de. Prevenção e controle da mosca branca *Bemisia argentifolli* (Hemíptera, Aleyrodidae). Disponível em WWW.agricultura.gov.br/sda/moscabranca.htm
Acesso em outubro de 2003.

OPENSHAW, S. J.; JARBOE, S. G.; BEAVIS, W. D. Marker-assisted selection in backcross breeding. In: ASHS/CSSA Joint Plant Breeding Symposium, 2, Corvallis **Proceedings...** Corvallis: Oregon State University, 1994.

PARAN, I.; MICHELMORE, R. W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**, v.85, p.985-993, 1993.

PEREIRA, M. G. e PEREIRA, T. N. S. Marcadores moleculares no pré-melhoramento de plantas. In: Borém, A.; Caixeta, E. T. (Eds). **Marcadores Moleculares**. Viçosa, MG, p.85-106, 2006.

PROVVIDENTI, R.; GONSALVES, D.; RANALL, P. Inheritance of resistance to soybean mosaic virus in *Phaseolus vulgaris*. **The Journal of Heredity**, v.73(4): p302-303, 1982.

PUPIM JÚNIOR, O. Herança da resistência do algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) à doença azul. 2007. 58p. **Dissertação Mestrado em Produção Vegetal** – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR.

RAFALSKI, J. A.; SCOTT, V. T. Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. **Trends in Genetics**, v.9, n.8, p.275-280, 1993.

REDDY, M. S. S.; GHABRIAL, S. A.; REDMOND, C. T.; DINKINS, R. D.; COLLINS, G. B. Resistance to Bean pod mottle virus in transgenic soybean lines expressing the capsid polyprotein. **Virology**, v.91(9): p.831-838, 2001.

RODRÍGUEZ-PARDINA, P. E., ARNEODO, J. D., TRUOL, G.A., HERRERA, P. S., LAGUNA, I. G. Cowpea mild mottle virus in bean crops in Argentina. **Australasian Plant Pathology**, v. 33 (1), p. 129-130, 2004. Summary.

ROESSING, A. C.; LAZZAROTTO, J. J. Criação de empregos pelo complexo agroindustrial da soja. Londrina: **Embrapa Soja**, 2004.

RONGWEN, j.; AKKAYA, M. S.; BHAGWAT, A. A.; LAVI, U.; CREGAN, P. B. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. **Theoretical and Applied Genetics**, v.90: p.43-48, 1995.

ROSSEL, H. W.; THOTTAPPILLY, G. Seed transmission of viruses in soybean (*Glycine max*) in relation to sanitation and international transfer of improved germplasm. **Seed Science and Technology**, v.21(1): p.25-30, 1993.

RUSSELL, J.; FULLER, J.; YOUNG, G.; THOMAS, B.; TARAMINO, G.; MACAULAY, M.; WAUGH, R.; POWELL, W. Discriminating between barley genotypes using microsatellite markers. **Genome**, v.40: p.442-450, 1997.

SCHUSTER, I. Identificação de QTL para a resistência ao nematóide de cisto da soja e capacidade de combinação de parentais. 1999. 85p. **Tese Doutorado em Genética e Melhoramento** – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

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

SCHUSTER, I.; VIEIRA, E. S. N.; PADILHA, L. Marcadores moleculares no pós-melhoramento. In: Borém, A.; Caixeta, E. T. (Eds). **Marcadores Moleculares**. Viçosa, MG, p.205-230, 2006.

SILVA, M. F.; KIIHL, R. A. S.; ALMEIDA, A. M. R. Inheritance of resistance to soybean mosaic virus in FT-10 soybean. **Euphytica**, v.135: p.339-343, 2004.

SILVA-LOBO, V. L.; GIORDANO, L. B.; LOPES, C. A. Herança da resistência a mancha bacteriana em tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.30(4): p.343-349, 2005.

SURYAWANSHI, A. P.; MALI, V. R.; BULBULE, S. V.; KURUNDKAR, B. P. Reactions of soybean genotypes to cowpea mild mottle virus – soybean isolate. **Indian Journal of Virology**, v.5(1-2): p.129-131, 1989.

TAYWO, M. A.; KAREEM, K. T.; NSA, I. Y.; HUGHES, J. D. A. Cowpea viruses: Effect of single and mixed infections on symptomatology and virus concentration. **Virology Journal**, 4: 95. 2007. pp. 1-7.

TANYA, P.; SRINIVES, P.; TOOJINDA, T.; VANAVICHIT, A.; HA, B. K.; BAE, J. S.; MOON, J. K.; LEE, S. H. Evaluation of genetic diversity among soybean genotypes using SSR and SNP. **Korean Journal of Crop Science**, v.46, n.4, p.334-340, 2001.

TEIXEIRA, A. P. M. Identificação de marcadores moleculares ligados a gene de resistência ao vírus do mosaico (PRSV-W) em melão (*Cucumis melo* L.). 2004. 66p. **Dissertação Mestrado em Fitopatologia** – Universidade de São Paulo - ESALQ, Piracicaba, SP.

THOUVENEL, J. C.; MONSARRAT, A.; FAUQUET, C. Isolation of Cowpea mild mottle virus from diseased soybeans in Ivory Coast. **Plant Disease**, v.66(4): p.336-337, 1982.

TOLIN, S. A.; LACY, G. H. Viral, bacterial and phytoplasmal diseases of soybean. In: BOERMA, H. R. e SPECHT, J. E. (Co-editors). **Soybeans: Improvement, Production and Uses**. Third edition. Madison, Wisconsin, USA: ASA, CSSA, SSSA, p.765-820, 2004.

USDA, **World crop production**. Disponível em www.usda.gov Acesso em maio de 2008.

VERNETTI, F. de J. **Soja: planta, clima, pragas, moléstias e invasoras**. Campinas, Fundação Cargill, v.1, 1983. 463p.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v.23(21): p.4407-4414, 1995.

WALLACE, T. P. e EL-ZIK, K. M. Inheritance of resistance in three cotton cultivars to the HV1 isolate of bacterial blight. **Crop Science**, v.29: p.1114-1119, 1989.

WANG, Y. H.; THOMAS, C. E.; DEAN, R. A. Genetic mapping of a fusarium wilt resistance gene (Fom-2) in melon (*Cucumis melo* L.). **Molecular Breeding**, v.6(4): p.379-389, 2000.

WANG, C. e ROBERTS, P. A. Development of AFLP and derived KAPS markers for root-knot nematode resistance in cotton. **Euphytica**, v.152(2): p.185-196, 2006.

WANG, C.; ULLOA, M; ROBERTS, P. A. Identification and mapping of microsatellites markers linked to root-knot nematode resistance gene (*rkn 1*) in Acala NemX cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.112(4): p.770-777, 2006.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids**, v.18(22): p.6532-6535, 1990.

YONGGUO, C.; GUOYING, W.; SHOUCAI, W.; YANLING, W.; JIANG, L.; YOUJU, X.; JINGRUI, D. Construction of a genetic map and location of quantitative trait loci for dwarf trait in maize by RFLP markers. **Chinese Science Bulletin**, v.45(3): p.247-250, 2000.

YORINORI, J. T. Sucessos e novos desafios no controle de doenças fúngicas da soja através da resistência genética no Brasil. CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 1999, Londrina. **Anais...** Londrina: Embrapa Soja. p.449. 1999.

YORINORI, J. T. Situação atual das doenças potenciais no cone sul. CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 1999, Londrina. **Anais...** Londrina: Embrapa Soja. p. 171-186. 2002.

YOUNG, N. D. Cautiously optimistic vision for marker assisted breeding. **Molecular Breeding**, v.5: p.505-510, 1999.

ZAMBOLIM, E. M. Curso de controle de doenças de plantas. **Fitovírus**. Apostila. Viçosa, 2002. 66p.

ZANDONÁ, C.; MEHTA, Y. R.; SCHUSTER, I.; ALVES, P. F. R.; BOMFETI, C. A.; BIBANCO, K. P.; SILVA, R. B.; LOPES, L. P. Mecanismo genético de resistência em três cultivares de algodoeiro à *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*. **Fitopatologia Brasileira**, v.30(6): p.647-649, 2005.

