



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

KARLA RODRIGUES COUTO SANTOS

**MAPEAMENTO DE QTLS LIGADOS À RESISTÊNCIA PARCIAL DA SOJA À FERRUGEM
ASIÁTICA**

**UBERLÂNDIA/MG
2015**

KARLA RODRIGUES COUTO SANTOS

MAPEAMENTO DE QTLS LIGADOS À RESISTÊNCIA PARCIAL DA SOJA À
FERRUGEM ASIÁTICA

Tese apresentada à Universidade Federal de
Uberlândia, como parte das exigências do Programa
de Pós-graduação em Agronomia – Doutorado, área
de concentração em Fitotecnia, para obtenção do
título de “Doutora”.

Orientador

Prof. Dr. Fernando Cezar Juliatti

UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS – BRASIL

2015

KARLA RODRIGUES COUTO SANTOS

MAPEAMENTO DE QTLS LIGADOS A RESISTÊNCIA PARCIAL DA SOJA À
FERRUGEM ASIÁTICA

Tese apresentada à Universidade Federal de
Uberlândia, como parte das exigências do Programa
de Pós-graduação em Agronomia – Doutorado, área
de concentração em Fitotecnia, para obtenção do
título de “Doutora”.

Aprovada, em 10 de Julho de 2015.

Profa. Dra. Maria Amélia dos Santos

UFU

Profa Dra. Ana Paula Oliveira Nogueira

UFU

Dra Juliana Araújo Santos Martins

IFTM

Dra Adriana de Andrade Figueiró

UFRGS

Prof. Dr. Fernando César Juliatti

ICIAG-UFU

(Orientador)

UBERLANDIA

MINAS GERAIS – BRASIL

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S237m 2015	<p>Santos, Karla Rodrigues Couto, 1985 Mapeamento de QTLs ligados à resistência parcial da soja à ferrugem asiática / Karla Rodrigues Couto Santos. - 2015. 109 f.</p> <p>Orientador: Fernando Cezar Juliatti. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Inclui bibliografia.</p> <p>1. Agronomia - Teses. 2. Soja - Doenças e pragas - Teses. 3. Ferrugem asiática - Teses. 4. Soja - Melhoramento genético - Teses. I. Juliatti, Fernando Cezar. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.</p>
---------------	--

CDU: 631

"Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse amor, seria como o metal que soa ou como o sino que tine"

Corintos 13

*Ao meu pequeno Vinicius, por me ensinar o significado de
amor incondicional.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por me ter permitido mais esta vitória.

Ao meu marido Marcelo, que sempre esteve a meu lado me dando muito amor e apoio nos momentos difíceis e compartilhando as alegrias das nossas conquistas, meu eterno agradecimento.

A meu filho Vinicius, que mesmo tão pequeno, tão indefeso, me faz querer ser uma pessoa melhor, ser sempre seu exemplo. Filho obrigado por me ensinar o verdadeiro sentido do amor incondicional.

Aos meus pais, Cecília e Zezão, pelo amor, caráter, ensinamentos, formação e por toda confiança que depositaram em mim.

A minha irmã Kamila, pelo carinho não só de irmã, mas de uma grande amiga, sempre minha confidente.

À Universidade Federal de Uberlândia, ao Programa de Pós Graduação em Agronomia, pela oportunidade de realização deste curso e a Capes, pelo financiamento para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Fernando César Juliatti, pela orientação, paciência, e compreensão, meu muito obrigada.

Aos meus amigos do Laboratório de Micologia e Proteção de Plantas, com os quais aprendi muito, em especial a querida Dri, por toda ajuda, e amizade durante a realização deste trabalho.

Aos amigos da Pós-Graduação, pela companhia, amizade e pelos tão merecidos momentos de descontração.

A todos que não foram citados, mas nem por isso, esquecidos, e que contribuíram de alguma maneira para o êxito desse trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	i
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
RESUMO GERAL	viii
ABSTRACT	ix
CAPÍTULO 1	1
1. INTRODUÇÃO GERAL	2
2. REFERENCIAL TEÓRICO	4
2.1. A cultura da soja	4
2.2. Ferrugem asiática da soja	5
2.3. Resistência genética	9
2.4. QTL (<i>quantitative trait loci</i>)	11
2.5. Marcadores moleculares	12
2.6. Microsatélites (SSR)	14
2.7. Método do <i>bulk</i> segregante (BSA)	15
2.8. Mapeamento Genético	16
2.9. Delineamento em blocos aumentados e predição de valores genéticos	17
3. REFERÊNCIAS	20
CAPITULO 2	28
RESUMO	29
ABSTRACT	30
1. INTRODUÇÃO	31
2. MATERIAL E MÉTODOS	32
2.1. Material Genético	32
2.2. Delineamento experimental e instalação do experimento	33
2.3. Avaliação fenotípica dos genitores e famílias F ₄	33
2.4. Análises Estatísticas	34
3. RESULTADOS DE DISCUSSÃO	37
3.1. Análises de variância e componentes de média	37
3.2. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD)	40
4. CONCLUSÕES	Erro! Indicador não definido.
5. REFERÊNCIAS	44
CAPITULO 3	47
RESUMO	48
ABSTRACT	49
INTRODUÇÃO	50
1. MATERIAL E MÉTODOS	51
1.1. Material Genético	51
1.2. Avaliação fenotípica	51
1.3. Extração e quantificação de DNA	52
1.4. Amplificação dos Microsatélites	53

1.5. Confeção dos <i>bulks</i> segregantes	53
1.6. Análises dos Microssatélites	54
1.6.1. Construção do mapa genético de ligação	54
1.6.2. Mapeamento de QTLs associados à resistência	54
2. RESULTADOS DE DISCUSSÃO	56
2.1. Análises de variância e componentes de média	56
2.2. Construção do mapa genético de ligação	56
2.3. Mapeamento de QTLs associados à resistência à ferrugem asiática	59
3. CONCLUSÕES.....	Erro! Indicador não definido.
4. REFERÊNCIAS	66
CAPITULO 4.....	70
RESUMO.....	71
ABSTRACT.....	72
1. INTRODUÇÃO	73
2. MATERIAL E MÉTODOS	74
2.1. Material genético	74
2.2. Preparo do inoculo e inoculação com <i>P. pachyrhizi</i>	74
2.3. Avaliação fenotípica	75
2.4. Extração e quantificação de DNA	75
2.5. Amplificação dos Microssatélites	76
2.6. Análises dos Microssatélites	76
2.7. Construção do grupo de ligação genético	77
2.8. Mapeamento de QTLs associados a resistência	77
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
3.1. Construção e comparação do mapa de ligação genético.....	79
3.2. Mapeamento e comparação de QTLs associados à resistência à ferrugem asiática.	80
4. CONCLUSÕES.....	85
5. REFERÊNCIAS	86
6. CONCLUSÕES GERAIS.....	88
7. ANEXOS	89

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Microgramas
µl	Microlitros
AACPD	Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
AS	Acurácia Seletiva
BSA	<i>Bulked Segregant analysis</i> – Análises de grupos segregantes
CAF	Consórcio Antiferrugem
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
CNPSo	Centro Nacional de Pesquisa de Soja
CTAB	Brometo de trimetil N-cetil amônio
CIM	<i>Composite interval mapping</i> – Mapeamento por intervalo composto
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i> ou Ácido desoxirribonucléico
dNTP's	Dinucletoídeos
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra acético
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
F₁	Primeira geração de um cruzamento
F₂	Segunda geração de um cruzamento
F₃	Terceira geração de um cruzamento
F₄	Quarta geração de um cruzamento
F₇	Sétima geração
GL	Grupos de Ligação da soja
GL	Graus de liberdade
LOD	<i>Logarithm of odds</i>
M	Molar
MG	Miligrama
MgCl₂	Cloreto de magnésio
ml	Mililitro
mM	Milimolar
m/v	Massa por volume
NaCl	Cloreto de sódio

ng	Nanograma
P.A.	Para análise (Puro)
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
PVP	Polivinilpirrolidona
p/v	Peso por volume
QTLs	<i>Quantitative Trait Loci</i> ou Locos de Característica Quantitativa
RB	<i>Reddish-Brown</i> ou Marrom-Avermelhado
RILs	<i>Recombinant Inbred Lines</i> ou Linhagens Endogâmicas Recombinantes
RNAse	Ribonuclease
R1	R (fase reprodutiva da soja) R1 – início da floração até 50% das plantas com uma flor aberta na haste principal.
R3	Final da floração até vagens de 1-4 cm
R5	Grãos Perceptíveis ao tato até 10% de enchimento da vagem
Rpp	<i>Resistance to Phakopsora pachyrhizi</i> ou Resistência a <i>Phakopsora pachyrhizi</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
SAM	<i>Marker Assisted Selection</i> ou Seleção Assistida por Marcadores
SEV	Severidade da doença em folhas
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> ou Polimorfismo de Base Única
SSR	<i>Simple Sequence Repeat</i> ou Sequência Simples Repetida
TAN	<i>Tanish</i> ou Castanha
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TRIS	Trizma [®] base
TE	Tris-HCL e EDTA
U	Unidade formadora de colônia
UV	Ultravioleta
v/v	Volume por volume
°C	Graus Celsius

LISTA DE TABELAS

CAPITULO 2	Pág
TABELA 1. Combinação das sete genótipos nos dez cruzamentos.	34
TABELA 2. Quadro resumo das análises de variância para a severidade da ferrugem da soja para os dez diferentes cruzamentos (genótipos parentais e progênes F ₄).	39
TABELA 3. Quadro resumo das análises de variância para a severidade da ferrugem da soja para os dez diferentes cruzamentos e genótipos parentais.	40
TABELA 4. Ranqueamento entre os cruzamentos e resumo das estimativas dos componentes de variância para cada um dos dez cruzamentos analisados.	41
TABELA 5. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para os dez cruzamentos, seus parentais e testemunhas	42
 CAPITULO 3	 Pág
TABELA 1. Quadro resumo das análises de variância entre as progênes e genótipos parentais.	58
TABELA 2. Descrição dos QTLs significativos detectados para resistência a ferrugem asiática da soja na população de mapeamento F ₄ .	66
 CAPITULO 4	 Pág
TABELA 1. Descrição dos QTLs significativos detectados para resistência a ferrugem asiática da soja na população de mapeamento F ₇ .	87

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 3	Pág
FIGURA 1. Mapa de ligação parcial da soja baseado em informações genotípicas de 29 marcadores SSR de uma população de mapeamento F ₄ originada do cruzamento entre os genótipos de soja IAC 100 e Caiapônia. Os locos marcadores são mostrados a direita de cada grupo de ligação (A2, C2, D1a, D2, E, G, J, L e N) e as distâncias genéticas são indicadas à esquerda.	60
FIGURA 2. Curva de LOD <i>score</i> para severidade de ferrugem asiática da soja no grupo de ligação A2. A distancia entre os marcadores, em cM, está indicada entre as marcas. O nível de significância do LOD (2,5) está indicado pela linha pontilhada horizontal. Sendo a) Mapeamento por marca simples e B) Mapeamento por intervalo composto (CIM).	62
FIGURA 3. Curva de LOD <i>score</i> para severidade de ferrugem asiática da soja no grupo de ligação D2. A distância entre os marcadores, em cM, está indicada entre as marcas. O nível de significância do LOD (2,5) está indicado pela linha pontilhada horizontal. Sendo, a) Mapeamento por marca simples e B) Mapeamento por intervalo composto (CIM).	63
FIGURA 4. Curva de LOD <i>score</i> para severidade de ferrugem asiática da soja no grupo de ligação G. A distância entre os marcadores, em cM, está indicada entre as marcas. O nível de significância do LOD (2,5) está indicado pela linha pontilhada horizontal. Sendo, a) Mapeamento por marca simples e B) Mapeamento por intervalo composto (CIM).	64
FIGURA 5. Curva de LOD <i>score</i> para severidade de ferrugem asiática da soja nos grupos de ligação N e J. A distância entre os marcadores, em cM, está indicada entre as marcas. O nível de significância do LOD (2,5) está indicado pela linha pontilhada horizontal. Sendo, a) Mapeamento por marca simples e B) Mapeamento por intervalo composto (CIM).	65

FIGURA 1. Comparação entre os grupos de ligação D2, D1a e G das populações de mapeamento F₇ e F₄ originadas do cruzamento entre os genótipos de soja IAC 100 e Caiapônia. Os loci marcadores são mostrados a direita de cada grupo de ligação e as distâncias genéticas são indicadas à esquerda.

82

FIGURA 2. Curvas de LOD *score* para severidade de ferrugem asiática da soja no grupo de ligação D2, nas populações F₄ e F₇. A distancia entre os marcadores, em cM, está indicada entre as marcas (marcas em cinza representam as distâncias encontradas para F₄). O nível de significância do LOD (2,5) está indicado pela linha pontilhada horizontal. Sendo a) Mapeamento por marca simples e B) Mapeamento por intervalo composto (CIM).

84

FIGURA 3. Curvas de LOD *score* para severidade de ferrugem asiática da soja no grupo de ligação G, nas populações F₄ e F₇. A distancia entre os marcadores, em cM, está indicada entre as marcas. O nível de significância do LOD (2,5) está indicado pela linha pontilhada horizontal. Sendo a) Mapeamento por marca simples e B) Mapeamento por intervalo composto (CIM).

