



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JOÃO VITOR MALDONADO DOS SANTOS

**MAPEAMENTO DE QTLS DE CARACTERÍSTICAS SOB
INFLUÊNCIA DA FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA**

JOÃO VITOR MALDONADO DOS SANTOS

**MAPEAMENTO DE QTLS DE CARACTERÍSTICAS SOB
INFLUÊNCIA DA FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA**

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

Orientador: Prof Dr. Ricardo Vilela Abdelnoor

Londrina
2010

JOÃO VITOR MALDONADO DOS SANTOS

**MAPEAMENTO DE QTLS DE CARACTERÍSTICAS SOB INFLUÊNCIA
DA FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA**

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

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricardo Vilela Abdelnoor
Embrapa Soja – Londrina - PR

Prof. Dr. Ivan Schuster
Coodetec – Cascável – PR

Prof. Dr. Josué Maldonado Ferreira
UEL – Londrina – PR

Londrina, 18 de fevereiro de 2010.

DEDICO

*Aos meus pais Manoel e Maria
por todo apoio, paciência e incentivo
em busca de meus objetivos*

OFEREÇO

*As minhas irmãs Aliny e Rúbia,
por acreditarem em mim.*

*A Sabrina por todo carinho nos
momentos difíceis ou não.*

AGRADECIMENTO

A Deus, que me iluminou nos momentos difíceis e sempre esteve presente em minha vida.

À Universidade Estadual de Londrina, ao programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular e aos professores do programa pela ótima formação que me proporcionaram.

À Empresa Brasileira de Pesquisa em Agropecuária (EMBRAPA) e ao Japan International Research Center for Agricultural Sciences (JIRCAS), pela oportunidade e suporte financeiro cedido durante meu mestrado.

À Capes pelo suporte financeiro e pela bolsa concedida durante meu mestrado

Ao meu orientador Dr. Ricardo Vilela Abdelnoor por todo auxílio intelectual, atenção e grande contribuição na realização do trabalho.

Aos pesquisadores Dr. Carlos Alberto Arrabal Arias, Dr. José Francisco de Ferraz Toledo, Dr. Alexandre Lima Nepomuceno e Dra. Francismar Correa Marcelino por todo o auxílio e sugestões dadas ao trabalho.

Ao pesquisador Dr. Naoki Yamanaka pelo grande auxílio na coleta de dados experimentais, pelo auxílio intelectual e amizade.

Aos técnicos do laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Soja, Silvana Marin, César Silverio, Nilson Vieira, Márcia, Jairo, Verinha Pierotti por todo auxílio e amizade.

Aos funcionários da Embrapa Soja, Paulo Roberto Choucino Andregretti, Rogério Matsuo Omura, Manoel Alves, Manoel Pinto da Silva, Paulo

Henrique de Souza Silva, que conjuntamente com a Dra. Aliny Simony Ribeiro, auxiliaram nas coletas e análises estatísticas dos dados do trabalho.

Aos amigos do laboratório, Adriana, Amanda Paiva, Ciça, Cynara, Elton, Gustavo, Glória, Guto, Hitomi, Joice, Josué, Juliana, Juliane, Juliana Marcolino, Lara, Larissa, Lizandra, Lucas, Maria Thereza, Marcelo, Paulo Silla, Paulo Camargo, Renata Fuganti, Renata Stolf, Rusiska, Rodrigo, Salvador, Selma, Thiago e Valéria, pelo companheirismo e amizade.

Aos amigos André, Livia e Michelle por toda amizade e ajuda nos experimentos de campo e laboratório.

À Dra. Maria Aparecida dos Santos por todo o apoio e suporte nas análises de mapeamento.

Aos meus grandes amigos Tiago, Diego, Juninho, Valter, Fernando, Marcel, Leandro (Shampoo) e Lucas, pela grande força e amizade em todos os momentos.

Aos amigos da turma de mestrado em Genética e Biologia Molecular, pelo ótimo convívio durante e as amizades formadas durante estes 2 anos que levarei para sempre, em especial a Luana, Maikel e Mariana.

Ao pessoal da disciplina de genética quantitativa, em especial aos amigos e companheiros de sala Cibelle, Leidy, Jacqueline e Paula pelos longos dias de resolução de listas de exercícios, discussões, risadas e grande amizade formada.

À secretária Sueli Trindade Miranda por toda ajuda prestada, carinho e respeito durante essa caminhada.

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

SANTOS, João Vitor Maldonado dos. **Mapeamento de Qtls de características sob influência da ferrugem asiática da soja.** 2010. 107 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

RESUMO

Em nível mundial, a soja (*Glycine max* (L) Merrill) é a principal leguminosa cultivada, devido a sua grande importância na saúde e alimentação humana, na alimentação animal e sua utilização para produção de biocombustíveis. O Brasil está entre os maiores produtores de soja do mundo, sendo uma das principais fontes econômicas que movimentam o agronegócio brasileiro. Por isso, estudos sobre os principais fatores, sejam bióticos ou abióticos, que podem afetar negativamente a produção, são necessários. Entre estes, a ferrugem asiática da soja, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* (Sydow; P.Sydow), apresenta um grande potencial de redução severa da produtividade de soja. Hoje, sabe-se que a forma mais eficaz de controle da doença é através da resistência genética. Devido à baixa durabilidade de genes de resistência vertical, estudos para o desenvolvimento de linhagens com genes de resistência horizontal são de extrema importância. Neste trabalho objetivou-se estudar a influência da ferrugem asiática sobre características de importância agrônômica, que foram avaliadas em uma população de linhagens endogâmicas recombinantes (RILs). Foram realizadas análises fenotípicas e estatísticas para cada característica sob influência da ferrugem asiática, em campo experimental e no fitotron. Essas análises permitiram estudar a correlação existente entre as características e a seleção de 16 linhagens de soja que apresentaram as melhores características sob ação da ferrugem. Além disto, foi construído um mapa genético da soja com marcadores microssatélites, em que foram formados 19 grupos de ligação. Em oito destes grupos foram detectados 17 QTLs que contribuem para a resistência horizontal à doença. Os resultados alcançados são muito importantes pois abrem a possibilidade para a utilização de marcadores ligados aos QTLs em programas de melhoramento contra a doença.

Palavras-chave: *Glycine max*. *Phakopsora pachyrhizi*. Resistência poligênica. Correlação. Scott-Knott. Mapa genético. Microssatélites. Grupos de ligação.

SANTOS, João Vitor Maldonado dos. **mapping of QTL traits under Asian soybean rust influence**. 2010. 107 f. Dissertation (Master's degree in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

ABSTRACT

Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) is the main legume crop worldwide due to its high importance to health, human and animal feed and its use for biofuel production. Brazil is among the largest soybean producers in the world, which is one of the main economic resources that stimulates Brazilian agribusiness. Therefore, studies on the main factors, whether biotic or abiotic, which can negatively affect the production, are necessary. Among these factors, the Asian Soybean Rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* (Sydow; P. Sydow), can severely reduce the soybean yield potential. It is currently known that the most effective control practice involves genetic resistance. However, due to the low durability of vertical resistance, studies to develop lines with horizontal resistance are extremely important. In this study, the main objective was to evaluate important agronomic traits under influence of soybean asian rust in a population of recombinant inbred lines (RILs). For each trait, phenotypic and statistical analysis were performed in the population under asian rust infection grown in field and grow chamber. These analyses allowed the identification of correlation between the traits and the selection of 16 soybean lines that showed the best traits under asian rust influence. Also, a molecular genetic map with 19 chromosomes was built using microsatellite markers. Seventeen QTLs contributing to horizontal resistance rust were detected in eight of these chromosomes. The results will allow the use of molecular markers associated to these QTLs in the soybean breeding program against this disease.

Keywords: *Glycine max*. *Phakopsora pachyrhizi*. Polygenic resistance. Pearson correlation. Scott-Knott. Molecular map.

LISTA DE TABELAS

Artigo

Tabela 1 – Análise de variância com dados não transformados entre tratamentos (RILs x BRS 231 x BRS 184) e entre famílias (RILs)	52
Tabela 2 – Análise de variância entre tratamentos (RILs x BRS 231 x BRS 184) e entre as RILs para as características peso total e severidade com dados transformados pela fórmula do arco seno	55
Tabela 3 – Análises de correlação de Pearson dos dados coletados em campo experimental, realizadas através do programa SAS.....	56
Tabela 4 – Médias das cinco características analisadas em fitotron.....	60
Tabela 5 – Análises de correlação de Pearson dos dados coletados em fitotron, realizadas através do programa SAS.....	61
Tabela 6 – Microssatélites polimórficos para o cruzamento BRS 231 x BRS 184. A posição demonstrada é referente à visualizada no mapa consenso da soja (Cregan et al., 1999; Song et al., 2004).....	63
Tabela 7 – Resultados obtidos pelas análises realizadas pela ferramenta Eqtl do programa QTL Cartographer	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Escala diagramática elaborada por Canteri e Godoy (2003) para análise de severidade da ferrugem asiática da soja.....	37
Figura 2 – A) Classificação da coloração das lesões, distribuída continuamente da mais clara (6) a mais escura (1) e B) Nível de esporulação, de nenhuma esporulação (0) a abundante esporulação (3)	39
 Artigo	
Figura 3 – Mapa genético da soja baseado na população de 163 F _{7:8} RILS derivadas das cultivares BRS 231 x BRS 184.....	64
Figura 4 – Resultados das análises de busca por QTLs no grupo C2(6). (a) Análises via Zmapqtl; (b) Análises via JZmapqtl	67
Figura 5 – Resultado das análises de busca por QTLs no grupo F(13)	68
Figura 6 – Resultados das análises de busca por QTLs no grupo L(12). (a) Análises via Zmapqtl; (b) Análises via JZmapqtl	69
Figura 7 – Resultados das análises de busca por QTLs no grupo O(10). (a) Análises via Zmapqtl; (b) Análises via JZmapqtl	72
Figura 8 – Resultado das análises de busca por QTLs no grupo M(7)	73
Figura 9 – Resultados das análises de busca por QTLs nos grupos I(20) e N(3)	75

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	microgramas
µl	microlitros
ALF	Altura da linhagem durante o período de floração
ALM	Altura da linhagem durante o período de maturação
CF	Cor da flor
CL	Cor da lesão
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
CNPSo	Centro Nacional de Pesquisa de Soja
CTAB	Brometo de trimetil N-cetil amônio
DF	Data de floração da linhagem
DIC	Delineamento Inteiramente Casualizado
DM	Data de maturação da linhagem
DNA	" <i>Desoxyribonucleic Acid</i> " ou Ácido desoxirribonucleico
dNTP's	dinucleotídeos
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra acético
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EST	" <i>Expressed Sequence Tag</i> " ou Etiqueta de Seqüência Expressa
FDA	Food and Drug Administration
F₁	Primeira geração de um cruzamento
F₂	Segunda geração de um cruzamento
F₇	Sétima geração referencial de um cruzamento
F₈	Oitava geração de um cruzamento
FUA	Freqüência de urédias abertas
GL	Grupos de Ligação da soja
M	molar
mg	miligrama
MgCl₂	Cloreto de magnésio
ml	mililitro
mM	milimolar
mmol	milimol
NaCl	Cloreto de sódio

ng	nanograma
NE	Nível de esporulação
NO	Número de nós por linhagem
NU	Número de urédias por folha
P100	Peso de cem sementes
pb	pares de base
PCR	" <i>Polymerase Chain reaction</i> " ou Reação de polimerização em cadeia
PI	" <i>Plant Introduction</i> " ou Introdução de Plantas
PLU	porcentagem de lesões contendo urédias
PT	Peso total de sementes
QTLs	" <i>Quantitative Trait Locus</i> " ou Locos de Característica Quantitativa
RB	" <i>Reddish-Brown</i> " ou Marrom-Avermelhado
RILs	" <i>Recombinant Inbred Lines</i> " ou Linhagens Endogâmicas Recombinantes
<i>RNAse</i>	<i>ribonuclease</i>
<i>Rpp</i>	" <i>Resistance to Phakopsora pachyrhizi</i> " ou Resistência a <i>Phakopsora pachyrhizi</i>
SAM	" <i>Marker Assisted Selection</i> " ou Seleção Assistida por Marcadores
SEV	Severidade da doença em folhas
SGQ	Sistema de Genética Quantitativa
SNP	" <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> " ou Polimorfismo de Base Única
SSR	" <i>Simple Sequence Repeat</i> " ou Seqüência Simples Repetida
SSD	" <i>Single Seed Descendent</i> " ou Descendência de uma Única Semente
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris-HCL e EDTA
TEMED	N,N,N'N' -Tetra-metil-etileno-diaminina
UV	ultravioleta
V₃	estágio trifoliar
°C	graus celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
3	REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1	SOJA.....	18
3.2	FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA.....	20
3.3	BIOLOGIA E SINTOMATOLOGIA DO PATÓGENO	21
3.4	PRÁTICAS DE MANEJO	22
3.5	QTL (<i>QUANTITATIVE TRAIT LOCI</i>)	25
3.6	MARCADORES MOLECULARES	28
3.7	MICROSSATÉLITE	29
3.8	MAPAS GENÉTICOS	30
4	MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1	DESENVOLVIMENTO DA POPULAÇÃO RILS	32
4.2	EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA.....	32
4.3	LOCOS DE MICROSSATÉLITES.....	33
4.4	AMPLIFICAÇÃO DE MICROSSATÉLITES.....	34
4.5	AVALIAÇÃO FENOTÍPICA	34
4.5.1	Delineamento Experimental de Campo	34
4.5.2	Inoculação do Patógeno	36
4.5.3	Coleta de dados.....	36
4.5.4	Coleta de dados em fitotron.....	37
4.5.5	Análises Estatísticas.....	39
4.6	CONSTRUÇÃO DO MAPA GENÉTICO E IDENTIFICAÇÃO DE QTLs.....	40
5	ARTIGO	42
5.1	TÍTULO – MAPEAMENTO DE QTLs DE CARACTERÍSTICAS SOB INFLUÊNCIA DA FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA.....	42
	REFERÊNCIAS	78

ANEXOS	92
ANEXO A – Médias, Variância e Scott-Knott em campo.....	93
ANEXO B – Protocolos	100
ANEXO C – Soluções	105

1 INTRODUÇÃO

A importância da agricultura para o desenvolvimento econômico e social de um país torna-se assunto de grande estudo. Tecnologias e produtos desenvolvidos em busca de um aumento significativo na produção agrícola brasileira, portanto, são de grande interesse. Dentro deste aspecto, a soja [*Glycine max* (L) Merrill] é considerada a leguminosa mais importante do mundo, devido a sua ampla utilização na alimentação e na produção de óleos e biocombustíveis. Em âmbito nacional, encontra-se como o principal produto de exportação do agronegócio brasileiro, impulsionando a economia brasileira. Devido a estas características, portanto, estudos relacionados a esta cultura são de extrema importância.

Embora o Brasil encontra-se em segundo lugar em produção mundial desta leguminosa, existem inúmeros fatores que necessitam de cuidados especiais para que a qualidade e produtividade brasileira da soja não decaiam. Estes fatores podem ser abióticos, causados por agentes naturais, e bióticos, causados por patógenos, cujos agentes variam de fungos, vírus, bactérias, insetos e nematóides.

Entre os inúmeros causadores de prejuízos da soja, o principal fator biótico responsável por perdas significativas é o fungo *Phakopsora pachyrhizi* (Sydow; Sydow), causador da ferrugem asiática da soja. Este fungo possui origem asiática e seus primeiros relatos em continente americano datam de 2001, especificamente no Paraguai, Brasil e Argentina. Estima-se que este fungo possui um potencial de redução de produtividade maior que 75%, o que o torna uma grande ameaça para a produção nacional.

Existem várias práticas de manejo que visam o controle da doença, porém a que apresenta melhores resultados em âmbito socioeconômico e ambiental é a de utilização de genótipos resistentes. Alguns genótipos já foram detectados como resistentes à doença, porém devido à alta variabilidade genética existente dentro dos isolados de fungos, existe a grande necessidade de obtenção de um maior número de genótipos superiores que apresentem características que contribuem com uma alta produção, mesmo sob a atuação do patógeno.

Com isto estudos em busca de materiais que possam suportar a ação do patógeno são de extrema importância. Uma importante ferramenta que auxilia nos programas de melhoramento visando resistência à ferrugem asiática da soja são os marcadores moleculares, que podem ser amplamente utilizados em programas de melhoramento que visam à identificação de genótipos superiores à ação da doença, pois, diferentemente dos marcadores morfológicos, estes são independentes dos efeitos ambientais e estádios fisiológicos da planta, além de apresentarem um alto nível de polimorfismo distribuído ao longo de todo genoma. Dentre estes, marcadores microssatélites são amplamente utilizados por apresentarem alta reprodutibilidade, simplicidade de uso e serem codominantes, o que é extremamente importante para distinguir genótipos homocigotos de heterocigotos.

Através do uso dos marcadores moleculares, é possível identificar genótipos superiores à agricultura e identificar características que possam ser trabalhadas em futuros programas de melhoramento visando resistência a doença. Além disto, abre-se a possibilidade de estudos mais direcionados em busca de um maior conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na interação planta-patógeno.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho possui o seguinte objetivo:

- Construir um mapa genético de ligação originado de uma população RILs (Recombinant Inbred Lines ou Linhagens Endogâmicas Recombinantes), através do uso de marcadores moleculares de microssatélites.
- Identificar QTLs atuantes sob a ação da ferrugem asiática da soja.
- Avaliar em fitotron e campo experimental caracteres de grande interesse agrônomo relacionados ou não à ferrugem asiática, a fim de selecionar genótipos superiores para a agricultura.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 SOJA

A soja pertence à divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, subclasse Rosidae, ordem Fabales, família Fabaceae, subfamília Faboideae, gênero *Glycine* L., subgênero *Glycine* subg. soja (Moench) e espécie *Glycine max* (L.) Merril.

Esta é considerada a leguminosa mais importante no mundo devido ao fato de a mesma possuir alto teor de proteínas, ácidos graxos poli-insaturados, e uma quantidade apreciável de vitaminas, minerais e fibras, sendo bem utilizada na alimentação mundial. Vale ressaltar que a mesma ainda apresenta como vantagem, em relação às fontes de proteína animal, o fato de não possuir colesterol. Segundo estudos desenvolvidos por Barnes et al. (1990) e dados elaborados pela Food and Drug Administration (1991), muitas substâncias encontradas nas sementes da soja foram identificadas como muito importantes para a saúde humana, reduzindo o número de doenças cardíacas, câncer intestinal, diabetes, cálculos biliares e doenças renais. Outro fato importante relacionado à utilização da soja em âmbito mundial é de esta possuir alta capacidade de produção de óleos, além de ser um material promissor para a produção de biodiesel. Hoje, a mesma possui um lugar de muito destaque na economia brasileira, sendo o maior produto nacional de exportação (EMBRAPA, 2007).

Foi no Rio Grande do Sul que a soja começou a ser cultivada em larga escala, sendo dois fatores decisivos para sua consolidação. O primeiro foi a existência de uma forte atividade de criação de suínos, razão pela qual se costuma dizer que a soja encontrou no porco o seu grande aliado. Foi também de grande importância na década de 50 a 59, a expansão da triticultura, incentivada pelo Governo Federal. Depois de ser usada como adubação verde, a soja foi considerada como cultura ideal para a rotação com o trigo, diante da preocupação em evitar a monocultura (CARUSO, 1997).

Por volta de 1940, a soja começou a ser conhecida em Minas Gerais. No Mato Grosso do Sul e em Goiás, o cultivo da soja foi introduzido na década de 50. No Distrito Federal seu cultivo começou a partir de 1973, ocupando pequena área, mas vindo a se expandir mais tarde (SANTOS, 1988). No Paraná, a cultura da soja foi introduzida comercialmente na década de 50, passando a ter representatividade econômica somente no final da década de 60 (DOMIT et al, 2007).

A explosão do preço da soja no mercado mundial, em meados de 1970, desperta ainda mais os agricultores e o próprio governo brasileiro. O País se beneficia de uma vantagem competitiva em relação aos outros países produtores: o escoamento da safra brasileira ocorre na entressafra americana, quando os preços atingem as maiores cotações. Desde então, o país passou a investir em tecnologia para adaptação da cultura às condições brasileiras. Os investimentos em pesquisa levaram à "tropicalização" da soja, permitindo, pela primeira vez na história, que o grão fosse plantado com sucesso, em regiões de baixas latitudes. Essa conquista dos cientistas brasileiros revolucionou a história mundial da soja e seu impacto começou a ser notado pelo mercado a partir do final da década de 80 e mais notoriamente na década de 90, quando os preços do grão começaram a cair (EMBRAPA SOJA, 2010).

Atualmente, os líderes mundiais na produção de soja são, nesta ordem, os Estados Unidos, Brasil, Argentina, China, Índia e Paraguai (EMBRAPA SOJA, 2010). Na última safra (2009/10), o total de área plantada de soja no Brasil correspondeu a cerca de 23.048.300 hectares, com uma média de produtividade em torno de 2.800 kg/ha e produção total 64.560.900 toneladas (CONAB, 2010). O Estado com maior área plantada (6.139.400 hectares), maior produtividade (3,038 kg/ha) e produção

(18.651.500 toneladas) é Mato Grosso, seguido do Estado do Paraná (CONAB, 2010). A China tem sido nos últimos anos o maior importador da soja brasileira em grão, seguida dos países baixos. O Brasil também exporta o farelo e o óleo de soja, porém em quantidades menores que o grão (CONAB, 2010).

3.2 FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA

A ferrugem asiática da soja, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* (Sydow; P. Sydow), é atualmente a doença mais importante no cultivo da soja, causando elevadas perdas de produção no Brasil.

Historicamente, a ferrugem asiática da soja foi primariamente descrita no Japão em 1902 e posteriormente, por volta de 1914, surgiu de forma epidêmica por outros países asiáticos (REIS; BRESOLIN, 2004). No continente africano, foi detectada inicialmente em 1990 e hoje é possível ser observada em países como Zimbábue, Uganda, Zâmbia e África do Sul. No continente americano, o primeiro foco de ferrugem asiática foi detectado no Paraguai, em 2001 e no mesmo ano no Brasil. Após sua detecção, a ferrugem asiática se espalhou por todo o Brasil, Paraguai, Bolívia e parte da Argentina (YORINORI, 2004). Nos Estados Unidos, esta doença foi primeiramente detectada em 2004, em parcelas experimentais de soja da Universidade Estadual da Louisiana (SCHNEIDER et AL., 2005), sendo posteriormente detectada em alguns Estados americanos, como a Florida, Alabama, Arkansas, Mississippi, Missouri e Carolina do Sul, os quais enfrentam problemas para o seu controle (YORINORI, 2005).

O prejuízo na produção de grãos, causado pela ferrugem na safra brasileira de 2007/2008, foi de aproximadamente 418,5 mil toneladas ou U\$ 204,5 milhões, considerando o preço médio de U\$ 488,72 por tonelada de soja. Já o custo total da ferrugem asiática nesta safra foi de U\$ 2,38 bilhões, pois a média nacional do custo da operação de controle da doença foi de US\$ 43 por aplicação, sendo que a média nacional de aplicação foi de 2,2 aplicações por hectares (CONSÓRCIO, 2010).

Na safra 2008/09, esta doença causou perdas em grãos para o Brasil de aproximadamente a 571,8 mil toneladas de grãos ou U\$ 71,7 milhões, considerando o preço médio de U\$ 230,65 a tonelada de soja. Somando-se o custo da operação de controle, cuja média nacional ficou em 2,4 aplicações por hectare, o que representa US\$ 1,67 bilhão, o custo total da ferrugem asiática nesta safra foi de U\$ 1,74 bilhão (CONSÓRCIO, 2010). O Estado com maior incidência da doença foi a Bahia.

3.3 BIOLOGIA E SINTOMATOLOGIA DO PATÓGENO

As condições abióticas influenciam demasiadamente no desenvolvimento da ferrugem em plantas de soja. Basicamente, a intensidade da doença é determinada pelo efeito da temperatura ambiente e da duração diária do molhamento foliar. Segundo Alves et al. (2005), a faixa de temperatura ótima de germinação do patógeno é de 15 a 25 °C. Temperaturas acima de 30° C são desfavoráveis à infecção. Além disto, estudos realizados por Alves et al. (2004) evidenciaram que as cultivares, quando submetidas a um molhamento foliar entre 6 a 12 horas, obtiveram acentuado aumento na frequência de infecção e severidade da doença. Em condições de campo, as chances de infecção geralmente são maiores durante a noite e no início da manhã, pois a umidade relativa e a duração do período de molhamento foliar são maiores nessas ocasiões (PIVONIA; YANG, 2006).

A infecção originada por esta doença causa uma série de lesões na parte abaxial da folha. Inicialmente, surgem como minúsculos pontos em tecidos saudáveis de folhas. Após alguns dias, é possível observar saliências que correspondem a urédias, estruturas de frutificação fúngica. Os sintomas causados pela ferrugem da soja são denominados de lesões e não de pústulas como nas demais ferrugens. Isto porque ocorre a necrose do tecido foliar e em cada lesão podem existir várias pústulas. Portanto, uma lesão da ferrugem da soja é composta por várias pústulas salientes e por um poro central. A manifestação mais comum da doença é observada como áreas foliares cloróticas, de forma poligonal e coloração bronzeada ou parda, podendo escurecer a medida que envelhecem. Individualmente, com o passar do tempo, as lesões aumentam de área alcançando até 1,2 mm² (REIS; BRESOLIN, 2004).

A ação da doença sobre uma lavoura de soja está relacionada com o desenvolvimento das urédias, que após certo tempo liberam uredósporos através de um poro central. O poro, através do qual os uredósporos são liberados, localiza-se na elevação do tecido epidérmico. Os uredósporos, inicialmente de coloração hialina, tornam-se bege e acumulam-se ao redor dos poros ou são carregados pelo

vento. O número de urédias, por ponto, pode variar de uma a seis. Os uredósporos são facilmente disseminados para lavouras próximas ou a longas distâncias através do vento, porém, não são transmitidos pela semente, restos culturais ou por material processado como a torta e o farelo da soja (REIS; BRESOLIN, 2004).

A presença de urédias é determinante para se distinguir a ferrugem asiática da soja de outras doenças que a afetam. Outra característica importante observada através das urédias está correlacionada à planta ser resistente ou susceptível. Se a coloração da urédia for castanho claro, a lesão observada na folha será denominada de *tan* (do inglês “bronze”) e a planta será susceptível. Caso a coloração seja castanho-escuro, a lesão observada na planta será RB (do inglês Reddish-Brown), e a planta será resistente à ferrugem asiática. O fato de a planta possuir lesões *tan* não implicará numa susceptibilidade imediata, sendo que algumas plantas, por mecanismos ainda não conhecidos, podem possuir algum tipo de tolerância à doença, que culminaria numa planta que possuiria a doença, porém não perderia sua produtividade. Além disto, atualmente existem estudos que visam identificar plantas com fenótipo de imunidade a esta doença (HENNING; GODOY, 2006). Imunidade já foi relatada em algumas fontes de resistência contra alguns isolados do fungo, como o alelo *Rpp1*, proveniente da PI 200492, contra o isolado India 73-1 (HARTWIG; BROMFIELD, 1983)

A infecção causa rápida clorose e queda prematura das folhas, impedindo a plena formação dos grãos. Quanto mais cedo ocorrer a desfolha, menor será o tamanho dos grãos e, conseqüentemente, maior o dano no rendimento e na qualidade. Dependendo da severidade, em alguns casos, quando a doença atinge a fase de formação das vagens ou no início da granação, pode causar o aborto e queda das vagens (HENNING; GODOY, 2006).

3.4 PRÁTICAS DE MANEJO

Para o controle da doença, existem algumas estratégias que devem ser levadas em consideração. A estratégia mais tradicional é a utilização de defensivos agrícolas. Existem inúmeros tipos de fungicidas que podem ser

utilizados. Dentre eles existem os fungicidas do grupo dos inibidores da biossíntese de ergosterol (trizóis, como o tebuconazole e o difenoconazole) usados em formulações simples ou em misturas com as estrobilurinas (como o epoxiconazole + pyraclostrobin), que inibem a respiração mitocondrial dos fungos, impedindo a transferência de elétrons entre o citocromo b e o citocromo c (BARLETT et al., 2002). Estes, segundo estudos realizados por Godoy e Canteri (2004) apresentam uma melhor resposta aos efeitos causados pela ferrugem tanto na aplicação preventiva como na curativa. Trabalhos desenvolvidos por Soares et al. (2004) demonstraram um melhor desempenho desses dois grupos de fungicidas no controle da doença. Existem ainda os fungicidas do grupo dos benzimidazóis, como o carbendazin, que apresenta menor eficiência de controle da doença, tanto na aplicação preventiva como na curativa (GODOY; CANTERI, 2004) e menor desempenho quanto a produção de grãos nas plantas tratadas, quando comparadas às plantas tratadas com outros grupos de fungicidas (SOARES et al., 2004).

A decisão sobre o momento de aplicar o fungicida deve levar em consideração vários fatores técnicos, pois o atraso na aplicação pode causar redução de produtividade muito elevada. O grande problema da utilização de fungicidas no controle da doença está relacionado ao aumento do custo de produção e ao impacto ambiental que estes produtos químicos podem causar (CONSÓRCIO, 2010).

Devido a isto, outras estratégias devem ser consideradas como maneira de contornar os riscos e diminuir o custo de controle da doença. Uma delas consiste na adoção do vazio sanitário, que é um período de 60 a 90 dias sem plantas de soja no campo, como uma estratégia para reduzir a quantidade de inóculo na entressafra. Todos os Estados brasileiros que cultivam a soja realizaram o vazio sanitário no ano de 2009, com muitas elevadíssimas para todos aqueles que tentaram burlar a sua utilização (CONSÓRCIO, 2010).

Outra estratégia de controle está relacionada à utilização de plantas precoces, pois o fato destas plantas apresentarem um baixo período de reprodutivo possibilita que sejam colhidas do campo em um período mais cedo, o que pode propiciar uma menor atuação do patógeno sobre a plantação (YORINORI; LAZZAROTTO, 2004).