ZANDONÁ, C.; NOVAES, T. G.; MEHTA, Y. R.; SCHUSTER, I.; TEIXEIRA, E. A.; CUNHA, H. Herança de resistência a *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em algodoeiro brasileiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.31(1): p.076-078, 2006.

ZAVRIEV, S. K.; KANYUKA, K. V.; LEVAY, K. E. The genome organization of potato virus M RNA. **Journal of General Virology**, v.72: p.9-14, 1991.

3. MAPEAMENTO DE GENES DE RESISTÊNCIA AO VÍRUS DA NECROSE DA HASTE DA SOJA UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES MICROSSATÉLITES

RESUMO

Identificada pela primeira vez no Brasil na safra 2000/2001, a necrose da haste da soja (NHS) é causada pelo vírus CpMMV – *Cowpea mild mottle virus*, pertencente ao grupo Carlavirus. É uma virose altamente destrutiva, que pode levar à morte das plantas. Essa virose tem se disseminado pelas lavouras de soja do país, por meio da mosca branca (*Bemisia tabaci* biótipo B) a qual é o vetor. Esse inseto está associado a outras culturas importantes no país, e apresenta grande capacidade de desenvolver resistência aos inseticidas. Os objetivos deste trabalho foram estudar a herança da resistência da soja à NHS e mapear o(s) gene(s) de resistência, com o auxílio de marcadores moleculares. Foi obtida uma população F₂ segregante para a resistência à NHS, a partir do cruzamento entre as cultivares BRS 133 (resistente) e CD 206 (suscetível). A avaliação foi realizada em casa-de-vegetação, e a inoculação foi realizada no primeiro trifólio totalmente expandido, e repetida após 10 dias. As avaliações foram realizadas 20 dias após a primeira inoculação, e repetidas 15 dias após. Das 114 plantas F₂ avaliadas, 92 foram resistentes e 22 foram suscetíveis. O resultado é compatível com a herança de um gene dominante ($\chi^2=1,98$, P=15,97%). O mapeamento deste gene de resistência foi realizado pelo método de análise de bulks segregantes (BSA). O gene, denominado *Rssn* (*Resistance to soybean stem necrosis*) foi mapeado no Grupo de Ligação G do genoma da soja, entre os marcadores Sat_308 e Satt303, a 28,87cM do primeiro e 29,64cM do segundo. O mapeamento fino desta região genômica poderá identificar marcadores mais proximamente ligados ao gene *Rssn*, os quais poderão ser utilizados em programas de seleção assistida por marcadores moleculares microssatélites, no melhoramento genético da soja.

Palavras-chave: *Cowpea mild mottle virus*, herança da resistência, marcadores microssatélites, BSA, seleção assistida por marcadores moleculares.

3. MAPPING OF GENES FOR RESISTANCE TO THE VIRUS OF STEM NECROSIS OF THE SOYBEAN USING MOLECULAR MARKERS MICROSSATELLITES

ABSTRACT

Identified for the first time in Brazil in the 2000/2001 season, the necrosis of the stem of soybean (NHS) is caused by the virus CpMMV - *Cowpea mild mottle virus* belonging to the group Carlavirus. It is a highly destructive virus, which can lead to death of plants. This virus has been spread by the soybean crop in the country, through the vector, the white fly (*Bemisia tabaci* biotype B). This insect is associated with other important crops in the country, and presents a great ability to develop resistance to insecticides. The objectives of this work were to study the inheritance of the resistance of soybeans to the NHS and map (s) gene (s) of resistance, with the help of molecular markers. It obtained a population F₂ segregant for resistance to the NHS, from crossing between the cultivars BRS 133 (resistant) and CD 206 (susceptible). The evaluation was performed in green house, and the inoculation was made in the first trifolium fully expanded, and repeated after 10 days. The assessments were made 20 days after the first inoculation, and repeated 15 days later. Of the 114 plants F₂ assessed, 92 were resistant and 22 were susceptible. The result is compatible with the legacy of a dominant gene ($\chi^2 = 1.98$, P = 15.97%). The mapping of the gene for resistance was made by the method of analysis bulks segregating (BSA). The gene, called *Rssn* (*Resistance to soybean stem necrosis*) was mapped in the Linkage Group G of the soybean genome, between the markers Sat_308 and Satt303, 28.87 cM of the first and second in 29.64 cM. The fine mapping of this region genomic markers can identify more closely linked to gene *Rssn*, which can be used in programs of assisted selection by molecular markers microsatellites in soybean genetic improvement.

Key-words: *Cowpea mild mottle virus*. inheritance of resistance, markers microsatellites, BSA, assisted selection by molecular markers.

3.1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é o quarto maior cultivo a nível mundial e o primeiro entre as oleaginosas, abrangendo uma área de mais de 90 milhões de hectares que proporcionaram 219,7 milhões de toneladas de grãos na safra 2007/2008 (USDA, 2008).

A produção mundial de soja cresceu mais de 5 milhões de toneladas anuais nos últimos 37 anos e no Brasil a produção aumentou 39 vezes nos últimos 47 anos. O mercado de soja terá avanços significativos nos próximos anos para dar suporte ao crescimento populacional, aos aumentos de renda e aos acréscimos da demanda de soja por parte de diferentes segmentos da indústria (DALL`AGNOL et al., 2007).

O Brasil é o segundo maior produtor de soja do mundo, com uma área de aproximadamente 21,2 milhões de hectares cultivados na safra 2007/2008, gerando uma produção de 59,5 milhões de toneladas e uma produtividade de grãos média de 2.804 kg/ha (CONAB, 2008).

Os países maiores responsáveis pela demanda mundial de soja até 2020 serão o Brasil e a Argentina, com incrementos de 64% e 45% sobre os atuais índices de produção, respectivamente. Próximo a 2015 o Brasil será o maior produtor mundial de soja e, a partir de 2020, será o único país com condições de sustentar a demandas adicionais (DALL`AGNOL et al., 2007).

Os fatores bióticos associados mundialmente à cultura da soja, representados pelos fungos, bactérias, nematóides, fitoviroses e fitoplasmas, foram responsáveis pela perda de 15 milhões de toneladas conforme estimativa realizada na safra 1994/1995 (HARTMAN et al., 1999).

As perdas por organismos prejudiciais à soja no Brasil, na safra 1997/1998, foram estimadas em 1,6 bilhões de dólares (YORINORI, 1999). No período de 1997 a 2000 foram estimadas perdas pela ocorrência de doenças em soja na ordem de 5,2 bilhões de dólares (YORINORI, 2002).

A necrose da haste da soja causada pelo vírus CMMV - *Cowpea mild mottle virus*, foi identificada pela primeira vez no Brasil em 2000/2001 podendo causar perdas significativas na produtividade de grãos. Essa virose apresenta alto

potencial de perdas, rápida e ampla disseminação e um vetor de grande agressividade e difícil controle (ALMEIDA et al., 2003).

O desenvolvimento de cultivares resistentes à necrose da haste da soja é de grande importância, pois até 2000/2001 não era realizada seleção visando esta característica, sendo que, das 168 cultivares comerciais brasileiras avaliadas em relação ao CMMV, 49 foram resistentes (ALMEIDA, et al., 2003).

A identificação de marcadores moleculares associados à resistência a organismos prejudiciais as diversas culturas tem sido crescente, como os marcadores ligados a genes de resistência ao míldio em alface (Paran e Michelmore, 1993), a antracnose do feijoeiro (ALZATE-MARIN, 1996), a murcha de *fusarium* em melão (WANG et al., 2000), ao cancro da haste da soja (Carvalho et al., 2002) e ao nematóide *Meloidogyne incognita* em algodoeiro (WANG; ROBERTS, 2006).

A seleção com o auxílio de marcadores moleculares é de grande utilidade para os programas de melhoramento alcançarem maior eficiência na seleção de genótipos resistentes aos principais patógenos (GUIMARÃES et al., 2006).

Os objetivos deste trabalho foram determinar a herança da resistência à necrose da haste da soja e mapear os genes de resistência com o auxílio de marcadores moleculares microssatélites.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Material vegetal

As populações para estudo de herança e de mapeamento foram obtidas pelo cruzamento entre a cultivar BRS 133, resistente à NHS, com a cultivar CD 206, que é suscetível ao patógeno. Foram obtidas as gerações F_1 , F_2 , RC_1P_1 e RC_1P_2 , em que RC_1P_1 foi obtida pelo cruzamento entre plantas F_1 e o parental resistente (BRS133) e a RC_1P_2 foi obtida pelo cruzamento entre plantas F_1 e o parental suscetível (CD206).