85

FIGURA 4. Curvas de LOD *score* para severidade de ferrugem asiática da soja no grupo de ligação N, nas populações F₄ e F₇. As distancias entre os marcadores, em cM, estão indicadas entre as marcas. O nível de significância do LOD (2,5) está indicado pela linha pontilhada horizontal. Sendo a) Mapeamento por marca simples e B) Mapeamento por intervalo composto (CIM).

86

RESUMO GERAL

SANTOS, KARLA RODRIGUES COUTO. **Mapeamento de QTLs ligados a resistência parcial da soja à ferrugem asiática.** 2015. 109f. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia¹.

A ferrugem asiática da soja, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* (Sydow & P. Syd.), é considerada altamente agressiva. As plantas de soja são suscetíveis ao fungo em todos os estádios de crescimento e as perdas podem ser de até 80%. As pesquisas têm se concentrado na obtenção de genótipos resistentes por meio de alelos dominantes ou recessivos, que condicionam a resistência vertical (qualitativa), mas a estabilidade desse tipo de resistência não é durável. A identificação de cruzamentos promissores que possam ser utilizados para desenvolvimento de genótipos com resistência horizontal (quantitativa) pode ajudar a aumentar a longevidade das cultivares recomendadas. Entretanto, esse tipo de resistência está condicionado às variáveis ambientais que podem dificultar a seleção. Desse modo, este trabalho objetivou ranquear cruzamentos quanto à resposta à ferrugem asiática, por meio de suas estimativas genéticas e ganhos preditos, a fim de identificar o/os cruzamentos mais promissores. Objetivou-se, ainda, identificar QTLs associados à resistência à ferrugem asiática da soja em duas diferentes gerações derivadas do mesmo cruzamento. Foram ranqueados dez diferentes cruzamentos, derivados de sete genótipos em diferentes combinações, e destes o cruzamento entre os genótipos IAC 100 (Resistencia Parcial) e BRS Caiapônia (Suscetível) foi o mais promissor. Para o mapeamento dos QTLs foram utilizadas 87 progênies F₄ derivadas deste cruzamento, previamente fenotipadas a campo. A partir dos dados da fenotipagem foram confeccionados dois *bulks* segregantes de DNA que foram empregados para a avaliação *primers* SSR (*Simple Sequence Repeats*). Destes 38 foram polimórficos para os parentais e os *bulks*. Um mapa de ligação, para a geração F₄, foi obtido baseado em 29 marcadores SSR, distribuídos em nove grupos de ligação, cobrindo 285,9 cM do genoma. Seis QTLs foram mapeados em quatro destes grupos (C2, D2, G e N), dos quais dois QTLs foram responsáveis por 37,05 % da variação fenotípica para a resistência a ferrugem asiática da soja. O mapa de ligação construído para a geração F₇, foi semelhante ao mapa da geração F₄, cobrindo 266 cM. Quatro dos seis QTLs mapeados na geração F₄ foram também identificados na geração F₇, demonstrando estabilidade para essas regiões genômicas contribuindo para a resistência horizontal à ferrugem asiática.

Palavras-chave: *Glycine max*, *Phakopsora pachyrhizi*, resistência horizontal, SSR, marcadores moleculares, melhoramento.

¹Orientador: Fernando Cézar Juliatti – UFU.

ABSTRACT

SANTOS, KARLA RODRIGUES COUTO. **QTL mapping for partial resistance of soybean asian rust** 2015. 109f. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia¹.

The asian soybean rust is caused by *Phakopsora pachyrhizi* (Sydow & P. Syd.) fungus, is considered a very aggressive disease. Soybean plants are susceptible to asian rust at any developmental stage and, in many cases, yield losses may reach 80%. Cultivar development has been concentrated in using resistance (vertical) expressed by single major dominant or recessive genes, but there is a common understanding that this type of resistance may not be durable. Identifying promising crossing that can be used to develop genotypes with horizontal resistance (quantitative) will certainly help increase the longevity of the recommended cultivars. However, this type of resistance is subject to environmental variables that may difficult the selection. Consequently, this work has the objective to ranking crossings on the response to asian rust through their genetic estimates and predicted gains in order to identify the most promising crossings. The objective was also to identify QTLs associated with resistance to asian rust in soybeans in two different generations derived from the same crossing. Were ranked ten different crosses derived from seven cultivars in different combinations of these and the crossing of the cultivars IAC 100 (Partial Resistencia) and BRS Caiapônia (Susceptible) was the most promising. For the mapping of QTLs were used 87 F₄ progeny derived from this cross, previously phenotyped at field. From the phenotyping data were prepared two DNA bulks that were used for the evaluation of 89 pairs of primer SSR (Simple Sequence Repeats). Of these 38 were polymorphic for the parents and the bulks. A linkage map for the F₄ generation was obtained based on 29 SSR markers distributed in nine linkage groups, covering 285.9 cM genome. Six QTLs were mapped at four of these groups (C2, D2, L and N), two QTLs were detected for greater effect, accounting for 37.05% of the phenotypic variation for resistance to soybean rust. The linkage map constructed for the F₇ generation was virtually identical to map the F₄ generation, covering 266 cM. Four of the six QTLs mapped in the F₄ generation were also identified in the F₇ generation, showing stability for these genomic regions contributing to the horizontal resistance.

Keywords: *Glycine max*, *Phakopsora pachyrhizi*, horizontal resistance, SSR, molecular markers, breeding.

¹ Adviser: Prof. Fernando Cezar Juliatti – UFU.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO GERAL

No cenário agrícola mundial, existem grandes desafios quanto ao fornecimento de alimentos a uma população com crescimento exponencial, de forma que haja o mínimo de impacto ao ambiente. A soja (*Glycine max* (L.) MERRIL) é a principal oleaginosa produzida no mundo, é a espécie mais cultivada no Brasil, sendo responsável por cerca da metade do óleo vegetal produzido e 20% do valor de exportações do agronegócio brasileiro.

Entretanto, vários fatores limitam o cultivo da soja, entre eles está a ocorrência de pragas e doenças. No Brasil foram identificadas aproximadamente quarenta doenças causadas por fungos, bactérias, nematóides e vírus que atacam a cultura da soja. A importância econômica de cada doença varia de ano para ano e de região para região, dependendo das condições climáticas de cada safra. Nesse cenário o fungo *Phakopsora pachyrhizi* (SYDOW; SYDOW), causador da ferrugem asiática da soja, é considerado o agente de maior importância na cultura, possuindo um potencial de redução de produtividade maior que 75%, o que o torna uma grande ameaça para a produção nacional.

Entre as estratégias para o controle da doença, o uso da resistência genética é considerada a mais eficiente, em âmbito socioeconômico e ambiental. Assim, os programas de melhoramento genético da soja conduzidos no Brasil têm visado lançar genótipos que, além de apresentar altos rendimentos, também apresentem resistência à doença. Alguns genótipos resistentes já foram desenvolvidos, porém, devido à alta variabilidade genética do fungo, essa resistência é rapidamente superada. Por isso, é necessária a obtenção de um maior número de genótipos superiores que apresentem características que contribuam com uma alta produção, mesmo sob a atuação do patógeno.

Contudo, pouco se sabe a respeito da resistência da soja à *P. pachyrhizi* e poucos são os genes parciais de resistência conhecidos. Dessa forma, são necessários estudos básicos visando identificar novos genótipos resistentes, bem como os mecanismos moleculares envolvidos no processo.

Uma importante ferramenta que auxilia os programas de melhoramento que visam resistência à ferrugem asiática da soja são os marcadores moleculares, esses, diferentemente dos marcadores morfológicos, são independentes dos efeitos ambientais e estádios fisiológicos da planta, além de apresentarem um alto nível de polimorfismo distribuído ao

longo de todo genoma. Os marcadores Microssatélites são amplamente utilizados por apresentarem alta reprodutibilidade, simplicidade de uso além de serem codominantes, o que é extremamente importante para distinguir genótipos homozigotos de heterozigotos. A identificação de marcadores ligados à resistência possibilita a seleção assistida, diminuindo o tempo gasto nos programas de melhoramento para obtenção de novas cultivares.

Portanto, os objetivos principais deste trabalho foram ranquear cruzamentos promissores quanto à ferrugem asiática da soja, além de identificar, mapear e quantificar os efeitos de QTLs envolvidos na resistência a essa doença utilizando marcadores moleculares Microssatélites.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. A cultura da soja

A soja cultivada comercialmente (*Glycine max* (L) Merrill) é uma planta herbácea, incluída na classe *Dicotyledoneae*, ordem *Rosales*, família *Leguminosae*, subfamília das *Papilionoideae*, tribo *Phaseoleae*, gênero *Glycine* L., espécie *max*. (GAZZONI, 1994).

A soja é uma planta autógama, possui $2n=40$ cromossomos, de ciclo anual, geralmente de porte ereto, ramificada esparsamente, com um tipo de crescimento arbustivo e com folhas trifolioladas alternas de folíolos ovalados. As flores são brancas ou roxas com várias tonalidades, localizadas em racemos curtos ou axilares e, ou, terminais sobre, pequenos pedúnculos. As vagens são retas ou ligeiramente curvadas, contendo cada uma, de uma a quatro sementes. As cores variam de amarelo-claro a verde oliva, ou marrom a preto-avermelhado (BORÉM, 2005).

Uma das referências mais antigas de sua origem foi feita baseada na ocorrência da forma selvagem *Glycine ussuriensis*, na China, Manchúria e Coréia, portanto referindo-se a essa leguminosa como nativa da Ásia oriental (SANTOS, 1988). Vavilov (1951) cita a soja como originária do Centro Chinês, área que se situa nas regiões montanhosas da China central e ocidental, junto às terras baixas adjacentes. A partir da China, a soja se expandiu para outras partes da Ásia, sendo disseminada, posteriormente, para a América do Norte, Europa e América do Sul (BONETTI, 1981).

Atualmente, os líderes mundiais na produção de soja são: Estados Unidos responsável por 32,21% da produção mundial, seguido pelo Brasil com 30,56% da produção, Argentina com 19,03% e China com 4,30% da produção (FAO, 2015).

No Brasil, a soja foi introduzida primeiramente na Bahia, em 1882. Até meados dos anos 30 as regiões produtoras de soja no Brasil se restringiam a Bahia, São Paulo e Rio Grande do Sul, a primeira exportação de soja brasileira foi realizada no ano de 1949 (BORÉM, 2005). A alta do preço da soja no mercado mundial, em meados de 1970, a política favorável aos produtos de exportação, e o fracasso da cultura do café em algumas regiões,

favoreceu a grande expansão da cultura da soja no cenário da agricultura brasileira (CNPSO, 2015).

O Brasil possui vantagem competitiva em relação aos outros países produtores, pois o escoamento da safra brasileira ocorre na entressafra americana, quando os preços atingem as maiores cotações. O grande interesse na cultura e a alta rentabilidade impulsionaram investimentos em tecnologia para adaptação da cultura às condições climáticas brasileiras. Os investimentos em pesquisa levaram à "tropicalização" da soja, permitindo, pela primeira vez na história, que a semente fosse plantada, com sucesso, em regiões de baixas latitudes. Essa conquista dos pesquisadores 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 o preço do grão começou a reduzir (EMBRAPA, 2015).

A soja é a cultura mais plantada no Brasil. Desde o início da produção comercial até a safra de 2013/14, a área cultivada nacional aumentou de 702 para 30,173 milhões de hectares, a produção de 457 para 86,120 milhões de toneladas e a produtividade média de 651 para 2.854 kg/ha (BONATO; BONATO, 1987; CONAB, 2015). Os principais estados produtores são Mato Grosso, Paraná, Rio Grande do Sul e Goiás, esses quatro estados representam aproximadamente 67% de toda a produção (CONAB, 2015).

As doenças que incidem nos campos de produção são limitadoras do rendimento, da lucratividade e do sucesso da produção. Anualmente o produtor chega a perder de 15 a 20% de sua safra devido à ocorrência de doenças. No mundo são relatadas mais de 100 doenças diferentes na cultura da soja. No Brasil, em torno de 40 doenças causadas por fungos, bactérias, nematóides e vírus já foram identificadas. Esse número tende a aumentar devido à expansão da cultura para novas áreas de cultivo e também como consequência da monocultura (HENNING, 2009). Dentre as doenças que acometem a sojicultura, a ferrugem asiática tem sido considerada como uma das mais importantes.

2.2. Ferrugem asiática da soja

Duas espécies do gênero *Phakopsora* incidem na cultura da soja, *Phakopsora meibomiae* (Arthur) e *Phakopsora pachyrhizi* (Sydow). *P. meibomiae*, agente causal da ferrugem americana, foi relatada pela primeira vez no Brasil em 1979, mas o fungo raramente causa danos econômicos. Enquanto que *P. pachyrhizi* causadora da ferrugem asiática, é

considerada uma espécie altamente agressiva (JULIATTI et al., 2004; GOELLNER et al., 2010).