Entretanto, dentre as estratégias utilizadas, a melhor forma para o controle a doença é a que envolve genes de resistência. Porém, existe um número pouco significativo de cultivares que apresentam esta característica, o que torna de grande utilidade estudos e trabalhos que visam o desenvolvimento de cultivares com resistência à ferrugem (CONSÓRCIO, 2010). Nesse caso, dois tipos de resistência podem ser considerados: vertical e horizontal.

Genes de resistência vertical são controlados por um ou alguns genes de efeito maior, de característica qualitativa, possuindo herança monogênica e sendo uma forma de resistência raça-específica. Estes genes atuam através de uma reação de hipersensibilidade, podendo ainda aparecer imunes ou inibir o processo de reprodução do fungo ou afetando o inóculo inicial do fungo (AGRIOS, 2005).

Alguns genes de resistência vertical à ferrugem asiática já foram identificados: *Rpp1* (primeiramente encontrado na planta introduzida PI-200492), *Rpp2* (PI-230970), *Rpp3* (PI-462312), *Rpp4* (PI-459025) e *Rpp5* (PI-200526) (BROMFIELD; HARTWING, 1980; MCLEAN; BYRTH, 1980; HARTWIG, 1986; GARCIA et al., 2008). Destes, *Rpp1* e *Rpp3* foram efetivos contra a ferrugem somente nos dois primeiros anos após o aparecimento da doença no Brasil (ARIAS et al., 2004).

Hoje, sabe-se que existem outras linhagens promissoras com genes de resistência a serem mapeados que possam contribuir com a diminuição dos prejuízos causados por este patógeno (LAPERUTA, 2007).

Já a resistência horizontal é geralmente conferida por genes de característica quantitativa, sendo comumente interpretada como uma herança poligênica. Este tipo de resistência trabalha com a somatória de efeitos de cada gene, que irão contribuir para a resistência a uma determinada doença. Diferentemente da resistência vertical, esta não é considerada específica para uma raça do patógeno. Em geral, este tipo de resistência não protege a planta da infecção pela doença, porém afeta o desenvolvimento do patógeno. A maior dificuldade para trabalhar com este tipo de característica está relacionada com as dificuldades de contornar o efeito ambiental sobre estas características (AGRIOS, 2005).

Uma característica importante que desfavorece a utilização de cultivares com genes de resistência vertical está relacionada à sua baixa durabilidade. A ação destes genes pode ser quebrada pelo surgimento de um isolado mais efetivo. Este processo ocorreu com os genes *Rpp1* e *Rpp3*, o que torna a cultivar que o possui suscetível a doença (ARIAS et al., 2004a; ARIAS et al., 2004b). A baixa durabilidade destes genes pode ser explicada pela teoria elaborada por Flor (1971), que demonstrou que a coexistência entre planta e seu patógeno está relacionado com um processo de evolução de ambos os lados (AGRIOS, 2005).

Este conceito evolutivo é conhecido como teoria gene-a-gene, usualmente observado em genes de resistência vertical a várias doenças em plantas. Esta teoria utiliza o conceito de que para cada gene de resistência da planta hospedeira, existe um gene correspondente no patógeno que irá conferir ou não virulência do patógeno. Desta maneira a expressão do gene de resistência da planta hospedeira é não só dependente de seus genes de resistência, mas também dos genes de virulência do patógeno. Assim, a indução da resposta de defesa da planta hospedeira é iniciada através do reconhecimento de moléculas sinalizadoras específicas (elicitoras) que são codificadas pelo gene *Avr* do patógeno. Estas são reconhecidas por proteínas presentes nas células vegetais codificadas pelo gene *R* da planta hospedeira. Este reconhecimento gera uma cascata de eventos de transdução de sinais que ativarão o processo de defesa da planta. Quando o patógeno não possui o correspondente gene *Avr*, este não será reconhecido pelo hospedeiro e desta maneira não ativarão o mecanismo de defesa da planta, o que possibilitará o crescimento e desenvolvimento do patógeno e quebra da ação do gene de resistência vertical (AGRIOS, 2005).

3.5 QTL (*QUANTITATIVE TRAIT LOC*)

Um QTL (*Quantitative Trait Loci*, em português Locos de Caracteres Quantitativos) corresponde a uma região do DNA a qual genes com herança poligênica, de efeito menor, estão associados atuando sobre uma característica específica. Estes genes contribuem com uma parcela no efeito sobre o fenótipo,

causando uma variação contínua sobre este. Existem QTLs associados a uma grande variedade de características dentro de um genoma, que podem estar localizados em um mesmo cromossomo ou em cromossomos diferentes, e muitas vezes a influência de um QTL sobre uma determinada característica pode ser influenciada por outro QTL. Se um pequeno número de QTLs (1-3) explicar grande parte da variação fenotípica, a característica pode ser trabalhada como se fosse qualitativa, utilizando seleção assistida por marcadores (BROGIN, 2005).

Em soja, já foram reportados a presença de QTLs relacionados a várias características, como por exemplo relacionadas à forma e tamanho de folíolos, e relacionados com a determinação da época de florescimento em soja, estando próximo do gene que define a coloração da pubescência e de um dos genes de florescimento e maturação (YAMANAKA et al., 2001). Foram relatados também QTLs associados a resistência a vários fungos causadores de prejuízos as lavouras de soja, como *Sclerotinia sclerotiorum*, causador do mofo branco (ARAHANA et al., 2001), *Phialophora gregata*, responsável pela podridão parda da haste (LEWERS et al., 1999), *Fusarium solani f. sp. glycines*, responsável pela síndrome da morte súbita (FARIAS NETO et al., 2007; NJITI et al., 2002; PRABHU et al., 1999; HNETKOVSKY et al., 1996), *Phytophthora sojae*, causador da podridão de semente (BURNHAM et al., 2003) e *Septoria glycines*, responsável pela septoriose ou mancha-parda (BROGIN et al., 2005). Além destes, existem outros trabalhos que identificaram a existência de QTLs de resistência a nematóides de galha (WANG et al., 2006; TAMULONIS et al., 1997) e nematóide do cisto (SCHUSTER et al., 2001; WEBB et al., 1995; PRABHU et al., 1999) e de resistência a insetos (KOMATSU et al., 2005; TERRY et al., 2000).

Um ponto, porém, difícil de ser superado é a influência do ambiente sobre a expressão fenotípica dos genes relacionados ao QTL. Devido a estes genes possuírem um efeito menos expressivo que um gene qualitativo, estes são mais influenciados pelo ambiente ao qual estão, o que dificulta ainda mais a seleção das melhores cultivares (FALCONER; MACKAY, 1996). Para o estudo de caracteres quantitativos, o ideal é avançar a geração originada até onde a homozigose predominará (F₇, F₈...), em gerações mais distantes dos pais, pois com um alto índice de homozigose, a possibilidade de segregação destes genes dentro da população diminua. Além disto, é importante também que as populações do

mapeamento de QTLs sejam avaliadas em condições ambientais variadas, como locais de plantio, épocas de semeadura e anos diferentes. Assim, pode-se ter uma estimativa da influência do ambiente sobre a característica. Outra maneira importante de diminuir a influencia ambiental sobre estes genes é através da utilização de marcadores moleculares, pois detectam o polimorfismo diretamente ao nível do DNA e não sofrem qualquer tipo de influência ambiental (SOUZA, 2001).

O mapeamento de QTLs para resistência a doenças busca uma alternativa ao controle da doença, visto que permite a identificação de genes de efeitos menores, mas importantes para a convivência da planta com o patógeno. No caso da ferrugem asiática da soja, o grande interesse para a utilização de QTLs está relacionado ao seu efeito prolongado quando comparado a genes de resistência vertical, visto que vários isolados do patógeno não conseguem quebrá-lo, o que dificulta o desenvolvimento da doença (PIEROZZI, 2007), além de que genótipos com esses genes tornam-se mais estáveis para a convivência com os vários isolados de ferrugem asiática da soja (RIBEIRO, 2006).

Foram detectados genes de resistência horizontal em algumas cultivares de soja, como a Mineira, Vila Rica FT-1, Ivaí, IAC-4, BR-4 e União (ZAMBOLIM et al., 1983), SER-B15-A (HARTMAN et al., 2004) e estima-se que a cultivar BRS 231 possua genes com esta característica (RIBEIRO, 2006). O maior problema enfrentado para detecção destes genes é a dificuldade na realização de avaliações periódicas de severidade da doença no material a ser estudado (BROMFIELD, 1984), pois é necessário um esforço demasiado para realizar a quantificação destes genes, o que limita e muito seu uso.

Atualmente, existem três cultivares comerciais de soja desenvolvidas que possuem genes de resistência à ferrugem asiática da soja: TMG 801, TMG 803 e BRSGO 7560. No entanto, todas possuem genes de resistência vertical à ferrugem asiática da soja.

3.6 MARCADORES MOLECULARES

O sucesso do aumento da produção agrícola no mundo tem sido influenciado de maneira decisiva pela atuação do melhoramento genético clássico. Entretanto, para a eficiente obtenção de ganhos genéticos no melhoramento é necessário um conhecimento da constituição genética das espécies. Com a introdução de técnicas de genética molecular no início da década de 80, os estudos de identificação, caracterização e mapeamento genético estão sendo realizados com maior segurança rapidez e eficiência (BERED et al., 1997).

Marcadores genéticos são características que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdados geneticamente. Via de regra, os marcadores genéticos são utilizados para a detecção de polimorfismo, que consiste no fenômeno em que, seqüências pertencentes ao mesmo loco são representados em uma espécie por duas ou mais formas alélicas diferentes entre si. Estes podem ser classificados em morfológicos (relacionados a características fenotípicas) ou moleculares (PÍPOLO et al., 2006).

Antigamente, o processo de seleção de cultivares elites em populações era realizado somente através de estudos de fenótipos de seus indivíduos. Nesta abordagem, são utilizados marcadores que segregam quantitativamente ou qualitativamente, de maneira mendeliana, para se estudar as diferenças genéticas entre os indivíduos. Esta estratégia vem contribuindo tanto para o conhecimento dos caracteres de alta herdabilidade quanto para estabelecer os princípios do mapeamento e das análises de ligação gênica (PÍPOLO et al, 2006). Porém, a probabilidade de associação entre as marcas morfológicas e características agronomicamente importantes era reduzida, devido ao baixo número destes marcadores em uma linhagem, o que limitava a sua utilização (GUIMARÃES; MOREIRA, 1999).

Os marcadores moleculares não sofrem qualquer tipo de influência ambiental, podendo ser utilizados em vários estágios de desenvolvimento da planta, além de permitirem a análise a partir de amostras de células de tecidos vivos, liofilizados ou até fossilizados, desde que uma quantidade suficiente de DNA possa

ser obtida. Este processo é importante, já que torna o processo de seleção de indivíduos através do genótipo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Cada tipo de marcador molecular existente possui certas vantagens e desvantagens (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). A escolha de utilização deve levar em consideração os problemas a serem solucionados, assim como todo o aspecto de capacitação técnica e instalações necessárias, custos e limitações quanto ao acesso a reagentes específicos (PÍPOLO et. al, 2006).

3.7 MICROSSATÉLITE

Microsatélites ou seqüências simples repetidas (SSR, do inglês simple sequence repeats) são blocos altamente conservados entre espécies com blocos de sequencias simples, repetidas de um a seis nucleotideos, posicionados em tandem e distribuídos ao longo do genoma (POWELL et al., 1996; MORGANTE; OLIVIERI, 1993)

Cada microsatélite constitui um loco genético altamente variável, multialélico, de grande conteúdo informativo, fazendo com essas regiões fossem utilizadas como marcadores moleculares. Essa natureza altamente informativa combinada com a especificidade e rapidez da tecnologia do PCR, faz desses marcadores uma eficiente ferramenta para estudos de genes eucarióticos (CAIXETA et al. 2006).

Microsatélites constituem-se uma das classes mais polimórficas de marcadores moleculares disponíveis atualmente. Existem relatos de microsatélites com até 26 alelos em soja (RONGWEN et al., 1995). A escolha da população para mapeamento não mais precisa ser feita com base na maximização da distância genética, mas sim visando à população mais informativa do ponto de vista das características biológicas ou econômicas de interesse (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Os microsatélites apresentam vantagens sobre outros demais marcadores, como RAPD e AFLP, porque são co-dominantes, possibilitando a distinção entre homocigotos e heterocigotos, e facilmente reproduzíveis. Além

dessas características, permitem uma cobertura ampla do genoma, além de ser altamente polimórficos, possuem alta reprodutibilidade e uma simplicidade de execução da técnica (CAIXETA et al. 2006; CARNEIRO; VIEIRA, 2002).

Todas essas características fazem desses marcadores importantes ferramentas para o mapeamento de genes que determinam características específicas, como resistência a doenças (HYTEN et al., 2009; SILVA et al., 2008; GARCIA et al., 2008; CATELLI et al., 2007b; BROGIN, 2005), mas também para estudos e identificação de QTLs de grande interesse econômico também relacionados à resistência genética a pragas e doenças (BROGIN, 2005; SCHUSTER et al., 2001; ARAHANA et al., 2001; NJITI et al., 1997; MANSUR et al., 1996; WEBB et al., 1995).

3.8 MAPAS GENÉTICOS

Os mapas genéticos são baseados na hipótese de que a co-transmissão de dois marcadores reflete a proximidade entre eles (PÍPOLO, 2006). São importantes por constituírem uma informação básica, necessária para a realização de estudos mais avançados, como o mapeamento de genes de interesse associados às características qualitativas ou quantitativas, bem como os estudos comparativos de sintenia genômica. A construção de mapas merece destaque especial quanto ao mapeamento de genes, pois constitui uma ação de pré-melhoramento, que agregará qualidade ao trabalho de estabelecimento, bem como na condução do futuro programa de melhoramento (PEREIRA; PEREIRA, 2006).

Para se construir um mapa molecular, primeiramente necessita-se combinar genitores através do cruzamento genético, que sejam fenotipicamente contrastantes. As populações provenientes desses cruzamentos podem ser avaliadas já na geração F_2 , mas quanto mais avançada estiver a população, mais homocigota esta se encontrará e com maior facilidade será possível estudar os caracteres de interesse. Neste momento, após o avanço das gerações, são utilizados marcadores moleculares como maneira de encontrar as regiões onde

estão os genes de interesse. A seleção de primers é uma etapa muito importante no processo de construção do mapa de ligação (PEREIRA; PEREIRA, 2006).

Dispondo-se do conjunto de marcadores, é necessário se construir o mapa com o auxílio do computador, e o programa mais observado na literatura como utilizado em construções de mapas de ligação em programas de melhoramento visando resistência à ferrugem asiática da soja é o mapmaker (HYTEN et al., 2009; SILVA et al., 2008; GARCIA et al., 2008; CATELLI et al., 2007b; BROGIN, 2005), sendo este desenvolvido por Lander et al., 1987. Basicamente estes calculam as distâncias, freqüências de recombinação, entre as centenas de marcadores que se obtêm e assim, mapeiam as características de interesse (PEREIRA; PEREIRA, 2006).

Os primeiros mapas genéticos da soja foram baseados em marcadores RFLP (*restriction fragment length polymorphism*), RAPD (*random amplified polymorphic DNA*), isoenzimas e marcadores morfológicos (SHOEMAKER, SPECHT, 1995; LARK et al., 1993; KEIM et al., 1990). Cregan et al. (1999) desenvolveram um conjunto de 606 marcadores microssatélites e utilizaram esses marcadores para construir mapas genéticos em duas populações F₂, uma do cruzamento entre a PI 468916 (*G. soja*) e a linhagem A81-356022 (*G. max*) e a outra do cruzamento entre os cultivares Clark x Harosoy. E também uma população de RILs (Minsoy x Noir 1). A partir daí, os mapas originados foram alinhados e geraram um mapa consenso com 20 grupos de ligação, correspondendo aos 20 pares de cromossomos homólogos da soja. Posteriormente 420 novos marcadores SSR, dentre os quais 24 derivados de seqüências ESTs, foram incorporados aos desenvolvidos por Cregan et al. (1999), resultando em um novo mapa com 1.026 marcadores SSR (SONG et al., 2004).

Mais recentemente, Choi et al. (2007) desenvolveram marcadores baseados em polimorfismos de base única (*single-nucleotide polymorphisms – SNPs*), a partir de seqüências ESTs, possibilitando inclusão de 1.141 SNPs no mapa genético da soja. Atualmente, estima-se que o mapa genético da soja possua um tamanho de aproximadamente 2.523,6 cM (distância de mapa de Kosambi), com 20 grupos de ligação contendo 1.015 marcadores microssatélites, 709 RFLPs, 73 RAPDs, 6 AFLPs, 10 isoenzimas, 24 marcadores morfológicos e 1.141 SNPs (SONG et al., 2004; CHOI et al., 2007).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESENVOLVIMENTO DA POPULAÇÃO RILs.

Para este trabalho, foi desenvolvida uma população de RILs (Recombinant Inbred Lines ou Linhagens Endogâmicas Recombinantes) a partir do cruzamento entre as cultivares BRS 231 (originada do cruzamento entre Sharkey e (Hartwig x BR92-318114)) e BRS 184 (originada do cruzamento entre FT Guaíra e IAC 13).

Do cruzamento entre estas cultivares, obteve-se três sementes F_1 , que foram semeadas e geraram uma população de 197 sementes F_2 . A partir daí, estas foram avançadas seguindo o método de descendência de uma única semente (SSD – Single Seed Descent), em casa-de-vegetação da Embrapa Soja.

Dessa forma, após o plantio das 197 sementes, somente uma única semente de cada planta foi selecionada e avançada, a fim de gerar uma população F_3 . Este processo seguiu, alcançando a geração $F_{7:8}$, onde da população originada foram obtidas as linhagens, contendo 164 RILs (SANTOS et al., 2007), que foram utilizados para extração de DNA populacional em casa-de-vegetação, para realização das análises moleculares deste trabalho. Posteriormente, esta população foi avançada novamente a $F_{8:9}$, a fim de produzir um número elevado de sementes para avaliações fenotípicas realizadas em campo e em casa-de-vegetação.

4.2 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA

Amostras de tecido foliar jovem da população de RILs e de seus parentais foram coletadas durante o estágio V_3 , armazenadas em microtubos de 2,0 mL juntamente com três esferas metálicas de 4mm e mantidas em ultrafreezer (-80°C) até o momento da extração de DNA.

O DNA genômico dos parentais e de cada linhagem da população RILs foi purificado, seguindo o protocolo desenvolvido por Keim et al. (1998), com modificações. As amostras coletadas foram agitadas em vórtex para reduzir as amostras em finas partículas. Adicionou-se em cada amostra 900 µL de tampão de extração [Tris-HCl a 100 mM e pH 8,0; NaCl a 5M; EDTA a 20 mM; brometo de trimetil N-cetil amônio (CTAB) a 1% (m/v); 2-mercaptoetanol a 0,1% (v/v)]. A suspensão foi incubada a 65 °C por uma hora, posteriormente centrifugada a 2940 g por 10 minutos e o sobrenadante retirado e colocado em outro microtubo de mesmo volume. Em seguida, prosseguiu-se a extração utilizando 900 µL clorofórmio – álcool isoamílico (24:1 v/v), sofrendo uma nova centrifugação a 13.800 g por 10 minutos, sendo este processo repetido uma vez. O sobrenadante do material centrifugado pela segunda vez foi transferido para microtubos de 1,5 mL e seu DNA precipitado com 600 µL de isopropanol gelado. Após a precipitação, o DNA foi centrifugado novamente a 13800 g por 10 minutos, purificado com 400 µL NaCl 1M, colocado em incubadora a 65 °C por 10 minutos e purificado com 40 µg/mL de RNase por uma hora, para eliminação de resíduos de RNA. O DNA então foi centrifugado novamente a 13800 g por 10 minutos e lavado primeiramente com 800 µL de etanol 99,5% e posteriormente com 500 µL de etanol 70%. Por fim, adicionou-se tampão TE (Tris a 10 mM e EDTA a 1 mM, pH 8,0) ao DNA como maneira de conservação.

A concentração de cada amostra de DNA foi estimada por análise espectrofotométrica (SAMBROOK et al., 1989), e a integridade verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio. Após a determinação da concentração e qualidade do DNA, as amostras foram diluídas para uma concentração de 10ng/µL.

4.3 LOCOS DE MICROSSATÉLITES

Os marcadores microssatélites utilizados neste trabalho foram desenvolvidos e publicados por Cregan et al. (1999) e as seqüências do primers e posicionamento no mapa genético encontra-se disponível no site do Soybase (<http://soybase.agron.iastate.edu/>). Inicialmente foram escolhidos marcadores

localizados a uma distância limite entre marcas de 40 cM, para cada grupo de ligação, que foram testados primeiramente nos parentais, para identificação de polimorfismos. Posteriormente, os marcadores polimórficos foram amplificados em todos os indivíduos da população de RILs, para a construção do mapa genético.

4.4 AMPLIFICAÇÃO DOS LOCOS DE MICROSSATÉLITES

As reações de PCR foram preparadas em um volume final de 10 μ L contendo 30ng de DNA molde; 10mM de Tris-HCl; 50mM de KCl; 1,5mM de MgCl₂; 1,3mM de desoxinucleosídeotrfosfato-dNTP's; 1 unidade de Taq-DNA polimerase e 2 μ M de cada *primer Forward* e *Reverse*. As reações de amplificação foram realizadas conforme Akkaya et al. (1995). Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% e corados com brometo de etídio.

4.5 AVALIAÇÃO FENOTÍPICA

4.5.1 Delineamento Experimental de Campo

Além das avaliações a nível molecular, experimentos em campo e casa-de-vegetação foram realizados a fim de auxiliar o processo de mapeamento de QTLs e seleção de progênes que apresentem caracteres agrônômicos de interesse.

O experimento foi conduzido na fazenda experimental do Centro Nacional de Pesquisa sobre Soja (Embrapa Soja), em Londrina, Paraná, localizada a 23° 22' de latitude sul, em latossolo roxo eutrófico, com clima temperado sub quente e sub úmido, com temperaturas anuais variando de 11-29°C, no ano agrícola 2007/2008.

Para os experimentos de campo, as parcelas foram dispostas obedecendo ao modelo estatístico de delineamento inteiramente casualizado (DIC),

com o mesmo número de plantas e condições ambientais (temperatura, luminosidade, disponibilidade de recursos). Para a casualização das parcelas do experimento, utilizou-se o programa de computador SGQ (Sistema de Genética Quantitativa), desenvolvido pela Embrapa Soja. Foi gerada uma caderneta para anotação dos dados de interesse e para melhor compreensão e análise dos dados.

Foram utilizados 5 repetições para cada uma das 163 RILs F8:9 a serem avaliadas, e, ainda 50 repetições para cada parental, totalizando 915 plantas. O modelo utilizado para plantio foi o de semeadura em covas (onde 1 planta = 1 cova = 1 parcela). A semeadura do experimento foi feita no mês de novembro de 2007.

A distância padrão utilizada para plantio das sementes nas covas foi de 20 cm e a distância entre as linhas úteis de 1,5 m. Entre duas linhas úteis do ensaio, foram semeadas duas linhas de bordadura para garantir a presença do inóculo de ferrugem no experimento, além de simular condições de competição que seriam encontradas em lavouras, como maneira de garantir uma população de aproximadamente 250.000-300.000 plantas/ha, semelhante ao observado no trabalho desenvolvido por Ribeiro (2006). A bordadura utilizada continha a cultivar BRSMS Bacuri, susceptível a doença. Para garantir a totalidade das parcelas, foram plantadas três sementes de uma mesma planta em uma mesma cova, e após a emergência, foi realizado o desbaste aleatório, deixando somente uma planta por cova.

Outros cuidados ainda foram tomados a fim de controlar as condições ambientais. Para conter a ação de roedores, telas de arame foram instaladas ao redor da área experimental. Já para combater a ação de algumas pragas como lagartas, percevejos e ácaros, foram realizadas pulverizações de inseticidas na área experimental e implantadas bordaduras adicionais ao redor da área experimental.

4.5.2 Inoculação do Patógeno

O bulk contendo os isolados do patógeno usado para este experimento foi obtido de folhas infectadas com abundante esporulação da cultivar BRSMS Bacuri, cultivadas em casa-de-vegetação. Após a obtenção dos esporos, estes foram suspensos em água destilada e contados em câmara de Neubauer. A solução foi diluída em água destilada para uma concentração de 1×10^4 esporos/mL, e adicionou-se o espalhante adesivo Tween 20 na proporção de 0,5 mL/L de solução, conforme descrito por Brogin (2005).

Com o auxílio de pulverizador manual, o inóculo de ferrugem foi aplicado somente nas bordaduras entrelinhas e ao redor da área experimental, a fim de simular uma infecção natural do experimento. Este processo ocorreu no momento em que as plantas alcançaram o estágio R₁ (FEHR; CAVINESS, 1981). Duas irrigações semanais foram realizadas, já que de acordo com Del Ponte et al. (2006), a umidade está relacionada a uma maior eficiência de infecção do patógeno.

4.5.3 Coleta de Dados

Vinte dias após a observação das primeiras infecções em plantas das linhas úteis do experimento, foi realizada uma avaliação para verificar a severidade (SEV) da doença de acordo com o percentual de área foliar infectada, com base em uma escala diagramática proposta por Canteri e Godoy (2003) (Figura 1). Nesta avaliação, foi levada em consideração a folha que possuísse o maior número de lesões causadas pela doença, sendo estas captadas por câmera digital e posteriormente analisadas.

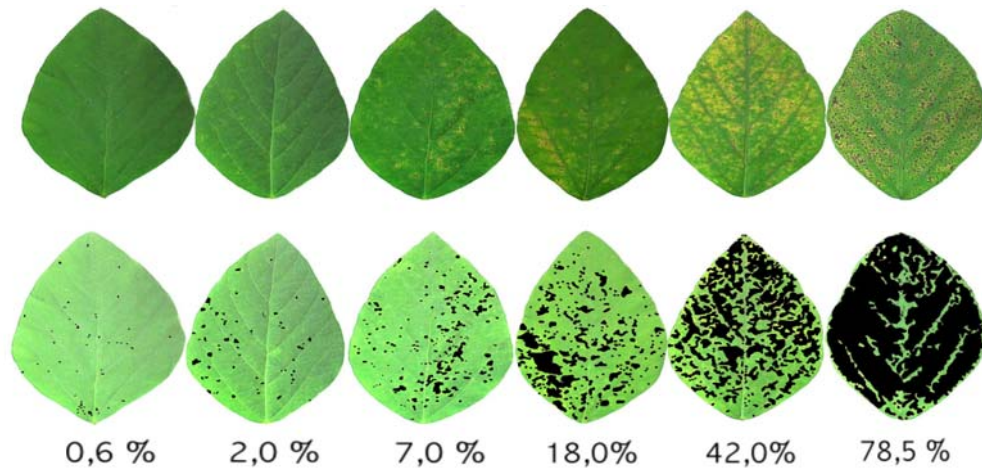


Figura 1 – Escala diagramática elaborada por Canteri e Godoy (2003) para análise de severidade da ferrugem asiática da soja.

Realizada a avaliação, as plantas foram colhidas, quando se encontravam no estágio R₇, sendo individualmente identificadas, com etiquetas, coletadas e submetidas à secagem natural em galpão coberto, para posterior trilhagem individual. Duas características quantitativas, peso total de sementes (PT) e peso de 100 sementes (P100), foram avaliadas. Estas características informam o quanto a ferrugem compromete a produção de grãos das RILs avaliadas.

Outras características relacionadas ao desenvolvimento da planta também foram avaliadas, como data de abertura da primeira flor, coloração da flor, altura da planta na floração, data de maturação, altura da planta na colheita e número total de nós.

4.5.4 Coleta de Dados em Fitotron

Algumas características foram avaliadas em fitotron, que foi utilizado por permitir um maior controle sobre o ambiente, quando comparado com casa-de-vegetação e campo experimental. Este experimento foi realizado em junho de 2008, no Japan International Research Center for Agricultural Sciences (Jircas), em Tsukuba, no Japão

Para este experimento, foram utilizados bulks de vários isolados brasileiros, denominados de Brazilian Bulk Isolates 1 (BBI-1) e Brazilian Bulk Isolates 2 (BBI-2), e japoneses, chamado de Japanese Bulk Isolates (JBI) do fungo. Os isolados brasileiros foram coletados em casa-de-vegetação no Brasil, na Embrapa Soja, em Janeiro de 2008. Possuem a mesma origem, porém o isolado BBI-1 foi coletado em casa-de-vegetação diretamente da cultivar BRSMS-Bacuri e o isolado BBI-2 coletado de outras cultivares. Já o isolado JBI foi obtido em campo experimental no Japão, sendo propagado pela cultivar Tachinagaha. Os esporos foram coletados e colocados em microtubos e armazenados para posterior aplicação. O processo de preparação dos isolados para inoculação foi o mesmo utilizado no experimento em campo experimental no Brasil.

Para este experimento foram escolhidas aleatoriamente 85 RILs, que foram distribuídas dentro de vaso no fitotron, sendo que cada vaso contava com 3 plantas, correspondentes a uma RIL. O experimento foi delineado como inteiramente casualizado, visto que se leva em consideração que neste tipo de local, o ambiente é mais homogêneo. O fitotron estava programado para uma temperatura ambiente de 24 °C e um período de fotoperiodismo de 14 horas.

O processo de inoculação dos isolados ocorreu quando as plantas estavam no estágio V₃ (FEHR; CAVINESS, 1981). Com auxílio de pincéis, o inóculo contendo os isolados foi aplicado no trifólio superior da planta, na parte abaxial das folhas (aproximadamente 0,1 mL por folha). Esta metodologia foi utilizada como uma maneira de se obter uma maior homogeneização dos esporos sobre as folhas. Após a inoculação, as RILs foram colocadas no fitotron e mantidas lá por um período de 13 dias para posteriormente serem avaliadas.

Os dados escolhidos para serem avaliados foram número de lesões por folha e porcentagem de lesões com urédias, cor das lesões, número de urédias, frequências de urédias abertas e nível de esporulação. Estes dados foram verificados em microscópio óptico. Para a característica cor da lesão foram consideradas seis classes, conforme descrito por Kato e Yorinori (2008), conforme visualizados na Figura 2.A. O Nível de esporulação também foi avaliado por uma escala de quatro classes, que variavam de pouca esporulação (nível 1) a abundante esporulação (nível 3) (Figura 2.B).