As populações em teste foram constituídas de 25 plantas do parental P_1 (BRS 133), 27 do parental P_2 (CD 206), 31 da geração F_1 , 60 da geração RC_1P_1 , 81 da geração RC_1P_2 e 149 da geração F_2 (Figura 1 A e B).



Figura 1: A) Visão geral do experimento em vasos. B) Disposição dos vasos e estacas de identificação.

3.2.2. Avaliação da necrose da haste

O experimento de fenotipagem para a necrose da haste da soja (NHS) nas populações oriundas do cruzamento entre BRS 133 e CD 206 foi conduzido em condições controladas de casa-de-vegetação na Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola – Coodetec, em Cascavel / PR.

As populações foram semeadas em vasos plásticos com dois litros de capacidade, contendo uma mistura de duas partes de solo de campo não autoclavado, uma parte de areia e uma parte de matéria orgânica. Os vasos foram irrigados diariamente para manutenção da umidade do solo.

O isolado da necrose da haste da soja utilizado foi obtido a partir de plantas de soja da cultivar CD 206 infectadas, cedidas pelo Dr. Álvaro M. R. Almeida do CNPSOJA - Embrapa, Londrina / PR. O isolado inicial sempre foi mantido em plantas de soja da cultivar CD 206, em casa-de-vegetação.

O inoculo utilizado para a fenotipagem das plantas das diferentes populações foi preparado a partir de folhas sintomáticas maceradas com uma solução tampão (Fosfato de Sódio 0,01 M pH 7), na proporção de 1 grama de folha com sintomas para cada 3 ml de solução tampão. O inoculo foi preparado com auxílio de um aparelho mix Walita.

A inoculação foi realizada mecanicamente, sendo aplicado levemente sobre o trifólio a ser inoculado carvão vegetal comum triturado em forma de pó fino, logo após, aplicou-se levemente com uma esponja nova e macia a solução de folhas trituradas e a solução tampão diluída sobre os folíolos do trifólio (Figura 2 A e B).



Figura 2: A) Aplicação do carvão vegetal triturado. **B)** Aplicação do inoculo+tampão.

A primeira inoculação foi realizada no primeiro trifólio totalmente expandido o que correspondeu a dezenove dias após a semeadura, e a segunda inoculação foi realizada 10 dias após a primeira (Figura 3 A e B).



Figura 3: A) Primeira inoculação. **B)** Segunda inoculação.

A primeira avaliação foi realizada aos 20 dias após a segunda inoculação o que ocorreu aos 49 dias após a semeadura. A segunda avaliação foi

realizada 15 dias após a primeira avaliação, ou seja, aos 64 dias após a semeadura. A escala utilizada nas avaliações foi proposta pelo DR. Álvaro M. R. Almeida do CNPSOJA - Embrapa, Londrina / PR (Figura 4).

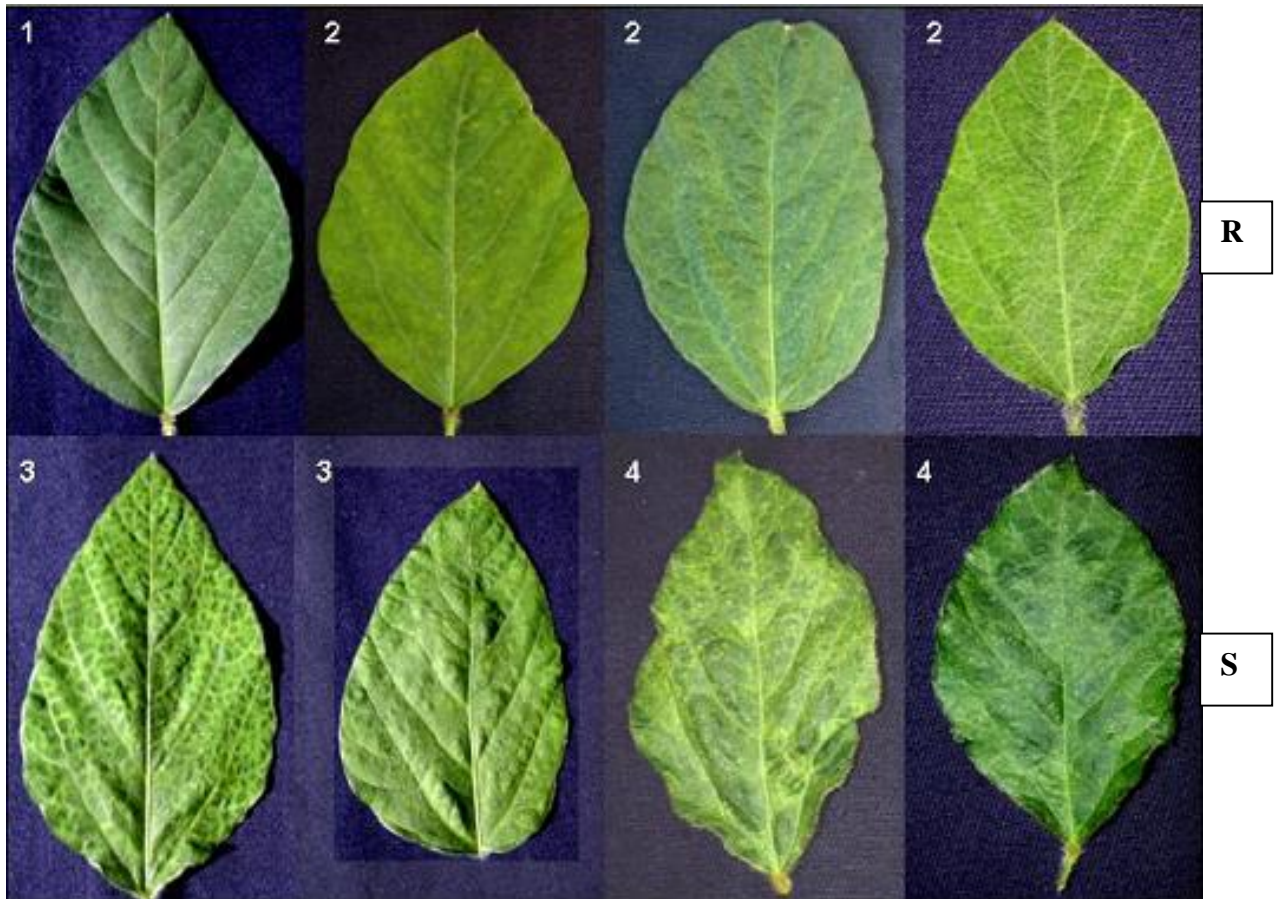


Figura 4: Escala para avaliação da necrose da haste da soja proposta pelo Dr. Álvaro M. R. Almeida do CNPSOJA - Embrapa, Londrina / PR. **Nota 1:** Ausência de sintomas. **Nota 2:** Clorose. **Nota 3:** Clorose – Mosaico leve. **Nota 4:** Clorose – Mosaico forte – Mosaico bolhoso. Fenótipos resistentes (**R**) notas 1 e 2 e fenótipos suscetíveis (**S**) notas 3 e 4.

A escala para avaliação da necrose da haste da soja proposta pelo Dr. Álvaro M. R. Almeida do CNPSOJA - Embrapa, Londrina / PR, contempla uma nota 5 (Clorose – Mosaico forte – Mosaico bolhoso – Necrose nas nervuras e/ou na haste) que não ocorreu quando se utilizou a inoculação da NHS em condições controladas. A necrose nas nervuras e/ou na haste só é observada em condições de campo.

3.2.3. Extração do DNA

Durante a condução das populações em casa-de-vegetação, para a avaliação fenotípica da resistência à NHS, também foram coletadas folhas de todas as plantas, de todas as populações. As folhas foram congeladas imediatamente em Nitrogênio (N₂) líquido, e em seguida armazenadas em ultra-freezer, a -80°C, até a extração de DNA.