A ferrugem asiática da soja foi descrita primeiramente no Japão em 1902 e posteriormente, por volta de 1914, surgiu de forma epidêmica em outros países asiáticos (SCHNEIDER et al., 2005). 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 neste mesmo ano confirmado no Brasil. Após sua detecção, a ferrugem asiática se espalhou por todo o Brasil, Paraguai, Bolívia e parte da Argentina (YORINORI, 2004; JULIATTI et al., 2004). Nos Estados Unidos, a ferrugem foi primeiramente detectada em 2004, em parcelas experimentais de soja da Universidade Estadual da Louisiana (SCHNEIDER et al., 2005), sendo posteriormente detectada em outros estados americanos, como a Florida, Alabama, Arkansas, Mississippi, Missouri e Carolina do Sul, os quais ainda enfrentam problemas para o seu controle (JORGE, 2014).

O fungo *P. pachyrhizi* pertence ao filo *Basidiomycota*, classe *Pucciniomycetes*, ordem *Pucciniales* e família *Phakopsoraceae* (INDEX FUNGORUM, 2015). Como todos os agentes causais das ferrugens, o fungo *P. pachyrhizi* é um parasita obrigatório e sua manutenção no ambiente depende de hospedeiros vivos. Na falta da soja no campo, sua sobrevivência é dependente de hospedeiros alternativos como feijão e plantas voluntárias (YORINORI et al., 2006).

A dispersão do patógeno ocorre, principalmente, pelo vento, podendo atingir grandes distâncias. Os uredósporos constituem o inóculo responsável pelas epidemias, pois são facilmente removidos das urédias, e carregados pelo vento, quando as folhas estão secas (REIS et al., 2006). Após a deposição do esporo nas folhas saudáveis, ocorre a sua germinação e penetração pelos estômatos ou diretamente pelas células da epiderme, a formação de apressórios nem sempre é observada (DEISING et al., 2000; ZAMBENEDETTI et al., 2007; GOELLNER et al., 2010).

A doença manifesta-se de forma irregular, dependendo das condições ambientais como umidade e temperatura. O processo de infecção depende da disponibilidade de água livre na superfície da folha, sendo necessário no mínimo 6 h, com um máximo de infecção ocorrendo com 10-12 h de molhamento foliar. Em temperaturas ótimas entre 17 e 27 °C, a

germinação dos urediniósporos ocorre em 1 a 4 h após deposição (WARD et al., 2012). A infecção é favorecida por temperaturas entre 15 a 28 °C e umidade relativa do ar entre 75 e 85% (ALVES et al., 2006).

O sintoma da doença é caracterizado por pequenos pontos com menos de 1 mm de diâmetro, de coloração pardo-avermelhada, na parte superior das folhas. Na parte inferior da folha, a lesão é de coloração castanho-clara a castanho-escuro, tendo uma pequena elevação no centro, de coloração mais clara. Esta parte mais clara do centro constitui a cutícula que cobre a massa de uredósporos produzida no interior do tecido da folha. A coloração das lesões varia com a idade e a interação com o hospedeiro, por isso são classificadas como do tipo castanho clara com muitos soros urediniais e abundante esporulação (TAN) ou castanho-avermelhada com poucos soros urediniais e com pouca ou nenhuma esporulação (RB - Reddish Brown). As lesões TAN caracterizam genótipos suscetíveis à ferrugem, enquanto que as lesões RB, caracterizam a reação de resistência dos genótipos (JULIATTI et al., 2004; BONDE et al., 2006).

A ferrugem asiática reduz a atividade fotossintética pela destruição dos tecidos foliares, causando desfolha prematura e redução do ciclo da planta, impedindo a plena formação dos grãos. De acordo com Yang et al. (1991), quanto mais cedo a doença atingir a cultura e causar desfolha, menor serão os grãos e maiores as perdas na produção. Reduções significativas na produtividade de soja causadas pela ferrugem asiática têm sido reportadas na maioria dos países Sul e Sudeste-Asiáticos e Austrália. A doença também tem sido reportada na África, América Central, América do Sul e Caribe. Quase todos os países tropicais e subtropicais têm verificado a ocorrência da ferrugem asiática da soja, causando perdas elevadas, essas perdas variam, dependendo do momento em que ela incide na cultura, das condições climáticas e do manejo da cultura, podendo chegar a 80% (BROMFIELD, 1984; PANDEY et al., 2010).

No Brasil, na safra 2008/09, houve incidência de *P. pachyrhizi* em todos os estados produtores, exceto Roraima e 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. (CAF, 2015).

Algumas estratégias podem ser usadas para o controle da doença. O uso de defensivos agrícolas é a mais tradicional. Vários tipos de fungicidas podem ser utilizados, dentre eles os

triazóis, fungicidas do grupo dos inibidores da biossíntese de ergosterol, usados em formulações simples ou em misturas com as estrobilurinas, que inibem a respiração mitocondrial do fungo (BARLETT et al., 2002; JULIATTI et al., 2004; JULIATTI et al., 2010) e ainda os fungicidas do grupo dos benzimidazóis, inibidores da síntese de DNA (GODOY; CANTERI, 2004). 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 (CAF, 2010).

Outras estratégias devem ser utilizadas a fim de contornar os riscos e diminuir o custo de controle da doença. Uma delas é a adoção do vazio sanitário. O vazio sanitário é definido como um período no qual é proibido cultivar, implantar, bem como manter ou permitir a presença de plantas de soja vivas em qualquer fase de desenvolvimento. Neste período, apenas áreas de pesquisa científica e de produção de semente genética, devidamente monitorada e controlada, são liberadas para o cultivo. Ele visa reduzir a quantidade de uredósporos no ambiente durante a entressafra e, dessa forma, diminuir a possibilidade de incidência precoce da ferrugem asiática. Apenas quatro estados produtores não adotam o vazio sanitário: Roraima, Piauí, Rio Grande do Sul e Santa Catarina. (CONAB, 2015).

A utilização de plantas precoces também pode ser eficiente no controle, pois, essas plantas apresentarem um curto período reprodutivo possibilitando a colheita precoce, o que diminui o tempo que o patógeno tem para se multiplicar na lavoura (YORINORI; LAZZAROTTO, 2004).

Entretanto, dentre as estratégias utilizadas, a melhor forma para o controle a doença é a utilização de genótipos resistentes. Porém, existe um número pouco significativo de genótipos que apresentam esta característica, o que torna de grande utilidade estudos e trabalhos que visam o desenvolvimento de cultivares com resistência à ferrugem (MORALES et al., 2012).

2.3. Resistência genética

A obtenção de cultivares resistentes à ferrugem asiática é a melhor estratégia para o controle duradouro e efetivo da doença. Nesse caso, dois tipos de resistência podem ser considerados: vertical e horizontal.

A resistência vertical é geralmente controlada por poucos genes de efeito principal, de característica qualitativa, possuindo herança monogênica e sendo uma forma de resistência raça-específica pouco influenciada pelo ambiente. 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).

Seis *loci* com genes que conferem resistência vertical a *P. pachyrhizi* já foram descritos, são os chamados de *Rpps* (sigla derivada de *resistence to P. pachyrhizi*): *Rpp1* (primeiramente identificado na Planta Introduzida, PI-200492), *Rpp2* (PI-230919), *Rpp3* (PI-462312), *Rpp4* (PI-459025) (BROMFIELD; HARTWIG, 1980; HARTWIG, 1986, GARCIA *et al.*, 2008), *rpp5* (PI-200456) (GARCIA *et al.*, 2008), e *Rpp6* (PI-567102B) (LI *et al.*, 2012),; *rpp2* [?] (PI-224270) (CALVO *et al.*, 2008) e *Rpp?* (Hyuuga) (MONTEIROS *et al.*, 2007). Todos esses genes conferem resistência, exceto *Rpp1* que confere imunidade, a algum isolado de *P. pachyrhizi* (MILES *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2015; YU *et al.*, 2015).

Todos os seis *loci* já foram geneticamente mapeados: *Rpp1*, *Rpp4* e *Rpp6* foram mapeados em três diferentes regiões do cromossomo 18 (HYTEN *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2012), *Rpp2* no cromossomo 16 (SILVA *et al.*, 2008), *Rpp3* no cromossomo 6 (HYTEN *et al.*, 2009), e *Rpp5* no cromossomo 3 (GARCIA *et al.*, 2008). Um novo alelo do gene *Rpp1*, descrito como *Rpp1-b*, foi mapeado na PI-594583A (KIM *et al.*, 2012). O alelo recessivo *rpp2* também foi identificado na PI-230970 na mesma região do alelo dominante *Rpp2* (GARCIA *et al.*, 2008). Para o gene *Rpp5* foram descritos 3 diferentes alelos, incluindo um alelo com dominância completa em PI-200526 e PI-200487, um alelo com dominância incompleta na PI-471904 e um alelo recessivo na PI-200456 (GARCIA *et al.*, 2008).

A resistência horizontal é geralmente conferida por vários genes de efeitos secundários, característica quantitativa, sendo comumente interpretada como uma herança poligênica. Essa resistência se deve a somatória de efeitos de cada gene, que irão contribuir para a resistência à doença (RAMALHO, 2008). 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 reduz a intensidade da doença, pois afeta o desenvolvimento do patógeno (GLADIEUX, 2011; MCDONALD; LINDE, 2002). A maior dificuldade para trabalhar com este tipo de característica está relacionada com as dificuldades de contornar os efeitos ambientais (AGRIOS, 2005).

Uma característica importante que desfavorece a utilização de cultivares com genes de resistência vertical está relacionada à sua baixa durabilidade. Devido à grande variedade de isolados, a ação destes genes pode ser superada pelo surgimento de um isolado mais efetivo (WALKER et al., 2011). Os genes *Rpp1* e *Rpp3* só foram efetivos contra a ferrugem no Brasil nos dois primeiros anos após o aparecimento da doença (ARIAS et al., 2004). Enquanto que *Rpp3*, *Rpp4* e *Rpp5* só demonstram eficiência em algumas partes do país (MORALES, 2012).

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 não só depende 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 (elicitores) 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 que supera a resistência vertical (AGRIOS, 2005)

Devido às dificuldades associadas com a identificação de cultivares de soja com resistência para todos os isolados de *P. pachyrhizi*, e a inefetividade da resistência raça – específica, as pesquisas básicas têm sido direcionadas para obtenção de cultivares com

resistência parcial à doença, o que permite uma resistência duradoura contra o patógeno (GOELLNER *et al.*, 2010).

2.4. QTL (*Quantitative Trait Loci*)

QTL (*Quantitative Trait Loci*, em português, *Loci* de Caracteres Quantitativos) corresponde a uma região do DNA onde genes com herança poligênica, de efeito menor, estão associados atuando em um caráter específico (COUTO *et al.*, 2010). Estes genes contribuem com uma pequena parcela do efeito sobre o fenótipo, causando uma variação contínua na característica em estudo. Existem QTLs associados a diversas 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, foi reportada a presença de QTLs relacionados a varias características, como por exemplo, ao tamanho e forma de folíolos, a determinação da época de florescimento, a coloração da pubescência e de florescimento e maturação (YAMANAKA *et al.*, 2001). Foram relatados também QTLs associados a resistência a vários fungos causadores de prejuízos às lavouras de soja, como *Sclerotinia sclerotiorum*, causador do mofo branco (IQUIRA *et al.*, 2015), *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; ACHARYA *et al.*, 2015), *Phytophthora sojae*, causador da podridão de semente (WANG *et al.*, 2012) e *Septoria glycines*, responsável pela septoriose ou mancha-parda (BROGIN, 2005). Além destes, existem outros trabalhos que identificaram 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; FERREIRA *et al.*, 2011) e de resistência a insetos (KOMATSU *et al.*, 2005; TERRY *et al.*, 2000).

A influência do ambiente sobre a expressão fenotípica dos genes relacionados ao QTL é uma característica que dificulta o trabalho dos melhoristas. O fato de estes genes possuírem efeito secundário, quando comparado a genes qualitativos, faz com que sejam mais influenciados pelo ambiente, o que dificulta a seleção dos melhores genótipos (FALCONER; MACKAY, 1996). Para o estudo de caracteres quantitativos, o ideal é avançar a geração

originada até onde a homozigose predomina (F_7 , $F_8...$), pois o alto índice de homozigose diminui a possibilidade de segregação destes genes dentro da população. 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. Uma ferramenta para a avaliação de QTLs é a utilização de marcadores moleculares, pois esses detectam o polimorfismo diretamente no genótipo, eliminando a influência do ambiente que é expressa no fenótipo (SOUZA, 2001).

O mapeamento de QTLs é uma alternativa ao controle da doença, visto que permite a identificação de genes de efeitos menores, mas importantes para a interação da planta com o patógeno (WANG et al., 2010). No caso da ferrugem asiática da soja, o grande interesse na utilização de QTLs está relacionado ao seu efeito prolongado quando comparado a genes de resistência vertical, visto que vários isolados do patógeno não conseguem superá-lo, o que dificulta o desenvolvimento da doença (PIEROZZI, 2007; JORGE et al., 2015), 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; SILVA, JULIATTI, SILVA, 2007). 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), Potenza e IAC 100 (SILVA, JULIATTI, SILVA, 2007). 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.

2.5. Marcadores moleculares

A atuação do melhoramento genético clássico tem influenciado de maneira decisiva o aumento da produção agrícola no mundo. Para isso, é necessário um conhecimento da constituição genética das espécies e obtenção de ganhos no melhoramento genético. O termo marcador indica que sua função é, entre outras, identificar algo. Esses marcadores podem ser classificados em: citológicos, bioquímicos e genéticos (BORÉM; MIRANDA, 2005).