A presença de lesões contendo urédias e a porcentagem de urédias abertas foram avaliadas a partir de um número mínimo de 30 lesões por genótipo, enquanto que os valores observados para o nível de esporulação e coloração da lesão foram obtidos através da média observada em cada uma das três plantas por vaso.

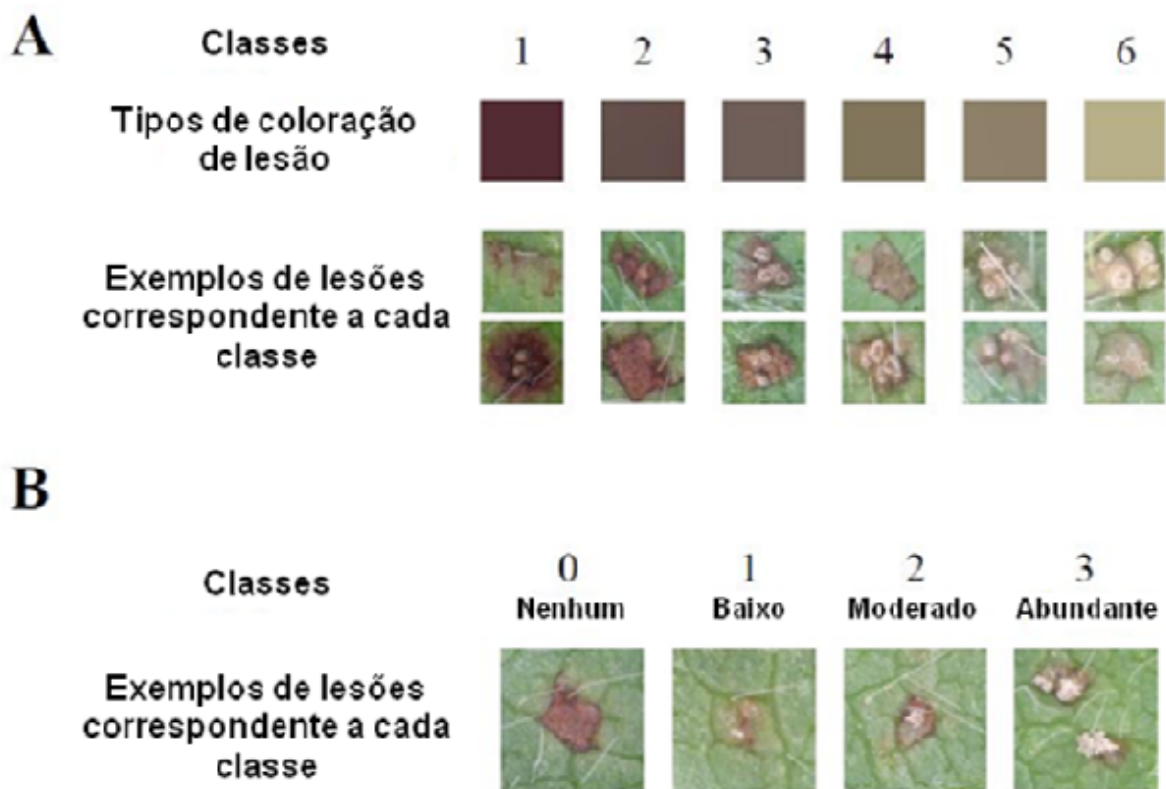


Figura 2 – A) Classificação da coloração das lesões, distribuída continuamente da mais clara (6) a mais escura (1) e B) Nível de esporulação das lesões, variando de nenhuma (0) a abundante esporulação (3). Escalas adaptadas de Kato e Yorinori (2008).

4.5.5 Análises Estatísticas

Para verificar se as diferenças existentes entre os dados coletados nas amostras eram estatisticamente significativas foram realizadas análises de variância (ANAVA) entre tratamentos, compreendendo os parentais e a população

RILs, e entre famílias, englobando somente as RILs, para cada característica estudada. Para a realização da ANAVA, foi utilizado o programa SAS (SAS INSTITUTE, 1990). Além destas análises, com auxílio do programa SAS, uma análise de correlação simples de Pearson entre as características avaliadas em campo e em casa-de-vegetação foi realizada para verificar a existência ligação entre elas.

Para comparação entre as médias, foi utilizado o teste de Scott-Knott (SCOTT; KNOTT, 1974), realizado através do programa estatístico GENES (CRUZ, 2001).

4.6 CONSTRUÇÃO DO MAPA GENÉTICO E IDENTIFICAÇÃO DE QTLs

Após as análises realizadas foi construído um mapa genético de ligação com os marcadores polimórficos de microssatélites. Este processo foi realizado por meio do programa MAPMAKER/EXP versão 3.0 (LANDER et al., 1987). Os critérios adotados para a formação dos grupos de ligação consistiram em um LOD de 3,0, uma distância entre marcas adjacentes de 50 cM e a função de mapeamento de Kosambi (1944) foi empregada para a conversão das unidades de recombinação em distâncias genéticas.

Após a construção do mapa, foi realizada a busca por QTLs que estejam contribuindo com a resistência horizontal à ferrugem asiática da soja. Para isto, foi utilizado o conjunto de ferramentas de mapeamento QTL Cartographer versão 1.17 (BASTEN; WEIR; ZENG, 2003). Os dados foram preparados através dos programas Rmap e Rcross e posteriormente levados para análises através dos programas Qstat, LRmapqtl, SRmapqtl, Zmapqtl, Eqtl e JZmapqtl. O programa JZmapqtl foi escolhido para alguns tratamentos por ser um módulo que trabalha com mapeamento de QTLs em intervalos compostos múltiplos (mCIM), além de ser altamente recomendado quando existe correlação entre os dados analisados. Para os resultados que não possuíam alta correlação genética, utilizou-se somente o Zmapqtl, pois é um módulo que trabalha com mapeamento de QTLs em intervalos compostos (CIM) proposto por Jiang e Zeng (1995) e resulta em uma boa precisão

dos testes estatísticos, e em melhor entendimento do controle genético. Foi utilizado o modelo 6 do módulo Zmapqtl e JZmapqtl para realizar estas análises de QTLs, com um teste de razão de verossimilhança (LR) a cada 1 cM de ligação (walking speed) e com uma janela (Windows size) de 5 cM.

Trabalhos que mapeiam QTLs em soja normalmente aceitam valores de LOD Score entre 2 e 3 como maneira para determinar uma associação significativa (KASSEM et al., 2006; GUZMAN et al., 2007; GUTIERREZ-GONZALEZ et al. 2009; ZHANG et al., 2009). Neste trabalho, o valor utilizado de LOD Score foi de 2,0, já que se trata de estudos iniciais de identificação de QTLs sob ação da ferrugem asiática da soja, além de tratar de algumas características que possuem um controle genético complexo, sendo necessário posteriormente, um maior aprofundamento sobre estes a fim de determinar sua significância sobre a característica analisada.

5 ARTIGO

5.1 TÍTULO

MAPEAMENTO DE QTLS DE CARACTERÍSTICAS SOB INFLUÊNCIA DA FERRUGEM ASIÁTICA DA
SOJA

João Vitor Maldonado dos Santos

Artigo a ser submetido: Revista *Genetics and Molecular Biology*

MAPEAMENTO DE QTLs DE CARACTERÍSTICAS SOB INFLUÊNCIA DA FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA

João Vitor Maldonado dos Santos

Resumo

A ferrugem asiática da soja, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* (Sydow & P.Sydow), é o principal fator biótico causador de prejuízos de redução do potencial sobre a cultura da soja, causando queda de produtividade superiores a 75%. Hoje, sabe-se que a forma mais eficaz de controle da doença é através da resistência genética. Devido à baixa durabilidade de genes de resistência vertical, estudos para o desenvolvimento de linhagens com genes de resistência horizontal são de extrema importância. Neste trabalho foi construído um mapa genético de uma população de linhagens endogâmicas recombinantes (RILs) a fim de buscar QTLs que estejam relacionados à resistência horizontal ao patógeno. Além disto, foram feitas análises fenotípicas para várias características em linhagens endogâmicas recombinantes (RILs) que estão sob ação do patógeno em campo experimental da Embrapa Soja e fitotron no Japão, a fim de verificar a existência de linhagens que possuam maior resistência horizontal a esta. Com auxílio das análises fenotípicas, foram construídos através de marcadores microssatélites 19 grupos de ligação, sendo que em oito grupos foram detectados 19 QTLs que possam estar contribuindo para a resistência horizontal à doença. Os dados gerados abrem a possibilidade para sua utilização em programas de melhoramento contra a doença.

Palavras-chave: *Glycine max*, *Phakopsora pachyrhizi*, resistência poligênica, correlação, Scott-Knott, mapa genético, microssatélites, grupos de ligação.

INTRODUÇÃO

A ferrugem asiática da soja, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* (Sydow & P. Sydow), é atualmente a doença mais importante no cultivo da soja, ocasionando elevadas perdas de produção no Brasil. Este fungo, de origem asiática, possui um potencial de redução de produtividade maior que 75% (YORINORI, 2005), o que o torna uma grande ameaça para a produção nacional. Estima-se que a doença já causou prejuízos na produção nacional desde seu surgimento até a última safra em torno de U\$ 11 bilhões (CONSÓRCIO, 2010).

Basicamente, a intensidade da doença é determinada pelo efeito da temperatura ambiente e da duração diária do molhamento foliar. Segundo Alves et al. (2005), a faixa de temperatura ótima de germinação do patógeno é de 15 a 25 °C. Além disto, estudos anteriores realizados por Alves et al. (2004) evidenciaram que as cultivares, quando submetidas a um molhamento foliar entre 6 a 12 horas, obtiveram acentuado aumento na frequência de infecção e severidade da doença. A infecção originada por esta doença causa uma série de lesões na parte abaxial da folha que surgem inicialmente minúsculos pontos em tecidos sadios de folhas. Após alguns dias, é possível observar saliências que correspondem a urédias, estruturas de frutificação fúngica. (REIS; BRESOLIN, 2004). A infecção causa rápida clorose e queda prematura das folhas, impedindo a plena formação dos grãos. Dependendo da severidade, em alguns casos, quando a doença atinge a fase de formação das vagens ou no início da granação, pode causar o aborto e queda das vagens (HENNING; GODOY, 2006).

Para o controle da doença, existem algumas estratégias que devem ser levadas em consideração. A estratégia mais tradicional é a utilização de defensivos agrícolas. O grande problema da utilização de fungicidas no controle da doença está relacionado ao aumento do custo de produção e ao impacto ambiental que estes produtos químicos podem causar (CONSÓRCIO, 2010).

Com isto, a estratégia que apresenta melhores resultados em âmbito socioeconômico e ambiental é a de utilização de genótipos resistentes. Contudo, existe um número pouco significativo de cultivares que apresentam esta característica, o que torna de grande utilidade estudos e trabalhos que visam o desenvolvimento de novos cultivares com resistência à ferrugem (CONSÓRCIO, 2010). Nesse caso, dois tipos de resistência podem ser considerados: vertical, com herança monogênica, e horizontal, com herança poligênica (AGRIOS, 2005).

Uma característica importante que desfavorece a utilização de cultivares com genes de resistência vertical está relacionada à sua baixa durabilidade. A ação destes genes pode ser quebrada pelo surgimento de um isolado mais efetivo. Este processo ocorreu com os genes *Rpp1* e *Rpp3*, o que torna a cultivar que o possui suscetível a doença (ARIAS et al., 2004a; ARIAS et al., 2004b). A baixa durabilidade destes genes pode ser explicada pela teoria elaborada por Flor (1971), que demonstrou que a coexistência entre planta e seu patógeno

está relacionado com um processo de evolução de ambos os lados (AGRIOS, 2005). Atualmente, existem três cultivares comerciais de soja desenvolvidas que possuem genes de resistência à ferrugem asiática da soja: TMG 801, TMG 803 e BRSGO 7560. No entanto, todas possuem genes de resistência vertical à ferrugem asiática da soja, o que demonstra a necessidade de busca de materiais alternativos, como os com genes de resistência horizontal.

Com o desenvolvimento da tecnologia de marcadores moleculares, genes com efeito sobre caracteres quantitativos puderam ser localizados através do estudo de QTLs (*Quantitative Trait Loci*, em português Locos de Caracteres Quantitativos), que corresponde a uma região do DNA a qual genes de efeito menor, estão associados atuando sobre uma característica específica, contribuindo com uma parcela no efeito sobre o fenótipo, causando uma variação contínua sobre este (BROGIN, 2005).

Em soja, já foram reportados a presença de QTLs associados à resistência a vários fungos causadores de prejuízos as lavouras de soja, como do mofo branco (ARAHANA et al., 2001), podridão parda da haste (LEWERS et al., 1999), síndrome da morte súbita (FARIAS NETO et al., 2007; NJITI et al., 2002; PRABHU et al., 1999 HNETKOVSKY et al., 1996), podridão de semente (BURNHAM et al., 2003) e septoriose (BROGIN et al., 2005). Além destes, existem outros trabalhos que identificaram a existência de QTLs de resistência a nematóides de galha (WANG et al., 2006; TAMULONIS et al., 1997) e nematóide do cisto (SCHUSTER et al., 2001; WEBB et al., 1995; PRABHU et al., 1999) e de resistência a insetos (KOMATSU et al., 2005; TERRY et al., 2000).

O mapeamento de QTLs para resistência a doenças busca uma alternativa ao controle da doença, visto que permite a identificação de genes de efeitos menores, mas importantes para a convivência da planta com o patógeno. No caso da ferrugem asiática da soja, o grande interesse para a utilização de QTLs está relacionado ao seu efeito prolongado quando comparado a genes de resistência vertical, visto que vários isolados do patógeno não conseguem quebrá-lo, o que dificulta o desenvolvimento da doença (PIEROZZI, 2007), além de que genótipos com esses genes tornam-se mais estáveis para a convivência com os vários isolados de ferrugem asiática da soja (RIBEIRO, 2006).

Com isto estudos em busca de materiais que possam suportar a ação do patógeno são de extrema importância. Marcadores moleculares tem sido uma importante ferramenta no estudo de características quantitativas e na identificação de QTLs, visto que, diferentemente dos marcadores morfológicos, estes são independentes dos efeitos ambientais e estádios fisiológicos da planta, além de apresentarem um alto nível de polimorfismo distribuído ao longo de todo genoma. Dentre estes, marcadores microssatélites são amplamente utilizados em programas de melhoramento devido possuírem alta reprodutibilidade, simplicidade de uso e serem codominantes (PÍPOLO et al., 2006), facilitando a identificação de genótipos superiores à agricultura e de características que possam ser trabalhadas em futuros programas de melhoramento visando resistência a doença.

O presente trabalho possui como objetivos construir um mapa genético de ligação originado de uma população RILs (Recombinant Inbred Lines ou Linhagens Endogâmicas Recombinantes), através do uso de marcadores moleculares de microssatélites e identificar QTLs atuantes sob a ação da ferrugem asiática da soja. Além disto, pretende-se avaliar em casa-de-vegetação, fitotron e campo experimental caracteres de grande interesse agrônômicos relacionados ou não à ferrugem asiática, a fim de selecionar genótipos superiores para a agricultura.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenvolvimento da população RILs.

Para este trabalho, foi desenvolvida uma população de RILs a partir do cruzamento entre as cultivares BRS 231 e BRS 184. A escolha das duas cultivares para realização deste trabalho levou em consideração alguns fatores. Estudos desenvolvidos identificaram que a variedade BRS 231 apresenta bom comportamento na presença da ferrugem asiática, apresentando superioridade de produtividade que varia de 15-55% a mais em relação a outras cultivares testadas (RIBEIRO, 2006), o que demonstra que possivelmente a BRS 231 possua algum tipo de resistência horizontal à ferrugem asiática da soja. Ainda, foi comprovado que o cruzamento BRS 231 x BRS 184 possui grande potencial para extrair linhagens

superiores, que sejam capazes de possuírem alta produtividade em presença de ferrugem asiática.

Deste cruzamento, obteve-se três sementes F_1 , que foram semeadas e geraram uma população de 197 sementes F_2 . A partir daí, estas foram avançadas até a geração F_8 , seguindo o método de descendência de uma única semente (SSD – Single Seed Descent), em casa-de-vegetação da Embrapa Soja, resultando em uma população RIL com 164 famílias (SANTOS et al., 2007). Posteriormente, esta população foi avançada novamente a F_9 , a fim de produzir um número elevado de sementes para avaliações fenotípicas realizadas em campo e em casa-de-vegetação.

Extração e Quantificação do DNA

Amostras de tecido foliar jovem da população de RILs e de seus parentais foram coletadas durante o estágio V_3 , armazenadas em microtubos de 2,0 mL juntamente com três esferas metálicas de 4mm e mantidas em ultrafreezer (-80°C) até o momento da extração de DNA. O DNA genômico dos parentais e de cada linhagem da população RILs foi purificado, seguindo o protocolo desenvolvido por Keim et al. (1998), com modificações.

A concentração de cada amostra de DNA foi estimada por análise espectrofotométrica (SAMBROOK et al., 1989), e a integridade verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio. Após a determinação da concentração e qualidade do DNA, as amostras foram diluídas para uma concentração de $10\text{ng}/\mu\text{L}$.

Seleção e Amplificação dos Locos de Microssatélites

Os marcadores microssatélites utilizados neste trabalho foram desenvolvidos e publicados por Cregan et al. (1999) e as seqüências dos primers e posicionamento no mapa genético encontra-se disponível no site do Soybase (<http://soybase.agron.iastate.edu/>).

Inicialmente foram escolhidos marcadores localizados a uma distância limite entre marcas de 40 cM, para cada grupo de ligação, que foram

testados primeiramente nos parentais, para identificação de polimorfismos. Posteriormente, os marcadores polimórficos foram amplificados em todos os indivíduos da população de RILs, para a construção do mapa genético, seguindo protocolo elaborado por Akkaya et al. (1995), em géis de poli(acrilamida 10% e corados com brometo de etídio.

Avaliação Fenotípica

Além das avaliações a nível molecular, experimentos em campo experimental e fitotron foram realizados a fim de auxiliar o processo de mapeamento de QTLs e seleção de progênies que apresentem caracteres agrônômicos de interesse.

O experimento realizado em campo experimental foi conduzido na Embrapa Soja, em Londrina, PR. Neste experimento, as parcelas foram dispostas através do delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 5 repetições para cada uma das 163 RILs F8:9 a serem avaliadas, e, ainda 50 repetições para cada parental, totalizando 915 plantas. O modelo utilizado para plantio foi o de semeadura em covas, sendo a semeadura do experimento realizada em novembro de 2007.

A distância padrão utilizada para plantio das sementes nas covas foi de 20 cm e a distância entre as linhas úteis de 1,5 m. A cada duas linhas úteis do ensaio, foram semeadas duas linhas de bordadura da cultivar BRSM5 Bacuri, para garantir a presença do inóculo de ferrugem no experimento, além de simular condições de competição que seriam encontradas em lavouras.

O inóculo contendo isolados do patógeno foi obtido de folhas infectadas com abundante esporulação da cultivar BRSM5 Bacuri. O inoculo foi diluído, quantificado e aplicado conforme descrito no item 4.5.2. A inoculação foi feita somente nas bordaduras entrelinhas e ao redor da área experimental, a fim de simular uma infecção natural do experimento. Este processo ocorreu no momento em que as plantas alcançaram o estágio R₁ (FEHR; CAVINESS, 1981).

Vinte dias após a observação das primeiras infecções em plantas das linhas úteis do experimento, foi realizada uma avaliação para verificar a severidade (SEV) da doença de com uma escala diagramática proposta por Canteri e Godoy (2003). Nesta avaliação, foi levada em consideração a folha que possuísse

o maior número de lesões causadas pela doença, sendo estas captadas por câmera digital e posteriormente analisadas.

Outras características relacionadas ao desenvolvimento da planta também foram avaliadas, como data de abertura da primeira flor, coloração da flor, altura da planta na floração, data de maturação, altura da planta na colheita, número total de nós, peso total de sementes e peso de 100 sementes, a fim de determinar se estas estão relacionadas com algum mecanismo de resistência horizontal à ferrugem asiática da soja.

Além destas características citadas, outras foram avaliadas em fitotron devido ao maior controle sobre o ambiente e facilidade para análise. Este experimento foi realizado em junho de 2008, no Japan International Research Center for Agricultural Sciences (Jircas), em Tsukuba, no Japão

Para este experimento, foram utilizados dois inóculos contendo vários isolados brasileiros, denominados de Brazilian Bulk Isolates 1 (BBI-1) e Brazilian Bulk Isolates 2 (BBI-2), e um inóculo japonês, chamado de Japanese Bulk Isolates (JBI) do fungo. Os isolados brasileiros possuem a mesma origem, porém o isolado BBI-1 foi coletado em casa-de-vegetação diretamente da cultivar BRSMS-Bacuri e o isolado BBI-2 coletado de outras cultivares. Já o isolado JBI foi obtido em campo experimental no Japão, sendo propagado pela cultivar Tachinagaha. Os isolados brasileiros e japoneses foram coletados no período de Janeiro de 2008 em casa-de-vegetação brasileira e japonesa.

Para este experimento foram escolhidas aleatoriamente 85 RILs, distribuídas dentro de vaso no fitotron, sendo que cada vaso contava com 3 plantas, correspondentes a uma RIL. O experimento foi delineado como inteiramente casualizado e o processo de inoculação dos isolados ocorreu no estágio V_3 das linhagens (FEHR; CAVINESS, 1981). Com auxílio de pincéis, o inóculo foi aplicado na parte abaxial do trifólio superior da planta. Após a inoculação, as RILs foram colocadas no fitotron e mantidas lá por um período de 13 dias para posteriormente serem avaliadas. As características avaliadas em fitotron foram número de lesões por folha e porcentagem de lesões com urédias, cor das lesões, número de urédias, freqüências de urédias abertas e nível de esporulação, sendo estes dados verificados em microscópio óptico. Para a característica cor da lesão foram consideradas seis classes, conforme descrito por Kato e Yorinori (2008). O Nível de

esporulação também foi avaliado por uma escala de quatro classes, que variavam de pouca esporulação (nível 1) a abundante esporulação (nível 3).

Construção do Mapa Genético e Identificação de QTLs

O mapa genético da população em estudo foi construído com os marcadores de microssatélites que foram polimórficos entre os parentais. Este processo foi realizado por meio do programa MAPMAKER/EXP versão 3.0 (LANDER et al., 1987). Os critérios adotados para a formação dos grupos de ligação consistiram em um LOD de 3,0, uma distância entre marcas adjacentes de 50 cM e a função de mapeamento de Kosambi (1944) foi empregada para a conversão das unidades de recombinação em distâncias genéticas.

A busca por QTLs na soja para as características estudadas, avaliadas sob influência da infecção pelo fungo da ferrugem asiática da soja, foi realizada com um conjunto de ferramentas de mapeamento QTL Cartographer versão 1.17 (BASTEN; WEIR; ZENG, 2003). O módulo JZmapqtl foi escolhido para alguns tratamentos por ser um módulo que trabalha com mapeamento de QTLs em intervalos compostos múltiplos (mCIM), proposto por Jiang e Zeng (1995), sendo recomendado quando existe alta correlação entre os dados analisados. Para os resultados que não possuíam alta correlação genética, utilizou-se somente o módulo Zmapqtl, pois é um módulo que trabalha com mapeamento em intervalos compostos (CIM) para análise simples e resulta em uma boa precisão dos testes estatísticos. Para ambos os módulos, foi utilizado o modelo 6, que trabalha com cofatores, com um teste de razão de verossimilhança (LR) a cada 1 cM de ligação (walking speed) e com uma janela (Windows size) de 5 cM. Trabalhos descritos na literatura envolvendo o mapeamento de QTLs em soja normalmente utilizam valores de LOD Score entre 2 e 3 como maneira para determinar uma associação significativa (KASSEM et al., 2006; GUZMAN et al., 2007 GUTIERREZ-GONZALEZ et al. 2009; ZHANG et al., 2009). Neste trabalho, o valor utilizado de LOD Score foi de 2, já que se trata de estudos iniciais de identificação de QTLs sob ação da ferrugem asiática da soja, além de tratar de algumas características que possuem um controle genético complexo.

Análises Estatísticas

Para verificar se as diferenças existentes entre os dados coletados em campo experimental eram estatisticamente significativas, foram realizadas análises de variância (ANAVA), através do programa SAS (SAS INSTITUTE, 1990), entre tratamentos, compreendendo os parentais e a população RILs, e entre famílias, englobando somente as RILs, para cada característica estudada. Além disto, com auxílio do programa SAS, uma análise de correlação simples de Pearson entre as características avaliadas em campo e em fitotron foi realizada para verificar a existência ligação entre elas. Para comparação entre as médias, foi utilizado o teste de Scott-Knott (SCOTT; KNOTT, 1974), realizado através do programa estatístico GENES (CRUZ, 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Campo Experimental

De acordo com as análises de variância (ANAVA) realizada (Tabela 1), os resultados obtidos pelo teste de F sugerem que existem diferenças para todas as características entre as famílias e entre quase todas as características entre tratamentos (BRS 231, BRS 184 e RILs), exceto para peso total. Porém, constatou-se que o coeficiente de variação (CV) alcançou altos valores, para severidade e peso total de sementes (acima de 50%). Este tipo de resultado já foi observado em outros trabalhos que envolvem experimentos em covas (RIBEIRO, 2009), pois, como se trata de parcelas com uma única planta, ocorre influência demasiadamente maior do ambiente sobre o local, o que aumenta o erro experimental.

Constata-se, através das análises realizadas, que o efeito ambiental está influenciando demasiadamente a característica severidade, pois se observa um aumento excessivo do coeficiente de variação, fato que pode ser explicado pelos altos valores de variação ambiental e a baixa herdabilidade observada nas análises entre famílias. Para outras características, observa-se também um valor elevado de variação ambiental, porém esta foi diluída pelo número de repetições do experimento que a torna menor quando analisamos individualmente as parcelas. Já para a

característica peso total, o principal atuante sobre a variação fenotípica observada é a variação genética, já que se trata de linhagens com alta variabilidade.

Tabela 1 – Análise de variância com dados não transformados entre tratamentos (RILs, BRS 231 e BRS 184) e entre famílias (RILs).

Entre Tratamentos

CARAC	TRAT		ERRO		F	Média	C.V.%	σ^2_G	σ^2_e	h ² %
	GL	QM	GL	QM						
DF	2	265,74	857	22,48	11,82**	53,47 dias	8,87	0,85	22,48	91,54
AF	2	2226,10	853	189,36	11,76**	67,69 cm	20,30	7,14	189,36	91,49
DM	2	944,67	781	124,58	7,58**	121,1 dias	9,92	3,14	124,58	86,81
AM	2	9990,62	767	325,57	28,34**	99,73 cm	19,02	37,55	352,57	96,47
NÓS	2	220,58	757	13,53	16,3**	14,99 nós	24,53	0,82	13,53	93,87
PT	2	104,007	697	36,91	2,82 ns	9,03 g	67,76	0,29	36,91	64,51
P100	2	10,35	549	2,40	4,31**	9,27 g	16,71	0,04	2,40	76,81
SEV	2	508,774	758	109,56	4,64**	17,26	66,45	1,57	109,56	78,47

Entre Famílias

CARAC	TRAT		ERRO		F	Média	C.V.%	σ^2_G	σ^2_e	h ² %
	GL	QM	GL	QM						
DF	162	88,75	604	7,34	12,09**	53,68 dias	5,05	17,30	7,34	91,73
AF	162	668,09	853	78,18	8,55**	68,47 cm	12,91	126,02	78,18	88,30
DM	162	413,39	536	46,56	8,88**	121,51 dias	5,62	85,54	46,56	88,74
AM	162	1068,39	523	165,26	6,46**	98,99 cm	12,99	214,59	165,26	84,53
NÓS	162	30,82	516	8,72	3,53**	14,91 nós	19,81	5,31	8,72	71,71
PT	162	79,49	464	23,71	3,35**	8,92 g	54,18	14,18	24,01	70,17
P100	154	5,48	336	1,32	4,16**	9,30 g	12,36	1,36	1,32	75,91
SEV	162	136,90	545	71,33	1,92**	14,40	58,67	15,10	71,33	47,90

CARAC, Característica analisada; **G.L.**, Graus de Liberdade; **QM**, Quadrado Médio; **F**, teste de F; **C.V.%**, Coeficiente de Variação em porcentagem; **σ^2_G** , variância genética; **σ^2_e** , variância ambiental; **h²%**, herdabilidade em porcentagem; **DF**, data de floração; **AF**, altura da planta durante a floração; **DM**, data de maturação; **AM**, altura da planta durante a maturação; **NÓS**, número de nós; **PT**, peso total; **P100**, peso de 100 sementes; **SEV**, severidade.

Além disto, observa-se que a principal explicação para não ter encontrado valores significativos para o teste de F está relacionado ao fato de os parentais não serem tão contrastantes para esta característica, o que determinou que, na análise dos valores de média entre eles e as linhagens, não foram encontradas diferenças significativas. Quando as linhagens foram analisadas individualmente, foi possível detectar diferença significativa pelo teste de F, o que pode ser explicado pela segregação transgressiva que ocorreu para esta característica, já que embora os parentais não possuam diferença estatística, observam-se linhas com médias muito superiores e inferiores a média dos parentais.

Este fato explica o motivo de não ser possível detectar diferença significativa entre tratamentos e sim somente entre famílias.

A herdabilidade observada para as características estudadas foi elevada, demonstrando que o principal fator atuante nestas linhagens é genético. A única característica que apresentou uma herdabilidade baixa foi severidade, fato já observado em outros trabalhos (RIBEIRO, 2009). Outro fato que pode confirmar o efeito ambiental sobre a severidade é alta magnitude de variância entre os parentais apresentada, o que demonstra uma maior instabilidade do efeito ambiental na manifestação da doença, fato também observado em outros estudos (PIEROZZI, 2007; RACHID, 2008; RIBEIRO, 2009).

Com os resultados obtidos, determinou-se a realização de um teste de normalização sobre as linhagens a fim de verificar se os dados observados neste experimento apresentam distribuição normal, o que poderia também explicar os erros observados. Pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, observou-se que as características data de maturação, número de nós, peso total e peso de 100 sementes precisavam ser transformados a fim de melhorar seus valores de coeficiente de variação e normalizar seus dados.