A extração do DNA de folhas de soja foi realizada com base no protocolo descrito por Doyle e Doyle (1990), com algumas modificações. Cerca de 200 a 300 mg de folhas foram trituradas na presença de N₂ líquido, sendo o pó resultante transferido para tubos tipo eppendorf. Em seguida, foram adicionados 650-800 µl de tampão de extração, constituído de Tris-HCl (pH 8,0) 50 µM, EDTA (pH 8,0) 50 mM, NaCl 0,7 M, CTAB (1% p/v) e β-mercaptoetanol (1% v/v), sendo esse último adicionado separado dos demais componentes. As amostras foram incubadas em banho-maria a 65° C por uma hora.

Após a incubação, as proteínas foram removidas pela extração com igual volume de clorofórmio, álcool-isoamílico (24:1) e centrifugação a 14.000 rpm. Os ácidos nucleicos foram precipitados da fase aquosa, pela adição de 2/3 do volume obtido de isopropanol gelado, lavados com etanol (70% e 90%) gelado por 20 minutos, secados ao ambiente e ressuspensos em TE, pH 8,0 (10 mM de Tris-HCl e 1 mM de EDTA), seguindo-se um tratamento com RNase A, na concentração final de 60 µg/ml a 37°C, por 30 minutos. O DNA foi recuperado por precipitação, mediante a adição de um volume de etanol 95%, seguido de centrifugação a 14.000 rpm por 15 minutos. Após seguiu-se a lavagem do precipitado com etanol (70% e 90%) gelado, secagem ao ambiente, e ressuspensão do DNA em 200-300 µl de TE. Todas as etapas de centrifugação foram realizadas em centrífuga Eppendorf modelo 5415C.

A concentração do DNA foi estimada em espectrofotômetro pela leitura da absorbância a 260 nm, sendo que cada unidade de absorbância corresponde à concentração de 50 µg/ml de DNA fita dupla (SAMBROOK et al., 1989).

A integridade do DNA foi determinada em gel de agarose 0,8%, fotografado sob luz ultravioleta.

3.2.4. Formação dos bulks de DNA

Os bulks de DNA foram formados pela mistura, em quantidades equimolares, de DNA de plantas com reação semelhante aos patógenos. Assim, foram formados dois bulks constituídos apenas por DNA de plantas resistentes e outros dois constituídos apenas por DNA de plantas suscetíveis. Cada bulk continha DNA de seis plantas.

3.2.5. Condições de amplificação e de eletroforese

A amplificação do DNA foi realizada com as amostras de DNA dos parentais e dos bulks, em 20 μ L de solução contendo 20 mM de Tris-HCL (pH 8,3), 50 mM de KCl, 3 mM de $MgCl_2$, 250 μ M de cada um dos desoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,2 μ M de cada iniciador, uma unidade da enzima Taq DNA polimerase e 30 ng de DNA. Foi utilizado termociclador MJ 96 programado para uma etapa inicial de 3 minutos a 72°C, seguida de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 50°C e 45 segundos a 72°C. Por fim, uma etapa de 10 minutos a 72°C.

Um total de 209 iniciadores SSR foi testado. Aqueles que foram polimórficos entre os parentais BRS 133 e CD 206 da população estudada foram utilizados na análise dos bulks.

Os fragmentos amplificados foram separados no gel de agarose 3% contendo SyneGel e brometo de etídio, ou em gel desnaturante de poliacrilamida a 7%. O tipo de gel foi definido em função da diferença de tamanho dos fragmentos de cada alelo, em cada marcador. Os géis de agarose corados com brometo de etídio foram fotografados em sistema de fotodocumentação Bio Capt (Vilber Lourmat), e os géis de poliacrilamida, após serem corados com nitrato de prata, foram escaneados.

3.2.6. Análise dos dados

A herança da resistência à Necrose da Haste da soja, bem como a segregação individual e conjunta dos marcadores moleculares foi testada pelo teste de Qui-quadrado, utilizando o programa GENES (CRUZ, 2001). A análise de ligação entre marcadores moleculares e locos de resistência à Necrose da Haste da soja, foi realizada com auxílio do programa GQMOL (Cruz e Schuster, 2006), utilizando as funções de mapeamento de Kosambi (1944). Dois locos foram considerados ligados quando a frequência de recombinação entre eles foi menor ou igual a 35%, e o LOD score igual ou superior a 3,0.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Herança da resistência da necrose da haste da soja

A metodologia utilizada para avaliar a reação das plantas de soja à necrose da haste da soja (NHS), em condições controladas, foi eficiente em discriminar plantas resistentes e suscetíveis à virose. Todas as plantas da cultivar suscetível (CD 206) obtiveram nota 4, nas condições de avaliação, e apresentaram sintomas de mosaico forte e bolhoso nas folhas (Figura 5). Por outro lado, todas as plantas da cultivar resistente (BRS 133) obtiveram nota 1, sem sintomas visíveis provocados pela infecção com a virose, nas condições de avaliação.



Figura 5: Sintomas típicos de mosaico forte e bolhoso ocasionados pela infecção com o vírus causador da necrose da haste da soja.

A avaliação da segregação da resistência das populações segregantes para NHS foi realizada inicialmente em 149 plantas supostamente F_2 . Foram obtidas 127 plantas resistentes (notas 1 ou 2) e 22 plantas suscetíveis (notas 3 ou 4). Esta segregação se ajustaria a uma proporção de 13:3, indicando a presença de dois genes independentes, um dominante e um recessivo, para a resistência da soja à NHS. Embora esta hipótese fosse também ajustada para as gerações F_1 , RC_1P_1 e RC_1P_2 , foi constatada uma distorção na segregação da

população F_2 (muitos genótipos idênticos ao parental BRS 133), quando dos primeiros testes para identificar marcadores candidatos para o mapeamento do gene de resistência a NHS.

Para obter maior segurança em relação aos dados obtidos, a população F_2 foi submetida a uma análise de pureza genética, com a utilização de marcadores moleculares SSR (PUPIM JÚNIOR, 2007). Nesta análise, marcadores moleculares co-dominantes foram utilizados para avaliar todos os indivíduos da população supostamente F_2 . Em uma população F_2 , em cada loco, a probabilidade de uma planta ser homocigota é de $1/4$. Ao se avaliar n locos, a probabilidade de uma planta F_2 ser homocigota para o genótipo do mesmo genitor é de $1/4^n$.

A população supostamente F_2 foi avaliada com 10 marcadores SSR polimórficos entre os parentais. Trinta e cinco plantas apresentaram o mesmo genótipo homocigoto da cultivar BRS 133 (Figura 6), que foi utilizada como genitor feminino no cruzamento original. A probabilidade de uma planta F_2 apresentar genótipo homocigoto para todos os 10 locos avaliados, é de 0,0001%. Isso indica que as sementes que originaram estas plantas foram obtidas a partir da autofecundação de uma planta da cultivar BRS 133, ao invés da autofecundação de uma planta F_1 . No momento do cruzamento entre os parentais BRS 133 e CD 206, algumas flores podem ter sido autofecundadas antes de serem polinizadas com o pólen da cultivar CD 206, e estas sementes autofecundadas foram misturadas às sementes F_1 .

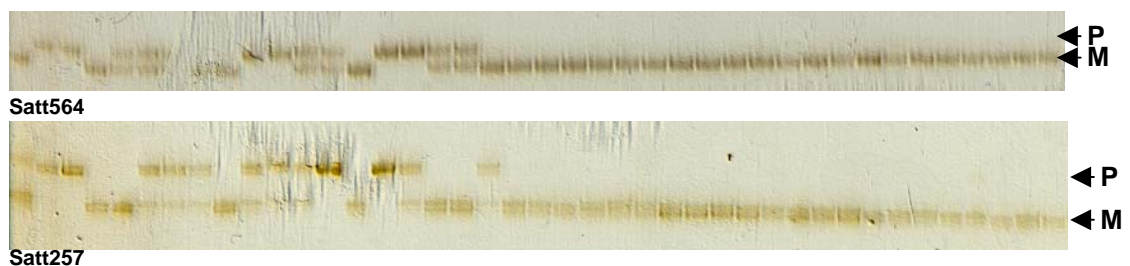


Figura 6: Amplificação de parte da população supostamente F_2 derivada do cruzamento entre as cultivares BRS 133 e CD 206, com os iniciadores Satt564 e Satt257. M= alelo materno e P= alelo paterno.