Marcadores genéticos são características que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdados geneticamente (RAMALHO, 2008). Estes são utilizados para a detecção de

polimorfismo, onde seqüências pertencentes ao mesmo loco são representadas em uma espécie por duas ou mais formas alélicas diferentes entre si. Estes podem ser classificados em morfológicos ou moleculares (PÍPOLO et al., 2006).

Os marcadores morfológicos foram os primeiros marcadores utilizados, em geral fenótipos de fácil identificação visual, como nanismo, cor de pétala, morfologia foliar, entre outros, a base genética desse marcador consiste na proximidade física dele com o gene que controla a característica de interesse, assim, a seleção desse marcador resulta na seleção indireta do gene de interesse agrônômico (RAMALHO, 2008). Marcadores morfológicos contribuíram significativamente para elucidar a ligação entre o gene e um determinado fenótipo de interesse, contribuindo para o entendimento da análise de ligação gênica e a construção das primeiras versões dos mapas genéticos. Entretanto, o número reduzido de marcadores morfológicos distintos reduz a probabilidade de se encontrar associações significativas entre esses marcadores e os caracteres de importância agrônômica, limitando sua utilização (GUIMARÃES; MOREIRA, 1999).

A introdução de técnicas de genética molecular aconteceu no início da década de 80 e desde então a caracterização, identificação e mapeamento genético estão sendo realizados com maior segurança e eficiência (BERED et al., 1997). Os marcadores moleculares permitem a seleção por meio do genótipo devido sua neutralidade em relação aos efeitos ambientais com pouco ou nenhum efeito de epistasia ou pleiotropismo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; LANZA et al., 2000), podendo ser utilizados em vários estágios de desenvolvimento da planta, além de permitirem a análise a partir de pequenas amostras de tecidos vivos, liofilizados ou até fossilizados, desde que uma quantidade suficiente de DNA possa ser obtida (YAMANAKA, 2015).

Atualmente, estão disponíveis diversas técnicas de biologia molecular para a detecção de polimorfismo genético. São muitas as aplicações dos marcadores moleculares em soja, sendo principalmente utilizados em análises de diversidade genética, na caracterização de germoplasma e no mapeamento de genes e QTLs de interesse (YAMANAKA et al., 2015; LANZA et al., 2000;). Há vários tipos de marcadores moleculares disponíveis para estudos genéticos, sendo que os mais utilizados são as Isoenzimas, o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) e os Microssatélites (SSR – *Simple Sequence Repeats*) (RAMALHO, 2008).

Cada tipo de marcador molecular possui suas particularidades, vantagens e desvantagens na detecção de polimorfismos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). A utilização de uma ou outra técnica deve levar em consideração os problemas a serem solucionados, assim como todo o aspecto de capacitação técnica, instalações, custos e limitações existentes em cada pesquisa (PÍPOLO et. al, 2006).

2.6. Microssatélites (SSR)

Microssatélites ou sequências simples repetidas (SSR, do inglês *simple sequence repeats*) são blocos de seqüências repetidas de um a seis nucleotídeos, posicionados em tandem e distribuídos ao longo do genoma, esses blocos são geralmente flanqueados por regiões altamente conservadas entre espécies (POWELL et al., 1996; MORGANTE; OLIVIERI, 1993) .

Cada microssatélite constitui um loco genético altamente variável, multialélico e de grande conteúdo informativo, e por isso, uma das classes mais polimórficas de marcadores moleculares. Esses marcadores são uma ferramenta eficiente para estudos genéticos quando combinados com a especificidade e rapidez da tecnologia da PCR (CAIXETA et al. 2006). Após amplificação dessas regiões específicas, o polimorfismo no tamanho dos fragmentos obtidos é devido ao número diferente de repetições das seqüências simples. Os Microssatélites são marcadores codominantes e multialélicos, fornecendo um elevado nível de informação genética por loco.

Os Microssatélites apresentam vantagens sobre outros marcadores, como RAPD e AFLP, pois são codominantes, o que possibilita a distinção entre homozigotos e heterozigotos, possuem alta reprodutibilidade, permitem uma cobertura ampla do genoma, são altamente polimórficos e de simples execução (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 às doenças (HYTEN et al., 2009; SILVA et al., 2008; GARCIA et al., 2008; 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; FREIRE et al., 2008). Os marcadores têm sido cada vez mais usados para a análise genética em soja, com os mais variados objetivos, principalmente,

visando o melhoramento por seleção assistida de QTLs, mais especificamente por ligação aos locos de resistência a doenças (ARAHANA et al., 2001).

2.7. Método do *bulk segregante* (BSA)

O método do *Bulk Segregante* (*Bulked Segregant Analysis* - BSA), ou análise de grupos segregantes, é um procedimento rápido para identificar marcadores ligados a um gene ou uma região genômica de interesse agrônômico (MICHELMORE et al., 1991).

Este método é uma alternativa ao mapeamento molecular saturado que é uma atividade cara, trabalhosa e que demanda muito tempo. O método de BSA surgiu como uma modificação feita por Michelmore (MICHELMORE et al., 1991) à técnica anteriormente proposta por Arnheim (ARNHEIM et al., 1985), que consistia na análise de misturas de DNA de indivíduos homozigotos para um determinado loco através da identificação prévia por RFLP de locos associados com doenças em seres humanos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

O BSA envolve a comparação de dois *pools* de amostras de DNA dos indivíduos de uma população segregante originária de um único cruzamento. Dentro de cada *pool* ou *bulk*, os indivíduos são idênticos para a característica ou gene de interesse, mas são arbitrários para todos os outros genes. Dois *pools* contrastantes para uma característica são analisados a fim de identificar marcadores que possam distingui-los. Marcadores que forem polimórficos entre os *bulks* serão potencialmente ligados a região genômica que determina a característica considerada para construir os *bulks* (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Esta evidência de ligação gênica entre o marcador polimórfico e o loco alvo é confirmada pela análise de segregação da população segregante. Estima-se, desta forma, o valor da frequência de recombinação entre o marcador e o loco genético que controla o caráter (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

O método BSA utiliza uma seleção genômica prévia para reduzir drasticamente o esforço necessário à identificação de ligação gênica e focaliza a análise diretamente na região do genoma associada ao caráter de interesse. Os marcadores identificados estão, em geral, numa janela genética de 25 cM de cada lado do alvo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; MICHELMORE et al., 1991).

O método tem duas aplicações imediatas no desenvolvimento de mapas genéticos: o desenvolvimento de mapas genéticos detalhados através da análise da segregação de marcadores moleculares selecionados em populações e a localização rápida de genes que não segregam em populações inicialmente usadas para gerar o mapa genético (MICHELMORE et al., 1991, DUVEAU et al., 2014).

2.8. Mapeamento Genético

O reconhecimento da ligação genética permitiu a construção dos primeiros mapas genéticos de espécies cultivadas, antes mesmo do material genético ser denominado DNA (MORGAN, 1910; MacARTHUR, 1934).

O conceito do mapeamento genético é baseado na hipótese de que a co-segregação de dois marcadores indica proximidade, e que a probabilidade de ocorrer permutas gênicas entre os marcadores é inversamente proporcional a distância entre eles. Dessa forma, é possível ordenar linearmente a informação genética ao longo dos cromossomos (LIU, 1998).

Para o mapeamento genético, diferentes tipos de populações podem ser utilizadas, estas populações são comumente chamadas de populações de mapeamento. Estas se dividem em populações endogâmicas ou populações derivadas de cruzamentos controlados e em populações exogâmicas ou populações naturais. As populações F_n ($n = 3, 4, \dots, \infty$), de retrocruzamento e linhagens recombinantes (*Recombinant Inbred Lines*, RILs), são os tipos mais utilizados para construção de mapas moleculares (BRONDANI et al., 2003; PEREIRA; PEREIRA, 2006). As populações endogâmicas podem ser avaliadas já na geração F_2 , porém, quanto mais avançada estiver a população, mais homozigota esta se encontrará e será possível estudar os caracteres de interesse com maior facilidade (PEREIRA; PEREIRA, 2006). A escolha da população deve levar em conta os objetivos do pesquisador, além do tempo e dos recursos disponíveis (LANZA et al., 2000; SHUSTER; CRUZ, 2004).

A probabilidade de ocorrência de permuta genética entre dois marcadores, ou frequência de recombinação, reflete a distância genética entre os locos (LIU, 1998). A distância de mapeamento, expressa em centiMorgans (cM), é calculada com base na frequência de recombinação por meio de funções de mapeamento, as quais corrigem as distorções entre a conversão das unidades. A função de Haldane (HALDANE, 1919) é a mais simples e admite que as permutas genéticas ocorram ao acaso e sejam independentes. A função de Kosambi (KOSAMBI, 1944) considera interferência parcial nos cálculos da

distância em cM. A interferência significa que uma permuta genética afeta a ocorrência de outras em regiões adjacentes, considerando a ocorrência de permutas duplas. Um marcador deve ser polimórfico entre os indivíduos parentais e apresentar uma segregação mendeliana esperada na progênie para ser utilizado no mapeamento genético (LANZA et al., 2000; SCHUSTER; CRUZ, 2004).

Mapear QTLs consiste em analisar regiões cromossômicas que contenham genes (ou blocos gênicos) que influenciam a variação de caracteres quantitativos. Análises desse tipo permitem identificar tanto o número, como a distribuição dos QTLs no genoma, além de identificar o tipo e a magnitude de seus efeitos (LIU, 1998; LYNCH; WALSH, 1998).

Em geral, no mapeamento de QTL a herança complexa dos caracteres quantitativos é relacionada à herança simples de caracteres qualitativos conhecidos, com base em marcadores genéticos. Diversos métodos estatísticos permitem quantificar essa relação, analisando a associação entre a variação de dados fenotípicos contínuos e o padrão de segregação de marcadores em populações segregantes. Associações significativas entre os fenótipos e os marcadores indicam a existência de QTLs localizados próximos a esses locos marcadores e permitem que sejam feitas inferências sobre os QTL (LIU, 1998).

2.9. Delineamento em blocos aumentados e predição de valores genéticos

Em programas de melhoramento genético de plantas é comum o melhorista se deparar com um número elevado de genótipos a serem avaliados em condições de campo. Nessa situação, utiliza-se, frequentemente, o delineamento em blocos aumentados.

A classe dos delineamentos aumentados foi introduzida por Walter T. Federer, na década de cinquenta, esse delineamento veio atender a uma necessidade experimental presente nas fases preliminares dos programas de melhoramento vegetal, quando o número de genótipos a ser avaliados é muito grande, a quantidade de material de propagação (sementes, tubérculos, etc.) para cada uma delas é pequena e ou a área experimental tem tamanho reduzido (FEDERER 1956; 1958; 1961, 1961a, 1963, FEDERER & RAGHAVARAO, 1975, FEDERER et al., 1975).

Os delineamentos em blocos aumentados são caracterizados pela ausência de repetições dos tratamentos principais e pela presença de testemunhas repetidas em todos os blocos, um delineamento experimental padrão é escolhido para as testemunhas, ou

tratamentos controle, em seguida os blocos (linhas e/ou colunas) são aumentados com parcelas que acomodarão os tratamentos adicionais. Estes últimos tratamentos, usualmente aparecem sem repetição, ou seja, uma única vez em todo o experimento (FEDERER; CROSSA, 2012). As testemunhas podem estar dispostas em blocos completos ou incompletos, balanceados ou parcialmente balanceados, mas o conjunto completo dos tratamentos (testemunhas + tratamentos novos) sempre estará distribuído em blocos incompletos, ou seja, segundo um delineamento não ortogonal. O mesmo ocorre quando se consideram apenas os novos tratamentos (FEDERER; KING, 2007). Outra característica típica desses ensaios é que devida a grande extensão dos experimentos pode ocorrer algum desbalanceamento não planejado, seja em decorrência da perda de parcelas, seja pela repetição desigual de alguns tratamentos genéticos (FEDERER et al., 1975).

As testemunhas podem ser consideradas de efeitos fixos ou de efeitos aleatórios. Na concepção original (FEDERER, 1958) são consideradas de efeitos fixos. Na metodologia de modelos mistos, se as testemunhas são avaliadas em muitas repetições, pode-se considerá-las como de efeitos aleatórios. Nesse caso, considerá-las como de efeitos fixos ou aleatórios conduz praticamente aos mesmos resultados. Inicialmente os blocos aumentados buscavam principalmente a obtenção de médias de tratamentos ajustadas para os efeitos de blocos, uma vez que os novos tratamentos são testados entre si em blocos diferentes. Assim, o enfoque foi dirigido para o modelo de efeitos fixos (blocos e tratamentos), ou seja, restringindo-se a análise intrablocos. O desenvolvimento de novos aplicativos computacionais mais robustos permitiu que os efeitos de blocos também fossem analisados como aleatórios (YATES, 1939; RAO, 1947; PATTERSON; THOMPSON, 1971). Usualmente, este tipo de análise também é aplicado admitindo-se os efeitos de tratamentos como fixos. Todavia, como afirmam Wolfinger *et al.* (1997) e Federer (1998), nos estágios iniciais dos programas de seleção, a natureza aleatória dos genótipos sob teste também precisa ser levada em consideração, dessa forma a utilização dos modelos mistos é necessária, haja vista os efeitos fixos de testemunhas, e aleatórios de progênies.