Para as características número de nós, peso total e peso de 100 sementes, a transformação de dados escolhida foi a do arco seno (Arco seno $\sqrt{x/100}$). Este tipo de transformação é utilizado principalmente para dados de porcentagens e proporções cujos valores variam de 0 a 30 (ZIMMERMANN, 2004), sendo já repetido em outros trabalhos que apresentaram a mesma dificuldade (RIBEIRO, 2009). Já para a característica data de maturação, nenhuma transformação utilizada foi capaz de normalizar os dados, sendo este fato explicado devido a problemas ocorridos durante a coleta dos dados. Assim, para futuros trabalhos, as análises para esta características deverão ser repetidas a fim de dar uma maior confiabilidade aos dados obtidos de QTLs que serão discutidos posteriormente.

Após a realização da transformação dos dados, realizou-se uma nova análise de variância (Tabela 2). Os novos resultados gerados sugerem que existem diferenças entre as famílias e entre os tratamentos utilizados em todas as características analisadas, em nível de significância de 5% e 1%. Além disto, verificou-se pelo teste de Kolmogorov-Smirnov que os dados transformados

obedeceram a uma distribuição normal a um nível de significância de 5%. Por fim, ainda, observou-se uma diminuição significativa do coeficiente de variação para severidade e peso total de sementes. Os valores ainda apresentaram-se altos, mas o principal motivo disto é o experimento ser realizado em covas, verificado também em outros trabalhos realizados (PIEROZZI, 2007; RIBEIRO, 2009), confirmando que altos CVs são comumente observados em análises de severidade e peso total de sementes em experimentos em covas.

Além destas análises, realizou-se também um estudo de correlação simples de Pearson (Tabela 3), permitindo assim a análise conjunta de características correlacionadas que possuam efeito pleiotrópico em relação à resistência horizontal.

Ao analisar a correlação peso total e peso de cem sementes entre as RILs, verificou-se uma correlação moderadamente positiva ($r = 0,4424$). Isto demonstra que 19,57% das linhagens apresentaram correlação direta entre peso total e peso de 100 sementes. Esse resultado pode sugerir que a ferrugem esteja atuante sobre as linhagens, pois, sabe-se que a doença atua na queda de uniformidade dos grãos, e através desta comparação, constata-se que embora algumas delas tenham apresentado valor de peso total alto, apresentaram baixo valor para peso de 100 sementes. A outra explicação para este tipo de observação está relacionada com a própria característica genética das linhagens estudadas.

Já a correlação entre peso total, peso de 100 sementes e severidade entre as RILs, obteve-se um valores de $r = -0,1510$ (para peso total x severidade) e $r = -0,1296$ (para peso de 100 sementes x severidade), o que demonstra que ambas as características apresentam uma baixa correlação negativa, que pode ser explicada por fatores genéticos, ambientais ou pela própria inexistência de correlação entre as características. Na safra 2008/2009, em que foi realizado o experimento, a doença ocorreu de maneira mais tardia e branda que em anos anteriores (RIBEIRO, 2009) e, dessa maneira pode ter influenciado na baixa correlação entre as características. Além disto, a alta variabilidade existente entre as linhagens pode ter influenciado para que, mesmo na presença da doença, algumas linhagens possuíssem uma elevada produção de grãos. Este fato pode estar relacionado a prováveis mecanismos de resistência horizontal que retardaram o desenvolvimento do fungo sobre a planta. Embora o fungo tenha infectado a planta,

a formação dos grãos não foi severamente afetada por já se encontrarem em estágio avançado de desenvolvimento, não causando assim uma queda acentuada de produção. Entre os vários mecanismos que podem estar contribuindo para isto, encontra-se o escape gênico, que pode ser verificado através da data de floração e maturação.

Tabela 2 – Análise de variância entre tratamentos (RILs, BRS 231 e BRS 184) e entre RILs para as características peso total e severidade com dados transformados pela fórmula do arco seno.

Entre Tratamentos

CARAC	TRAT		ERRO		F	Média	C.V.%
	GL	QM	GL	QM			
NOS	2	0,0398	757	0,0027	14,84**	0,3949	13,12
PT	2	0,0436	697	0,0116	3,76**	0,2881	37,38
SEV	2	0,0997	758	0,0213	4,69**	0,4092	35,63

Entre Famílias

CARAC	TRAT		ERRO		F	Média	C.V.%	K-S
	GL	QM	GL	QM				
NOS	162	0,9640	516	0,0060	3,34**	0,3937	10,72	0,0902 n.s.
PT	162	0,0264	464	0,0071	3,74**	0,2856	29,44	0,0604 n.s.
SEV	162	0,0307	545	0,0157	1,95**	0,3691	33,94	0,0684 n.s.

CARAC, Característica analisada; **G.L.**, Graus de Liberdade; **QM**, Quadrado Médio; **F**, teste de F; **C.V.%**, Coeficiente de Variação em porcentagem; **K-S**, valores do teste de Kolmogorov-Smirnov a 5% de significância; **NOS**, número de nós; **PT**, peso total; **P100**, peso de 100 sementes; **SEV**, severidade.

Tabela 3 – Análises de correlação simples dos dados coletados em campo experimental.

	DF	CF	ALF	DM	ALM	NO	PT	P100	SEV
DF	-	0,0461	0,8338	0,6168	0,4333	0,0099	-0,4491	-0,4744	0,0738
Prob	-	0,2021	0,0001	0,0001	0,0001	0,7977	0,0001	0,0001	0,0506
Obs.	-	767	763	699	686	679	627	491	703
CF	-	-	0,0210	0,0677	-0,0174	-0,0594	-0,1635	-0,0412	-0,0491
Prob	-	-	0,5630	0,0738	0,6488	0,1223	0,0001	0,3621	0,1935
Obs.	-	-	763	699	686	679	627	491	703
ALF	-	-	-	0,5751	0,5634	0,1209	-0,3663	-0,4155	0,0683
Prob	-	-	-	0,0001	0,0001	0,0016	0,0001	0,0001	0,0708
Obs.	-	-	-	695	682	676	624	488	700
DM	-	-	-	-	0,3158	-0,2825	-0,3370	-0,3230	0,0184
Prob	-	-	-	-	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,6399
Obs.	-	-	-	-	686	679	627	491	651
ALM	-	-	-	-	-	0,4945	-0,2108	-0,2541	0,0682
Prob	-	-	-	-	-	0,0001	0,0001	0,0001	0,0853
Obs.	-	-	-	-	-	679	619	489	638
NO	-	-	-	-	-	-	0,0735	-0,1318	-0,0268
Prob	-	-	-	-	-	-	0,0682	0,0035	0,5015
Obs.	-	-	-	-	-	-	617	489	631
PT	-	-	-	-	-	-	-	0,4424	-0,1364
Prob	-	-	-	-	-	-	-	0,0001	0,001
Obs.	-	-	-	-	-	-	-	481	583
P100	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,1296
Prob	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0055
Obs.	-	-	-	-	-	-	-	-	457
SEV	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Prob	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Obs.	-	-	-	-	-	-	-	-	-

DF, Data de Floração; CF, Cor da Flor; ALF, Altura da Planta durante a Floração; DM, Data de Maturação; ALM, Altura da Planta durante a Maturação; NO, Número de Nós; PT, Peso Total de sementes; SEV, Severidade; P100, Peso de 100 sementes; Prob., Probabilidade da correlação ser significativa ; Obs., Número de observações.

Com o objetivo de verificar o mecanismo de escape contra o patógeno na resistência a ferrugem, foi avaliada a correlação entre data de floração e data de maturação com as demais características. Observou-se que a data de floração apresentou correlação moderadamente negativa quando comparada com peso total ($r = -0,4491$) e com peso de 100 sementes ($r = -0,4744$), o que sugere que cerca de 20,12% das RILs apresentam correspondência direta entre peso total e data de floração, e 22,50% entre peso de 100 sementes e data de floração. Desta maneira, observa-se que quanto mais precoce for a linhagem, maiores são as chances desta conseguir escapar da ação da doença, o que demonstra a atuação do mecanismo de escape ou evasão direcionado a doença. Para a data de maturação, valores de correlação moderadamente negativa também foram

observados para peso total ($r = -0,33698$) e para peso de 100 sementes ($r = -0,32299$), o que enfatiza a ação de mecanismos de escape contra a ação do patógeno.

O escape pode ser considerado como uma forma de resistência horizontal (AGRIOS, 2005), e baseia-se em táticas de fugas dirigidas contra o patógeno ou contra o ambiente favorável ao seu desenvolvimento (KIMATI; BERGAMIN FILHO, 1995). Portanto, estas RILs devem possuir genes de resistência horizontal que auxiliam neste processo. Algumas destas, mesmo com floração e ciclo precoce, apresentaram baixos valores para peso total de sementes e peso de 100 sementes. Isto ocorre devido a alta variabilidade genética que existe entre as RILs ou a atuação da doença sobre algumas linhagens. Ainda, foram observadas linhagens que apresentam data de floração intermediária e altos valores de peso total de grãos e de peso de 100 sementes, o que pode indicar que outros mecanismos de resistência horizontal podem estar atuando.

As características das linhagens devem ser levadas em consideração nas análises de correlação. Algumas delas, por questões genéticas, possuem baixo potencial produtivo. Isto pode ter influenciado nas análises, visto que em alguns casos, linhagens que apresentaram baixa severidade, apresentaram ao mesmo tempo, baixa produção, confirmando a baixa correlação existente entre severidade e as características produtivas. Essa questão poderia ser melhor investigada com a condução de experimentos que envolvam a comparação de populações tratadas e não tratadas com fungicida, o que possibilitaria fazer uma análise da real influência da ferrugem sobre as linhagens. Vale ressaltar que algumas das RILs possuem genes de resistência horizontal à doença o que contribuiu para que os valores de severidade, quando comparados com os de peso total e peso de cem sementes, não possuam valores negativamente maiores.

Com base nos resultados observados, um teste de médias foi realizado a fim de classificar as linhagens e separar as melhores em condição de infecção com o fungo da ferrugem. O teste de Scott-Knott (SCOTT; KNOTT, 1974) foi o escolhido por ser uma ferramenta mais robusta e poderosa para separação de médias em comparação aos demais testes (ZIMMERMANN, 2004; BORGES; FERREIRA, 2003).

Com base nos resultados obtidos (Anexo A), foi possível comparar as RILs em busca de linhagens que apresentem as características mais desejáveis com relação à ferrugem. As RILs que apresentaram melhores desempenhos para data de floração e maturação, peso total, peso de 100 sementes e severidade foram 9, 27, 41, 48, 55, 76, 80, 85, 86, 87, 102, 127, 136, 144, 145 e 151. Dentre as características estudadas, severidade não apresentou uma relação alta quando comparadas com as cinco características citadas acima. Porém, algumas linhagens, como as 91, 131, 135, que mesmo com um período de floração e maturação elevado e com uma severidade alta, apresentaram alta produção de grãos e altos valores individuais, o que demonstra que outros mecanismos devem estar contribuindo para a resistência horizontal destas a doença.

Todos os dados descritos acima foram utilizados para estudos e detecção de QTLs que estejam contribuindo para o processo de resistência horizontal observado nas RILs estudadas acima. Desta maneira, pode-se saber o quanto que um determinado QTL esteja contribuindo para as características relacionadas à resistência das RILs à ação do patógeno.

Para melhor acompanhamento do desenvolvimento da doença, o processo de avaliação escolhido para severidade deve ser revisto. Para futuros trabalhos, deve-se analisar a parcela como um todo e não uma única folha, visto que algumas fotos foram retiradas de diferentes partes das plantas. Além disto, vale ressaltar a importância de também avaliar o impacto que a presença do fungo causa na produtividade das linhagens. Para isto, é recomendável a realização de dois experimentos, sendo um deles tratado com fungicida e o outro não. Assim, seria possível uma comparação mais eficiente em busca de linhagens com melhores características contra o patógeno. Este tipo de experimento também visaria verificar se alguns QTLs identificados se manifestam em ambas as condições.

Fitotron

Com o objetivo de complementar as informações obtidas a campo, foi realizado também um experimento em ambiente controlado (Fitotron), em que foram avaliadas as características cor da lesão (CL), porcentagem de lesões com urédia (PLU), número de urédias (NU), frequência de urédias abertas (FUA) e nível

de esporulação (NE) (Tabela 4). Além disto, foi realizado também uma análise de correlação simples de Pearson (Tabela 5) para as cinco características e os resultados foram utilizados para a detecção de possíveis QTLs.

A característica nível de esporulação foi a que apresentou maiores valores de correlação significativa entre os dados estudados. Esta apresentou alta correlação com as características cor da lesão ($r = 0,67719$), porcentagem de lesões contendo urédias ($r = 0,60330$) e número de urédias ($r = 0,57484$). Estes valores sugerem que quanto maior a porcentagem de lesões que tiverem urédias, assim como a quantidade destas e mais clara for a lesão, maior será o nível de esporulação do fungo nas linhagens. Trabalhos anteriores demonstraram que existe uma relação existente entre plantas susceptíveis e resistentes de acordo com o nível de esporulação destas (YAMANAKA et al., 2008).

Para as demais características, observaram-se variações nos níveis de correlação. A característica cor da lesão apresentou valores altamente significativos quando comparada com as demais características. Esta apresentou correlação moderadamente positiva ($r = 0,45325$) quando comparada com porcentagem de lesões que possuem urédias e número de urédias ($r = 0,33707$). Estes resultados ressaltam que quanto mais clara for à lesão, um maior número de lesões serão encontradas na folha e com um maior número de urédias.

Trabalho realizado por Yamanaka et al. (2008) demonstrou que classificar uma planta como susceptível ou resistente a doença através da avaliação da cor da lesão não é a maneira mais eficiente, principalmente se forem analisadas plantas com resistência horizontal à doença. Primeiramente pela dificuldade de separação entre plantas resistentes e susceptíveis, já que a distribuição contínua existente nas cores das lesões dificulta a inserção nestas classes. Além disto, quando comparadas com outras variedades de soja, susceptíveis e resistentes a doenças, esta característica apresentou baixa correlação. Por fim, foram observados ainda que variedades resistentes a doença possuíam lesões claras. Estes motivos descritos neste trabalho levam a crer que análises gradativas da cor da lesão não seja o método mais adequado quando se deseja classificar as linhagens de acordo com seu nível de susceptibilidade a ação do patógeno.

Tabela 4 – Médias das cinco características analisadas em fitotron.

Famil.	CL	PLU	NU	FUA	NE	Famil.	CL	PLU	NU	FUA	NE
1	5,00	100,00%	3,00	100,00%	2,75	70	4,47	100,00%	5,67	87,65%	3,00
2	4,80	100,00%	4,00	100,00%	2,80	74	4,97	100,00%	5,10	82,35%	3,00
3	5,50	100,00%	4,00	93,75%	3,00	75	5,11	100,00%	3,67	78,79%	3,00
5	5,00	100,00%	6,50	92,31%	3,00	77	5,40	100,00%	3,70	76,58%	3,00
6	5,00	100,00%	2,00	87,50%	2,50	80	4,90	100,00%	5,33	87,50%	3,00
8	5,50	100,00%	2,42	93,10%	2,92	82	5,05	100,00%	3,42	75,38%	2,74
9	5,50	100,00%	2,00	100,00%	3,00	83	5,19	100,00%	3,54	61,96%	2,96
12	3,50	100,00%	1,53	100,00%	2,27	86	5,13	100,00%	2,90	77,01%	2,90
13	2,33	100,00%	3,23	90,72%	3,00	89	5,30	100,00%	3,87	94,83%	3,00
14	3,37	90,00%	2,07	95,16%	2,23	92	4,97	100,00%	4,90	95,24%	2,93
16	3,07	93,33%	2,33	91,43%	2,40	93	5,10	100,00%	3,60	85,19%	3,00
17	2,90	100,00%	3,47	91,35%	2,56	96	5,07	100,00%	3,27	88,78%	3,00
20	3,00	96,67%	2,60	91,03%	2,57	97	5,10	100,00%	3,53	81,13%	3,00
21	2,80	100,00%	2,43	83,56%	2,47	98	5,00	100,00%	3,73	89,29%	3,00
22	5,00	100,00%	2,00	100,00%	3,00	101	5,03	100,00%	3,67	90,00%	3,00
23	3,24	100,00%	2,97	84,88%	2,43	102	5,03	100,00%	3,50	88,57%	3,00
24	3,27	93,33%	1,63	81,63%	2,33	103	4,93	100,00%	3,93	77,12%	3,00
26	5,40	100,00%	4,00	80,00%	2,80	104	5,07	100,00%	3,82	75,70%	3,00
28	4,57	100,00%	4,86	88,24%	3,00	106	5,03	100,00%	3,73	93,75%	3,00
29	4,50	100,00%	4,00	88,89%	2,89	108	5,07	100,00%	5,00	96,00%	3,00
32	4,40	100,00%	4,53	85,29%	2,73	112	5,00	100,00%	3,73	93,75%	3,00
34	4,43	100,00%	4,71	81,82%	2,79	113	4,77	100,00%	3,77	87,61%	3,00
35	5,20	100,00%	3,20	68,75%	3,00	115	5,03	100,00%	4,53	78,68%	2,93
41	4,75	100,00%	3,50	100,00%	3,00	116	5,00	100,00%	3,67	87,27%	3,00
42	5,08	100,00%	4,58	83,64%	3,00	117	4,93	100,00%	4,07	89,34%	3,00
44	4,13	100,00%	3,77	85,84%	2,93	118	5,03	100,00%	3,57	87,85%	3,00
45	4,13	100,00%	4,40	87,88%	2,93	119	4,91	100,00%	3,50	88,57%	3,00
46	4,17	100,00%	3,07	82,61%	2,63	120	5,20	100,00%	5,90	83,62%	3,00
47	4,50	100,00%	3,77	83,19%	2,93	122	5,03	100,00%	4,23	91,34%	3,00
49	4,26	100,00%	3,83	85,22%	2,67	124	5,00	100,00%	3,43	89,32%	2,87
50	4,10	100,00%	4,27	85,16%	2,90	125	5,00	100,00%	4,20	85,71%	3,00
51	4,37	100,00%	3,90	86,32%	2,93	129	5,00	100,00%	4,17	95,20%	2,97
52	3,73	100,00%	3,10	84,95%	2,60	133	5,17	100,00%	4,33	86,92%	2,93
54	4,27	100,00%	3,53	84,91%	2,90	136	5,00	100,00%	3,73	79,46%	3,00
55	4,07	100,00%	3,50	78,10%	2,87	140	5,10	100,00%	4,40	80,30%	2,93
57	3,97	100,00%	3,93	88,14%	2,97	141	5,13	100,00%	4,20	80,16%	2,93
59	4,27	100,00%	3,87	85,34%	2,93	147	5,03	100,00%	3,28	81,05%	2,69
61	5,07	100,00%	3,83	96,52%	3,00	155	5,10	100,00%	3,73	79,46%	2,97
62	4,83	100,00%	4,40	81,06%	3,00	156	5,07	100,00%	3,57	79,44%	2,93
63	4,83	100,00%	4,13	91,13%	3,00	157	5,03	100,00%	2,67	80,00%	2,83
67	4,97	100,00%	4,00	87,50%	3,00	160	5,00	100,00%	3,03	73,63%	2,97
68	5,10	100,00%	4,70	74,47%	3,00	163	5,00	100,00%	3,83	85,22%	2,97
69	4,97	100,00%	4,87	89,73%	2,97						

Famil., RILs utilizadas; **CL**, Cor da Lesão; **PLU**, Porcentagem de Lesões com Urédias; **NU**, Número de Urédias; **FUA**, Frequência de Urédias Abertas; **NE**, Nível de esporulação

Tabela 5 – Análises de correlação de Pearson dos dados coletados em fitotron, realizadas através do programa SAS.

	CL	PLU	NU	FUA	NE
CL	-	0,45325	0,33707	-0,13385	0,67719
Prob	-	0,0001	0,0016	0,2220	0,0001
Obs	-	85	85	85	85
PLU	-	-	0,38722	-0,11494	0,60330
Prob	-	-	0,0003	0,2949	0,0001
Obs	-	-	85	85	85
NU	-	-	-	-0,09552	0,57484
Prob	-	-	-	0,3845	0,0001
Obs	-	-	-	85	85
FUA	-	-	-	-	-0,09803
Prob	-	-	-	-	0,3721
Obs	-	-	-	-	85
NE	-	-	-	-	-
Prob	-	-	-	-	-
Obs	-	-	-	-	-

CL, Cor da Lesão; **PLU**, Porcentagem de Lesões com Urédias; **NU**, Número de Urédias; **FUA**, Freqüência de Urédias Abertas; **NE**, Nível de esporulação; ; **Prob.**, Probabilidade da correlação ser significativa ; **Obs.**, Número de observações.

Construção do Mapa Genético de Ligação

Nesse trabalho, foram avaliados 565 marcadores microssatélites nos genótipos parentais, sendo identificados 149 marcadores polimórficos. Destes, foram escolhidos 80 marcadores para a construção do mapa, onde se buscou uma ampla cobertura do genoma da soja (Tabela 6). Esses 80 marcadores foram amplificados em 163 indivíduos da população de RILs. Foram incluídos também, dois marcadores morfológicos: cor da flor (W1, mapeado no grupo de ligação F, a 28,86 cM) e cor de pubescência (T, mapeado no grupo de ligação C2 a 112,44 cM). Essas análises permitiram a construção de um mapa genético da soja com base na população RILs e a distribuição dos marcadores em 19 grupos de ligação (Figura 3), com uma cobertura de 1.023,5 cM. Essa cobertura do genoma é bem abaixo da cobertura conseguida por Song et al. (2004) no mapa consenso da soja, que foi de aproximadamente 2.500 cM. Essa menor cobertura alcançada nesse trabalho já era esperada, visto que foram utilizados somente 80 marcadores, enquanto o mapa consenso se baseia em mais de 1.800 marcadores, em cinco populações de mapeamento. Embora a cobertura obtida por estes microssatélites utilizados seja

baixa, os resultados obtidos estabelecem o estágio inicial de estudos relacionados à QTLs relacionados à resistência horizontal a ferrugem asiática da soja.

Dos 82 marcadores utilizados, 14 não foram mapeados em nenhum grupo de ligação por estarem a uma distância genética acima de 50 cM durante o processo de mapeamento. O número médio de marcadores por grupo de ligação foi quatro, sendo que o grupo que apresentou maior número de marcadores corresponde ao C2, com oito marcas e os que apresentaram menor quantidade de marcadores foram A2, B1, C1, F, H, I, K, O, com duas marcas por grupo de ligação.

Vários outros mapas com coberturas parciais de genomas já foram relatados na literatura, geralmente associados a mapeamento de características agrônômicas específicas. Brogin (2005) construiu um mapa de ligação composto por 41 microssatélites para o mapeamento de genes de resistência a ferrugem asiática da soja e identificação de QTLs relacionados à resistência a mancha parda em soja. Em outros trabalhos, desenvolvidos por Palomeque et al. (2009a) e Palomeque et al. (2009b), 105 marcadores foram agrupados em 26 grupos de ligação para a construção de um mapa e identificação de QTLs que estivessem ligados à produção de grãos em soja. Enquanto isto, Santos et al. (2006) utilizou 24 marcadores SSR, construindo um mapa genético com 6 grupos de ligação a fim de identificar QTLs associados à fixação biológica de nitrogênio.

Estes dados enfatizam que é possível encontrar QTLs para as características de interesse, mesmo com uma cobertura não tão ampla do genoma. Porém, uma maior cobertura dos grupos de ligação será necessária futuramente para posicionar novos QTLs com associação a outras características de interesse. Além disto, é necessária a saturação de regiões cromossômicas que possam estar relacionadas à QTLs, pois desta maneira pode-se estimar melhor o efeito de cada um deles.

O mapa originado neste estudo ainda pode servir para futuros trabalhos de identificação de QTLs para outras características, pois a população utilizada neste trabalho foi originada de um cruzamento entre duas cultivares contrastantes para várias outras características, como resistência a várias doenças de grande interesse agrônômico. As cultivares BRS 184 e BRS 231 apresentam como características em comum a resistência ao cancro e à necrose da haste, porém divergem em relação a outras doenças. A cultivar BRS 184 é resistente ao

mosaico comum da soja e a duas raças fisiológicas da mancha “olho-de-rã”. Já a BRS 231 é resistente as raças 1 e 3 do nematóide de cisto e moderadamente resistente ao nematóide de galha causado por *Meloidogyne javanica* e resistente à podridão vermelhada da raiz (EMBRAPA SOJA, 2007).

Tabela 6 – Microssatélites polimórficos para o cruzamento BRS 231 x BRS 184, utilizados para construção do mapa genético.

SSR	GL	P(cM)	SSR	GL	P(cM)	SSR	GL	P(cM)
Satt382	A1 (5)	26,78	Sat_069	D1b (2)	106,56	Sat_412	J (16)	44,02
Satt042	A1 (5)	27,99	Satt458	D2 (17)	26,86	Satt380	J (16)	45,41
Satt155	A1 (5)	32,92	Satt208	D2 (17)	63,66	Satt183	J (16)	47,56
Satt599	A1 (5)	81,36	Satt389	D2 (17)	75,33	Satt547	J (16)	72,53
Satt424	A2 (8)	56,16	Satt310	D2 (17)	100,82	Sat_119	K (9)	17,32
Satt377	A2 (8)	84,09	Satt386	D2 (17)	119,75	Satt349	K (9)	39,09
Satt509	B1 (11)	35,72	Sat_112	E (15)	8,75	Satt499	K (9)	61,50
Satt359	B1 (11)	99,23	Satt573	E (15)	74,94	Satt196	K (9)	88,91
Satt126	B2 (14)	22,55	Sat_107	E (15)	80,65	Satt495	L (19)	0,00
Satt304	B2 (14)	53,08	Satt325	F (13)	2,23	Sat_071	L (19)	20,78
Satt066	B2 (14)	68,29	W1	F (13)	28,86	Satt143	L (19)	28,16
Satt190	C1 (4)	54,21	Satt395	F (13)	146,41	Satt166	L (19)	61,08
Satt294	C1 (4)	58,51	Satt235	G (18)	26,27	Satt527	L (19)	70,36
T	C2 (6)	112,44	Satt115	G (18)	46,75	Sat_099	L (19)	78,23
Satt134	C2 (6)	112,83	Satt340	G (18)	48,17	Satt513	L (19)	106,37
Sat_312	C2 (6)	112,84	Satt303	G (18)	55,13	Satt435	M (7)	38,43
Sat_251	C2 (6)	114,19	Satt288	G (18)	74,42	Satt463	M (7)	50,09
Satt708	C2 (6)	115,48	Sat_117	G (18)	100,00	Satt175	M (7)	62,75
Satt079	C2 (6)	117,87	Satt353	H (12)	14,89	Satt308	M (7)	124,01
Sat_263	C2 (6)	118,77	Satt442	H (12)	44,55	Satt152	N (3)	24,79
Sct_028	C2 (6)	122,01	Satt142	H (12)	83,21	Satt080	N (3)	38,56
Satt371	C2 (6)	145,47	Satt181	H (12)	86,03	Satt339	N (3)	63,06
Satt502	D1a (1)	46,71	Satt587	I (20)	30,84	Satt188	O (10)	55,38
Satt408	D1a (1)	100,73	Satt354	I (20)	44,89	Satt478	O (10)	70,69
Satt157	D1b (2)	44,40	Satt330	I (20)	76,18	Satt331	O (10)	99,41
Satt412	D1b (2)	75,17	Satt285	J (16)	23,07	Sat_109	O (10)	125,94
Satt141	D1b (2)	81,68	Satt414	J (16)	41,67			
Satt172	D1b (2)	105,07	Sat_165	J (16)	42,20			

SSR, marcador microssatélite; **GL**, grupo de ligação da soja, sendo os valores entre parênteses os correspondentes ao número do cromossomo; **P**, posição do marcador no mapa genético consenso da soja em cM (Cregan et al., 1999; Song et al., 2004); **T**, marcador morfológico para cor de pubescência; **W1**, marcador morfológico para cor de flor

Adicionalmente, a cultivar BRS 184 encontra-se entre uma das cultivares brasileira com maior tolerância a seca (OYA et al., 2004). Portanto, o

mapa gerado pode servir como grande ferramenta a fim de gerar estudos em busca de novos QTLs que estejam relacionados a esta e outras características de grande interesse agrônomo e econômico.