Estas 35 plantas foram então retiradas da população, e o que restou consistiu, então, de uma verdadeira população F_2 , com 114 plantas. As plantas da geração F_1 e das populações de retrocruzamento também foram avaliadas com marcadores SSR, e nenhuma “contaminação” foi observada.

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados da análise de segregação da resistência da soja à NHS, após a purificação da população F_2 . Das 114 plantas F_2 avaliadas, 92 foram resistentes e 22 foram suscetíveis. Esta proporção observada se ajusta a hipótese de resistência condicionada por um gene dominante ($P= 15,97\%$). Na população obtida do cruzamento do F_1 com o parental suscetível (RC_1F_1S), a proporção de plantas resistentes e suscetíveis também se ajustou a hipótese de um gene dominante ($P= 43,67\%$).

Tabela 1: Reação das cultivares BRS 133 e CD 206 e das gerações F_1 , F_2 purificada, $RC_1P_1(R)$ e $RC_1P_2(S)$ à inoculação do agente causador da necrose da haste da soja (NHS), e teste de segregação para a herança da resistência da soja à NHS.

Geração	Observado		Esperado		Proporção esperada	χ^2	Probab. (%)
	R	S	R	S			
P1 (BRS 133)	25	0	25	0	1:0		
P2 (CD 206)	0	27	0	27	0:1		
F_1	30	1	30	0	1:0		
F_2	92	22	85,5	28,5	3:1	1,9766	15,97
$RC_1P_1(R)$	59	1	60	0	1:0		
$RC_1P_2(S)$	44	37	40,5	40,5	1:1	0,6049	43,67

$RC_1P_1(R)$ é a população de retrocruzamento com o genitor resistente.

$RC_1P_2(S)$ é a população de retrocruzamento com o genitor suscetível.

Sob a hipótese de resistência condicionada por um gene dominante, seria esperado que 100% das plantas F_1 e 100% das plantas da população RC_1F_1 obtida do cruzamento do F_1 com o genitor resistente (RC_1F_1R) fossem resistentes. Foi observada uma planta F_1 suscetível, e uma planta $RC_1F_1(R)$ suscetível. A análise por meio de marcadores moleculares confirmou que estas plantas eram realmente F_1 e $RC_1F_1(R)$. A suscetibilidade destas plantas pode ter sido devido ao rigor do protocolo de avaliação fenotípica, ou mesmo a uma penetrância incompleta da resistência associada a este gene.

Este é o primeiro relato da herança da resistência da soja à NHS. Na cultivar BRS 133, a resistência à NHS é condicionada por um gene dominante, que foi denominado de *Rssn* (*Resistance to soybean stem necrosis*).

A partir dos resultados obtidos neste trabalho relativo ao estudo da herança da resistência da soja ao *Cowpea mild mottle virus* – CMMV pode-se observar um padrão de herança simples ou qualitativa, como o que ocorre com a maior parte dos estudos envolvendo a herança da resistência às mais diferentes fitoviroses, nas mais diversas espécies de plantas.

Em soja, foram identificados dois genes recessivos responsáveis pela resistência ou pela inibição do movimento sistêmico quando associada ao *Cowpea chlorotic mottle virus* – CpCMV (GOODRICK et al., 1991). Silva et al. (2004), também realizaram estudo de herança a partir de uma nova estirpe de *Soybean mosaic virus* - SMV que quebrou a resistência da cultivar de soja FT-10 no Brasil, sendo identificado mais um alelo alternativo para o locus *Rsv₁* que foi denominado de *Rsv₁^d*.

A resistência ao *Soybean mosaic virus* – SMV na cultivar de feijoeiro Great Northern 1140 foi relacionada a um único gene (*Smv*) que apresentou dominância incompleta (PROVVIDENTI et al., 1982). Foram relatados dois alelos dominantes de locos independentes associados à resistência do feijoeiro ao *Watermelon mosaic virus 2* – WMV 2, um dos alelos foi designado de *Wmv* que impedia a disseminação sistêmica do vírus e outro descrito como *Hsv* que conferia resistência tanto local como sistêmica ao WMV 2 (KYLE; PROVVIDENTI, 1987).

A herança da resistência ao *Watermelon mosaic virus 1* – WMV 1 em abóbora foi condicionada por três genes com dominância parcial na cultivar ABL-010 e por dois genes com efeitos aditivos na cultivar Redlands Trailblazer (MALUF et al., 1997).

Em algodoeiro, a resistência à doença azul, causada pelo *Cotton leaf roll dwarf virus* (CLRDV) também é condicionada por um gene dominante (PUPIM Jr, 2007).

Os estudos realizados por Ayala et al. (2002) e por Beserra Júnior et al. (2006), relataram a natureza poligênica da resistência ao *Barley yellow dwarf* – BYDV em trigo e da resistência ao *Watermelon mosaic virus* – WMV em melancia, respectivamente.

Outros organismos prejudiciais como as bactérias e os fungos, também apresentam um padrão de herança simples para a resistência na relação entre os patógenos e as espécies de plantas, como o cancro da haste em soja (CARVALHO et al., 2002), bacterioses em algodoeiro (WALLACE; EI-ZIK, 1989; ZANDONÁ et al. 2005), a mancha preta do algodoeiro (MEHTA; ARIAS, 2001) e a mancha angular em feijoeiro (CORRÊA et al., 2001).

O resultado obtido neste trabalho associando um gene dominante à herança da resistência da soja ao agente causal da NHS poderá ser utilizado na adequação de estratégias de melhoramento visando resistência a este patógeno, como também, identifica a necessidade de ampliação do conhecimento da herança da mesma característica em outras importantes fontes de resistência à NHS.

3.3.2. Mapeamento genético do gene *Rssn*

O método de BSA (*Bulk segregant analysis* – análise de bulks segregantes) foi utilizado para identificar marcadores moleculares ligados ao gene *Rssn*. Do total de 209 iniciadores SSR testados, 54 não geraram produto de amplificação. Dos 155 iniciadores que apresentaram resultado de amplificação, 56 (36,13%) foram polimórficos entre os parentais da população estudada (BRS 133 e CD 206).

Para análise de BSA, foram obtidos quatro bulks de DNA, cada um composto pela mistura equimolar de DNA de seis plantas F₂. Dois bulks foram constituídos apenas por DNA de plantas resistentes, e dois bulks foram constituídos apenas por DNA de plantas suscetíveis à necrose da haste da soja. Estes quatro bulks foram avaliados pelos 56 iniciadores polimórficos entre BRS 133 e CD 206.

O estudo de herança da resistência da soja à NHS indicou a presença de um gene dominante (*Rssn*) segregando nesta população. Como os dados fenotípicos foram obtidos em uma população F₂, é de se esperar que o grupo de plantas resistentes seja constituído por indivíduos homocigotos dominantes e heterocigotos, enquanto que o grupo de plantas suscetíveis deveria ser constituído apenas por indivíduos homocigotos recessivos. Neste caso, na análise dos bulks, espera-se que os marcadores associados à resistência apresentassem o alelo do

parental resistente (BRS 133) ou os alelos dos dois parentais nos bulks resistentes, e apenas o alelo do parental suscetível (CD 206) nos bulks suscetíveis. Este padrão foi observado na avaliação dos bulks com o iniciador Sat_308 (Figura 7).

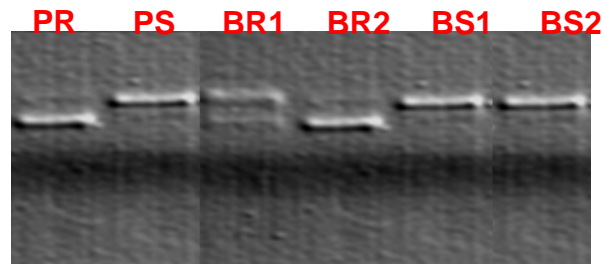


Figura 7: Análise de bulks segregantes (BSA) com o iniciador Sat_308. PR: parental resistente (BRS 133); PS: parental suscetível (CD 206); BR1 e BR2: bulks resistentes; BS1 e BS2: bulks suscetíveis. Cada bulk contém a mistura de DNA de seis plantas.

Para avaliar a co-segregação do marcador Sat_308 com o gene *Rssn*, as amostras de DNA das plantas individuais, constituintes dos bulks, foram amplificadas com esse iniciador (Figura 8).