Até o início da década de 80 os modelos mistos eram pouco utilizados, uma vez que poucos aplicativos computacionais estavam disponíveis, dessa forma a adoção dos modelos fixos era predominante. Atualmente, com a ampla disponibilidade de *softwares* estatísticos (Selegen-REML/BLUP, SAS, STATISTICA, MINITAB, GENSTAB, etc.) permite uma melhor adoção dos modelos mistos (RESENDE, 2006).

É importante ressaltar que apesar do delineamento em blocos aumentados ou blocos de Federer não apresentar repetições para os tratamentos regulares, certos estratos ambientais podem funcionar como blocos, como por exemplo, cruzamentos diferentes. As avaliações sempre serão a nível de plantas (RESENDE, 2006).

Atualmente, o procedimento ótimo de predição de valores genéticos é o *best linear unbiased prediction* (melhor predição linear não viesada), ou BLUP (RESENDE, 2002). Esse procedimento tem sido mais utilizado na predição genética em animais (MRODE, 1996) e, mais recentemente, tem sido aplicado no melhoramento de espécies perenes (RESENDE, 2002). Sob condições de desbalanceamento, tem maiores vantagens quando comparado com o método dos quadrados mínimos ponderados, além de incorporar a informação de plantas individuais, otimizando as comparações entre as progênes por meio dos valores genéticos (BERNARDO, 2002). Valores genéticos preditos referem-se, de acordo com Falconer; Mackay (1996), à avaliação do somatório dos efeitos médios dos alelos que o indivíduo possui.

Um dos entraves à obtenção de ganhos genéticos mais expressivos no melhoramento de plantas é a baixa acurácia seletiva. Para resolver isto, a predição por BLUP, com uso de componentes de variância estimados via REML (máxima verossimilhança restrita) é a melhor opção (RESENDE, 2004). O uso de modelos mistos do tipo REML/BLUP é fundamental para a predição de valores genéticos aditivos e genotípicos, tanto intra quanto interpopulacionalmente (RESENDE, 2000). Mesmo em condições de experimentos desbalanceados, essa abordagem permite a predição acurada e não viesada dos valores genéticos, propicia informações específicas sobre o mérito da progênie e de indivíduos nas progênes (RESENDE, 2007). Assim, as propriedades do BLUP permitem maximização da acurácia seletiva, minimização do erro de predição, predição não viciada de valores genéticos, maximização do ganho genético - por ciclo de seleção - e maximização da probabilidade de seleção do melhor entre dois ou vários genótipos (RESENDE, 2004).

3. REFERÊNCIAS

- ACHARYA, B. et al. Identification and mapping of quantitative trait loci (QTL) conferring resistance to *Fusarium graminearum* from soybean PI 567301B. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.128, p.827-838, 2015.
- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5.ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005.
- ALVES, S. A. M.; FURTADO, G. Q.; BERGAMIN FILHO, A. Influência das condições climáticas sobre a ferrugem da soja. In: ZAMBOLIM, L. (ed.). **Ferrugem asiática da soja**. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora Ltda., 2006. p.37-59.
- ARAHANA, V.S. et al. Identification of QTLs for resistance of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Crop Science**, Madison, v.41, p.180-188, 2001.
- ARIAS, C. A. A. et al. Inheritance of resistance of soybean to rust (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow). In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 7., 2004, Londrina, Brasil. **Anais...** Londrina: Embrapa Soja, 2004.
- ARNHEIM, N.; STRANGE, C.; ERLICH, H. Use of pooled DNA samples to detect linkage disequilibrium of polymorphic restriction fragments and human disease: studies of the HLA class II loci. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, Washington, v.82, n.20 p.6970-6974, 1985.
- BARLETT, D. W. et al. The strobilurin fungicides. **Pest Management**, Sussex, v.58, p.649-662, 2002.
- BERED, F.; BARBOSA NETO, F. J.; CARVALHO, F. I. F. Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.27, p.513-520, 1997.
- BERNARDO, R. **Breeding for quantitative traits in plants**. Woodbury: Minnesota, 2002. 369p.
- BONATO, E. R.; BONATO, A. L. V. **A Soja no Brasil: história e estatística**. Londrina: EMBRAPA / CNPSo, 1987. 61p.
- BONDE, M. R. et al. Evaluation of virulence of *Phakopsora pachyrhizi* and *P. meibomia* isolates. **Plant Disease**, Saint Paul, v.90, n.6, p.708-716, 2006.
- BONETTI, L. P. Distribuição da soja no mundo: origem, história e distribuição. In: MIYASAKA, S.; MEDINA, J. C. (eds). **A Soja no Brasil**. Campinas: IAC, 1981. p.1-5.
- BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. 3.ed. Viçosa: UFV, 2005. 453p.
- BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de Plantas**. 4.ed. Viçosa: UFV, 2005. 525p.
- BROGIN, R. L. **Mapeamento de genes de resistência à ferrugem e de QTLs envolvidos na resistência à septoriose em soja**. 2005. 93f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2005.

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

BROMFIELD, K. R. **Soybean Rust**. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1984.

BRONDANI, C.; BRONDANI, R. P. V.; RANGEL, P. H. N. **Utilização de marcadores moleculares em programas de ampliação da base genética de espécies cultivadas**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2003. 36p.

CAIXETA, E. T. et al. Tipos de Marcadores Moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (eds). **Marcadores Moleculares**. Viçosa: UFV, 2006. p.9-78.

CALVO, E.S. et al. Two major recessive soybean genes conferring soybean rust resistance. **Crop Science**, Madison, v.48, p.1350-1354, 2008.

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

CHEN, H. et al. Genetic analysis and molecular mapping of resistance gene to *Phakopsora pachyrhizi* in soybean germplasm SX6907. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.128, n.4, p.733-743, 2015.

CNPSo - **Centro Nacional de Pesquisa em Soja**. 2015. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/sojaemnumeros/>>. Acesso em: jun. 2015.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento da safra brasileira de grãos: safra 2014/15**. 2015. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: jun. 2015.

CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM. 2015. Disponível em: <<http://www.consorcioantiferrugem.net/>>. Acesso em: jun. 2015.

COUTO, K. R. et al. Identificação de marcadores microsatélites relacionados ao escurecimento de grãos em feijão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.45, n.11, p.1268-1274, 2010.

DEISING, H. B.; WERNER, S.; WERNITZ, M. The role of fungal appressoria in plant infection. **Microbes and Infection**, Paris, v.2, n.13, p.1631-1641, 2000.

DUARTE, J. B.; VENKOVSKY, R.; DIAS, C. T. S. Estimadores de componentes de variância em delineamento de blocos aumentados com tratamentos novos de uma ou mais populações. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, p.1155-1167, 2001.

DUVEAU, F. et al. Mapping small effect mutations in *Saccharomyces cerevisiae*: impacts of experimental design and mutational properties. **G3**, Bethesda, v.4, n.7, p.1205-1216, 2014.

EMBRAPA - **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. 2015. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja>>. Acesso em: jun. 2015.

FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. C. **Introduction to Quantitative Genetics**. 4.ed. Essex: Longman, 1996. 464p.

FAO - **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. 2015. Disponível em: <<http://www.fao.org/>>. Acesso em: jun. 2015.

FARIAS NETO, A. L. de. et al. 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**, Dordrecht, v.20, p.53-62. 2007.

FEDERER, W. T. Augmented designs with one-way elimination of heterogeneity. **Biometrics**, Washington, v.17, p.447-473, 1961.

FEDERER, W. T. Augmented designs with two-three and higher-way elimination of heterogeneity. **Biometrics**, Washington, v.17, p.166, 1961a.

FEDERER, W. T. Procedures and designs useful for screening material in selection and allocation, with a bibliography. **Biometrics**, Washington, v.19, p.553-587, 1963.

FEDERER, W. T.; KING, F. **Variations on Split Plot and Split Block Experiment Designs**. Hoboken: John Wiley and Sons Inc., 2007. 270p.

FEDERER, W. T.; RAGHAVARAO, D. On augmented designs. **Biometrics**, Washington, v.31, p.29-35, 1975.

FEDERER, W. T.; NAIR, R. C.; RAGHAVARAO, D. Some augmented row-column designs. **Biometrics**, Washington, v.31, p.361-373, 1975.

FEDERER, W. T.; CROSSA, J. I.4 screening experimental designs for quantitative trait loci, association mapping, genotype-by environment interaction, and other investigations. **Frontiers in Physiology**, [S.l.], v.3, n.156, 2012.

FEDERER, W. T. Augmented designs. **Hawaian Planter's Record**, [S.l.], v.55, p.191-208, 1956.

FEDERER, W. T. Recovery of interblock, intergradient, and intervariety information in incomplete block and lattice rectangle designed experiments. **Biometrics**, Washington, v.54, p.471-481, 1998.

FERREIRA, M. F. S. et al. QTLs de resistência ao nematoide do cisto da soja, raças 3, 9 e 14 na cultivar Hartwig. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.46, n.4, p.420-428, 2011.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: CENARGEN-EMBRAPA, 1998. 220p.

FLOR, H. H. Current Status of the Gene-For-Gene Concept. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.9, p.275-296, 1971.

FREIRE, M. C. M. et al. Evolutionary history of *Phakopsora pachyrhizi* (the Asian soybean rust) in Brazil based on nucleotide sequences of the internal transcribed spacer region of the nuclear ribosomal DNA. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.31, p.920-931, 2008.

GARCIA, A. et al. Molecular mapping of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) resistance genes: discovery of a novel locus and alleles. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.117, p.545-553, 2008.

GAZZONI, D. L. Botany. In: FAO. (ed.). **Tropical soybean: improvement and production**. Rome: FAO, 1994. p.1-12.

GLADIEUX, P. et al. Epidemiology and evolution of fungal pathogens, in plants and animals. In: _____. **Genetics and Evolution of Infectious Diseases**. Melbourne: Elsevier, 2011 p.772.

GODOY, C. V.; CANTERI, M. G. Efeitos protetor, curativo e erradicante de fungicidas no controle da ferrugem da soja causada por *Phakopsora pachyrhizi*, em casa de vegetação. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, p.97-101, 2004.

GOELLNER, K. et al. *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust. **Molecular Plant Pathology**, London, v.11, p.169-177, 2010.

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

HARTMAN, G. L. et al. 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 Iguaçu. **Anais...** Londrina: Embrapa Soja, 2004.

HARTWIG, E. E. Identification of a 4th major gene conferring resistance to soybean rust. **Crop Science**, Madison, v.26, p.1135-1136, 1986.

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

HENNING, A. A.; GODOY, C. V. Situação da ferrugem da soja no Brasil e no mundo. In: ZAMBOLIM, L. (ed.). **Ferrugem Asiática da Soja**. Viçosa: UFV, 2009. p.1-14.

HYTEN, D. L. et al. Bulk segregant analysis using the goldengate assay to locate the *Rpp3* locus that confers resistance to soybean rust in soybean. **Crop Science**, Madison, v.49, p.265-271, 2009.

INDEX FUNGORUM. 2015. Disponível em: < <http://www.indexfungorum.org/>>. Acesso em: jun. 2015.

IQUIRA, E.; HUMIRA, E.; FRANÇOIS, B. Association mapping of QTLs for sclerotinia stem rot resistance in a collection of soybean plant introductions using a genotyping by sequencing (GBS) approach. **BMC Plant Biology**, Stuttgart, v.15, n.5, 2015.

JORGE, V. R. et al. The origin and genetic diversity of the causal agent of Asian soybean rust, *Phakopsora pachyrhizi*, in South America. **Plant Pathology**, Oxford, v.64, n.3, p.729-737, 2014.

- JULIATTI, F. C. et al. Resistência genética da soja à *Phakopsora pachyrhizi* e uso de fungicidas no manejo sustentável da doença. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.18, n.1, p.77-118, 2010.
- JULIATTI, F. C.; POLIZEI, A. C.; JULIATTI, F.C. **Manejo integrado de doenças de soja**. Uberlândia: Composer, 2004. 327p.
- KIM, K. S. et al. Molecular mapping of soybean rust resistance in soybean accession PI 561356 and SNP haplotype analysis of the *Rpp1* region in diverse germplasm. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.125, n.6, p.1339-1352, 2012.
- KOMATSU, K. et al. QTL mapping of antibiosis resistance to common cutworm (*Spodoptera litura* Fabricius) in soybean. **Crop Science**, Madison, v.45, p.2044-2048, 2005.
- KOSAMBI, D. D. The estimation of map distance from recombination values. **Annuaire of Eugenetics**, [S.l.], v.12, p.172-175, 1944.
- LANZA, M. A.; GUIMARÃES, T. C.; SHUSTER, I. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.21, p.97-108, 2000.
- LEWERS, K. S. et al. Detection of linked QTL for soybean brown stem rot resistance in 'BSR101' as expressed in a growth chamber environment. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v.5, p.33-42, 1999.
- LI, S. et al. Identification of a new soybean rust resistance gene in PI 567102B. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.125, p.133-142, 2012.
- LIU, B. H. **Statistical genomics: linkage, mapping, and QTL analysis**. Boca Raton: CRC Press, 1998. 611p.
- LYNCH, M.; WALSH, B. **Genetics and analysis of quantitative traits**. Sunderland: Sinuauer Associates, Inc., 1998. 980p.
- MacARTHUR, J. D. Linkage groups in tomato. **Journal of Genetics**, Bangalore, v.29, p.123-133, 1934.
- McDONALD, B. A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.40, p.349-379, 2002.
- MICHELMORE, R. W.; PARAN, I.; KESSELI, R. V. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulk segregant analysis a rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.88, n.1, p.9828-9832, 1991.
- MILES, M. R. et al. International fungicide efficacy trials for the management of soybean rust. **Plant Disease**, Saint Paul, v.91, p.1450-1458, 2007.
- MONTEROS, M. J. et al. Mapping and confirmation of the 'Hyuuga' red-brown lesion resistance gene for Asian soybean rust. **Crop Science**, Madison, v.47, n.2, p.829-836, 2007.