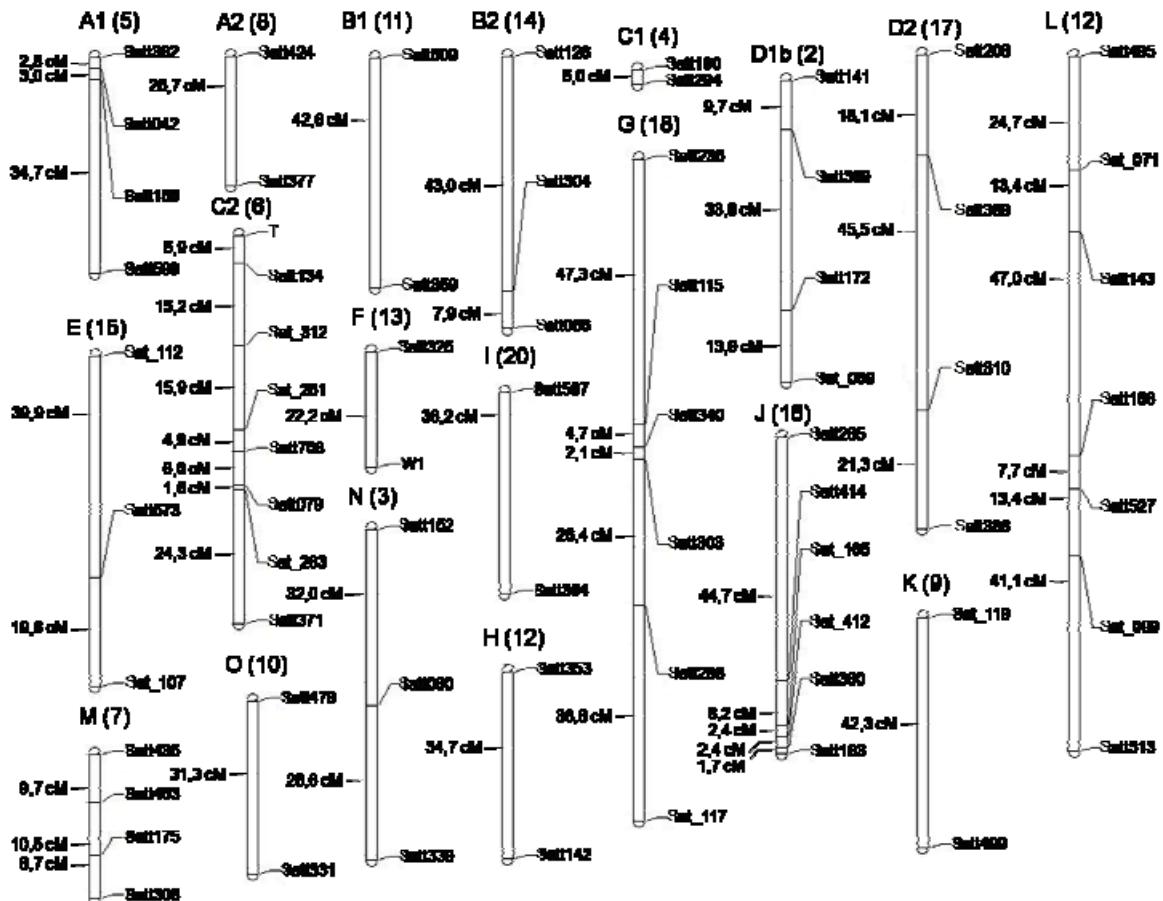


Figura 3 – Mapa genético da soja baseado na população de 163 $F_{7:8}$ RILs derivadas do cruzamento entre as cultivares BRS 231 e BRS 184. A imagem abaixo demonstra os 19 grupos de ligação da soja. Entre parênteses encontra-se o número de cada cromossomo, conforme descrito no site do Soybase (<http://soybase.org/LG2Xsome.php>).

Mapeamento de QTLs associados à resistência a ferrugem asiática

Foram identificados 29 picos que ultrapassaram os valores do nível de significância estabelecidos inicialmente relacionados à data de floração, altura da planta durante a floração, data de maturação, altura da planta durante a maturação, número de nós, peso total, peso de 100 sementes, frequência de urédias abertas e nível de esporulação. Grande parte dos picos observados para cada característica

encontrou-se no grupo de ligação C2, seguido do cromossomo L. Estes resultados indicam a existência de QTLs, porém é necessário um aprofundamento real a fim de determinar a quantidade de QTLs existentes.

Para o grupo de ligação C2 (6), foram visualizados oito picos superiores ao nível de significância (Figura 4a). Estima-se que na região correspondente ao intervalo entre os marcadores T (marcador morfológico de pubescência) e Satt134 exista um ou vários QTLs que esteja influenciando nas características data de floração, altura da planta durante a floração, data de maturação, altura da planta durante a maturação, peso total e peso de 100 sementes. Como se tratam de características que apresentaram correlação genética entre elas (Tabela 3) e ainda apresentaram os valores máximos de *LOD* em posições próximas, buscou-se por intermédio da ferramenta JZmapqtl verificar se estas características estariam sob controle de um único gene. Com base nos resultados obtidos (Figura 4b), foi verificado a presença de apenas um QTL, que contribui para as características observadas, com um efeito pleiotrópico sobre estas. Esse QTL contribuiu com um efeito aditivo de 2,64 dias para data de floração, 8,36 cm para altura da planta durante a floração, 5,89 dias para data de maturação, 9,13 cm para altura da planta durante a maturação, 0,15 g para peso total e 0,50 g para peso de 100 grãos, explicando individualmente 15,63%, 19,08%, 34,27%, 17,47%, 20,81% e 7,51%, respectivamente, da variação fenotípica observada no experimento.

Para as características data de floração, altura da floração, data de maturação e altura da planta durante a maturação, os alelos que aumentam o valor da característica foram oriundos do parental BRS 231, enquanto que para as características peso total e peso de 100 sementes, vieram do parental BRS 184. Os valores obtidos de efeito aditivo e a variação fenotípica observada foram obtidos por meio da ferramenta Eqtl do programa QTL Cartographer.

QTLs também foram identificados em outras regiões deste grupo de ligação, porém com efeitos bem mais baixo nas características. Na região localizada entre os marcadores Satt134 e Sat_312, observa-se um QTL que está contribuindo com a característica data de maturação (2,60 dias), explicando individualmente 6,87% da variação fenotípica observada (Figura 4a). Para estas características, os alelos de efeito aditivo foram oriundos do parental BRS 231.

Por fim, o último QTL identificado nesse cromossomo foi localizado entre os marcadores Satt708 e Satt079 e tem sua atuação sobre a característica peso de 100 sementes (Figura 4a), porém contribuindo com um efeito aditivo de 0,37 g, o que explica apenas 4,10% da variação fenotípica observada. O valor de LOD Score observado para este QTL foi bem baixo (2,06), será necessário um estudo mais detalhado nessa região, a fim de determinar a real significância desse locus.

Vários QTLs já foram identificados nesse mesmo intervalo no grupo de ligação C2, entre os intervalos dos marcadores T e Sat_132, como os relacionados à resistência a insetos (TERRY et al., 2000), tolerância a seca (SPECHT et al., 2001), peso individual de sementes e número de sementes sob resfriamento (FUNATSUKI et al., 2005), e período de floração, maturação e altura da planta (FUNATSUKI et al., 2005; YAMANAKA et al., 2005; MANSUR et al., 1996; MANSUR et al., 1993a; MANSUR et al., 1993b) e concentração de óleo (HYTEN et al., 2004).

Por fim, entre os marcadores Satt708 e Satt079, foram identificados QTLs relacionados ao fotoperiodismo (TASMA et al., 2001), taxa de absorvância de água, germinação, dureza, tamanho e qualidade dos grãos (HYTEN et al., 2004; WATANABE et al., 2004; CSANÁDI et al., 2001), o período de floração, maturação e altura da planta (FUNATSUKI et al., 2005; YAMANAKA et al., 2005; MANSUR et al., 1996; MANSUR et al., 1993a; MANSUR et al., 1993b) e de resistência a septoriose (BROGIN et al., 2005).

Próximo a este último intervalo, foram identificados QTLs relacionados à resistência a raça 5 do nematóides do cisto (YUE et al., 2001) e a síndrome da morte súbita da soja (NJITI et al., 2002). Por fim, verifica-se ainda existência de alguns genes importantes de resistência a ferrugem, como o *Rpp1* (HYTEN et al., 2009), um gene presente na cultivar FT-2 (BROGIN, 2005), e um alelo presente na cultivar 'Hyuuga' (MONTEROS et al., 2007). Também nessa região foi mapeado recentemente um gene de resistência vertical relacionado à oídio (CATELLI et al., 2007a). Agrupamentos de genes de resistência são muito comuns, já sendo observados em vários grupos de ligação (KANAZIN et al., 1996; GRAHAM et al., 2002).

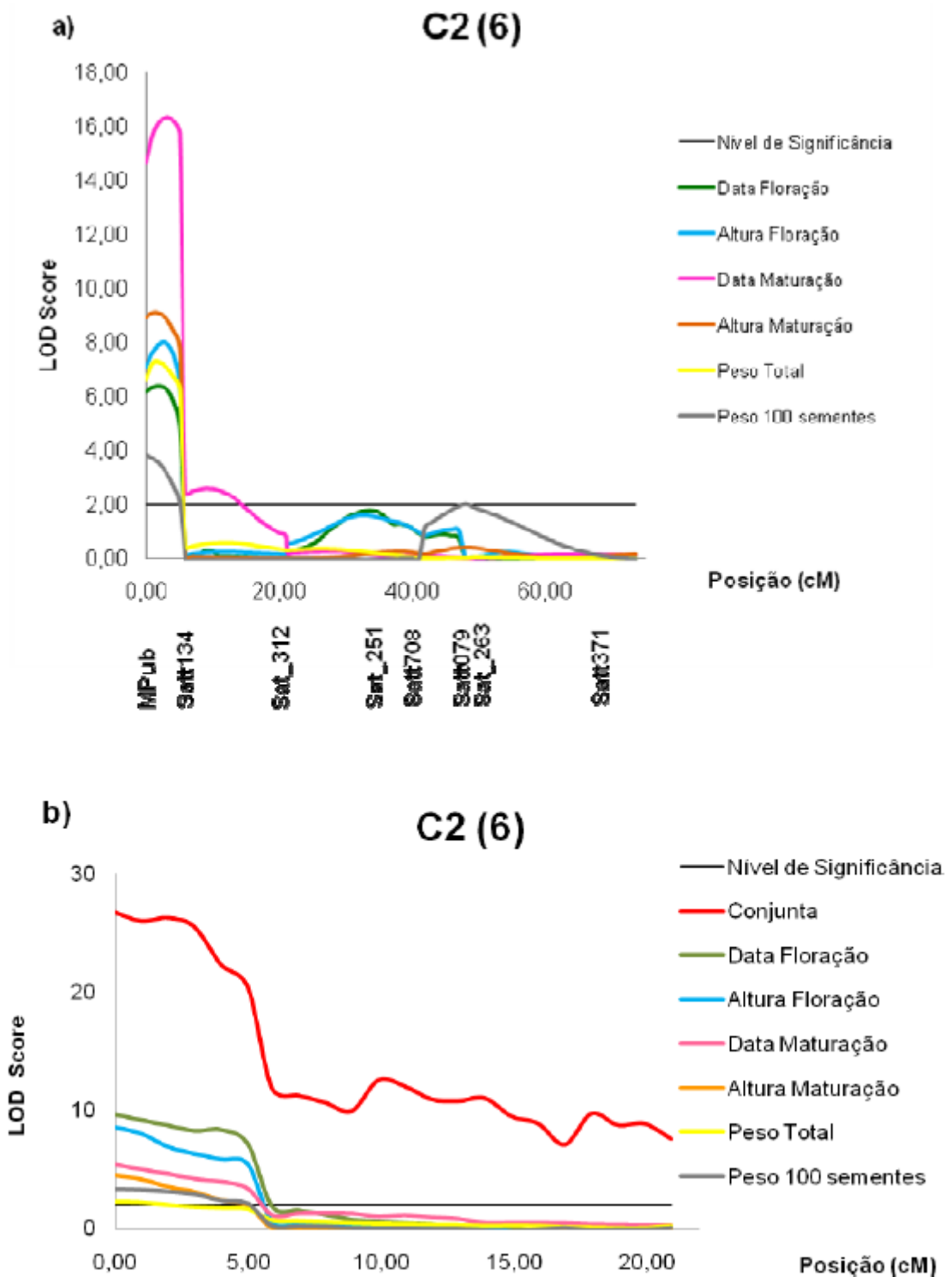


Figura 4 – Resultados das análises de busca por QTLs no grupo C2 (6). (a) Análises via Zmapqtl; (b) Análises via JZmapqtl. Valores que ultrapassam o nível de significância de $LOD = 2,0$ demonstram a existência de possíveis QTLs significativos para a característica analisada.

Foram observados também QTLs no grupo de ligação F (Cromossomo 13), na região compreendida entre os marcadores Satt325 e W1

(marcador morfológico para coloração de flor) (Figura 5). Um QTL que atua na característica data de maturação contribui com um efeito aditivo de 2,39 cm, esclarecendo 5,53% da variação fenotípica observada. Já o QTL que atua na característica peso total contribui com um efeito aditivo de 1,40 g, explicando 8,76% de toda variação fenotípica observada nas linhagens. Este resultado demonstra que o maior motivo da correlação entre peso total e coloração de flor ser significativo está relacionado ao gene responsável pela coloração da flor estar ligado a este QTL.

Quando analisado esta região no mapa consenso da soja, observa-se que já foi identificado entre este intervalo de marcas, QTLs relacionados à podridão da raiz em soja (BURNHAM et al., 2003) e ainda relacionados à data de maturação e peso de sementes sob estresse de seca (SPECHT et al., 2001).

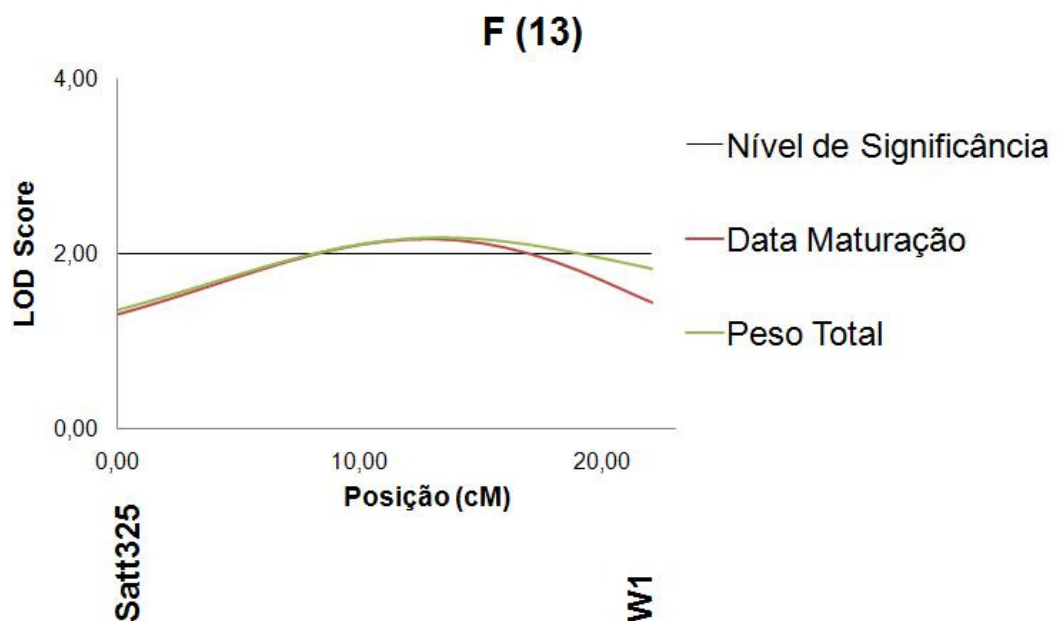


Figura 5 – Resultado das análises via Zmapqtl de busca por QTLs no grupo F (13). Valores que ultrapassam o nível de significância de $LOD = 2,0$ demonstram a existência de possíveis QTLs significativos para a característica analisada.

O grupo de ligação L (cromossomo 12) também apresentou QTLs para várias características (Figura 6a), localizados entre os marcadores Satt143 e Satt527. Valores de LOD significativos foram identificados para altura da planta durante a floração, data de maturação, altura da planta durante a maturação e número de nós. Já no intervalo entre os marcadores Satt527 e Sat_099, foram

identificados quatro picos significativos para altura da planta durante a floração, data de maturação e altura da planta durante a maturação. Devido à correlação genética existente entre as características e a proximidade das posições onde foram identificados os picos, utilizou-se o programa JZmapqtl para tentar explicar qual o efeito do gene e quantos QTLs foram identificados nesta região. Com os resultados obtidos, pode-se determinar que, nesse estudo, para este grupo de ligação foram identificados quatro QTLs, sendo que dois destes possuem efeito pleiotrópico para as características estudadas (Figura 6b).

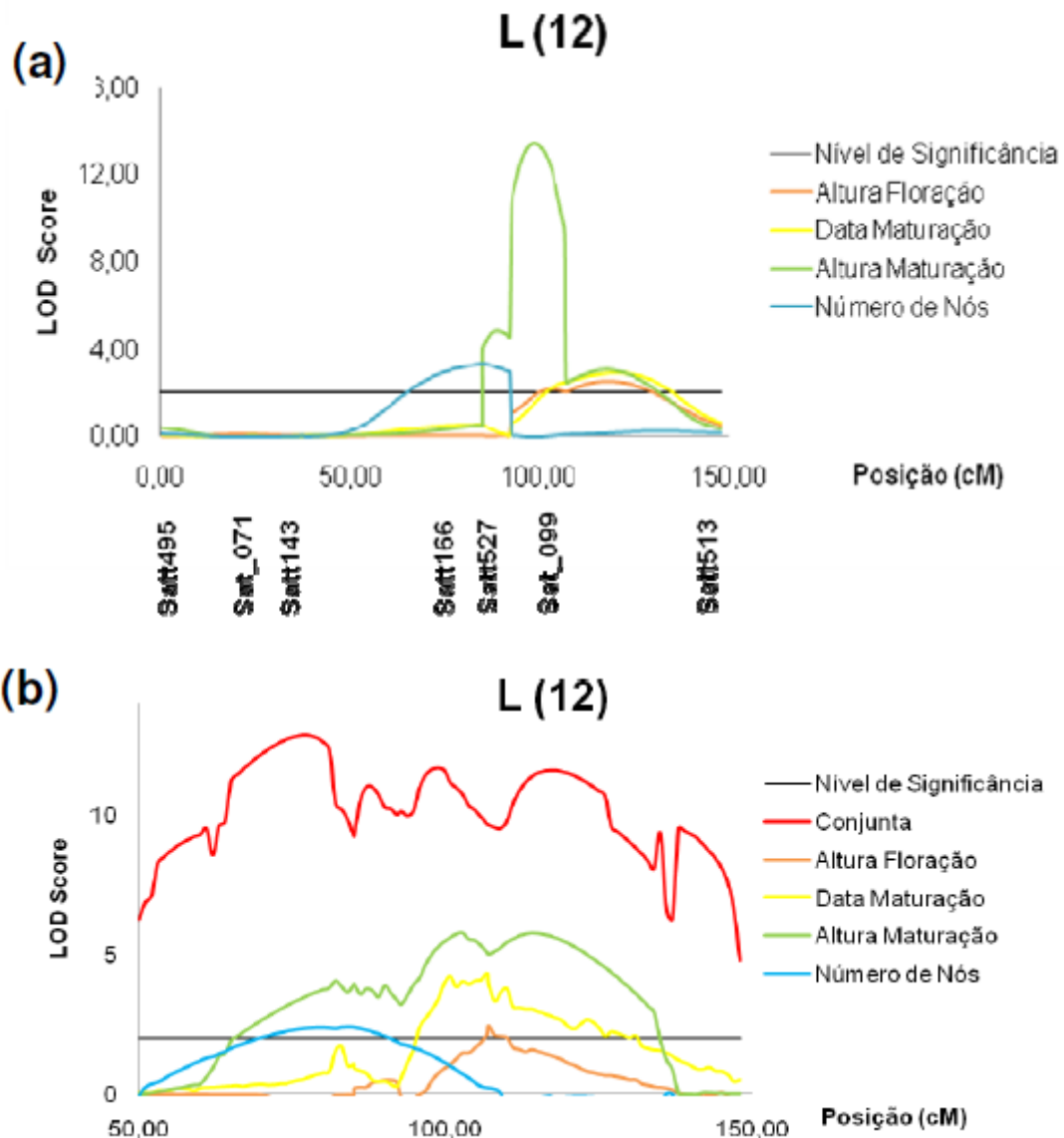


Figura 6 – Resultados das análises de busca por QTLs no grupo L (12). (A) Análises via Zmapqtl; (B) Análises via JZmapqtl. Valores que ultrapassam o nível de significância de $LOD = 2,0$ demonstram a existência de possíveis QTLs significativos para a característica analisada.

Para o QTL identificado entre os marcadores Satt143 e Satt166, observou-se um efeito pleiotrópico sobre as características altura da planta durante a maturação e número de nós. Para a característica número de nós observa-se um valor aditivo de 0,95, o que explica 11,24% da variação fenotípica observada e para a característica altura da planta durante a maturação, contribuindo com um efeito aditivo de 7,04 cm, o que explica 14,26% da variação fenotípica das linhagens.

Já entre as marcas Satt166 e Satt527 foi identificado um QTL que contribui com um efeito de 9,79 cm para a característica altura da planta durante a maturação, explicando 36,29% da variação fenotípica observada.

Por fim, entre os marcadores Satt527 e Sat_099 foram identificados dois QTLs, sendo que um destes apresentou efeito pleiotrópico para as características altura da planta durante a floração, data de maturação e altura da planta durante a maturação. Este QTL possui um efeito aditivo de 4,04 cm, explicando 10,93% da variação fenotípica da altura da planta durante a floração, outro efeito aditivo de 3,59 dias, elucidando 12,72% da variação fenotípica para data de maturação das linhagens e outro efeito aditivo de 3,59 cm, esclarecendo 17,66% da variação fenotípica apresentada para altura da planta durante a maturação. Outro QTL encontrado neste intervalo, porém em uma posição mais distante, está relacionado à característica altura da planta durante a floração e contribui com um efeito aditivo de 2,97cm, explicando cerca de 5,86% da variação fenotípica observada. Para todos os QTLs encontrados, os alelos aditivos que contribuem para o aumento no valor das características observadas foram oriundos do parental BRS 231.

Vários QTLs, relacionados a várias características de interesse agrônômico, já foram identificados nessas regiões onde foram detectados QTLs. No intervalo entre Satt166 e Satt527 foram observados QTLs relacionados concentração de proteínas (MANSUR et al., 1996), altura, florescimento, maturação de vagens e período reprodutivo (ORF et al., 1999a) e qualidade do óleo (HYTEN et al., 2004). Próximos a esta região, ainda foram descritos QTLs relacionados à resistência ao mofo branco (ARAHANA et al., 2001) e teor de óleo (FASOULA et al., 2004).

Já para o intervalo entre os marcadores Satt527 e Sat_099 já foram descritos na literatura QTLs relacionados ao tamanho da semente (HYTEN et al.,

2004), peso total e rendimento dos grãos (ORF et al.; 1999b), altura, florescimento, maturação de vagens e período reprodutivo (ORF et al., 1999a), além de QTLs em resposta ao estresse hídrico (SPECHT et al., 2001).

Para finalizar, entre os marcadores Sat_099 e Satt513, foram identificados QTLs de resistência a raça 3 do nematóide do cisto (GUO et al., 2005), efeito do resfriamento sobre o florescimento (FUNATSUKI et al., 2005), peso de sementes (ORF et al., 1999a) dureza da semente (Keim et al., 1990), concentração de óleo e proteínas (HYTEN et al., 2004), período de maturação (MANSUR et al., 1996) e período reprodutivo (ORF et al., 1999a).

Para o grupo de ligação O (cromossomo 10), verificou-se duas curvas acima do nível de significância para data de floração e altura da planta durante a floração (Figura 7a). Os valores encontravam-se no intervalo entre os marcadores Satt478 e Satt331. Para data de floração, ocorreu um aumento de efeito aditivo de 2,50 dias, vindo este alelo do parental BRS 184. Este valor explica 7,93% da variação fenotípica observada nas linhagens. Já para Altura da Floração, observou-se que os alelos responsáveis pelo efeito aditivo vieram também do parental BRS 184 e trouxeram um aumento de 2,92 cm, explicando 7,49% da variação fenotípica das linhagens. Devido à alta correlação existente entre as características visualizadas, determinou-se de realizar o processo de mapeamento de múltiplas características (Figura 7b). Através destas análises, observou-se que os picos para ambas as características encontravam-se praticamente na mesma região, o que determina que para estas duas características, um único QTL está atuando sob efeito pleiotrópico.

Quando comparado com o mapa consenso, observou-se que nesta região do grupo de ligação foram observados QTLs para outras características, como para resistência ao mofo branco (ARAHANA et al., 2001), para altura da planta (KABELKA et al., 2004), peso de sementes (CSANADI et al., 2001) e concentração de proteínas em estudos de tolerância a seca (SPECHT et al., 2001). Verifica-se ser uma região com poucos QTLs identificados, comparados com outras regiões já descritas.

No grupo de ligação M (Cromossomo 7), observou-se um pico acima do nível de significância para as características peso de 100 sementes e nível de esporulação (Figura 8). Para estas duas características, não foi possível realizar

uma análise via JZMapqtl, pois análises de correlação a fim de verificar a relação entre estas duas características não foram realizadas, pois os experimentos foram conduzidos de maneira diferente e em locais diferentes. Pelos resultados observados no gráfico, observa-se que para a característica peso de 100 sementes existem três QTLs, em intervalos diferentes. Todos os alelos de efeito aditivo observados nestes QTLs vieram do parental BRS 231. No intervalo correspondente aos marcadores Satt435 e Satt463, foi identificado um QTL que contribui com 0,43 g para a característica, explicando 9,92% da variação fenotípica visualizada nas linhagens.

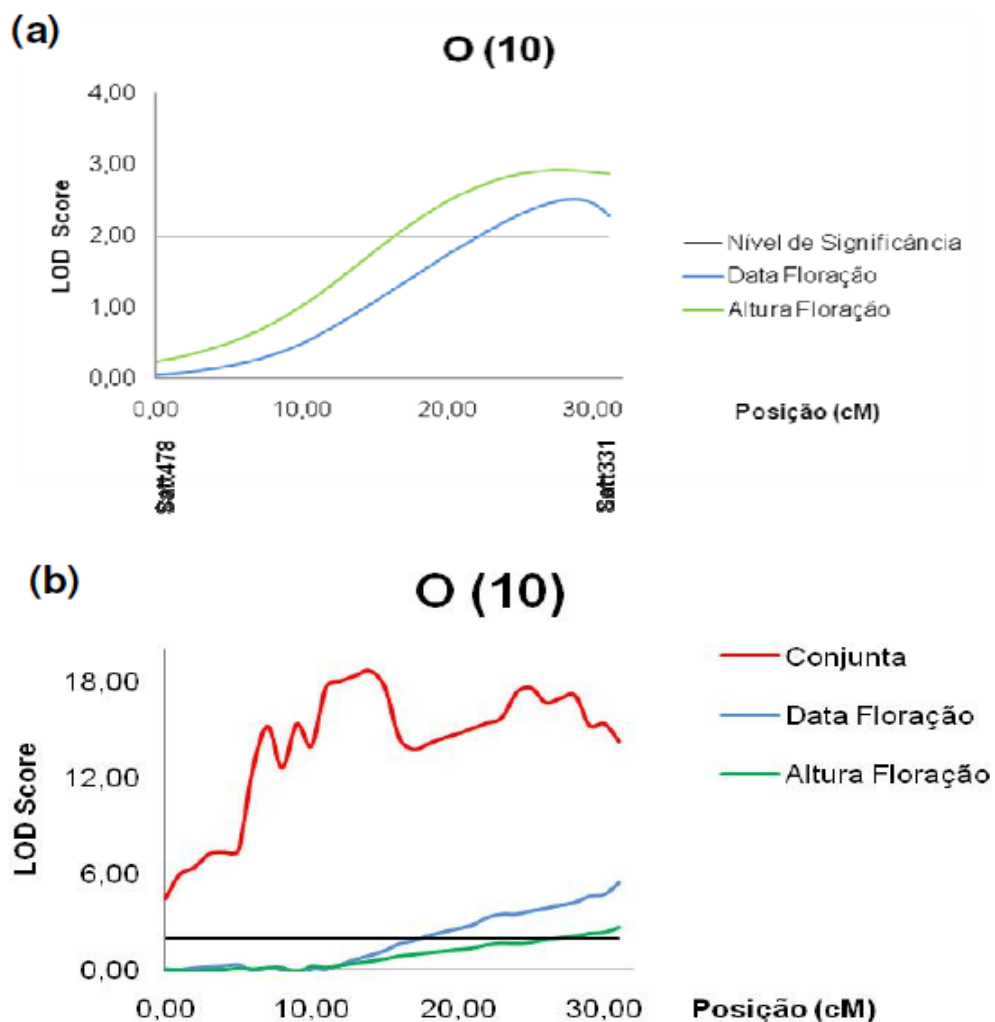


Figura 7 – Resultados das análises de busca por QTLs no grupo de ligação O (10). O primeiro gráfico representa as análises via Zmapqtl e o segundo as análises via JZmapqtl. Valores que ultrapassam o nível de significância de LOD = 2,0 demonstram a existência de possíveis QTLs significativos para a característica analisada.

Já no intervalo entre as marcas Satt463 e Satt175, observou-se um QTL que colabora com o aumento de 0,47 g da característica estudada, explicando 11,90% da variação fenotípica observada, enquanto que entre os marcadores Satt175 e Satt308, observou-se um QTL que contribui com 0,45 g, explicando 11,08% da variação fenotípica observada. Além destes, ainda foi observado um QTL relacionado ao nível de esporulação do fungo nas linhagens. Observou-se neste QTL um efeito aditivo no valor de 0,06, que explica 11,68% da variação fenotípica observada. Os alelos aditivos observados para esta característica, assim como observado nos QTLs de peso de 100 sementes deste grupo de ligação, novamente foram oriundos do parental BRS 231.

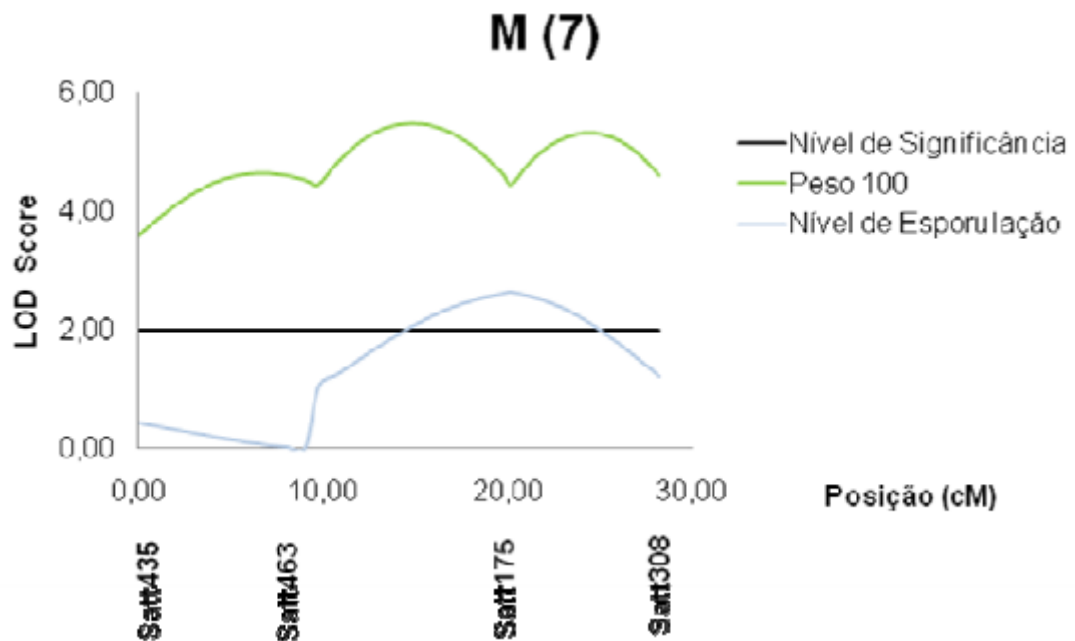


Figura 8 – Resultado das análises via Zmapqtl de busca por QTLs no grupo M (7). Valores que ultrapassam o nível de significância de $LOD = 2,0$ demonstram a existência de possíveis QTLs significativos para a característica analisada.