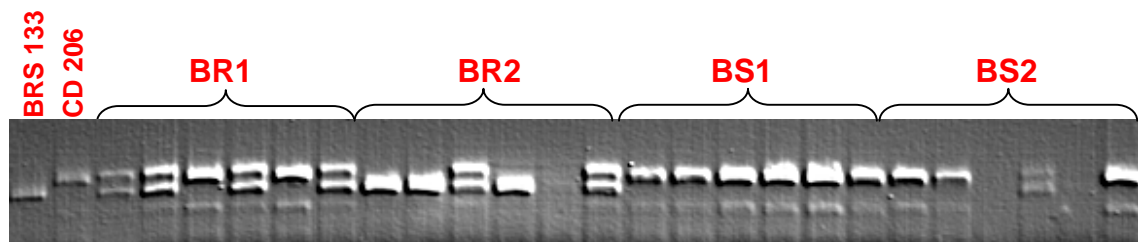


Figura 8: Amplificação das amostras individuais de DNA constituintes dos bulks, com o iniciador Sat_308. BR1 e BR2 contêm DNA apenas de plantas resistentes, constituintes dos bulks BR1 e BR2. BS1 e BS2 contêm DNA apenas de plantas suscetíveis, constituintes dos bulks BS1 e BS2.

Os resultados confirmaram a possibilidade de ligação genética entre o marcador e o gene, e as amostras de DNA do restante da população foram amplificadas com o iniciador Sat_308. Os resultados confirmaram a ligação genética entre o marcador e o gene (Tabela 2).

Tabela 2: Tabela de contingência para a hipótese de independência entre o marcador molecular Sat_308 e a resistência da soja à NHS.

Marcador Molecular	Notas (Fenótipo)	
	1+2	3+4
Sat_308	72	7
HR + Het	15	14

$$\chi^2 = 21,38; P = 0,0003.$$

HR: Homozigoto com o genótipo do parental resistente (BRS 133).

Het: Heterozigoto.

HS: Homozigoto com genótipo do parental suscetível (CD 206).

O valor significativo do teste de χ^2 indica que o marcador e o gene de resistência não segregam independentemente. Na análise de co-segregação, utilizando o programa GQMol, foi estimada uma frequência de recombinação de 25,3% entre o marcador Sat_308 e o gene *Rssn*, com LOD score de 3,83.

O marcador Sat_308 está localizado no grupo de ligação G do mapa genético da soja (CREGAN et al., 1999; SONG et al., 2004). Com o objetivo de obter um posicionamento mais preciso do gene *Rssn* neste grupo de ligação, outros 12 marcadores moleculares, localizados na mesma região cromossômica do marcador Sat_308 foram utilizados para avaliar as amostras de DNA de todos os indivíduos da população F₂. Os marcadores Satt610, Satt356, Satt131, Satt324, Satt394, Sctt010, Satt400 e Satt612 não apresentaram polimorfismo entre as cultivares BRS 133 e CD 206. Os marcadores Satt505, Satt303, Satt352 e Satt564 foram polimórficos entre os dois parentais. O marcador Satt352 apresentou um padrão de amplificação de baixa qualidade, e não pode ser utilizado. Os demais marcadores foram utilizados para localizar o gene *Rssn* no grupo de ligação G.

Os quatro marcadores do grupo de ligação G segregaram de acordo com o esperado para uma população F_2 (Tabela 3), e juntamente com o gene *Rssn*, formaram um grupo de ligação de 89,14 cM na região do gene *Rssn* (Figura 9).

Tabela 3: Segregação dos marcadores moleculares utilizados para mapear o gene *Rssn* no grupo de ligação G do genoma da soja.

Marcador	Valores observados			Hipótese	χ^2	Probabilidade
	HR	Het	HS			
Satt303	27	56	19	1:2:1	2,23	32,70
Satt564	30	60	20	1:2:1	2,73	25,57
Satt505	12	51	24	1:2:1	5,90	5,24
Sat_308	30	49	29	1:2:1	0,94	93,36

HR: Homozigoto com o genótipo do parental resistente (BRS 133).

Het: Heterozigoto.

HS: Homozigoto com genótipo do parental suscetível (CD 206).

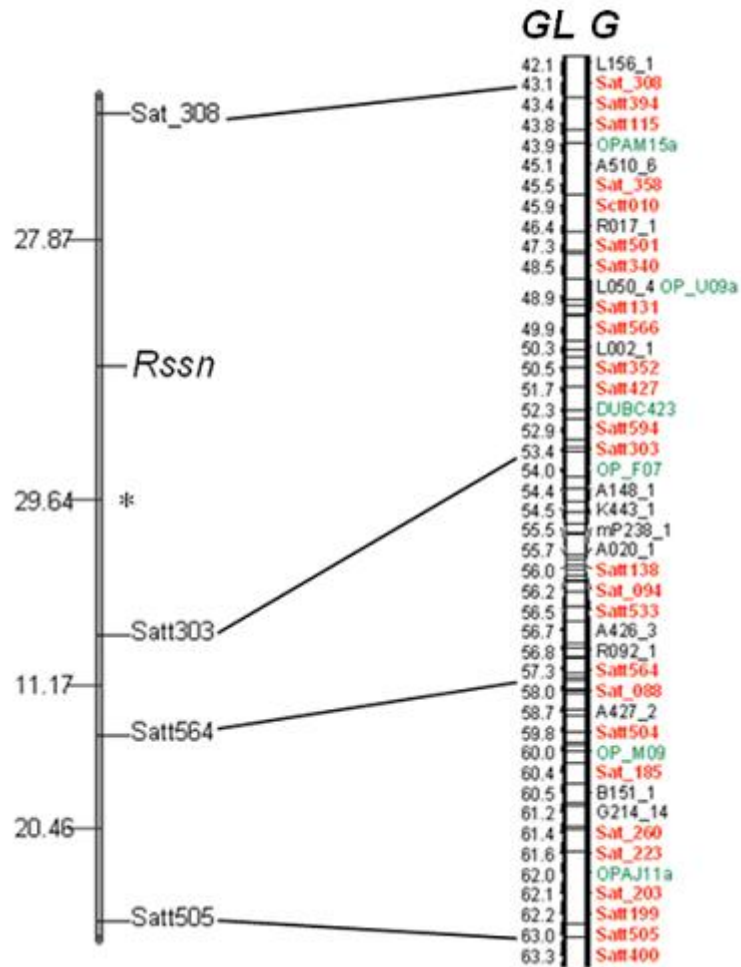


Figura 9: Mapa de ligação da região genômica contendo o gene *Rssn*, no grupo de ligação G do mapa consenso da soja. À esquerda, o grupo de ligação obtido com a população F_2 do cruzamento entre as cultivares BRS 133 e CD 206, neste estudo. À direita, parte do grupo de ligação G do mapa consenso da soja. Em cada figura, os nomes dos marcadores ou do gene estão indicados à direita do grupo de ligação. No grupo de ligação da esquerda, as distâncias entre os marcadores ou entre os marcadores e o gene *Rssn*, em cM (função de Kosambi) estão indicadas à esquerda da figura. No grupo de ligação da direita, os valores à esquerda da figura indicam as distâncias genéticas cumulativas.

A ordem dos marcadores moleculares no grupo de ligação formado coincidiu com a ordem dos mesmos no mapa consenso da soja (SONG et al., 2004). O gene *Rssn* foi mapeado entre os marcadores Sat_308 e Satt303, a 27,87 cM do

marcador Sat_308 e 29,64 cM do marcador Satt303. A ligação entre o marcador Satt303 e o gene *Rssn*, marcada com um asterisco (*) na Figura 9, foi obtida com LOD score de 2,96, mas por estar em acordo com o mapa consenso, a ligação genética entre estes dois locos foi considerada significativa.

As distâncias dos marcadores ao gene ainda são grandes, o que pode resultar em baixa eficiência para uso em um programa de seleção assistida por marcadores moleculares para a resistência da soja à NHS. Mas os resultados obtidos até o momento permitiram localizar o gene no grupo de ligação G do genoma da soja. O mapeamento fino desta região poderá identificar marcadores moleculares mais proximamente ligados a este gene, fornecendo uma ferramenta mais eficiente para uso em seleção assistida por marcadores moleculares.