- MORALES, A. M. A. P. et al. Advances on molecular studies of the interaction soybean - Asian rust. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, [S.l.], v.12, p.1-7, 2012.
- MORGAN, T. H. Sex-linked inheritance in Drosophila. **Science**, London, v.32, p.120-122, 1910.
- MORGANTE, M.; OLIVIERI, A. M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **Plant Journal**, Oxford, v.3, p.175-182, 1993.
- MRODE, R. A. **Linear models for the prediction of animal breeding values**. Guildford: Biddles, 1996. 184p.
- PANDEY, A. K. et al. Functional analysis of the Asian soybean rust pathway mediated by *Rpp2*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, [S.l.], v.24, n.2, p.194-206, 2010.
- PATTERSON, H. D.; THOMPSON, R. Recovery of inter-block information when block sizes are unequal. **Biometrika**, London, v.58, p.545-554, 1971.
- PEREIRA, M. G.; PEREIRA, T. N. S. Marcadores Moleculares no Pré-melhoramento de Plantas. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (eds). **Marcadores Moleculares**. Viçosa: UFV, 2006. p.85-106.
- PIEROZZI, P. H. B. **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, 2007.
- PÍPOLO, V. C.; GARCIA, J. E.; RINALDI, D. A. Desenvolvimento e aplicações de marcadores moleculares. In: PÍPOLO, V. C.; GARCIA, J. E. (eds). **Biotecnologia na Agricultura: aplicações e biossegurança**. Londrina: UEL, 2006. p.1-29.
- POWELL, W.; MACHRAY, G. C.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends in Plant Science**, Oxford, v.1, p.215-222, 1996.
- RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B. P. **Genética na agropecuária**. 4.ed. Lavras: UFLA, 2008. 464p.
- RAO, C. R. General methods of analysis for incomplete block designs. **Journal of the American Statistical Association**, New York, v.58, p.541-561, 1947.
- REIS, E. M.; BRESOLIN, A. C. R.; CARMONA, M. **Doenças da soja: ferrugem asiática**. Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, 2006. 48p.
- RESENDE, M. D. V. de; DUARTE, J. B. Precisão e controle de qualidade em experimentos de avaliação de cultivares. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v.37, p.182-194, 2007.
- RESENDE, M. D. V. de; BARBOSA, M. H. P. Selection via simulated individual BLUP based on family genotypic effects in sugarcane. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, p.421-429, 2006.
- RESENDE, M. D. V. de. **Métodos estatísticos ótimos na análise de experimentos de campo**. Colombo: Embrapa Florestas, 2004. 57p.

RESENDE, M. D. V. **Genética, biométrica e estatística**: no melhoramento de plantas perenes. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. 975p.

RESENDE, M. D. V. Análise estatística de modelos mistos via REML/BLUP na experimentação em melhoramento de plantas perenes. Colombo: Embrapa Florestas, 2000. 101p.

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

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

SCHNEIDER, R. W. et al. First report of soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* in the continental United States. **Plant Disease**, Saint Paul, v.89, p.774, 2005.

SCHUSTER, I. et al. Identification of a new QTL associated with resistance to soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.102, p.91-96, 2001.

SCHUSTER, I.; CRUZ, C. D. **Estatística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados**. Viçosa: UFV, 2004. 568p.

SILVA, D. C. G. et al. Molecular mapping of two loci that confer resistance to Asian rust in soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.117, p.57-63, 2008.

SILVA, V. A. S.; JULIATTI, F. C.; SILVA, L. A. S. Interação entre resistência genética parcial e fungicidas no controle da ferrugem asiática da soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.9, p.1261-1268, 2007.

SOUZA, A. P. Biologia molecular aplicada ao melhoramento. In: NASS, L. L. et al. (eds). **Recursos genéticos e Melhoramento de plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p.939-965.

TAMULONIS, J. P. et al. DNA marker analysis of loci conferring resistance to peanut rootknot nematode in soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.95, p.664-670, 1997.

TERRY, L. I. et al. Soybean quantitative trait loci for resistance to insects. **Crop Science**, Madison, v.40, p.375-382, 2000.

VAVILOV, N. I. The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants. **Chronica Botanica**, New York, v.13, p.13-54, 1951.

WALKER, D. R. et al. Evaluation of USDA soybean germplasm accessions for resistance to soybean rust in the Southern United States. **Crop Science**, Madison, v.51, p.678-693, 2011.

WANG, H. et al. Dissection of two soybean QTL conferring partial resistance to *Phytophthora sojae* through sequence and gene expression analysis, **BMC Genomics**, [S.I.], v.13, p. 428, 2012.

- WANG, C. et al. Mapping QTL associated with photoperiod sensitivity and assessing the importance of QTL×environment interaction for flowering time in maize. **PLoS ONE**, [S.l], v.5, n.11, e14068, 2010.
- WARD, N. A. et al. Effects of *Simplicillium lanosoniveum* on *Phakopsora pachyrhizi*, the soybean rust pathogen, and its use as a biological control agent. **Phytopathology**, Saint Paul, v.102, n.8, p.749-760, 2012.
- WEBB, D. M. et al. Genetic mapping of soybean cyst-nematode race-3 resistance loci in soybean PI 437.654. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.91, p.574-581, 1995.
- WOLFINGER, R. D. An example of using mixed models and PROC MIXED for longitudinal data. **Journal of Biopharmaceutical Statistics**, [S.l], v.7, p.381-500, 1997.
- YAMANAKA, N.; HOSSAIN, M.; YAMAOKA, Y. Molecular mapping of Asian soybean rust resistance in Chinese and Japanese soybean lines, Xiao Jing Huang, Himeshirazu, and Iyodaizu B. **Euphytica**, Wageningen, v.14, p.311-324, 2015.
- YAMANAKA, N. et al. An informative linkage map of soybean reveals QTLs for flowering time, leaflet morphology and regions of segregation distortion. **DNA Research**, [S.l], v.8, p.61-72, 2001.
- YANG, X. B. et al. Development of yield loss models in relation to reductions of components of soybean infected with *Phakopsora pachyrhizi*. **Journal of Phytopathology**, Hamburg, v.81, n.11, p.1420-1426, 1991.
- YATES, F. The recovery of inter-block information in variety trials arranged in the three dimensional lattices. **Annals of Eugenics**, London, v.9, p.136-156, 1939.
- YORINORI, J. T.; LAZZAROTTO, J. J. **Situação da ferrugem asiática da soja no Brasil e na América do Sul**. Londrina: Embrapa Soja, 2004. 27p.
- YORINORI, J. T.; YUYAMA, M. M.; SIQUERI, F. V. Doenças de soja. **Boletim de Pesquisa de Soja**, Rondonópolis, v.13, p.180-228, 2009.
- YU, N. et al. Fine mapping of the Asian soybean rust resistance gene Rpp2 from soybean PI 230970. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.128, n.3, p.387-396, 2015.
- ZAMBENEDETTI, E. B.; ALVES, E.; ARAÚJO, D. V. Eventos dos processos de pré-penetração, penetração e colonização de *Phakopsora pachyrhizi* em folíolos de soja. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.32, n.2, p.156-160, 2007.
- ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; CHAVES, G. M. Partial resistance of soybean cultivars to *Phakopsora pachyrhizi*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.8, n.1, p.117-122, 1983.

CAPÍTULO 2

RANQUEAMENTO DE PROGÊNIES F₄, PROVENIENTES DE DIFERENTES CRUZAMENTOS, QUANTO A RESISTÊNCIA A FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA

RESUMO

A ferrugem asiática da soja, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* (Sydow & P. Syd.), tem alto potencial de dano à cultura, pois pode causar rápido amarelecimento e queda prematura das folhas, prejudicando a plena formação dos grãos. O uso de genótipos com resistência vertical tem sido pouco efetivo, devido a variabilidade do patógeno. Logo, a identificação e escolha dos cruzamentos mais promissores para o desenvolvimento de genótipos com resistência horizontal certamente ajudará a aumentar a longevidade das cultivares recomendadas. O presente estudo teve como objetivo ranquear cruzamentos derivados de sete cultivares em 10 diferentes combinações, quanto à resposta à ferrugem asiática da soja, através das estimativas de ganho esperado de seleção, herdabilidade e acurácia de seleção, além de se obter a área abaixo da curva de progresso da doença para elucidar a epidemia da doença. Para isso foram realizadas três avaliações quanto à severidade da ferrugem da soja em 565 progênies derivadas dos 10 diferentes cruzamentos, no campo experimental da Agroteste. As cultivares IAC 100 e UFUS Impacta apresentaram melhores resposta quanto a ferrugem, e as combinações em que elas aparecem como parental resistente, IAC 100 x BRS Caiapônia e UFUS Impacta x BRS Caiapônia, foram as melhores ranqueadas entre os cruzamentos, sendo os mais promissores para o desenvolvimento de linhagens com resistência parcial a ferrugem asiática da soja.

Palavras-chave: Resistência horizontal, Blocos Aumentados, melhoramento.

¹Orientador: Fernando Cézar Juliatti – UFU.

ABSTRACT

Asian soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* (Sydow & P. Syd.), Has high potential for damage to the culture, as it can cause rapid yellowing and premature leaf drop, damaging the full formation of the grains. The use of cultivars with vertical resistance has been ineffective due to variability of the pathogen. Therefore, the identification and selection of the most promising crosses to develop genotypes with horizontal resistance will certainly help to increase the longevity of the recommended cultivars. This study aimed to rank derived from crossing from seven cultivars in 10 different combinations, as the response to the Asian soybean rust, through the gain estimates expected selection, heritability and accuracy of selection, and obtain the area under the curve disease progress to elucidate the epidemic of the disease as a whole. For this there were three assessments of severity of soybean rust in 565 progenies derived from 10 different crosses in Agroteste the experimental field. The IAC 100 cultivars and UFUS Impacta showed better response as rust, and combinations in which they appear as resistant parent, IAC 100 x BRS Caiapônia and UFUS Impacta x BRS Caiapônia were the best ranked between the crossings, the most promising for the development of genotypes with partial resistance to Asian soybean rust.

Keywords: *Glycine max*, *Phakopsora pachyrhizi*, horizontal resistance.

¹ Adviser: Prof. Fernando Cezar Juliatti – UFU.

1. INTRODUÇÃO

A ferrugem asiática, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* desponta como a principal doença da cultura da soja. Devido a sua rápida disseminação, a doença já acomete praticamente todas as áreas de plantio brasileiro, causando perdas de até 80 % para os sojicultores.

O método de controle mais utilizado tem sido o uso de fungicidas, que incrementam o custo de produção. Por esta razão, têm se intensificado as pesquisas visando à obtenção de cultivares resistentes. Tem-se utilizado linhagens com resistência vertical, porém, essa estratégia pode ter baixa eficiência, pois o patógeno possui alta variabilidade e pode rapidamente superar a resistência. Por essa razão, espera-se que a resistência poligênica possa ser mais efetiva para a maioria das raças, reduzindo a taxa de progresso da doença.

A presença de genes quantitativos que expressam resistência à ferrugem asiática no germoplasma brasileiro pode representar uma alternativa para o desenvolvimento de novas cultivares e no controle da ferrugem.

Ter informações a respeito do comportamento de diferentes genótipos quanto a resistência é de grande importância. A variabilidade fenotípica pode ser conhecida por meio das estimativas de herdabilidade, das variâncias genéticas e fenotípicas, entre outros parâmetros genéticos, que quantificam e distinguem os efeitos de natureza genética e ambiental, permitindo, assim, a predição dos ganhos decorrentes da seleção e a definição das estratégias de melhoramento que devem ser adotadas.

Diante disso, no programa de melhoramento da Universidade Federal de Uberlândia foram realizados vários cruzamentos envolvendo genótipos resistentes e suscetíveis ao patógeno, visando o desenvolvimento de linhagens com resistência parcial à doença. O objetivo deste trabalho foi avaliar fenotipicamente a reação de populações segregantes derivadas destes cruzamentos, visando determinar quais combinações são mais promissoras para o desenvolvimento de cultivares resistentes à ferrugem no Brasil.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Micologia e Proteção de Plantas (LAMIP) na Universidade Federal de Uberlândia, Campus Umuarama e na Estação Experimental Agroteste, em Uberlândia-MG, localizada na latitude Sul 21°12'58'' e 45°03'18'' longitude Oeste, a 900 metros de altitude acima do nível do mar.