Vários QTLs foram relatados neste grupo de ligação ligados ou não a resistência a doenças e pragas. Entre os relacionados a doenças e pragas, observou-se no mapa consenso a existência de QTLs relacionados à resistência ao mofo branco (KIM; DIERS, 2000), a raça 3 do nematóide de cisto (WEBB et al., 1995) e a insetos (KOMATSU et al., 2005). Além destes, foram observados QTLs relacionados à produção e qualidade de sementes (MANSUR et al., 1996; CSANADI

et al., 2001), concentração de ácido palmítico (LI et al., 2001), além do período de floração (ORF et al., 1999a) e maturação (MANSUR et al., 1996) da soja.

Por fim, ainda foram identificados mais dois QTLs que encontravam-se nos grupos de ligação I (Cromossomo 20) e N (Cromossomo 3), cada um contribuindo de maneira diferente para a resistência horizontal a doença (Figura 9). No grupo I (20), foi possível identificar um QTL diretamente relacionado à resistência horizontal à doença. Este QTL encontra-se entre as marcas Satt587 e Satt354 e está relacionado à frequência de urédias abertas nas folhas. O efeito aditivo para esta característica observada foi de 4,00% e os alelos, assim como observado no grupo de ligação D2, foram originados do parental BRS 184. Este QTL auxilia a explicar cerca de 28,94% da variação fenotípica observado nesta característica.

Para esta região do grupo de ligação I, foi observado no mapa consenso a existência de QTLs relacionados à resistência a raça 5 do nematóide de cisto (QIU et al., 1999), a síndrome da morte súbita (IQBAL et al., 2001), além de QTLs relacionados à características agrônômicas como data de maturação, produção, peso de grãos, concentração de proteínas (NICHOLS et al., 2006; SEBOLT et al., 2000; DIERS et al., 1992) e relacionados ao florescimento sob ação do resfriamento (FUNATSUKI et al., 2005).

Além destes, ainda foi identificado no grupo de ligação N (3) um QTL relacionado à altura da planta durante a floração. Este QTL encontra-se entre os marcadores Satt152 e Satt080, e foi o que foi detectado com o menor valor de *LOD* (2,05), contribuindo com 3,37 cm, o que representa 7,67% da variação fenotípica observada nas linhagens. Neste caso, os alelos de efeito aditivo foram oriundos do parental BRS 231. Quando comparada com o mapa consenso da soja, observou-se que a região entre os marcadores Satt152 e Satt080 foram identificados QTLs relacionados à resistência ao mofo branco (ARAHANA et al., 2001), a síndrome da morte súbita (NJITI et al., 2002), a raça 4 do nematóide de cisto (CONCIBIDO et al., 1997). Além destes, ainda foram observados QTLs relacionados à concentração de proteínas (LEE et al., 1996) e dureza de sementes (KEIM et al., 1990). Ainda sobre esta região, foram identificados genes de resistência vertical a podridão da raiz (WENG et al., 2001) e 3 genes de resistência a ferrugem asiática da soja, sendo 2 deles dominantes (GARCIA et al., 2007; CATELLI et al., 2007b) e 1 recessivo (GARCIA et al., 2007).

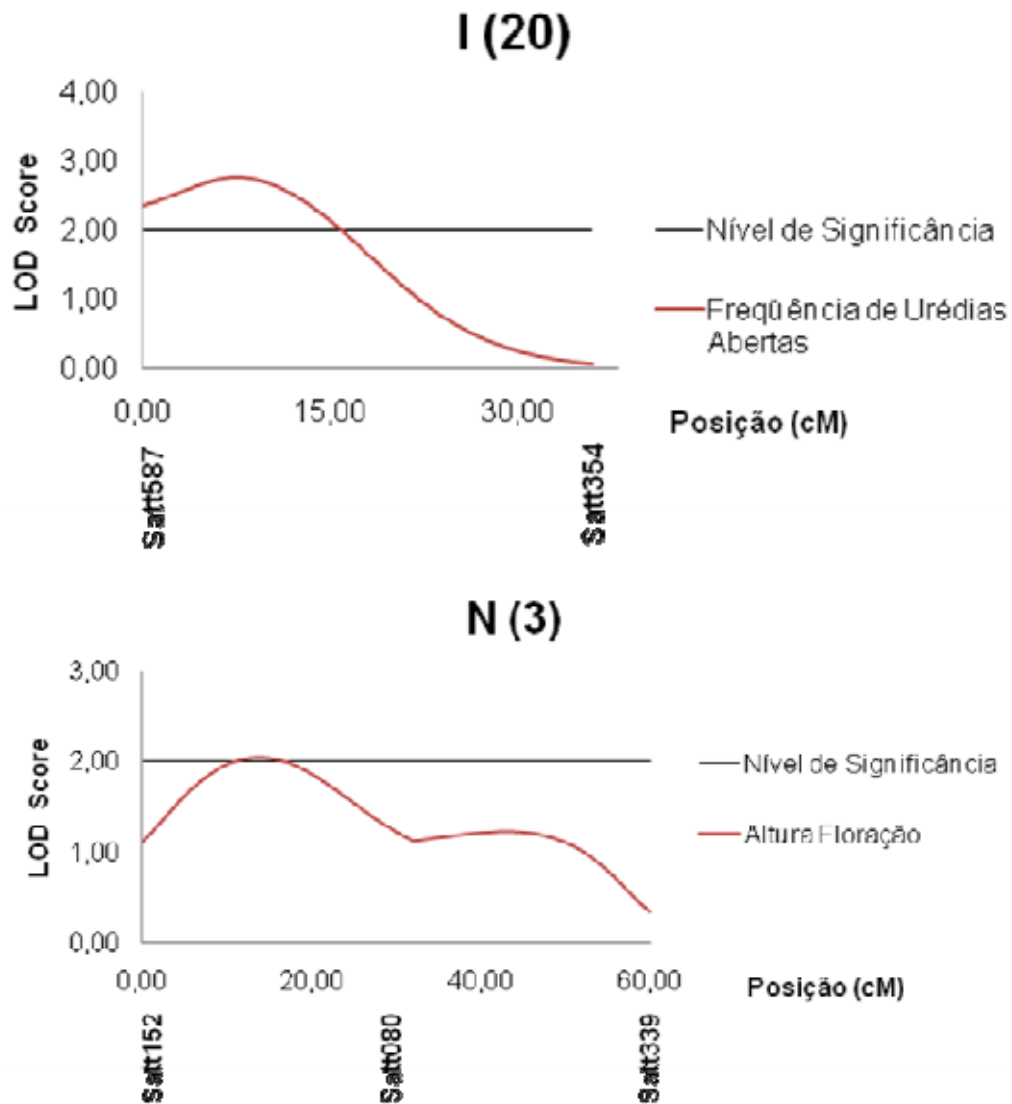


Figura 9 – Resultado das análises via Zmapqtl de busca por QTLs nos grupos I (20) e N (3). Valores que ultrapassam o nível de significância de $LOD = 2,0$ demonstram a existência de possíveis QTLs significativos para a característica analisada.

Foram identificados nesse trabalho, um total de 17 QTLs para diversas características, sob a ação direta da ferrugem asiática da soja. O resumo de todos os QTLs encontrados, os grupos de ligação correspondentes, assim como a característica controlada, posição que foi identificado e os valores de LOD , efeito aditivo e porcentagem de variação fenotípica podem ser observados na tabela 7. Estima-se que alguns destes QTLs sejam de extrema importância para que as linhagens apresentem resistência horizontal ao patógeno, sendo necessárias novas análises em ambientes diferentes, sob condições diferentes das apresentadas durante a condução deste experimento para confirmação dos resultados.

Algumas características, como data de floração, data de maturação e nível de esporulação, não foram contrastantes entre os parentais, porém observa-se que algumas RILs apresentaram valores de médias muito acima ou abaixo da média dos pais, porém a distribuição das médias ocorreu de maneira uniforme quando analisada a população total. Este fato é explicado devido ao processo de segregação transgressiva que ocorreu entre as linhagens e que foi determinante para que apresentassem este perfil, pois os alelos que influenciaram nestas características estão dispersos nos pais e as diferentes médias observadas entre as linhagens foi causada devido ao processo de recombinação genética entre os alelos parentais. Portanto, para estas características que ocorreu o processo de segregação transgressiva, ambos os parentais contribuíram tanto para a diminuição como para o aumento do efeito observado dos QTLs.

Além disto, vale ressaltar que para a característica data de maturação, novas análises fenotípicas deverão ser realizadas a fim de confirmar a existência dos efeitos dos QTLs identificados sobre elas. Com os problemas relatados e diagnosticados pelo teste de normalidade, abre-se a possibilidade de alguns dos valores de LOD identificados possam ser menores do que os observados nesta análise preliminar. Portanto, para confirmar os resultados observados para esta característica, é necessário realizar uma nova avaliação sobre a característica.

Os grupos de Ligação G e J são conhecidos na literatura pela existência de genes verticais relacionados à resistência a ferrugem asiática da soja (HYTEN et al., 2007; SILVA et al., 2008), além de QTLs de resistência a outras doenças (PATZOLDT et al., 2005; GLOVER et al., 2004; YUE et al., 2001; ARAHANA et al., 2001; MEKSEM et al., 1999; CONCIBIDO et al., 1996). Esperava-se que nestes grupos de ligação fossem identificados QTLs que pudessem ser relacionados à ferrugem asiática da soja. Existem algumas hipóteses que podem explicar a ausência de QTLs para estes dois grupos de ligação. Uma das hipóteses está relacionada a falta de saturação de algumas regiões dos grupos de ligação, como no caso do grupo J, que ainda necessita de uma maior cobertura, visto que a maioria dos marcadores ficaram concentrados em uma única região.

Tabela 7 – Resultados obtidos pelas análises realizadas pela ferramenta Eqtl do programa QTL Cartographer.

Grupo de Ligação	Intervalo	Característica	Posição (cM)	LOD	Efeito a	R ² %
C2	T-Satt134	Data Floração	2,01	6,39	2,64	15,63%
		Altura Floração	3,01	8,02	8,36	19,08%
		Data Maturação	3,01	16,37	5,89	34,27%
	Satt134-Sat_312	Altura Maturação	1,01	9,13	6,71	17,47%
		Peso Total	2,01	7,27	-2,15	20,81%
		Peso 100	0,01	3,86	-0,50	7,51%
		Satt708-Satt079	Data Maturação	8,92	2,60	3,74
	Peso 100	47,92	2,06	-0,37	4,10%	
F	Satt325-W1	Data Maturação	13,01	2,17	-2,39	5,53%
		Peso Total	13,01	2,19	1,40	8,76%
I	Satt587-Satt354	Freqüência de Urédias Abertas	7,01	2,78	-4,00	28,94%
L	Satt166-Satt527	Número de Nós	85,10	3,30	0,95	11,24%
		Altura Maturação	89,10	4,87	7,04	14,26%
	Satt527-Sat_099	Altura Maturação	98,78	13,49	9,79	36,29%
	Sat_099-Satt513	Altura Floração	102,78	2,97	2,97	5,86%
		Altura Floração	118,04	2,57	4,04	10,93%
		Altura Maturação	118,04	3,09	7,21	17,66%
		Data Maturação	120,04	2,97	3,59	12,72%
M	Satt435-Satt463	Peso 100	7,01	4,63	0,43	9,92%
	Satt463-Satt175	Peso 100	14,72	5,48	0,47	11,90%
	Satt175-Satt308	Nível de	20,20	2,64	0,06	11,68%
		Esporulação				
	Peso 100	24,20	5,32	0,45	11,08%	
N	Satt152-Satt080	Altura Floração	14,01	2,05	3,37	7,67%
O	Satt478-Satt331	Data Floração	29,01	2,50	-1,25	7,93%
		Altura Floração	28,01	2,92	-3,33	7,49%

Existem poucos estudos voltados para mapeamento de QTLs que possam influenciar a resistência horizontal à ferrugem asiática da soja, o que tornam mais promissores ainda os dados obtidos. No entanto, esses resultados necessitam ser validados e confirmados através da avaliação da população em diferentes ambientes. Além disso, uma maior saturação do mapa genético é necessária, visto que o espaçamento entre os marcadores é relativamente alto, o que pode ter dificultado a visualização de outros QTLs presentes nessas regiões, e também para localizar mais precisamente os QTLs identificados, visando trabalhos futuros de clonagem gênica e também de seleção assistida por marcadores.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. (2005). **Plant Pathology**. 5th Ed. Amsterdam. Elsevier Academic Press. 2005.
- ALVES, S. A. M.; FURTADO, G. Q.; GODOY, C. V.; BERGAMIN FILHO, A (2005). **Influência da temperatura e da duração do período de molhamento foliar no desenvolvimento da ferrugem da soja**. Fitopatologia Brasileira, v.30, p.127.
- ALVES, S. A. M.; FURTADO, G. Q.; GODOY, C. V.; BERGAMIN FILHO, A (2004). **Efeito da temperatura e do período de molhamento na germinação de *Phakopsora pachyrhizi***. Fitopatologia Brasileira, v29, p.207.
- ARAHANA, V. S., GRAEF, G. L.; SPECHT, J. E.; STEADMAN, J. R.; ESKRIDGE, K. M. (2001). **Identification of QTL's for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean**. Crop Sci.41:180–188.
- ARIAS, C. A. A.; RIBEIRO, A. S.; YORINORI, J. T.; BROGIN, R. L.; OLIVEIRA, M. F.; TOLEDO, J. F. F. (2004a) **Inheritance of resistance of soybean to rust (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow)**. In: Abstracts of contributed papers and posters, VII World Soybean Research Conference. (Moscardi, F. et al. editors) Londrina: Embrapa Soybean.
- ARIAS, C. A. A.; RIBEIRO, A. S.; KIIHL (2004b). **A single gene determining high level of resistance to powdery mildew in soybean**. In: Abstracts of contributed papers and posters, VII World Soybean Research Conference. (Moscardi, F. et al. editors) Londrina: Embrapa Soybean.
- BARNES, S.; GRUBBS, C.; SETCHELL, K. D.; CARLSON, J. (1990). **Soybeans inhibit mammary tumors in models of breast cancer**. In: Mutagens and Carcinogens in the Diet New York, Wiley-Liss, Inc. 239-253.
- BARLETT, D. W., CLOUGH, J. M., GODWIN, J. R., HALL, A. A., HAMER, M. & PARRDOBRZANSKI, B. (2002). **The strobilurin fungicides**. Pest Management 58:649-662.
- BASTEN, C. J.; WEIR, B. S.; ZENG, Z-B. (2003) **QTL cartographer: version 1.17**. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh. BERED, F.; BARBOSA NETO, F. J.; CARVALHO, F. I. F. (1997). **Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas**. Ciência Rural, v.27, p.513-520.

BORGES, L. C. ; FERREIRA, D. F. (2003). **Poder e taxas de erro tipo I dos testes Scott-Knott, Tukey e Student-Newman-Keuls sob distribuições normal e não normais dos resíduos.** Revista de Matemática e Estatística, São Paulo, v. 21, n. 1, p. 67-83.

BROGIN, R. L. (2005). **Mapeamento de genes de resistência à ferrugem e de QTLs envolvidos na resistência à septoriose em soja.** Piracicaba, 2005, 93p. Tese(doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.

BROMFIELD, K. R. (1984). **Soybean rust.** Monography No 11 St. Paul: American Phytopathological Society Press, MN. 65p.

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

BURNHAM, K. D., DORRANCE, A. E.; FRANCIS, D. M.; FIORITTO, R. J.; ST. MARTIN, S. K. (2003). **Rps8, a new locus in soybean for resistance to Phytophthora sojae.** Crop Sci.,43:101–105.

CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B. DE; BRITO, G. G. de; SAKIYAMA, N. S. (2006). **Tipos de Marcadores Moleculares.** In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T.; Marcadores Moleculares. Viçosa, MG, Ed. UFV, p.9 – 78.

CANTERI, M. G.; GODOY, C. V. (2003). **Escala diagramática para avaliação da ferrugem da soja.** Summa Phytopathologica, 32:89.

CARUSO, R. (1997). **Soja: uma caminhada sem fim.** Campinas: Fundação Cargil, 95p.

CARNEIRO, M. S.; VIEIRA, M. L. C. (2002). **Mapas genéticos em plantas.** Bragantia, v.61, p.89-100.

CATELLI, L. L.; ARIAS, C. A. A.; CAMARGO, P. O; DI MAURO, A. O; ABDELNOOR, R. V. (2007a). **Mapeamento Molecular de um Gene de Resistência ao Oídio da Soja.** In: IV Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, 2007, São Lourenço. IV Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas.

CATELLI, L. L.; ARIAS, C. A. A.; CAMARGO, P. O; ABDELNOOR, R. V. (2007b). **Mapeamento molecular do gene de resistência à ferrugem asiática nos genótipos PI200487 (Kinoshita) e Shiranui.** In: XL Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2007, Maringá. XL Congresso Brasileiro de Fitopatologia.

CATELLI, L. L. (2005). **Caracterização de Cultivares de Soja Utilizando Marcadores Moleculares Microssatélites**. 104f, Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

CHOI, I-Y.; HYTEN, D. L.; MATUKUMALLI, L. K.; SONG, Q.; CHAKY, J. M.; QUIGLEY, C. V.; CHASE, K.; LARK, K. G.; REITER, R. S.; YOON, M-S.; HWANG, E-Y.; YI, S-I.; YOUNG, N. D.; SHOEMAKER, R. C.; VAN TASSELL, C. P.; SPECHT, J. E.; CREGAN, P. B. (2007). **A soybean transcript map: gene distribution, haplotype and single-nucleotide polymorphism analysis**. *Genetics*, Austin, v. 176, n. 1, p. 685-696.

COBER, E. R; VOLDENG, H. D (2001) **A new soybean maturity and photoperiodsensitivity locus linked to *E1* and *T***. *Crop Sci* 41:698–701.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (Conab). Disponível no site <<http://www.conab.gov.br>>, acesso em janeiro de 2010.

CONCIBIDO, V. C.; LANGE, D. A.; DENNY, R. L.; ORF, J. H.; YOUNG, N. D. (1997). **Genome mapping of soybean cyst nematode resistance genes in Peking, PI 90763, and PI 88788 using DNA markers**. *Crop Science*, v.37, p.258-264.

CONCIBIDO, V. C.; YOUNG, N. D.; LANGE, D. A.; DENNY, R. L.; DANESH, D; ORF, J. H. (1996). **Targeted comparative genome analysis and qualitative mapping of a major partial-resistance gene to the soybean cyst nematode**. *Theoretical & Applied Genetics*, 93:234-241.

CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM. Disponível em <<http://www.consorcioantiferrugem.net/>>, acessado em janeiro de 2010.

CREGAN, P. B.; JARVIK, T.; BUSH, A. L.; SHOEMAKER, R. C.; LARK, K. G.; KAHLER, A. L.; KAYA, N.; VAN TOAL, T. T.; LOHNES, D. G.; CHUNG, J.; SPECHT, J. E. (1999). **An integrated genetic linkage map of the soybean genome**. *Crop Science*, Madison, v. 39, n. 5, p. 1464 - 1491.

CRUZ, C. D. (2001). **Programa Genes: versão Windows; aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: UFV.

CSANADI, G; VOLLMANN, J; STIFT, G; LELLEY, T. (2001) **Seed quality QTLs identified in a molecular map of early maturing soybean**. *Theor Appl Genet* 103:912–919

DEL PONTE, E. M.; GODOY, C. V.; LI, X.; YANG, X. B. (2006). **Predicting severity of asian soybean rust epidemics with empirical rainfall models**. *Phytopathology*, 96:797 – 803.

DIERS, B. W.; KEIM, P.; FEHR, W. R.; SHOEMAKER, R. C. (1992) **RFLP analysis of soybean seed protein and oil content**. *Theor. Appl. Genet.* 83: 608-612.

DOMIT, L. A.; PÍPOLO, A. E.; MIRANDA, L. C. GUIMARÃES, M. F. (2007). **Transferência de tecnologia para cultivares de soja desenvolvidas pela Embrapa Soja para o Paraná**. *Rev. Bras. Sementes*. v.29, p.1 - 9.

EMBRAPA SOJA. **História**. Disponível em <<http://www.cnpso.embrapa.com.br>>, acessado em janeiro de 2010.

EMBRAPA SOJA, EMBRAPA CERRADO, EMBRAPA AGROPECUÁRIA OESTE. (2007). **Tecnologia de Produção de Soja, Região Central do Brasil**.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. (2006). **Tecnologias de produção de soja: Paraná 2007**. Londrina: Embrapa Soja, 217p.

FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. C. (1996). **Introduction to Quantitative Genetics**. 4th ed. Essex, UK: Longman, 464 p, Viçosa, UFV

FARIAS NETO, A. L. de; HASHMI, R.; SCHMIDT, M.; CARLSON, S. R.; HARTMAN, G. L.; LI, S.; NELSON, R. L.; DIERS, B. W. (2007). **Mapping and confirmation of a new sudden death syndrome resistance QTL on linkage group D2 from the soybean genotypes PI 567374 and Ripley**. *Molecular Breeding*, v.20, p.53-62.

FASOULA, V. A.; HARRIS, D. K.; BOERMA, H. R. (2004). **Validation and designation of quantitative trait loci for seed protein, seed oil, and seed weight from two soybean populations**. *Crop Science*, v.44, p.1218-1225.

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

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. (1998). **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª ed. Brasília: Embrapa - Cernargen. 220p.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (1999). **Food labeling: health claims; soy protein and coronary heart disease**. *Federal Register*, 64: 57699-733.

FUNATSUKI, H.; KAWAGUCHI, K.; MATSUBA, S.; SATO Y.; ISHIMOTO, M.; (2005) **Mapping of QTL associated with chilling tolerance during reproductive growth in soybean.** Theor. Appl. Genet. 111: 851–861.

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

GLOVER, K. D.; WANG, D.; ARELLI, P. R.; CARLSON, S. R.; CIANZIO, S. R.; DIERS; B.W. (2004). **Near isogenic lines confirm a soybean cyst nematode resistance gene from PI 88788 on linkage group J.** Crop Sci. 44:936–941.

GODOY, C. V.; CANTERI, M. G. (2004). **Efeitos protetor, curativo e erradicante de fungicidas no controle da ferrugem da soja causada por *Phakopsora pachyrhizi*, em casa de vegetação.** Fitopatologia Brasileira 29:097-101.

GRAHAM, M. A., MAREK, L. F., AND SHOEMAKER, R. C. (2002). **Organization, Expression and Evolution of a Disease Resistance Gene Cluster in Soybean.** Genetics 162, 1961-1977.

GUIMARÃES, C. T., MOREIRA, M. A. (1999) **Genética Molecular Aplicada ao Melhoramento de Plantas.** In: BORÉM, A. (Ed.) Melhoramento de espécies cultivadas. Viçosa: UFV, p. 715-740.

HARTMAN, G. L.; BONDE, M. R.; MILES, M. M.; FREDERICK, R. D. (2004). **Variation of *Phakopsora pachyrhizi* isolates on soybean.** In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 7.; INTERNATIONAL SOYBEAN PROCESSING AND UTILIZATION CONFERENCE, 4.; CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 3., 2004, Foz do Iguassu. Proceeding. Londrina: Embrapa Soybean.

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

HENNING, A. A.; GODOY, C. V. (2006). **Situação da ferrugem da soja no Brasil e no mundo.** In: Zambolim, L. Ferrugem Asiática da Soja, Viçosa, MG, Ed. UFV, p. 1-14.

HNETKOVSKY, N; CHANG, S. J. C; DOUBLER, TW; GIBSON, P. T; LIGHTFOOT, D. A. (1996). **Genetic mapping of loci underlying field resistance to soybean sudden death syndrome (SDS).** Crop Sci 36:393–400

HYTEN, D. L., SMITH, J. R., FREDERICK, R. D., TUCKER, M. L., SONG, Q. J., AND CREGAN, P. B. (2009). **Bulked Segregant Analysis Using the Goldengate Assay to Locate the Rpp3 Locus That Confers Resistance to Soybean Rust in Soybean.** *Crop Science* 49, 265-271.

HYTEN, D. L.; PANTALONE, C. E.; SAMS, A. M.; SAXTON, D.; LANDAU-ELLIS, T. R.; STEFANIAK, T. R.; SCHMIDT, M. E. (2004) **Seed quality QTL in a prominent soybean population.** *Theor Appl Genet* 109:552–561

IQBAL, M. J.; MEKSEM, K.; NJITI, V. N.; KASSEM, M. Y. A.; LIGHTFOOT, D. A. (2001) **Microsatellite markers identify three additional quantitative trait loci for resistance to soybean sudden-death syndrome (SDS) in Essex × Forrest RILs.** *Theor. Appl. Genet.* 102: 187-192.

JIANG, C.; ZENG, Z-B. (1995). **Multiple trait analysis of genetic mapping for quantitative trait loci.** *Genetics, Austin*, v.140, n.3, p. 1111-1127.

KABELKA, E. A.; DIERS, B. W.; FEHR, W. R.; LEROY, A. R.; BAIANU, I. C.; YOU, T.; NEECE, D. J.; NELSON, R. L. (2004). **Putative alleles for increased yield from soybean Plant Introduction.** *Crop Sci.* 44:784–791.

KANAZIN, V.; MAREK, L. F.; SHOEMAKER, R. C. (1996). **Resistance Gene Analogs are conserved and clustered in soybean.** *PNAS USA*, v. 93, n. 21, p. 11746-11750.

KATO, M; YORINORI, J. T (2008). **A study on a race composition of *Phakopsora pachyrhizi* in Brazil: a difficulty of race identification.** *JIRCAS Working Rep* 58.

KEIM, P.; DIERS, B. W.; OLSON, T. C.; SHOEMAKER, R. C. (1990) **RFLP mapping in soybean: association between marker loci and variation in quantitative traits.** *Genetics, Austin*, v. 126, n. 3, p. 735-742.

KIM, H. S; DIERS, B. W. (2000). **Inheritance of partial resistance to sclerotinia stem rot in soybean.** *Crop Science* 40, pp. 55–61.

KIMATI, H. & BERGAMIN FILHO, A. (1995). **Princípios gerais de controle.** In: Bergamin Filho, A., Kimati, H. & Amorim, L. (Eds.) *Manual de Fitopatologia. Volume 1: Princípios e conceitos.* 3. ed. São Paulo. Editora Agronômica Ceres. p.692-709.

KOMATSU, K; OKUDA, S; TAKAHASHI, M; MATSUNAGA, R; NAKAZAWA, Y. (2005) **QTL mapping of antibiosis resistance to common cutworm (*Spodoptera litura* Fabricius) in soybean.** Crop Sci 45:2044-2048

LANDER, E. S; GREEN, P.; ABRAHAMSON, J.; BARLOW, A.; DALY, J. M.; LINCON, S. E.; NEWBERG, L. (1987). **Genomics**, n.1, p.174-181.

LAPERUTA, L. di. C. (2007). **Teste de alelismo para genes de resistência á ferrugem asiática da soja.** Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Londrina, Londrina-Paraná, 83 p.

LARK, K. G.; WEISEMANN, J. M.; MATHEWS, J. M.; PALMER, R.; CHASE, K.; MACALMA, T. (1993). **A genetic map of soybean (*Glycine max* L.) using an intraspecific cross of two cultivars: 'Minsoy' and 'Noir 1'.** Theoretical and Applied Genetics, Berlin, v. 86, n. 8, p. 901-906.

LEE, S. H.; BAILEY, M. A.; MIAN, M. A. R.; CARTER JUNIOR, T. E.; SHIPE, E. R.; ASHLEY, D. A. PARROTT, W. A.; HUSSEY, R. S.; BOERMA, H. R. (1996) **RFLP loci associated with soybean seed protein and oil content across populations and locations.** Theor. Appl. Genet. 93: 649-657.

LEWERS, K. S., CRANE, E. H.; BRONSON, C. R.; SCHUPP, J. M.; KEIM, P.; SHOEMAKER, R. C. (1999). **Detection of linked QTL for soybean brown stem rot resistance in 'BSR101' as expressed in a growth chamber environment.** Mol. Breed. 5:33-42.

LI, Z. L., WILSON, R. F.; RAYFORD, W. E.; BOERMA, H. R. (2002) **Molecular mapping genes conditioning reduced palmitic acid content in N87-2122-4 soybean.** Crop Sci. 42: 373-378.

MANSUR, L. M., ORF, J. H.; CHASE, K.; JARVIK, T.; CREGAN, P. B.; LARK, K. G.; (1996) **Genetic mapping of agronomic traits using recombinant inbred lines of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.].** Crop Science 36:1327-1336

MANSUR, L. M., ORF, J. H.; LARK, K. G.; (1993a) **Determining the linkage of quantitative trait loci to RFLP markers using bulked DNA from extreme phenotypes of recombinant inbreds of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.).** Theor. Appl. Genet. 86:914-918.

MANSUR, L. M., LARK, K. G.; KROSS, H.; OLIVEIRA, A. (1993b) **Interval mapping of quantitative trait loci for reproductive, morphological and seed traits of soybean (*Glycine Max* L. Merrill).** Theor. Appl. Genet. 86:907-913.

MCLEAN, R. J.; BYRTH, D. E. (1980). **Inheritance of resistance to rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in soybeans**. Aust. J. Agric. Res., v. 31, p. 951-956.

MEKSEM, K; DOUBLER, T. W.; CHANCHAROENCHAI, K.; NJITI, V. N.; CHANG, S. J. C.; ARELLI, A. P. R.; CREGAN, P. E.; GRAY, L. E.; GIBSON, P. T.; LIGHTFOOT, D. A. (1999). **Clustering among loci underlying soybean resistance to *Fusarium solani*, SDS and SCN in near-isogenic lines**. Theoretical & Applied Genetics, 99:1131-1142.