Os marcadores moleculares Satt394, Sctt010 e Satt352, localizados no intervalo entre os marcadores Sat_308 e Satt303 foram utilizados neste estudo, mas os dois primeiros não foram polimórficos entre os parentais, e o marcador Satt352 apresentou um padrão de amplificação de baixa qualidade, de forma que não pode ser utilizado. Mas existem ainda diversos marcadores neste intervalo que ainda podem ser utilizados, na tentativa de obter marcadores mais proximamente ligados ao gene *Rssn*. Além disso, em outras populações, descendentes do cruzamento da fonte de resistência com outras cultivares suscetíveis, estes marcadores poderão ser polimórficos, e auxiliar no mapeamento mais fino do gene *Rssn*.

Deve-se considerar ainda que os dados fenotípicos foram obtidos em plantas F_2 , de forma que não é possível distinguir plantas homozigotas resistentes de plantas heterozigotas. Desta forma, os dados fenotípicos foram codificados como dados dominantes para o mapeamento genético. A precisão de mapeamento de dados dominantes é menor do que de dados co-dominantes (SCHUSTER; CRUZ, 2004). A avaliação das famílias $F_{2:3}$ desta população poderá diferenciar as plantas F_2 homozigotas resistentes das plantas heterozigotas, transformando os dados dominantes em dados co-dominantes, aumentando a precisão do mapeamento. Com isso, é possível que as estimativas de frequência de recombinação (e distâncias em cM) entre os marcadores já identificados e o gene sejam menores.

Na Tabela 4 estão apresentados os dados de eficiência de seleção, ou percentual de acerto na identificação do fenótipo a partir da análise com os

marcadores moleculares. Como é esperado, observa-se que à medida que o marcador está mais distante do gene, o percentual de acerto do fenótipo a partir do genótipo do marcador diminuiu. Observa-se também na Tabela 4 que o percentual de acerto é maior quando se selecionam plantas resistentes com o marcador molecular, do que quando se selecionam plantas suscetíveis.

Tabela 4: Análise conjunta do genótipo dos marcadores moleculares e do fenótipo das plantas F_2 para a resistência à NHS, e percentual de acerto do fenótipo pelo genótipo do marcador.

Marcador	Genótipo	Fenótipo		% de Acerto
		R	S	
Sat_308	R	72	7	91,1
	S	15	14	48,3
Satt303	R	71	12	85,5
	S	10	9	47,4
Satt564	R	76	14	84,4
	S	13	7	35,0
Satt505	R	53	11	82,8
	S	16	8	33,3
Sat_308 + Satt303	R	59	7	89,4
	S	3	9	75,0

R: resistente; S: suscetível. Para o caso de Sat_308 + Satt303, no grupo do genótipo R estão apenas plantas com genótipo de resistência para ambos os marcadores, e no grupo do genótipo S estão apenas plantas com genótipo de suscetibilidade para ambos os marcadores.

O erro de classificação do fenótipo a partir do genótipo do marcador molecular se dá pela recombinação entre o loco do marcador e do gene. No entanto, espera-se que a recombinação gere erros de classificação da mesma magnitude para o alelo de resistência e para o alelo de suscetibilidade.

Outra causa do erro de classificação do fenótipo a partir do genótipo do marcador pode ser o escape, ou seja, plantas com genótipo de suscetibilidade apresentam fenótipo de resistência por não terem sido infectadas pelo vírus. Neste caso, o erro de classificação ocorre somente nas plantas com genótipo suscetível. O excesso de plantas resistentes entre aquelas com genótipo de suscetibilidade para o marcador, em relação ao número de plantas suscetíveis entre as plantas com genótipo de resistência para o marcador, sugere que pode ter havido escape de algumas plantas suscetíveis na avaliação fenotípica. Neste caso, a distância dos marcadores ao gene poderá ser menor do que aquela que foi estimada. A avaliação das famílias F_{2:3} também auxiliará na averiguação desta hipótese.

Neste trabalho foi identificado mais um gene de resistência no grupo de ligação G do genoma da soja. Diversos genes de resistência têm sido identificados neste grupo de ligação, como por exemplo, genes de resistência ao nematóide de cisto da soja *Heterodera glycines* (CONCIBIDO et al., 1994, CREAGAN et al., 1999, YUE et al., 2001, WANG et al., 2001, CERVIGNI et al., 2004), nematóide de galhas *Meloydogine incognita* (TAMULONIS et al., 1997, LI et al., 2001), podridão de esclerotínia *Sclerotinia sclerotiorum* (Arahana et al., 2001), podridão de fitóftora *Phytophthora sojae* (DEMIRBAS et al., 2001), síndrome da morte súbita *Fusarium tucumaniae* (CHANG et al., 1997), e os genes *Rpp1* (HYTEN et al., 2007) e *Rpp4* (SILVA et al., 2008), que conferem resistência à ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi*.

Uma vez que cada um destes genes é proveniente de fontes de resistência diferentes, alelos de resistência devem estar ligados, na maior parte das fontes de resistência, a alelos de suscetibilidade para outras doenças. Por este motivo, estratégias de melhoramento genético devem ser utilizadas, a fim de quebrar estas ligações, e gerar progênies com ligação entre alelos de resistência para diferentes doenças. Uma vez obtidas estas progênies, a obtenção de cultivares contendo múltiplos genes de resistência deverá ser facilitada nos programas de melhoramento genético. A obtenção destas progênies recombinantes deve ser facilitada pela utilização dos marcadores moleculares identificados nos diversos trabalhos de mapeamento genético, incluindo os marcadores identificados neste trabalho. No entanto, novas populações devem ser avaliadas, a fim de obter um mapeamento mais fino, e identificar marcadores mais proximamente ligados ao gene *Rssn*, a fim de aumentar a eficiência de seleção pelos marcadores moleculares.

3.4. CONCLUSÕES

A herança da resistência da cultivar BRS 133 à necrose da haste da soja é condicionada por um gene dominante. Este é o primeiro relato da resistência à necrose da haste da soja e sugere-se desta forma que este gene seja denominado de *Rssn* (*Resistance to soybean stem necrosis*).

Os marcadores microssatélites Satt303 e Sat_308 estão ligados ao gene de resistência à necrose da haste da soja a uma distância de 27,87 cM e 29,64 cM, respectivamente.

3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A. M. R.; PIUGA, F. F.; KITAJIMA, E. W.; GASPAR, J. O.; VALENTIN, N.; BENATO, L. C.; MARIN, S. R. R.; BINNECK, E.; OLIVEIRA, T. G. de, BELINTANI, P.; GUERZONI, R. A.; NUNES JUNIOR, J.; HOFFMANN, L.; NORA, P. S.; NEPOMUCENO, A. L.; MEYER, M. C.; ALMEIDA, L. A. Necrose da haste da soja. **Documentos / Embrapa Soja, nº 221**, Londrina: Embrapa Soja, 2003. 44p.

ALZATE-MARIN, A. L. Resistência à antracnose do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.): diversidade genética de raças de *Colletotrichum lindemuthianum*, herança da resistência e identificação de marcadores moleculares. 1996. 65p. **Tese Doutorado em Genética e Melhoramento** – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

ARAHANA V.S.; GRAEF G.L.; SPECHT J.E.; STEADMAN J.R.; ESKRIDGE K.M. Identification of QTLs for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Crop Science**, v.41: p.180–188, 2001.

AYALA, L.; HENRY, M.; VAN GINKEL, M.; SINGH, R.; KELLER, B.; KHAIRALLAH, M. Identification of QTLs for BYDV tolerance in bread wheat. **Euphytica**, v.128: p.249-259, 2002.

BESERRA JR, J. E. A.; MALUF, W. R.; FIGUEIRA, A. R.; BARGUIL, B. M. Herança da resistência ao *Watermelon mosaic virus* em melancia (*Citrullus lanatus* L.). **Fitopatologia Brasileira**, v.31(3): p.302-305, 2006.

CARVALHO, G. A.; SEDIYAMA, T.; MARIN, A. L. A.; BARROS, E. G. e MOREIRA, M. A. Identificação de marcadores RAPD ligados a um gene de resistência ao cancro da haste da soja. **Fitopatologia Brasileira**, v.27(5): p.474-478, 2002.