2.1. Material Genético

Foram utilizadas 565 progênies F_4 , derivadas de cruzamentos entre os genótipos BRS Caiapônia, IAC 100, UFUS Impacta, BRS Santa Cruz, BRS Luiziânia, Msoy 9350, e Potenza em dez diferentes combinações (Tabela 1), os cruzamentos foram realizados em casa de vegetação no ano de 2007, onde foram obtidas as gerações F_1 . O avanço da geração F_1 e F_2 e a multiplicação dos parentais foram realizadas também em casa de vegetação, no período de 2008 a 2009. As progênies F_2 e F_3 e os parentais foram utilizados nos anos 2009/10, em um experimento para o estudo do controle genético da resistência a ferrugem asiática (MARTINS, 2011), onde os mesmos foram avaliados sob condições de campo na estação experimental Agroteste, Uberlândia, MG. As sementes foram colhidas e novamente semeadas no ano de 2011 para gerar as progênies F_4 utilizadas no presente trabalho.

TABELA 1. Combinação dos sete genótipos de soja nos dez cruzamentos realizados na estação experimental Agroteste nos anos de 2009/10. (Fonte: MARTINS, 2011)

Cruzamento	Combinação
1	BRS Caiapônia x IAC 100
2	BRS Caiapônia x UFUS Impacta
3	BRS Santa Cruz x IAC 100
4	BRS Luiziânia x Msoy 9350
5	BRS Santa Cruz x Msoy 9350
6	BRS Santa Cruz x Potenza
7	BRS Luiziânia x UFUS Impacta
8	BRS Santa Cruz x UFUS Impacta
9	BRS Caiapônia x Potenza
10	BRS Luiziânia x Potenza

2.2. Delineamento experimental e instalação do experimento

O delineamento experimental foi o de blocos aumentados, usando os genótipos TMG 801 e TMG 803 como testemunhas comuns e padrões de resistência a doença. As 565 progênes F_4 , sem repetição, e os sete parentais, com quatro repetições cada, foram distribuídos em 15 blocos não balanceados. A parcela experimental consistiu-se de duas linhas de 5 m cada e espaçamento de 50 cm por genótipo. Os tratos culturais foram àqueles comuns à cultura da soja (LOPES, 2013). Durante a condução do experimento, foram promovidos o controle químico das pragas e o manual das plantas daninhas, na medida em que se fizeram necessários.

Para redução do potencial de evolução da epidemia da ferrugem, uma vez que a semeadura foi tardia, e também para a melhor avaliação da resistência parcial, foram realizadas duas aplicações de fungicidas (SILVA, JULIATTI, SILVA, 2007). Na primeira aplicação foi utilizado o fungicida do grupo químico das estrobilurinas (azoxistrobina) – sendo 300 mL do produto comercial por hectare, para um volume de calda de 200 L. Na segunda aplicação, utilizou-se a mistura de triazol e estrobilurina (piraclostrobina + epoxiconazole), na dose de 500 mL por hectare, para um volume de 200 L de calda. As aplicações foram realizadas nos estádios R1 e R5. Deste modo, buscou-se melhorar o grau de confiabilidade para avaliar a resistência parcial.

2.3. Avaliação fenotípica dos genitores e famílias F_4

A severidade da doença foi avaliada de acordo com o percentual da área foliar infectada com base na escala diagramática proposta por Juliatti (dados não publicados) que considera as porcentagens 0,5, 5, 20, 40, 60 e 80% do tecido foliar infectado (ANEXO).

A severidade da ferrugem da soja foi avaliada pela estimativa visual de três folhas do terço médio da planta, por três avaliadores diferentes, obtendo-se assim a média de cada progênie. Duas avaliações foram realizadas, aos 60, 80 e 100 dias após a semeadura.

2.4. Análises Estatísticas

Para verificar se as diferenças existentes entre os dados coletados para a severidade aos 80 dias após semeadura eram estatisticamente significativas foram realizadas análises de variância (ANAVA) entre tratamentos, compreendendo os parentais e as progênies para cada um dos dez cruzamentos, e entre os dez cruzamentos. Para a realização da ANAVA foi utilizado o programa Selegen-REML/BLUP (RESENDE, 2002). As pressuposições da ANAVA foram testadas pelos programas GENES (CRUZ, 2006) e SPSS versão 8.0 (SPSS Inc., Chicago IL).

Os componentes de variância foram estimados empregando o programa Selegen-REML/BLUP, que utiliza o método da REML, que é o método recomendado no caso de modelos mistos com dados desbalanceados (VERNEQUE, 1994; DUARTE *et al.*, 2001), e o procedimento ótimo de predição de valores genéticos (*best linear unbiased prediction* - melhor predição linear não viesada), ou BLUP (RESENDE, 2002). No modelo utilizado o efeito de bloco foi assumido como fixo, os efeitos dos genótipos como aleatórios e os efeitos de testemunhas como fixos, conforme expressão:

$$Y_{ijk} = \mu + b_j + C_k + g_i(k) + e_{ijk}$$

em que:

Y_{ijk} : é a observação gerada para a parcela do bloco j que recebeu o genótipo i oriundo do cruzamento k ;

μ : é a constante comum a todas as observações (média geral, sob restrições do tipo “soma zero” para cada um dos demais efeitos);

b_j : é o efeito do bloco j ($j = 1, 2, \dots, b$), assumido como fixo;

C_k : é o efeito do cruzamento k , incluindo-se testemunha ($k: 1, 2, \dots, c, c+1, c+2, \dots, c+t$), sendo c o número de cruzamentos originando progênies e t o número de testemunhas);

$g_i(k)$: é o efeito do genótipo (progênie ou testemunha) i , oriundo do cruzamento k ($i: 1, 2, \dots, p_k$; p_k é o número de genótipos no cruzamento k), assumido fixo e nulo se i for testemunha, ou aleatório com distribuição $N(0, \sigma^2(g_i(k)))$ independente, se i for uma progênie relacionada ao cruzamento k ; e

ε_{ijk} : é o erro experimental aleatório associado a ijk -ésima parcela, assumido independente e identicamente distribuído, sob $N[(0, \sigma^2) \text{ I}^2]$.

Trata-se, portanto, de um modelo misto em que as n observações Y_{ijk} , expressas pelo vetor $Y_{(n \times 1)}$, podem ser descritas matricialmente pelo modelo linear misto geral (HENDERSON, 1984):

$$y = X\beta + Z\gamma + \varepsilon$$

com:

$$\varepsilon \sim N(\phi, R);$$

$$\gamma \sim N(\phi, G);$$

$$E(y) = X\beta; \text{ e } Var(y) = V_{(n)} = ZGZ' + R.$$

Nesse modelo todos os efeitos fixos estão reunidos no vetor paramétrico $\beta_{(p \times 1)}$ e os efeitos aleatórios, no vetor paramétrico $\gamma_{(q \times 1)}$, exceto os erros que compõem o vetor $\varepsilon_{(n \times 1)}$; e, $X_{(n \times p)}$ e $Z_{(n \times q)}$ representam as matrizes de incidências dos efeitos contidos em β e γ , respectivamente.

As notas de severidade médias, aos 60, 80 e 100 dias após semeadura, utilizadas para realizar a análise dos dados da doença por meio da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para os dez cruzamentos, os sete parentais e as duas testemunhas. A AACPD foi usada para descrever a epidemia nas progênies de cada um dos dez cruzamentos e pode ser calculada pela fórmula (SHANNER; FINLEY, 1977):

$$AACPD = \sum_{i=1}^{t-1} \left[\left(\frac{Y_i - Y_{i+1}}{2(T_{i+1} - T_i)} \right) \right]$$

em que:

Y_i : Proporção da doença na i -ésima observação;

T_i : tempo (dias) na i -ésima observação e;

n : número total de observações.

A AACPD foi padronizada dividindo-se o valor da área abaixo da curva de progresso pelo tempo ($T_n - T_1$) da epidemia (FRY, 1977). Para obtenção da AACPD foi utilizado o

programa AVACPD (TORRES; VENTURA, 1991). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 0,5% (TUKEY, 1953).

3. RESULTADOS DE DISCUSSÃO

3.1. Análises de variância e componentes de média

De acordo com as análises de variância (ANAVA) realizadas dentro de cada um dos cruzamentos (Tabela 2), os resultados obtidos pelo teste de F mostraram que existem diferenças significativas ($P \leq 0,1$ e/ou $0,5\%$) para as notas de severidade entre as progênes e seus respectivos parentais, exceto para o cruzamento entre os genótipos BRS Caiapônia e Potenza. A principal explicação para os valores não significativos para o teste de F, no oitavo cruzamento, está relacionado ao fato de os parentais não serem contrastantes para esta característica, ambos são suscetíveis à ferrugem, logo, na análise dos valores de média entre eles e as progênes, não foram encontradas diferenças significativas.

TABELA 2. Quadro resumo das análises de variância para a severidade da ferrugem da soja para os dez diferentes cruzamentos (genótipos parentais e progênes F_4). Fonte: SANTOS, 2015.

Nº	CRUZAMENTO	TRAT		ERRO		Média (%)	CV (%)
		GL	QM	GL	QM		
1	BRS Caiapônia x IAC 100	2	173.56	68	22.58	36.89**	30.28
2	BRS Caiapônia x UFUS Impacta	2	367.70	57	78.54	48.54*	26.46
3	BRS Santa Cruz x IAC 100	2	736.73	57	156.23	54.38**	24.52
4	BRS Luiziana x Msoy 9350	2	363.45	33	111.56	63.85*	34.34
5	BRS Santa Cruz x Msoy 9350	2	125.76	42	421.60	78.45**	25.76
6	BRS Santa Cruz x Potenza	2	167.81	41	34.63	76.34*	32.64
7	BRS Luiziana x UFUS Impacta	2	445.77	56	78.46	58.56**	27.33
8	BRS Santa Cruz x UFUS Impacta	2	378.34	58	56.42	86.70**	19.23
9	BRS Caiapônia x Potenza	2	34.63	76	35.66	93.23 ^{ns}	12.25
10	BRS Luiziana x Potenza	2	227.58	113	45.77	63.56*	8.34

GL, Graus de Liberdade; QM, Quadrado Médio; CV%, Coeficiente de Variação em porcentagem; **, *, significativo a 0,1 e 0,5% de probabilidade, pelo teste de F respectivamente.

Constatou-se pelas análises realizadas, que o efeito ambiental está superestimando a característica severidade, pois se observa altos coeficientes de variação, fato que pode ser explicado pela elevada influência ambiental no caráter. Coeficientes de variação elevados para avaliações de severidade são freqüentes (PIEROZZI, 2007; RACHID, 2008; RIBEIRO, 2009; MELO *et al.*, 2015). Além disso, comparações entre diferentes delineamentos

mostraram que o coeficiente de variação tende a ser maior no delineamento de blocos aumentados (OLIVEIRA, 1993; BEARZOTI et al., 1997; AGUIAR et al., 2000; PETERNELLI et al., 2009, DUARTE et al., 2001).

Os resultados da ANAVA entre os cruzamentos indicam que existe diferença significativa para as notas de severidade entre os cruzamentos avaliados e também entre tratamentos, pelo teste de F a 1% de probabilidade (Tabela 3). Observou-se também que não houve interação entre o tratamento (progênies e parentais) e as testemunhas. A existência de diferenças estatísticas significativas é preponderante para que os componentes genéticos sejam calculados. Os componentes de variância são apresentados na Tabela 4.

TABELA 3 – Quadro resumo das análises de variância para a severidade da ferrugem da soja para os dez diferentes cruzamentos e genótipos parentais. Fonte: SANTOS, 2015.

FV	GL	QM	F
Cruzamentos	9	14.15	3.21 ^{**}
Bloco (cruzamentos)	140	36.69	8.28 ^{**}
Tratamento (ajustado)	171	19.32	4.36 ^{**}
Interação Tratamento x Testemunhas	9	7.41	1.67 ^{ns}
Resíduo intrabloco	430	4.43	
Total	592	15.76	
Média geral	47.91		
CV(%)	21.11		

FV, Fonte de Variação; GL, Graus de Liberdade; QM, Quadrado Médio; CV%, Coeficiente de Variação em porcentagem; **, *, ^{ns}, significante a 0,1 e 0,5% de probabilidade, e não significante, pelo teste de F, respectivamente.

A acurácia seletiva (AS) avalia a qualidade do experimento em uma abordagem genética e estatística, e não somente sob a perspectiva estatística, que é o caso do coeficiente de variação. Um dos entraves à obtenção de ganhos genéticos mais expressivos no melhoramento de plantas é a baixa acurácia seletiva. Esse parâmetro corresponde à correlação entre o valor genotípico verdadeiro do tratamento genético e aquele estimado a partir das informações experimentais (RESENDE, 2004). Dessa forma, a AS foi alta 0,90 para a maioria dos cruzamentos. O cruzamento entre os genótipos BRS Luiziânia e Msoy 9350 apresentou baixa AS, o que pode ter ocorrido devido ao pequeno tamanho de população avaliado (TABELA 4).

TABELA 4. Ranqueamento entre os cruzamentos e resumo das estimativas dos componentes de variância para cada um dos dez cruzamentos analisados. Fonte: SANTOS, 2015.