MIAN, M. A; BAILEY, M. A; TAMULONIS, J. P; SHIPE, E. R; CARTER JUNIOR, T. E; PARROT, W. A; ASHLEY, D. A; HUSSEY, R. S; BOERMA, H. R. (1996). **Molecular markers associated with seed weight in two soybean populations**. Theor Appl Genet 93:1011–1016.

MONTEROS, M. J., MISSAOUI, A. M., PHILLIPS, D. V., WALKER, D. R., AND BOERMA, H. R. (2007). **Mapping and Confirmation of the 'Hyuuga' Red-Brown Lesion Resistance Gene for Asian Soybean Rust**. Crop Sci 47, 829-834.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A. M. (1993). **PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics**. Plant Journal, v.3, p.175-182.

NICHOLS, D. M; GLOVER, K. D; CARLSON, S. R; SPECHT, J. E.; DIERS, D. W. (2006). **Fine mapping of a seed protein QTL on soybean linkage group and its correlated effects on agronomic data**. Crop Sci 46:834-839.

NJITI V. N, MEKSEM K, IQBAL MJ, J. E. JOHNSON, K. F. ZOBRIST, V.Y. KILO, D. A. LIGHTFOOT (2002). **Common Loci Underlie Field Resistance to Soybean Sudden Death Syndrome in Forrest, Pyramid, Essex, and Douglas**. Theor Appl Genet 104: 294- 300

ORF, J. H.; CHASE, K.; ADLER, F. R.; MANSUR, L. M.; LARK, K. G. (1999a). **Genetics of soybean agronomic traits: II Interactions between yield quantitative trait loci in soybean**. Crop Sci. 39:1652–1657.

ORF, J. H.; CHASE, K.; JARVIK, T.; MANSUR, L. M.; CREGAN, P. B.; ADLER, F. R.; LARK, K. G. (1999b). **Genetics of soybean agronomic traits: I. Comparison of three related recombinant inbred populations**. Crop Sci. 39:1642–1651.

OYA, T.; NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER, N.; FARIAS, J. R. B.; TOBITA, S.; ITO, O. (2004). **Drought tolerance characteristics of brazilian soybean cultivars – evaluation and characterization of drought tolerance of various Brazilian soybean cultivars in the field**. Plant prod. Sci., p.129 – 137.

PALMER, R. G; KILEN, T. C. (1987) **Qualitative genetics and cytogenetics**. In: Wilcox JR (ed) Soybeans: Improvement, Production, and Uses (Agronomy 16). 2nd edition. American Society of Agronomy, Madison, pp 135-209.

PALOMEQUE, P.; LI-JUN, L.; LI, W.; HEDGES, B.; COBER, E. R.; RAJCAN, I. (2009a) **QTL in mega-environments: I. universal and specific seed yield QTL detected in a population derived from a cross of high-yielding adapted x highyielding exotic soybean lines**. Theoretical and Applied Genetics, Berlin, v. 119, n. 3, p. 417-427.

PALOMEQUE, L.; LI-JUN, L.; LI, W.; BRADLEY, H.; COBER, E. R.; RAJCAN, I. (2009b). **QTL in mega-environments: II. Agronomic trait QTL co-localized with seed yield QTL detected in a population derived from a cross of high-yielding adapted x high-yielding exotic soybean lines**. Theoretical and Applied Genetics, Berlin, v. 119, n. 3, p. 429-436.

PATZOLDT, M. E.; CARLSON, S. R.; DIERS, B. W. (2005). **Characterization of resistance to brown stem rot of soybean in five accessions from central China**. Crop Sci., 45, 1092–1095.

PEREIRA, M. G.; PEREIRA, T. N. S. (2006). **Marcadores Moleculares no Pré – Melhoramento de Plantas**. In: Borém, A.; Caixeta, E.T.; Marcadores Moleculares. Viçosa, MG, Ed. UFV, p. 85 – 106.

PIEROZZI, P. H. B. (2007). **Controle genético da resistência da soja à ferrugem asiática: avaliações de severidade em campo experimental**. 2007, 123f, Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

PÍPOLO, V. C.; GARCIA, J. E.; RINALDI, D. A. (2006). **Desenvolvimento e aplicações de marcadores moleculares**. In: Pípolo, V. C.; Garcia, J.E. Biotecnologia na Agricultura: aplicações e biossegurança. Londrina, PR, Ed.UEL, p. 1-29.

POWELL, W.; MACHRAY, G. C.; PROVAN, J. (1996). **Polymorphism revealed by simple sequence repeats**. Trends in Plant Science, v.1, p.215-222.

PRABHU, R. R; NJITI, V. N; BELL JOHNSON, B; JOHNSON, J. E; SCHMIDT, M. E; KLEIN, J. H; LIGHTFOOT, D. A. (1999) **Selecting soybean cultivars for dual resistance to soybean cyst nematode and sudden death syndrome using two DNA markers**. Crop Sci 39:982–987

QIU, B. X.; ARELLI, P. R.; SLEPER, D. A. (1999) **RFLP markers associated with soybean cyst nematode resistance and seed composition in a 'Peking' × 'Essex' population.** Theor. Appl. Genet. 98: 356-364.

RACHID, B. F. (2008). **Identificação de novos locos de resistência à ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) em soja (*Glycine max*).** 2008, 60f, Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

REIS, E. M.; BRESOLIN, A. C. (2004). **Ferrugem da Soja: Revisão e aspectos técnicos.** In: Fercelini, C. A.; Reis, E. M.; Gassen, F.; Yorinori, J. T.; Hoffmann, L.; Costamilan, L.; Silva, O. C. da; Balardin, R.; Casa, R.T. Doenças na Cultura da Soja. Passo Fundo, RS, Ed. Aldeia Norte, p. 55 - 70.

RIBEIRO, A. S. (2009). **Estratégias para a obtenção de linhagens com resistência durável à ferrugem asiática da soja.** 2009, Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

RIBEIRO, A. S. (2006). **Controle genético da produtividade de grãos da soja em presença e ausência da ferrugem asiática.** 2007, 60f, Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. (1989). **Molecular cloning: A laboratory Manual.** Second edition. New York. Cold spring Harbor.

SANTOS, J. V. M. DOS; YAMANAKA, N.; SILVA, D. C. G.; PASSIANOTTO, A. L. L.; NOGUEIRA, L. M.; TOBITA, S.; ARIAS, C. A. A.; NEPOMUCENO, A. L.; ABDELNOOR, R. V. (2007). **Desenvolvimento de Linhagens Endogâmicas Recombinantes para a Análise Genética da Tolerância à Ferrugem Asiática da Soja.** In: IV Congresso Brasileiro de Melhoramento, São Lourenço, MG, UFLA.

SANTOS M. A, NICOLAS M. F, HUNGRIA M (2006) **Identificação de QTL associados à simbiose entre *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii* e soja.** Pesq. Agropec. Bras. 41:67-75

SANTOS, O. S. (1988). **A cultura da soja, 1: Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná.** Rio de Janeiro: Globo.

SAS INSTITUTE. (1990). **SAS/STAT user's guide.** Cary: Statistical Analysis System Institute, 956p.

SCHNEIDER, R. W.; HOLLIER, C. A.; WHITAM, H. K.; PALM, M. E.; MCKEMY, J. M.; HERNÁNDEZ, J. R.; LEVY, L.; DEVRIES-PATERSON, R. (2005) **First report of soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* in the continental United States**. Plant Dis. 89:774. [Online.]doi: 10.1094/PD-89-0774A.

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

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

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. (1974). **A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance**. Biometrics, v. 30, n. 2, p. 507-512.

SEBOLT, A. M.; SHOEMAKER, R. C.; DIERS, B. W. (2000) **Analysis of a quantitative trait locus allele from wild soybean that increases seed protein concentration in soybean**. Crop Sci. 40: 1438-1444.

SHOEMAKER, R. C.; SPECHT, J. E. (1995). **Integration of the soybean molecular and classical genetic linkage groups**. Crop Science, Madison, v. 35, n. 2, p. 436-446.

SOARES, R. M.; RUBIN, S. A. L.; WIELEWICKI, A. P.; OZELAME, J. G. (2004). **Fungicidas no controle da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) e produtividade da soja**. Ciência Rural, Santa Maria, v. 34, n. 4, p. 1245-1247.

SONG, Q. J.; MAREK, L. F.; SHOEMAKER, R. C.; LARK, K. G.; CONCIBIDO, V. C.; DELANNAY, X.; SPECHT, J. E.; CREGAN, P. B. (2004). **A new integrated genetic linkage map of the soybean**. Theoretical and Applied Genetics, Berlin, v.109, n. 1, p. 122-128.

SOUZA, A. P. (2001). **Biologia molecular aplicada ao melhoramento**. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELLO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. (Ed.) Recursos genéticos e Melhoramento de plantas. Rondonópolis: Fundação MT, p.939-965.

SPECHT, J. E; CHASE, K; MACRANDER, M; GRAEF, G. L; CHUNG, J. U; MARKWELL, J. P; GERMANN, M; ORF, J. H; LARK, K. G. (2001). **Soybean response to water: a QTL analysis of drought tolerance.** *Crop Sci* 41:493–509

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

TAKAHASHI, R. (1997). **Association of soybean genes *I* and *T* with lowtemperature induced seed coat deterioration.** *Crop Sci* 37:1755–1759

TAMULONIS, J. P., LUZZI, B. M.; HUSSEY, R. S.; PARROTT, W. A.; BOERMA, H. R. (1997). **DNA marker analysis of loci conferring resistance to peanut root-knot nematode in soybean.** *Theor. Appl. Genet.* 95:664–670.

TASMA, I. M; LORENZEN, L. L; GREEN, DE; SHOEMAKER, R. C. (2001) **Mapping genetic loci for flowering times, maturity and photoperiod insensitivity in soybean.** *Mol Breed* 8:25–35

TERRY, L. I.; CHASE, K.; JARVIK, T; ORF, J.; MANSUR, L.; LARK, K. G. (2000). **Soybean quantitative trait loci for resistance to insects.** *Crop Sci* 40:375–382.

WANG, C; ULLOA, M; ROBERTS, P. (2006) **Identification and mapping of microsatellite markers linked to a root-knot nematode resistance gene (*rkn1*) in Acala NemX cotton.** *Theor Appl Genet* 112:770–777

WANG, D.; GRAEF, G. L.; PROCOPIUK, A. M.; DIERS, B. W. (2004). **Identification of putative QTL that underlie yield in interspecific soybean backcross populations.** *Theor Appl Genet* 106:575-582.

WATANABE, S.; TAJUDDIN, T.; YAMANAKA, N.; HAYASHI, M; HARADA, K. (2004). **Analysis of QTLs for Reproductive Development and Seed Quality Traits in Soybean using Recombinant Inbred Lines.** *Breed. Sci.* 54: 399-407

WEBB, D. M; BALTAZAR, B. M; RAO-ARELLI, A. P; SCHUPP, J; CLAYTON, K; KEIM, P; BEAVIS, W. D. (1995) **Genetic mapping of soybean cyst-nematode race-3 resistance loci in soybean PI 437.654.** *Theor Appl Genet* 91:574–581

WENG, C.; YU, K.; ANDERSON, T. R.; POYSA, V. (2001). **Mapping genes conferring resistance to *Phytophthora* root rot of soybean, *Rps1a* and *Rps7*.** *J. Hered.* 92: 442–446.

YAMANAKA, N.; SILVA, D. C. G.; PASSIANOTTO, A. L. L.; NOGUEIRA, L. M.; POLIZEL, A. M.; PEREIRA, S. S.; SANTOS, J. V. M.; BROGIN, R. L.; ARIAS, C. A. A.; HOFFMANNCAMPO, C. B.; NEPOMUCENO, A. L.; ABDELNOOR, R. V. (2008) **Identification of DNA Markers and Characterization of the Genes for Resistance against Asian Soybean Rust.** JIRCAS Working Rep 58: 99-107

YAMANAKA, N.; OLIVEIRA, M. C. N.; YANG, Z.; ABDELNOOR, R. V.; NEUMAIER, A. L.; NEPOMUCENO, A. L. (2006). **Correlação entre 21 características observadas em 225 genótipos de soja do noroeste da China.** IV Congresso Brasileiro de Soja, Embrapa Soja, Londrina, p. 103.

YAMANAKA, N.; WATANABE, S.; TODA, K.; HAYASHI, M.; FUCHIGAMI, H.; TAKAHASHI, R.; HARADA, K. (2005). **Fine mapping of the FT1 locus for soybean flowering time using a residual heterozygous line derived from a recombinant inbred line.** Theor Appl Genet 110:634-639

YAMANAKA, N.; NINOMIYA, S.; HOSHI, M.; TSUBOKURA, Y.; YANO, M.; NAGAMURA, Y.; SASAKI, T.; HARADA, K. (2001). **An informative linkage map of soybean reveals QTLs for flowering time, leaflet morphology and regions of segregation distortion.** DNA Research, 8, 61-72.

YORINORI, J. T. (2005). **A ferrugem asiática da soja no continente americano: evolução, importância econômica e estratégias de controle.** IN: JULIATTI, F. C.; POLIZEL, A. C.; HAMAWAKI, O. T. (ed). I Workshop brasileiro sobre a ferrugem asiática, Uberlândia, EDUUFU, p.21-23.

YORINORI, J. T.; NUNES JÚNIOR, J.; GODOY, C. V.; LAZZAROTTO, J. J. (2004). **Situação da ferrugem asiática no Brasil, 2003/04.** IN: Resumos da reunião de pesquisa de soja da região central do Brasil, Londrina: Embrapa Soja: Fundação Meridional, Documentos/Embrapa Soja, n.234), p.330.

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

YUE, P.; ARELLI, P. R.; SLEPER, D. A. (2001). **Molecular characterization of resistance to *Heterodera glycines* in soybean PI 438489B.** Theoretical and Applied Genetics 102:921-928.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; CHAVES, G. M. (1983). **Partial resistance of soybean cultivars to *Phakopsora pachyrhizi*.** Fitopatologia Brasileira, v.8, n.1, p.117-122.

ZENG, G.; LI, D.; HAN, Y.; TENG, W.; WANG, J.; QIU, L.; LI, W. (2009) **Identification of QTL underlying isoflavone contents in soybean seeds among multiple environments.** Theoretical and Applied Genetics, Berlin, v. 118, n. 8, p. 1455-1463.

ZIMMERMANN, F. J. P. (2004). **Estatística aplicada à pesquisa agrícola.** Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA Arroz e Feijão.

ANEXOS

ANEXO A – Valores de médias, variância e nota do teste de Scott-Knott realizado pelo programa Genes para cada característica estudada

Trat	CF	Data de Floração			Altura Floração			Data Maturação			Altura Maturação			Número de Nós			Peso Total			Peso de 100			Severidade		
		F	m		m	N	σ^2	m	N	σ^2	m	N	σ^2	m	N	σ^2	m	N	σ^2	m	N	σ^2	m	N	σ^2
RIL 1	B	54,8	d	7,7	83,0	a	42,3	142,0	a	14,7	115,4	b	346,3	14,3	c	8,3	7,40	c	5,10	7,10	e	0,30	30,0	a	189,00
RIL 2	R	48,4	f	0,8	47,0	d	15,2	114,0	d	9,8	71,4	d	23,3	13,0	d	1,5	7,40	c	15,40	8,30	d	0,90	23,8	b	81,60
RIL 3	R	49,6	f	0,8	63,0	c	34,7	113,0	d	0,8	83,6	d	32,3	15,2	c	2,2	13,60	b	65,20	8,70	d	1,20	22,7	b	9,30
RIL 4	R	56,6	d	1,3	74,0	b	103,8	131,0	b	290,3	94,6	c	33,8	13,6	c	8,8	7,80	c	27,00	7,00	e	0,10	19,0	b	44,00
RIL 5	R	58,6	c	57,3	87,0	a	183,3	137,0	a	142,3	117,6	a	338,3	14,6	c	20,8	5,80	c	4,20	7,00	e	0,80	18,5	b	19,70
RIL 6	R	58,3	c	2,3	80,0	b	1,6	135,0	b	81,0	127,8	a	350,9	14,3	c	17,6	7,50	c	52,20	7,00	e	0,20	22,5	b	97,70
RIL 7	B	51,2	e	10,7	62,0	c	76,7	114,0	d	15,2	79,6	d	54,3	13,0	d	3,5	12,90	b	5,90	9,80	c	1,80	27,4	a	88,80
RIL 8	B	49,8	f	0,7	57,0	d	37,7	116,0	d	14,7	80,6	d	47,8	13,6	c	1,3	8,50	c	17,80	8,40	d	0,40	23,8	b	58,90
RIL 9	R	52,8	e	1,2	67,0	c	182,8	113,0	d	0,8	88,0	d	171,0	14,2	c	2,7	10,80	b	16,80	9,20	d	0,30	11,6	c	47,30
RIL 10	R	56,6	d	5,3	77,0	b	105,0	126,0	c	153,2	89,4	c	323,3	13,8	c	7,7	7,30	c	2,70	8,70	d	0,40	15,4	c	18,80
RIL 11	R	48,4	f	1,8	55,0	d	26,0	114,0	d	12,0	97,0	c	76,5	16,2	c	3,7	19,20	a	21,70	11,00	b	0,60	22,3	b	126,30
RIL 12	B	57,8	c	0,7	76,0	b	15,7	132,0	b	97,2	93,6	c	92,3	12,4	d	3,3	5,20	d	5,80	7,00	e	1,80	17,8	c	70,20
RIL 13	B	54,8	d	56,7	57,0	d	40,7	119,0	c	12,8	85,8	d	74,2	15,2	c	4,7	9,60	c	10,10	9,80	c	0,60	15,0	c	83,00
RIL 14	R	51,0	e	11,5	58,0	c	62,8	115,0	d	12,8	87,0	d	33,0	14,6	c	6,8	11,50	b	30,20	9,10	d	1,10	18,4	b	32,30
RIL 15	B	54,8	d	2,7	78,0	b	56,5	119,0	c	16,0	99,5	c	57,0	17,3	b	1,6	7,40	c	8,10	9,60	c	0,30	22,6	b	91,30
RIL 16	R	51,4	e	2,8	62,0	c	113,3	118,0	d	19,0	84,5	d	420,5	11,5	d	40,5	4,30	d	7,30	10,60	b	0,00	23,5	b	263,00
RIL 17	R	54,6	d	3,8	71,0	b	62,3	118,0	d	17,8	93,2	c	21,7	16,2	c	2,7	9,80	c	14,10	8,90	d	0,30	12,0	c	45,50
RIL 18	R	49,0	f	8,5	51,0	d	19,0	114,0	d	15,6	83,5	d	190,3	14,3	c	10,3	11,30	b	24,20	9,60	c	0,00	17,4	c	78,30
RIL 19	R	55,6	d	1,3	75,0	b	30,8	144,0	a	12,3	119,5	a	109,7	16,3	c	5,6	9,50	c	23,20	8,00	e	1,90	19,8	b	63,20
RIL 20	B	54,6	d	2,3	72,0	b	26,8	120,0	c	15,2	123,2	a	47,2	23,0	a	4,0	9,40	c	9,20	8,50	d	0,20	27,8	a	154,90
RIL 21	R	53,8	e	2,2	69,0	c	12,8	117,0	d	16,0	102,0	c	388,0	15,3	c	5,3	4,40	d	4,10	.	f	.	22,4	b	53,30
RIL 22	R	49,8	f	6,9	56,0	d	139,7	113,0	d	9,0	87,0	d	98,7	9,8	d	1,6	8,20	c	19,60	11,00	b	0,20	12,0	c	18,70
RIL 23	B	56,2	d	2,7	78,0	b	53,5	142,0	a	14,7	95,8	c	52,3	9,0	d	11,3	0,90	d	0,20	.	f	.	12,6	c	68,30
RIL 24	R	52,8	e	4,7	64,0	c	70,8	116,0	d	14,7	79,2	d	37,7	11,6	d	9,3	6,60	c	20,00	10,40	c	3,20	10,4	c	75,30
RIL 25	R	49,0	f	2,0	66,0	c	448,3	114,0	d	15,6	77,5	d	105,0	12,0	d	0,7	8,00	c	10,30	8,90	d	1,30	23,5	b	183,00

Trat, RILs ou Parentais; F, RIL utilizadas; CF, coloração da flor; R, flor roxa; B, flor branca; m, média da característica estudada; N, nota atribuída pelo teste de Scott-Knott; σ^2 , variância da característica estudada.

Trat	CF	Data de Floração			Altura Floração			Data Maturação			Altura Maturação			Número de Nós			Peso Total			Peso de 100			Severidade		
		F	m	m	N	σ^2	m	N	σ^2	m	N	σ^2	m	N	σ^2	m	N	σ^2	m	N	σ^2	m	N	σ^2	
RIL 26	B	59,8	c	22,7	83,0	a	185,7	135,0	b	166,3	127,0	a	8,0	18,0	b	18,0	5,20	d	3,60	6,70	e	0,50	31,0	a	2,00
RIL 27	B	49,5	f	11,7	56,0	d	168,0	112,0	d	1,3	100,0	c	304,0	12,3	d	2,3	14,00	b	53,80	10,90	b	1,70	3,0	c	4,00
RIL 28	B	55,4	d	9,8	72,0	b	106,7	121,0	c	0,0	90,3	c	30,9	16,0	c	0,7	4,60	d	4,40	9,30	d	0,20	15,8	c	52,30
RIL 29	R	52,8	e	6,3	67,0	c	66,3	118,0	d	21,3	126,7	a	133,3	19,0	b	9,0	6,90	c	29,20	8,90	d	0,50	16,5	c	9,70
RIL 30	R	54,8	d	15,2	75,0	b	66,8	118,0	d	135,2	85,8	d	47,2	11,6	d	18,3	4,70	d	27,50	8,40	d	0,10	31,8	a	128,30
RIL 31	B	56,4	d	7,3	78,0	b	24,3	116,0	d	14,7	118,8	a	8,9	22,0	a	6,0	6,60	c	7,70	9,40	c	0,10	21,6	b	50,30
RIL 32	B	57,5	c	23,0	82,0	a	131,0	126,0	c	283,0	126,7	a	133,3	14,3	c	30,3	8,00	c	13,10	10,30	c	1,40	10,8	c	38,30
RIL 33	R	49,6	f	8,3	57,0	d	113,5	116,0	d	23,2	87,2	d	312,7	14,6	c	5,3	8,60	c	19,50	9,40	d	1,70	16,0	c	134,00
RIL 34	B	63,5	b	19,7	95,0	a	173,7	141,0	a	12,3	116,8	a	121,6	12,5	d	6,3	4,50	d	9,50	7,30	e	0,10	30,7	a	34,30
RIL 35	R	55,3	d	4,9	84,0	a	56,3	141,0	a	12,3	126,0	a	306,0	11,3	d	3,6	3,80	d	0,60	.	f	.	22,7	b	41,30
RIL 36	B	50,7	e	6,3	62,0	c	163,0	112,0	d	1,3	100,7	c	26,3	15,3	c	5,3	12,50	b	48,30	8,90	d	0,20	31,3	a	40,30
RIL 37	R	58,6	c	2,8	83,0	a	30,7	140,0	a	9,8	108,8	b	154,7	13,0	d	2,5	1,30	d	1,50	.	f	.	5,2	c	14,70
RIL 38	B	77,5	a	1,0	101,0	a	32,3	144,0	a	16,3	94,7	c	386,3	9,3	d	2,3	0,50	d	0,00	.	f	.	39,0	a	48,00
RIL 39	B	57,5	c	8,3	76,0	b	52,3	115,0	d	16,0	102,0	c	22,0	16,5	b	1,0	6,60	c	11,70	9,70	c	0,00	12,5	c	57,00
RIL 40	B	48,3	f	0,3	49,0	d	1,7	114,0	d	15,6	68,5	d	23,0	11,5	d	3,0	10,90	b	13,00	8,80	d	0,70	19,0	b	18,00
RIL 41	R	52,0	e	14,0	64,0	c	214,9	115,0	d	12,3	101,8	c	300,9	17,0	b	6,0	15,50	a	23,40	10,00	c	0,60	16,5	c	41,00
RIL 42	R	59,7	c	1,3	76,0	b	36,3	143,0	a	24,5	101,0	c	50,0	9,5	d	24,5	2,40	d	7,20	.	f	.	19,5	b	60,50
RIL 43	R	53,3	e	2,3	63,0	c	158,3	115,0	d	16,3	82,0	d	13,0	12,0	d	7,0	10,40	b	14,00	11,00	b	0,80	32,0	a	75,00
RIL 44	B	54,2	d	15,2	78,0	b	93,3	123,0	c	122,9	86,5	d	81,0	12,8	d	17,6	9,30	c	8,00	7,90	e	0,10	22,4	b	20,30
RIL 45	R	57,3	c	8,3	87,0	a	70,3	121,0	c	.	125,0	a	.	23,0	a	.	.	d	.	.	f	.	5,0	c	7,00
RIL 46	B	51,4	e	1,3	62,0	c	98,7	114,0	d	12,0	100,2	c	43,7	14,8	c	6,7	7,50	c	10,40	9,70	c	0,80	19,4	b	65,30
RIL 47	R	56,8	c	0,7	79,0	b	14,8	135,0	b	163,2	124,0	a	72,0	15,0	c	26,0	5,00	d	1,70	7,40	e	0,30	23,0	b	117,00
RIL 48	B	47,6	f	0,8	59,0	c	24,8	112,0	d	1,2	95,2	c	87,7	14,8	c	3,2	23,10	a	56,60	10,80	b	0,50	17,5	c	17,00
RIL 49	B	56,4	d	1,3	81,0	b	45,7	127,0	c	130,8	135,0	a	475,0	19,6	a	27,8	3,40	d	2,50	7,70	e	0,00	23,8	b	41,60
RIL 50	B	56,6	d	2,3	75,0	b	6,5	141,0	a	16,3	93,7	c	122,3	11,3	d	1,3	12,60	b	0,90	8,40	d	0,00	37,3	a	401,30

Trat, RILs ou Parentais; F, RIL utilizadas; CF, coloração da flor; R, flor roxa; B, flor branca; m, média da característica estudada; N, nota atribuída pelo teste de Scott-Knott; σ^2 , variância da característica estudada.

Trat	CF	Data de Floração			Altura Floração			Data Maturação			Altura Maturação			Número de Nós			Peso Total			Peso de 100			Severidade		
		F	m	m N σ^2	m N σ^2	m N σ^2	m N σ^2	m N σ^2	m N σ^2	m N σ^2	m N σ^2	m N σ^2	m N σ^2	m N σ^2	m N σ^2	m N σ^2	m N σ^2	m N σ^2	m N σ^2	m N σ^2	m N σ^2				
RIL 51	R		51,2	e 3,2	61,0	c 62,8	116,0	d 11,6	93,5	c 32,3	13,5	c 15,0	7,70	c 38,70	10,40	c 1,60	14,6	c 37,80							
RIL 52	B		52,0	e 3,0	63,0	c 67,3	119,0	c 12,2	92,6	c 36,8	14,6	c 8,3	15,60	a 32,10	11,10	b 0,80	20,6	b 123,80							
RIL 53	R		51,4	e 8,3	62,0	c 149,3	127,0	c 272,2	105,8	b 111,2	15,6	c 14,3	9,90	c 35,70	9,40	d 1,60	19,6	b 84,80							
RIL 54	R		56,6	d 7,3	76,0	b 38,8	122,0	c 150,3	122,0	a 88,0	19,8	a 22,3	4,60	d 4,10	9,00	d 0,80	16,0	c 79,50							
RIL 55	B		52,0	e 5,0	66,0	c 91,3	115,0	d 10,2	83,0	d 42,5	15,0	c 1,0	12,70	b 16,30	9,90	c 0,60	6,2	c 29,20							
RIL 56	R		49,4	f 7,3	56,0	d 70,0	116,0	d 9,0	95,4	c 122,3	14,0	c 6,5	16,60	a 3,10	10,70	b 0,00	24,7	b 186,30							
RIL 57	R		55,4	d 2,8	78,0	b 41,3	122,0	c 179,8	103,2	b 40,7	15,8	c 1,2	5,80	c 14,60	8,60	d 0,10	20,0	b 283,30							
RIL 58	B		51,5	e 9,7	56,0	d 61,7	117,0	d 21,3	78,3	d 84,3	13,5	c 3,0	8,40	c 23,60	9,80	c 1,00	24,0	b 12,00							
RIL 59	R		50,6	e 10,8	55,0	d 100,8	113,0	d 1,0	95,8	c 105,6	15,3	c 16,3	2,70	d 0,50	.	f .	18,7	b 220,30							
RIL 60	B		49,0	f 7,0	59,0	c 89,7	114,0	d 13,8	103,4	b 207,8	13,4	c 6,3	8,20	c 24,90	10,20	c 0,20	16,6	c 54,80							
RIL 61	R		47,6	f 0,8	49,0	d 223,5	113,0	d 1,0	80,3	d 30,9	13,3	c 0,9	14,50	b 4,00	11,90	a 0,20	13,0	c 283,00							
RIL 62	B		52,4	e 9,8	67,0	c 100,3	115,0	d 10,2	93,8	c 14,2	13,2	d 15,2	10,00	c 12,40	8,10	e 2,60	25,5	b 45,70							
RIL 63	B		49,4	f 0,3	54,0	d 6,2	113,0	d 4,8	99,2	c 16,7	16,8	b 5,2	14,80	a 35,70	9,70	c 0,70	11,8	c 196,70							
RIL 64	B		47,4	f 2,8	51,0	d 38,7	115,0	d 13,2	92,0	c 96,5	14,6	c 3,3	12,60	b 53,00	9,40	d 0,20	10,0	c 134,50							
RIL 65	B		49,4	f 0,8	56,0	d 33,8	115,0	d 12,3	105,8	b 288,9	16,5	b 9,7	7,10	c 17,20	9,10	d 0,20	23,3	b 218,90							
RIL 66	B		54,3	d 0,3	68,0	c 4,0	113,0	d 0,0	99,5	c 0,5	15,5	c 0,5	7,30	c 1,00	8,30	d 0,50	7,5	c 4,50							
RIL 67	B		53,0	e 4,5	63,0	c 69,2	113,0	d 0,0	88,2	d 48,2	15,0	c 1,5	15,50	a 103,20	10,00	c 1,60	11,6	c 37,30							
RIL 68	B		53,8	e 2,7	75,0	b 45,2	124,0	c 157,8	130,2	a 1106,2	21,0	a 23,5	4,80	d 16,50	9,70	c 0,20	25,0	b 79,50							
RIL 69	R		56,4	d 5,8	76,0	b 56,7	142,0	a 14,7	113,4	b 269,3	14,0	c 8,5	6,10	c 13,40	8,90	d 0,20	16,8	c 38,30							
RIL 70	B		54,6	d 3,3	75,0	b 59,2	126,0	c 81,0	97,3	c 9,3	15,3	c 8,3	11,10	b 257,90	.	f .	25,2	b 87,70							
RIL 71	B		56,3	d 2,3	85,0	a 28,7	130,0	b 121,0	131,0	a 257,3	18,3	b 58,9	7,60	c 26,10	9,30	d 0,20	11,5	c 115,00							
RIL 72	R		57,0	c 6,5	72,0	b 147,7	117,0	d 8,3	113,4	b 20,8	18,4	b 3,8	9,60	c 4,80	11,20	b 1,30	9,0	c 62,00							
RIL 73	R		54,0	d 5,5	68,0	c 30,0	119,0	c 134,8	104,2	b 149,2	16,0	c 13,5	4,50	d 16,50	.	f .	28,0	a 82,70							
RIL 74	R		59,2	c 10,7	87,0	a 158,2	139,0	a 0,0	117,7	a 89,3	11,3	d 9,3	3,80	d 14,50	9,10	d 4,50	6,8	c 1,60							
RIL 75	B		54,8	d 0,7	74,0	b 34,7	119,0	c 14,9	108,8	b 147,6	20,3	a 23,6	5,60	d 21,50	7,70	e 0,30	10,4	c 87,80							

Trat, RILs ou Parentais; F, RIL utilizadas; CF, coloração da flor; R, flor roxa; B, flor branca; m, média da característica estudada; N, nota atribuída pelo teste de Scott-Knott; σ^2 , variância da característica estudada.