CHANG S.J.C.; DOUBLER T.W.; KILO V.Y.; ABUTHREDEIH J.; PRABHU R.; FREIRE V.; SUTTNER R.; KLEIN J.; SCHMIDT M.E.; GIBSON P.T.; LIGHTFOOT D.A. Association of loci underlying field resistance to soybean sudden death syndrome (SDS) and cyst nematode (SCN) Race 3. **Crop Science**, v.37: p.965–971, 1997.

CERVIGNI, G. D. L.; SCHUSTER, I.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Two microsatellite markers flanking a dominant gene for resistance to soybean cyst nematode race 3. **Euphytica**, v.135: p.99-105, 2004.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Soja: comparativo de área, produtividade e produção de grãos safras 2006/07 e 2007/08 – Oitavo Levantamento maio 2008**. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br>. Acesso em: 18 maio de 2008.

CONCIBIDO V.C.; DENNY R.L.; BOUTIN S.R.; HAUTEA R.; ORF J.H.; YOUNG N.D. DNA marker analysis of loci underlying resistance to soybean cyst-nematode (*Heterodera glycines ichinohe*). **Crop Science**, v.34: p.240–246, 1994.

CORRÊA, R. X.; GOOD-GOD; P. I. V.; OLIVEIRA, M. L. P.; NIETSCHÉ, S.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Herança da resistência a mancha angular do feijoeiro e identificação de marcadores moleculares flanqueando o loco de resistência. **Fitopatologia Brasileira**, v.26(1): p.27-32, 2001.

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

CRUZ, C. D. **Programa Genes**: Versão Windows, aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 648p.:il., 2001.

CRUZ, C. D. e SCHUSTER, I. GQMOL: aplicativo computacional para análise de dados moleculares e de suas associações com caracteres quantitativos, Versão 9.1. <http://www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm>. 2006. Acessado em 30 de maio de 2008.

DALL`AGNOL, A.; ROESSING, A. C.; LAZZAROTTO, J. J.; HIRAKURI, M. H.; OLIVEIRA, A. B. de. **O complexo agroindustrial da soja brasileira**. Londrina, PR: Embrapa/CNPSo, Circular Técnica, 43, 2007. 11p.

DEMIRBAS A.; RECTOR B.G.; LOHNES D.G.; FIORITTO R.J.; GRAEF G.L.; CREGAN P.B.; SHOEMAKER R.C.; SPECHT J.E. Simple sequence repeat markers linked to the soybean *rps* genes for *phytophthora* resistance. **Crop Science**, v.41: p.1220–1227, 2001

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p. 13-15, 1990.

GOODRICK, B. J.; KUHN, C. W.; BOERMA, H. R. Inheritance of nonnecrotic resistance to cowpea chlorotic mottle virus in soybean. **The Journal of Heredity**, v.82(6): p.512-514, 1991.

GUIMARÃES, C. T.; SCHUSTER, I.; MAGALHÃES, J. V.; SOUZA JÚNIOR, C. L. Marcadores moleculares no melhoramento de plantas. In: Borém, A.: Caixeta, E. T. (Eds). **Marcadores Moleculares**. Viçosa, MG, p.107-144, 2006.

HARTMAN, G. L.; SINCLAIR, J. B.; RUPE, J. C. **Compendium of soybean diseases**. The American Phytopathological Society, Fourth edition, 1999. 100p.

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

KOSAMBI, D. D. The estimation of map distances from recombination values. **Ann. Eugen.** v.12: p.173-175, 1944.

KYLE, M. M.; PROVVIDENTI, R. Inheritance of resistance to potato Y viruses in *Phaseolus vulgaris* L. **Theoretical and Applied Genetics**, v.74, p.595-600, 1987.

LI Z.; JAKKULA L.; HUSSEY R. S.; TAMULONIS J. P.; BOERMA H. R. SSR mapping and confirmation of the qtl from PI 96354 conditioning soybean resistance to southern root-knot nematode. **Theoretical and Applied Genetics**, v.103: p.1167–1173, 2001.

MALUF, W. R.; PEREIRA, J. J.; FIGUEIRA, A. R. Inheritance of resistance to the papaya ringspot virus-watermelon strain from two different accessions of winter squash *Cucurbita maxima* Duch. **Euphytica**, v.94: p.163-168, 1997.

MEHTA, Y. R. e ARIAS, C. A. A. Herança da resistência à *Stemphylium solani* e intensidade a sua fitotoxina em cultivares de algodoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.26(4): p.761-765, 2001.

PARAN, I.; MICHELMORE, R. W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**, v.85, p.985-993, 1993.

PROVVIDENTI, R.; GONSALVES, D.; RANALL, P. Inheritance of resistance to soybean mosaic virus in *Phaseolus vulgaris*. **The Journal of Heredity**, v.73(4): p.302-303, 1982.

PUPIM JÚNIOR, O. Herança da resistência do algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) à doença azul. 2007. 58p. **Dissertação Mestrado em Produção Vegetal** – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR.

SAMBROOCK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular cloning a laboratory manual**. 2nd Ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, V. 3, 1989.

SCHUSTER, I. e CRUZ, C. D. Estatística Genômica Aplicada a Populações Derivadas de Cruzamentos Controlados. Viçosa: Editora UFV, 2004. 568 p.

SILVA, M. F.; KIIHL, R. A. S.; ALMEIDA, A. M. R. Inheritance of resistance to soybean mosaic virus in FT-10 soybean. **Euphytica**, v.135: p.339-343, 2004.

SILVA, D. C. G; YAMANAKA, N.; BROGIN, R. L.; ARIAS, C. A. A.; NEPOMUCENO, A. L.; DI MAURO, A. L.; PEREIRA, S. S. NOGUEIRA, L. M.; PASSIANOTO, A. L. L. ABDELNOOR, R. V. Molecular mapping of two loci that confer resistance to Asian rust in soybean. **Theoretical and Applied. Genetics**, v.117: p.57-63, 2008.

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

TAMULONIS J. P.; LUZZI B. M.; HUSSEY R. S.; PARROTT W. A.; BOERMA H. R. DNA markers associated with resistance to javanese root-knot nematode in soybean. **Crop Science**, v.37: p.783–788, 1997.

- USDA, World crop production. Disponível em www.usda.gov Acesso em maio de 2008.
- WALLACE, T. P. e EL-ZIK, K. M. Inheritance of resistance in three cotton cultivars to the HV1 isolate of bacterial blight. **Crop Science**, v.29: p.1114-1119, 1989.
- WANG, Y. H.; THOMAS, C. E.; DEAN, R. A. Genetic mapping of a fusarium wilt resistance gene (Fom-2) in melon (*Cucumis melo* L.). **Molecular Breeding**, v.6(4): p.379-389, 2000.
- WANG D.; ARELLI P. R.; SHOEMAKER R. C.; DIERS B. W. Loci underlying resistance to race 3 of soybean cyst nematode in *Glycine soja* plant introduction 468916. **Theoretical and Applied Genetics**, v.103: p.561-566, 2001.
- WANG, C.; ULLOA, M; ROBERTS, P. A. Identification and mapping of microsatellites markers linked to root-knot nematode resistance gene (*rkn 1*) in Acala NemX cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.112(4): p.770-777, 2006.
- YORINORI, J. T. Sucessos e novos desafios no controle de doenças fúngicas da soja através da resistência genética no Brasil. CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 1999, Londrina. **Anais...** Londrina: Embrapa Soja. p.449. 1999.
- YORINORI, J. T. Situação atual das doenças potenciais no cone sul. CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 1999, Londrina. **Anais...** Londrina: Embrapa Soja. p. 171-186. 2002.
- YUE P.; ARELLI P. R.; SLEPER D. A. Molecular characterization of resistance to *Heterodera glycines* in soybean PI 438489b. **Theoretical and Applied Genetics**, v.102: p.921–928, 2001.
- ZANDONÁ, C.; MEHTA, Y. R.; SCHUSTER, I.; ALVES, P. F. R.; BOMFETI, C. A.; BIBANCO, K. P.; SILVA, R. B.; LOPES, L. P. Mecanismo genético de resistência em três cultivares de algodoeiro à *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*. **Fitopatologia Brasileira**, v.30(6): p.647-649, 2005.