Trat	CF	Data de Floração			Altura Floração			Data Maturação			Altura Maturação			Número de Nós			Peso Total			Peso de 100			Severidade		
		F	m	m	N	σ^2	m	N	σ^2	m	N	σ^2	m	N	σ^2	m	N	σ^2	m	N	σ^2	m	N	σ^2	
RIL 76	R	48,8	f	2,2	62,0	c	429,3	113,0	d	0,0	83,6	d	73,3	14,4	c	1,8	12,20	b	10,40	11,20	b	0,50	9,8	c	15,70
RIL 77	R	54,5	d	0,3	64,0	c	26,7	117,0	d	21,3	87,3	d	24,9	14,8	c	2,3	12,80	b	43,10	7,90	e	2,80	9,5	c	72,30
RIL 78	B	54,4	d	2,8	75,0	b	9,7	119,0	c	12,2	99,8	c	32,2	13,8	c	3,7	16,60	a	31,60	9,70	c	1,00	10,2	c	94,70
RIL 79	B	51,6	e	3,3	66,0	c	41,3	117,0	d	14,2	85,4	d	3,8	14,6	c	5,3	8,80	c	42,00	9,00	d	0,50	12,2	c	79,70
RIL 80	B	50,4	e	11,3	60,0	c	113,7	116,0	d	23,2	87,4	d	250,8	14,2	c	2,2	17,30	a	71,60	10,70	b	4,00	7,3	c	20,30
RIL 81	B	57,5	c	3,7	78,0	b	6,9	118,0	d	19,0	102,7	b	329,3	16,7	b	20,3	5,10	d	0,20	7,20	e	0,30	17,8	c	37,60
RIL 82	R	57,2	c	10,2	84,0	a	80,3	121,0	c	112,8	132,0	a	70,0	20,8	a	1,6	4,50	d	10,40	8,00	e	1,10	10,2	c	153,70
RIL 83	B	57,2	c	6,7	82,0	a	18,7	141,0	a	12,3	121,8	a	46,9	16,5	b	9,7	12,90	b	34,70	9,30	d	0,30	5,2	c	4,20
RIL 84	B	55,0	d	1,0	69,0	b	114,3	113,0	d	.	112,0	b	.	19,0	b	.	.	d	.	.	f	.	18,5	b	0,50
RIL 85	R	53,8	e	0,2	67,0	c	31,7	117,0	d	16,0	87,2	d	65,2	15,0	c	2,5	10,70	b	9,50	9,10	d	2,30	11,6	c	47,30
RIL 86	R	51,6	e	2,3	63,0	c	29,7	115,0	d	12,8	100,6	c	36,8	17,8	b	6,2	19,90	a	74,80	10,00	c	1,10	6,4	c	54,80
RIL 87	B	52,8	e	7,7	69,0	b	49,7	117,0	d	16,3	83,7	d	12,3	12,7	d	6,3	18,50	a	98,40	8,80	d	1,00	10,4	c	60,30
RIL 88	R	48,0	f	2,0	54,0	d	35,3	117,0	d	146,8	92,8	c	85,7	13,6	c	7,8	15,50	a	32,40	9,90	c	2,40	8,4	c	38,30
RIL 89	B	54,6	d	0,8	72,0	b	55,2	123,0	c	92,0	95,0	c	13,0	16,2	c	3,7	10,80	b	12,70	6,80	e	0,50	18,6	b	74,80
RIL 90	B	49,6	f	9,3	52,0	d	95,3	115,0	d	18,3	88,2	d	319,2	12,4	d	13,3	18,20	a	51,10	11,00	b	0,40	11,8	c	116,20
RIL 91	B	58,0	c	18,0	90,0	a	40,3	126,0	c	225,3	125,5	a	181,7	22,0	a	19,0	15,00	a	7,90	8,90	d	0,10	21,8	b	38,30
RIL 92	R	49,2	f	0,2	47,0	d	7,2	116,0	d	14,7	65,4	d	22,3	11,6	d	3,3	10,20	b	47,50	9,90	c	0,80	28,3	a	133,30
RIL 93	R	57,2	c	5,2	80,0	b	68,2	143,0	a	16,3	91,8	c	3140,9	15,0	c	18,0	3,60	d	0,90	7,10	e	0,20	7,5	c	25,00
RIL 94	R	66,8	b	41,6	96,0	a	64,7	141,0	a	12,3	107,3	b	174,3	14,0	c	14,0	3,60	d	2,70	7,50	e	0,00	26,3	a	56,30
RIL 95	B	59,4	c	10,8	84,0	a	75,2	143,0	a	16,3	116,5	a	435,0	13,5	c	13,7	5,10	d	9,30	6,50	e	0,20	12,8	c	144,20
RIL 96	R	54,0	d	2,0	76,0	b	17,2	114,0	d	4,0	92,3	c	161,6	14,5	c	1,7	4,60	d	4,50	8,00	e	2,00	9,8	c	64,90
RIL 97	R	55,2	d	2,2	75,0	b	25,7	117,0	d	16,0	90,2	c	56,2	15,2	c	2,2	6,60	c	13,40	8,30	d	1,10	17,3	c	307,60
RIL 98	R	56,0	d	70,5	80,0	b	574,5	122,0	c	150,3	122,5	a	71,0	17,5	b	17,0	5,10	d	12,90	8,80	d	2,90	29,5	a	214,30
RIL 99	B	57,3	c	6,9	75,0	b	246,9	141,0	a	12,3	107,0	b	873,0	12,3	d	2,3	5,30	d	24,90	9,60	c	1,30	30,8	a	64,30
RIL 100	B	48,2	f	1,7	53,0	d	46,8	112,0	d	1,2	98,4	c	194,3	15,2	c	2,2	16,80	a	37,00	10,30	c	1,00	33,0	a	73,00

Trat, RILs ou Parentais; F, RIL utilizadas; CF, coloração da flor; R, flor roxa; B, flor branca; m, média da característica estudada; N, nota atribuída pelo teste de Scott-Knott; σ^2 , variância da característica estudada.

Trat	CF	Data de Floração			Altura Floração			Data Maturação			Altura Maturação			Número de Nós			Peso Total			Peso de 100			Severidade		
		F	m	m N σ^2	m N σ^2	m N σ^2	m N σ^2	m N σ^2	m N σ^2	m N σ^2	m N σ^2	m N σ^2	m N σ^2	m N σ^2	m N σ^2	m N σ^2	m N σ^2	m N σ^2	m N σ^2	m N σ^2	m N σ^2				
RIL 101	R	52,6	e	6,8	65,0	c	29,8	112,0	d	1,3	102,0	c	648,0	11,5	d	4,5	5,30	d	1,80	7,60	e	13,50	20,0	b	82,70
RIL 102	B	48,6	f	3,3	58,0	d	15,2	112,0	d	1,2	77,0	d	62,0	12,4	d	5,3	17,40	a	23,40	10,00	c	0,50	6,0	c	31,00
RIL 103	R	49,6	f	7,3	50,0	d	105,3	113,0	d	0,0	74,6	d	109,8	12,8	d	1,7	8,80	c	18,20	11,10	b	0,90	22,5	b	73,00
RIL 104	B	52,2	e	4,7	69,0	c	77,8	115,0	d	12,8	93,8	c	100,2	15,8	c	5,2	12,70	b	18,10	9,00	d	0,70	24,8	b	46,30
RIL 105	R	50,4	e	3,3	57,0	d	30,7	117,0	d	16,3	105,4	b	223,3	15,4	c	9,8	22,10	a	120,00	9,20	d	0,30	30,5	a	71,00
RIL 106	R	56,0	d	2,5	79,0	b	33,2	139,0	a	0,0	114,2	b	220,7	13,8	c	1,7	5,00	d	2,80	9,10	d	0,40	19,4	b	279,30
RIL 107	B	51,2	e	11,2	60,0	c	181,2	114,0	d	12,0	98,2	c	10,7	13,4	c	4,8	15,20	a	26,00	10,50	c	1,20	32,3	a	96,90
RIL 108	R	54,4	d	3,3	77,0	b	18,7	115,0	d	16,0	99,0	c	1,3	16,5	b	1,0	6,00	c	6,90	8,30	d	0,40	20,0	b	26,50
RIL 109	R	56,4	d	23,8	78,0	b	245,5	114,0	d	9,8	126,6	a	492,8	18,8	b	12,7	4,20	d	12,60	9,00	d	0,10	5,4	c	31,30
RIL 110	R	52,6	e	8,8	62,0	c	187,3	123,0	c	122,9	79,3	d	166,3	12,0	d	15,3	5,80	c	21,40	9,10	d	1,10	6,0	c	25,30
RIL 111	R	57,8	c	4,7	77,0	b	20,8	140,0	a	9,8	116,4	a	47,3	14,0	c	6,0	7,30	c	0,60	9,00	d	3,50	14,7	c	86,30
RIL 112	B	55,0	d	11,5	78,0	b	137,2	115,0	d	16,0	128,8	a	439,6	19,3	a	4,3	3,60	d	11,80	.	f	.	9,6	c	67,80
RIL 113	B	49,8	f	12,7	56,0	d	93,7	112,0	d	1,3	90,8	c	52,3	14,0	c	3,3	5,80	c	8,80	11,40	b	0,20	26,7	a	12,30
RIL 114	B	46,2	f	1,7	43,0	d	33,2	114,0	d	13,8	74,6	d	401,3	12,6	d	5,3	18,00	a	46,40	11,00	b	0,80	23,3	b	78,90
RIL 115	R	56,4	d	8,3	75,0	b	49,3	126,0	c	232,8	113,5	b	251,0	20,3	a	9,3	7,90	c	14,50	9,40	c	0,70	19,6	b	38,30
RIL 116	B	56,6	d	1,8	76,0	b	20,3	115,0	d	12,8	111,4	b	14,8	20,8	a	5,2	8,60	c	2,10	7,00	e	0,30	17,0	c	243,00
RIL 117	R	64,4	b	12,8	90,0	a	10,7	139,0	a	0,0	111,5	b	116,3	14,3	c	4,3	2,90	d	2,20	6,80	e	0,00	9,4	c	33,80
RIL 118	R	52,8	e	12,3	67,0	c	130,9	118,0	d	14,7	110,5	b	81,0	20,0	a	4,7	8,70	c	20,00	9,70	c	0,70	29,5	a	97,70
RIL 119	B	56,6	d	0,3	82,0	a	72,2	135,0	b	64,8	113,6	b	98,3	13,2	d	4,7	8,60	c	0,70	7,80	e	0,20	17,5	c	91,00
RIL 120	R	60,0	c	8,0	89,0	a	113,0	136,0	b	280,3	102,7	b	41,3	15,3	c	60,3	8,00	c	21,20	8,90	d	1,80	18,8	b	72,30
RIL 121	R	54,2	d	1,7	71,0	b	73,0	117,0	d	21,3	92,3	c	166,3	16,3	c	1,6	10,70	b	3,30	9,20	d	0,20	11,4	c	96,30
RIL 122	R	51,8	e	19,7	60,0	c	54,8	118,0	d	135,2	86,2	d	401,2	15,8	c	2,9	5,30	d	17,70	8,40	d	6,60	14,0	c	90,00
RIL 123	R	51,8	e	2,3	61,0	c	6,3	113,0	d	.	105,0	b	.	18,0	b	.	.	d	.	.	f	.	26,0	a	137,00
RIL 124	R	60,6	c	22,8	80,0	b	116,3	139,0	a	0,0	105,8	b	0,3	12,8	d	3,6	3,80	d	11,60	7,60	e	0,10	17,8	c	256,30
RIL 125	B	63,0	b	19,5	91,0	a	195,3	140,0	a	9,8	99,2	c	153,2	10,8	d	5,7	3,60	d	17,30	8,00	e	0,00	12,4	c	84,80

Trat, RILs ou Parentais; F, RIL utilizadas; CF, coloração da flor; R, flor roxa; B, flor branca; m, média da característica estudada; N, nota atribuída pelo teste de Scott-Knott; σ^2 , variância da característica estudada.

Trat	CF	Data de Floração			Altura Floração			Data Maturação			Altura Maturação			Número de Nós			Peso Total			Peso de 100			Severidade		
		F	m	m N σ^2	m N σ^2	m N σ^2	m N σ^2	m N σ^2	m N σ^2	m N σ^2	m N σ^2	m N σ^2	m N σ^2	m N σ^2	m N σ^2	m N σ^2	m N σ^2	m N σ^2	m N σ^2	m N σ^2	m N σ^2				
RIL 126	R		51,8	e 1,2	61,0	c 24,5	113,0	d 0,0	86,2	d 25,7	14,4	c 0,3	6,10	c 23,20	10,80	b 0,30	19,5	B 189,70							
RIL 127	R		48,0	f 2,0	54,0	d 22,3	112,0	d 1,2	70,8	d 53,7	12,6	d 1,3	14,80	a 37,00	10,80	b 0,80	13,8	C 10,70							
RIL 128	B		48,3	f 6,3	49,0	d 22,9	113,0	d 1,0	85,5	d 404,3	13,8	c 26,9	8,00	c 125,20	12,80	a 46,10	29,7	A 76,30							
RIL 129	R		62,8	b 52,3	87,0	a 209,3	139,0	a 0,0	119,7	a 140,3	13,0	d 3,0	2,20	d 8,00	.	f .	19,0	B 92,70							
RIL 130	B		54,3	d 4,3	64,0	c 60,7	118,0	d 19,0	87,0	d 139,0	16,0	c 1,0	10,10	b 38,50	8,80	d 0,00	10,3	C 52,90							
RIL 131	R		49,0	f 4,0	60,0	c 30,7	121,0	c 192,0	101,4	c 216,3	17,6	b 5,3	12,00	b 19,40	12,80	a 19,00	21,0	B 84,70							
RIL 132	R		57,8	c 17,7	73,0	b 70,8	121,0	c 0,0	92,3	c 136,3	17,0	b 1,0	6,60	c 7,60	6,80	e 0,20	15,3	C 84,90							
RIL 133	B		53,6	e 2,8	66,0	c 49,2	119,0	c 14,9	113,3	b 28,9	20,5	a 3,7	7,80	c 1,80	8,70	d 0,20	10,6	C 52,80							
RIL 134	R		57,2	c 2,7	75,0	b 25,7	134,0	b 135,2	101,2	c 109,7	10,8	d 13,7	1,70	d 0,10	.	f .	14,8	C 44,90							
RIL 135	R		57,5	c 19,7	82,0	a 29,3	126,0	c 225,3	113,0	b 710,0	14,5	c 19,7	11,60	b 5,10	9,10	d 0,70	35,5	A 40,50							
RIL 136	R		50,6	e 5,3	61,0	c 135,0	114,0	d 13,8	82,6	d 64,3	11,6	d 5,3	11,30	b 59,20	12,40	a 2,20	7,4	C 15,80							
RIL 137	B		55,3	d 2,3	73,0	b 6,3	139,0	a 0,0	126,0	a 229,0	13,3	d 5,3	7,50	c 15,40	9,40	d 0,70	20,0	B 75,00							
RIL 138	R		48,8	f 1,7	49,0	d 39,2	112,0	d 1,2	75,4	d 66,3	10,8	d 9,7	7,90	c 23,50	9,90	c 0,70	18,4	B 77,30							
RIL 139	R		53,2	e 9,2	72,0	b 97,2	127,0	c 148,3	111,8	b 84,3	15,5	c 4,3	9,40	c 12,20	8,70	d 0,30	19,5	B 83,70							
RIL 140	R		47,0	f 1,0	53,0	d 25,0	112,0	d 1,3	86,7	d 4,3	14,0	c 1,0	16,70	a 17,40	9,70	c 0,50	38,5	a 24,50							
RIL 141	R		52,2	e 8,7	75,0	b 154,7	113,0	d 0,0	121,0	a 70,7	18,0	b 4,7	8,50	c 18,70	10,50	c 0,40	7,6	c 57,30							
RIL 142	B		50,0	f 1,5	58,0	d 32,7	114,0	d 12,0	85,0	d 23,0	14,0	c 1,0	6,70	c 14,60	9,20	d 0,60	13,4	c 191,30							
RIL 143	R		46,3	f 0,3	46,0	d 1,7	113,0	d 0,0	68,0	d 181,0	15,0	c 12,0	13,20	b 40,90	11,00	b 2,60	15,0	c 126,00							
RIL 144	B		52,0	e 2,5	67,0	c 131,7	121,0	c 112,8	94,2	c 141,2	16,0	c 21,5	15,00	a 26,50	10,30	c 0,80	17,6	c 58,30							
RIL 145	B		50,0	f 2,0	55,0	d 40,9	114,0	d 15,6	90,5	c 57,7	13,8	c 16,3	15,30	a 22,40	10,70	b 1,80	8,8	c 51,60							
RIL 146	B		50,5	e 5,7	56,0	d 71,0	116,0	d 22,0	86,7	d 97,3	12,3	d 2,3	7,10	c 13,50	8,90	d 1,30	10,8	c 28,90							
RIL 147	B		48,4	f 3,8	52,0	d 17,7	117,0	d 16,3	99,8	c 529,6	14,3	c 32,3	13,20	b 122,40	12,20	a 0,10	18,3	b 72,30							
RIL 148	R		63,0	b 16,0	88,0	a 119,3	141,0	a 16,3	113,3	b 110,3	14,0	c 7,0	4,90	d 2,40	6,40	e 0,70	28,0	a 68,70							
RIL 149	B		49,4	f 7,3	55,0	d 43,7	113,0	d 0,0	78,2	d 40,2	12,6	d 2,8	14,40	b 67,20	11,50	b 0,40	36,3	a 74,30							
RIL 150	B		49,6	f 3,8	61,0	c 136,2	115,0	d 24,2	85,2	d 408,7	15,5	c 9,7	11,10	b 134,60	10,20	c 0,80	19,0	b 84,70							

Trat, RILs ou Parentais; F, RIL utilizadas; CF, coloração da flor; R, flor roxa; B, flor branca; m, média da característica estudada; N, nota atribuída pelo teste de Scott-Knott; σ^2 , variância da característica estudada.

Trat	CF	Data de Floração			Altura Floração			Data Maturação			Altura Maturação			Número de Nós			Peso Total			Peso de 100			Severidade		
		F	m		m	N	σ^2	m	N	σ^2	m	N	σ^2	m	N	σ^2	m	N	σ^2	m	N	σ^2	m	N	σ^2
RIL 151	B	51,6	e	1,8	67,0	c	10,8	125	c	120,8	89,6	c	54,8	13,4	c	1,3	16,30	a	36,70	10,40	c	1,60	9,2	c	89,7
RIL 152	R	48,6	f	0,3	55,0	d	8,3	113	d	0,8	81,0	d	5,0	12,8	d	1,7	9,00	c	38,50	9,20	d	0,60	20,2	b	91,2
RIL 153	R	56,6	d	0,8	76,0	b	58,2	120	c	19,7	121,0	a	20,7	22,8	a	0,9	4,40	d	0,80	.	f	.	19,0	b	93,0
RIL 154	B	58,3	c	24,3	83,0	a	354,3	118	d	17,3	105,3	b	184,3	15,7	c	8,3	7,00	c	9,80	10,20	c	0,00	16,3	c	92,3
RIL 155	B	55,8	d	3,2	83,0	a	24,8	122	c	100,0	125,4	a	325,8	19,4	a	28,8	7,70	c	23,80	8,70	d	1,10	17,5	c	97,7
RIL 156	B	51,6	e	4,3	69,0	c	73,5	113	d	0,8	119,2	a	352,7	19,6	a	13,3	7,30	c	15,50	9,20	d	1,90	30,0	a	163,0
RIL 157	B	46,6	f	0,8	49,0	d	26,5	112	d	1,3	84,7	d	196,3	14,0	c	9,0	6,20	c	18,90	.	f	.	24,8	b	120,9
RIL 158	R	48,2	f	8,7	52,0	d	157,2	116	d	14,7	72,3	d	106,9	12,3	d	2,3	8,30	c	20,90	10,00	c	0,30	22,0	b	112,7
RIL 159	R	55,2	d	3,2	71,0	b	25,2	128	b	172,0	103,3	b	124,9	14,0	c	34,0	1,80	d	1,30	.	f	.	12,0	c	55,5
RIL 160	R	53,2	e	2,7	62,0	c	2,8	115	d	12,8	107,4	b	186,3	17,8	b	20,7	8,90	c	22,40	9,00	d	0,00	13,6	c	95,3
RIL 161	R	61,0	b	4,7	88,0	a	94,9	138	a	139,3	105,0	b	189,0	17,3	b	58,3	1,00	d	0,90	.	f	.	32,0	a	126,0
RIL 162	R	51,3	e	3,6	61,0	c	139,6	122	c	225,3	102,7	b	56,3	13,7	c	8,3	2,10	d	1,30	.	f	.	14,8	c	4,9
RIL 163	R	59,0	c	8,5	85,0	a	127,8	137	b	87,2	111,2	b	297,2	11,8	d	21,7	2,80	d	14,20	.	f	.	14,6	c	69,8
BRS 184	R	50,2	-	3,7	59,0	-	74,4	115	-	24,0	81,0	-	89,3	13,5	-	3,0	11,27	-	23,80	9,50	-	0,60	21,2	-	115,5
BRS 231	B	53,2	-	6,3	66,0	-	65,9	120	-	102,5	111,5	-	174,7	17,9	-	15,7	8,46	-	28,50	8,40	-	0,40	13,1	-	84,1
Total	-	8867,8	-	1213,5	11321	-	13105	20075	-	7509,1	16432,6	-	27615,2	2471,3	-	1501,3	1438,5	-	3808,0	1331,5	-	197,7	2956,6	-	13464,5
Média	-	53,7	-	105,8	69	-	6710,2	122	-	4747,8	99,6	-	82967,5	15,0	-	109,8	8,9	-	949,9	9,2	-	18,4	17,9	-	4346,3

Trat, RILs ou Parentais; F, RIL utilizadas; CF, coloração da flor; R, flor roxa; B, flor branca; m, média da característica estudada; N, nota atribuída pelo teste de Scott-Knott; σ^2 , variância da característica estudada.

ANEXO B – Protocolos

EXTRAÇÃO DE DNA DE PLANTAS

- Colocar os tubos contendo as esferas metálicas e as folhas em contato com N₂ líquido em triturá-los em vórtex
- Adicionar 900 µl de tampão de extração na amostra;
- Incubar a 65 ° C por 60 minutos, agitando de vez em quando (cada 15 minutos);
- Resfriar e centrifugar a 2940 x g por minutos por 10 minutos. Transferir a fase aquosa (superior) para outro tubo;
- Adicionar 900 µl de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e agitar por suaves inversões por cerca de 10 minutos
- Centrifugar a 2940 x g por 10 minutos e transferir a fase superior para outro tubo;
- Repetir os dois passos anteriores
- Precipitar os ácidos nucleicos pela adição de isopropanol gelado (2/3 do volume);
- Misturar por suaves inversões até os ácidos nucleicos tornarem-se visíveis e deixar over night a 4° C ou 2 horas à -20° C;
- Centrifugar a velocidade máxima por 10 minutos.
- Descartar o sobrenadante e adicionar 900 µl de etanol 90%. Ressuspender o sedimento (pellet). Se necessário, pode-se aquecer a 65 C por 5 minutos para ajudar a ressuspensão.
- Adicionar RNase A, na concentração final de 40 µg/ml e incubar a 37° C por pelo menos 30 minutos.
- Centrifugar a velocidade máxima por 10 minutos.
- Descartar o sobrenadante e adicionar 500 µl de etanol 70 %. Centrifugar novamente por 5 minutos, descartar o sobrenadante e secar o pellet (o pellet pode ser seco a vácuo ou deixar o tubo invertido sobre a bancada por cerca de 2 horas);
- Ressuspender o pellet em 30 µl de TE pH 8,0.

QUANTIFICAÇÃO DO DNA

- O DNA pode ser quantificado com o uso de espectrofotômetro. Devem ser feitas leituras em comprimentos de onda de 260 nm. Uma unidade de densidade óptica (DO) corresponde a 50 ug/μl de DNA. A amostra de DNA deve ser diluída para se fazer a leitura, sendo que o ideal é que a absorbância fique entre 0,2 e 1.

$$\text{Concentração de DNA (ng/μl)} = \text{DO}_{260} \times \text{Fator de Diluição} \times 50 \text{ ug/μl}$$

- Para verificar a pureza do DNA, deve ser feita também a leitura a 280 nm. A relação entre as leituras 260/280 nos dá uma indicação da pureza do DNA

$$\text{Relação 260/280} = \text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$$

- Se a razão ficar entre 1,8 e 2,0 a absorção é provavelmente devido aos ácidos nucleicos. Uma razão menor que 1,8 indica que pode haver proteínas e/ou outras moléculas absorventes de UV na amostra. Uma razão superior a 2,0 indica que a amostra pode estar contaminada com clorofórmo ou fenol, e deve ser reprecipitado com etanol.

GEL DE AGAROSE 0,8%

Agarose..... 2 g

SB 1X..... 250 ML

- Fundir a agarose no microondas. Esfriar até que suporte a temperatura na parte interna do antebraço;
- Adicionar 25 µl brometo de etídio 1 mg/mL). Despejar na cuba, colocar os pentes e esperar a completa solidificação para aplicação das amostras

CONDIÇÕES PARA AMPLIFICAÇÃO MICROSSATÉLITE

<i>Mix</i>	Volume para 1 reação	[Final]
Água MilliQ®	3,00 µl	---
Tampão 10 X	1,00 µl	1 X
MgCl ₂ (50 mM)	0,30 µl	50 mM/µl
dNTP's (2,5 mM)	0,52 µl	2,5 mM
<i>Primer F</i> (2 µM)	1,00 µl	2 µM
<i>Primer R</i> (2 µM)	1,00 µl	2 µM
Taq 5U/µl)	0,20 µl	1U
DNA (10 ng/µl)	3,00 µl	30 ng

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

94 °C - 5 minutos	} 35 ciclos
94 °C - 40 segundos	
50 °C - 40 segundos	
72 °C - 40 segundos	
72 °C - 1 minuto	
4 °C - forever	

GEL DE POLIACRILAMIDA 10%

Componentes	Volume Final
<i>Running Gel</i>	
Acrilamida-Bis (29:1)	8,9 mL
Água destilada	3,3 mL
1,5 Tris-Hcl	4,2 mL
Persulfato de Amônio 10%	63,8 µl
TEMED	15,8 µl
<i>Stacking Gel</i>	
Acrilamida-Bis (29:1)	0,60 mL
Água destilada	2,04 mL
1,5 Tris-Hcl	0,98 mL
Persulfato de Amônio	30,00 µl
TEMED	4,00 µl

Obs: Usar luvas na preparação do gel.

Prepara primeiramente o *Running Gel* e após sua solidificação, preparar o *Stacking Gel*.

ANEXO C – Soluções

Tampão de Extração

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

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

TE pH 8,0

- 10 mM Tris-HCl pH 8,0 (500 µl Tris-HCl 1M pH 8,0)
- 1 mM EDTA pH 8,0 (100 µl EDTA 0,5 pH 8,0)
- Completar com água MilliQ® para 50 ml

Tampão para RNase A

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

SB (50x)

- 0,5 M NaOH – 20g
- Água destilada – 700 ml
- Ajustar o pH para 8,5 com ácido bórico
- Completar o volume para 1 l

Tampão de Amostra – 40% sacarose

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

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

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

Tampão de Reação 10X

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

Cloreto de Magnésio 50 mM

- 50 µl MgCl₂ 1M
- 950 água MilliQ®

dNTP's 2,5 mM

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

Solução de acrilamida 40% (29:1)

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

- Em 40 g adicionar 29 parte de acrilamida e 1 parte de bis-acrilamida:
- 36,67 g de acrilamida
- 1,33 g de bis-acrilamida
- Em um Becker, pesar a acrilamida e a bis-acrilamida, adicionar 50 mL de água destilada, colocar no agitador com aquecimento para dissolver. Em um Balão volumétrico, completar com o volume para 100 mL com água destilada.

Solução de persulfato de amônio 10%

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

Solução de Brometo de Etídio para corar gel (1mg/ml)

- Usar 0,01% de brometo de etídio para a quantidade de gel utilizado
- Gel de 250 ml 25 µl de brometo de etídio