Nº	CRUZAMENTO	P	VG	GS	AS	σ_g^2	σ_e^2	h^2
1	BRS Caiapônia x IAC 100	1	29.71	-22.17	0.96	5.10	171.73	69.40
2	BRS Caiapônia x UFUS Impacta	2	37.18	-14.70	0.86	1.54	124.78	39,45
3	BRS Santa Cruz x Potenza	5	42.70	-9.17	0.92	10.75	352.57	79.32
4	BRS Santa Cruz x Msoy 9350	6	42.87	-9.01	0.86	0.29	36.91	34,64
5	BRS Santa Cruz x IAC 100	4	44.08	-7.80	0.95	7.14	189.36	61.57
6	BRS Luiziana x Msoy 9350	3	44.10	-7.78	0.74	17.12	82.83	98,11
7	BRS Luiziana x UFUS Impacta	7	46.25	-5.63	0.95	2.56	226.98	77,78
8	BRS Luiziana x Potenza	9	47.92	-3.96	0.95	9.57	245.65	89.44
9	BRS Santa Cruz x UFUS Impacta	10	51.21	-0.67	0.91	1.75	46.78	35,40
10	BRS Caiapônia x Potenza	8	51.76	-0.12	0.96	1.46	28.66	30,51
Média TMG 801		38.25			Média TMG 803			32.33
Média geral		38.91						
		15.6						
CV(%)		6						

P, posição no ranqueamento; VC, valor genotípico; GS, ganho de seleção estimado; AS, acurácia seletiva; σ_g^2 , variância genética; σ_e^2 , variância ambiental; h^2 , herdabilidade em porcentagem; CV, coeficiente de variação.

Os cruzamentos BRS Caiapônia x IAC 100 e BRS Caiapônia x UFUS Impacta, que apresentavam parentais mais contrastantes quanto ao caráter, foram os que apresentaram o melhor ganho de seleção. Neste caso, a seleção de plantas resistentes originadas destes cruzamentos permitiu a obtenção de menores médias de severidade a ferrugem asiática. O menor ganho de seleção foi estimado para o cruzamento entre BRS Caiapônia e Potenza (TABELA 4).

A herdabilidade observada para as progênies do cruzamento BRS Luiziana x Msoy 9350 foi muito elevada. Duarte (2001) relatou que populações pequenas sofrem superestimação das variâncias, e consequentemente da herdabilidade. Esse cruzamento possuía apenas 25 progênies F₄, o que provavelmente foi a causa da superestimação da variância genética e consequentemente alta h^2 , o mesmo pode ter acontecido com os cruzamentos BRS Santa Cruz x Potenza e BRS Luiziana x Msoy 9350.

Observou-se que o cruzamento entre BRS Caiapônia e IAC 100 foi o que obteve melhor desempenho entre os cruzamentos, o mesmo proporcionou o maior ganho de seleção predito, melhor acurácia de seleção e obteve herdabilidade alta.

3.2. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD)

A AACPD é a variável que representa a epidemia como um todo, pois leva em consideração o estresse que a cultura sofreu durante vários estádios de desenvolvimento (BERGAMIN FILHO *et al.*, 1996). As médias da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para os cruzamentos, genótipos parentais e testemunhas encontram-se na Tabela 05.

TABELA 5 - Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para os dez cruzamentos, seus parentais e testemunhas.

Cruzamentos/Testemunhas	AACPD	
BRS Caiapônia x IAC 100	283.94*	ab
BRS Caiapônia x UFUS Impacta	285.67	ab
BRS Santa Cruz x IAC 100	329.50	ab
BRS Luiziânia x Msoy 9350	713.22	c
BRS Santa Cruz x Msoy 9350	853.39	d
BRS Santa Cruz x Potenza	751.28	cd
BRS Luiziânia x UFUS Impacta	947.94	d
BRS Santa Cruz x UFUS Impacta	717.28	c
BRS Caiapônia x Potenza	729.17	c
BRS Luiziânia x Potenza	463.78	bc
BRS Caiapônia	627.50	bcd
IAC 100	183.94	a
UFUS Impacta	297.35	ab
BRS Santa Cruz	339.98	bc
BRS Luiziânia	998,06	d
Msoy 9350	884.44	d
Potenza	856.44	d
TMG 801	218,61	ab
TMG 803	194.35	a

* Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

O genótipo que apresentou maior resistência ao patógeno foi a IAC 100 (TABELA 5). Essa cultivar é resultado do Programa de Melhoramento Genético do Instituto Agrônomo de Campinas, e é considerada como parcialmente resistente ao fungo causador da ferrugem asiática (SILVA, JULIATTI, SILVA, 2007), esses resultados confirmam assim essa

resistência. A cultivar UFUS Impacta, desenvolvida pelo programa de melhoramento da Universidade Federal de Uberlândia, apresentou o segundo melhor resultado quanto à resistência ao patógeno. Os cruzamentos em que estes genótipos foram parentais também evidenciaram bons resultados quanto a doença.

Os genótipos BRS Luiziânia, Msoy 9350, Potenza, e BRS Caiapônia, assim como os cruzamentos em que foram parentais apresentaram maior suscetibilidade à doença. A cultivar Potenza foi relatada como portadora de resistência parcial (SILVA; JULIATTI; SILVA, 2007), contudo, nesse experimento, as notas de severidade para ferrugem para essa cultivar foram altas, sugerindo que a mesma seja suscetível à ferrugem. Resultados apresentados por Martins (2011) também mostraram a cultivar como suscetível. Esse fato pode estar relacionado às condições ambientais e/ou variabilidade do patógeno (JULIATTI et al., 2003; YORINORI, 2004).

Os genótipos TMG 801 e TMG 803 apresentaram notas baixas de AACPD, indicando resistência ao caráter, esse comportamento já era esperado, pois as mesmas foram escolhidas como padrões de resistência (TABELA 5). Esses genótipos são resultado do programa de melhoramento genético da Fundação Mato Grosso e da empresa TMG, e desenvolvidas pela tecnologia Inox, portanto consideradas como variedades resistentes ao fungo causador da ferrugem asiática (FUNDAÇÃO MT, 2009), os resultados obtidos confirmam o sucesso da tecnologia nessas variedades.

Com base nos resultados obtidos, foi possível comparar os cruzamentos com as melhores progênies para desenvolvimento de linhagens que apresentem maior resistência à ferrugem. Os cruzamentos entre IAC 100, BRS Caiapônia e BRS Caiapônia, UFUS Impacta foram os que proporcionaram maiores ganhos de seleção, com alta acurácia de seleção e, porém o cruzamento entre IAC 100 e BRS Caiapônia apresentou melhor herdabilidade para a resistência a ferrugem asiática (TABELA 5).

Além da estimativa da epidemia como um todo a AACPD, para severidade, apresenta boa correlação com a produtividade de grãos (GODOY, 2009; FREITAS, 2012; MARCHI et al., 2008), fator que dever ser levado em consideração para futuras seleções.

É importante ressaltar a importância de se avaliar o impacto que a presença do fungo causa na produtividade das linhagens. Para isto, em próximos experimentos é recomendável a coleta de dados de produtividade de grãos para as progênies. Assim, seria possível uma

correlação entre os dados de severidade e produtividade, o que elevaria a eficiência em busca de linhagens mais resistentes ao patógeno.

Os dados referentes ao cruzamento entre IAC 100 e Caiapônia foram utilizados para estudos e detecção e mapeamento de QTLs que estejam contribuindo para o processo de resistência horizontal a ferrugem asiática.

A importância da obtenção e utilização de genótipos resistentes que demandam menor número de aplicação de fungicidas para o controle eficiente da doença foi destacada por OLIVEIRA et al (2005). É importante ressaltar que o uso de genótipos com resistência parcial à ferrugem asiática da soja poderá ser útil na redução do número de aplicações de fungicidas (SILVA, 2007; SANTOS, 2010; MARTINS, 2011).

4. CONCLUSÕES

Os genótipos IAC 100 e UFUS Impacta apresentam resistência parcial para a ferrugem asiática da soja, apresentando grande potencial como genitores resistentes em cruzamentos contrastantes.

Os cruzamentos entre IAC 100, BRS Caiapônia e BRS Caiapônia, UFUS Impacta são os que proporcionam maiores ganhos de seleção, com alta acurácia de seleção e alta herdabilidade para a resistência a ferrugem asiática.

5. REFERÊNCIAS

- AGUIAR, A. M.; RAMALHO, M. A. P.; SOUZA, E. A. Comparação entre látice e blocos aumentados na avaliação de famílias segregantes em um programa de melhoramento do feijoeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, p.857-860, 2000.
- BEARZOTI, E. et al. Comparação entre métodos estatísticos na avaliação de clones em um programa de melhoramento de batata. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.32, p.877-884, 1997.
- BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. Princípios e conceitos. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (eds). **Manual de Fitopatologia**. 3.ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1996. p.692-709.
- CRUZ, C. D. **Programa Genes: biometria**. Viçosa: UFV, 2006. 382p.
- DUARTE, J. B.; VENKOVSKY, R.; DIAS, C. T. S. Estimadores de componentes de variância em delineamento de blocos aumentados com tratamentos novos de uma ou mais populações. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, p.1155-1167, 2001.
- FREITAS, J. **Aplicação de fungicidas em diferentes estádios da cultura da soja e dois locais**. 2012. 101f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2012.
- FRY, W. E. Integrated control of potatoes late blight: effects of polygenic resistance and techniques of timing fungicide application. **Phytopathology**, Saint Paul, v.68, p.1650-1655, 1977.
- FUNDAÇÃO MT. **Doenças da soja**. Rondonópolis: Boletim De Pesquisa de Soja, 2009.
- GODOY, C. V. et al. Eficiência do controle da ferrugem asiática da soja em função do momento de aplicação sob condições de epidemia em Londrina, PR. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v.34, n.1, p.56-61, 2009.
- HENDERSON, C. R. **Applications of linear models in plant breeding**. Guelph: University of Guelph, 1984. 462p.
- JULIATTI, F. C. et al. Doenças da soja. **Cultivar Caderno Técnico**, Pelotas, v.47, p.3-14, 2003.
- LOPES, A. L. C. **Cultivo e manejo da soja**. Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais / CETEC, 2013. 31p.
- MARCHI, C. E. et al. Progresso e controle da mela-das-sementes (*Claviceps maximensis*) de *Brachiaria brizantha*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.34, n.3, p.241-247, 2008.

- MARTINS, J. A. S. **Controle genético da resistência parcial, adaptabilidade e estabilidade frente à ferrugem asiática da soja**. 2011. 172f. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.
- MELO, C. L. P.; ROESE, A. D.; GOULART, A. C. P. Tolerância de genótipos de soja à ferrugem-asiática. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.45, n.8, p.1353-1360, 2015.
- OLIVEIRA, A. C. Análise conjunta de experimentos em blocos incompletos com alguns tratamentos comuns - análise intrablocos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.28, n.11, p.1255-1262, 1993.
- OLIVEIRA, A. C. B.; GODOY, C. V.; MARTINS, M. C. Avaliação da tolerância de cultivares de soja à ferrugem asiática no Oeste da Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.30, p. 658-662, 2005.
- PETERNELLI, L. A. et al. Delineamentos aumentados no melhoramento de plantas em condições de restrições de recursos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.9, p.2425-2430, 2009.
- PIEROZZI, P. H. B. **Controle genético da resistência da soja à ferrugem asiática: avaliações de severidade em campo experimental**. 2007. 142f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.
- RACHID, B. F. **Teste de alelismo em soja visando à obtenção de novos genes de resistência para ferrugem asiática**. 2008. 83f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.
- RESENDE, M. D. V. **Genética, biométrica e estatística: no melhoramento de plantas perenes**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. 975p.
- RESENDE, M. D. V. de. **Métodos estatísticos ótimos na análise de experimentos de campo**. Colombo: Embrapa Florestas, 2004. 57p.
- RESENDE, M. D. V. **Software Selegen–REML/BLUP**. Curitiba: Embrapa Florestas, 2002. 67p.
- RIBEIRO, A. S. **Estratégias para a obtenção de linhagens com resistência durável à ferrugem asiática da soja**. 2009. 112f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.
- SANTOS, J. V. M. **Mapping of QTL traits under Asian soybean rust influence**. 2010. 107f. Dissertation (Master's degree in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.
- SHANER, G.; FINNEY, R. E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. **Phytopathology**, Saint Paul, v.70, p.1183-1186, 1977.
- SILVA, V. A. S.; JULIATTI, F. C.; SILVA, L. A. S. Interação entre resistência genética parcial e fungicidas no controle da ferrugem asiática da soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.9, p.1261-1268, 2007.
- SPSS Inc. **SPSS Base 8.0 for Windows User's Guide**. Chicago: SPSS Inc., 1998.

TUKEY, J. W. **The problem of multiple comparisons**. Princeton: Mimeographs Princeton University, 1953.

VERNEQUE, R. S. **Procedimentos numéricos e estimação de componentes de covariância em análise multivariada pelo método da máxima verossimilhança restrita: modelos mistos aplicados ao melhoramento animal**. 1994. 175f. Tese (Doutorado em Estatística e Experimentação Animal) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1994.

YORINORI, J. T.; LAZZAROTTO, J. J. **Situação da ferrugem asiática da soja no Brasil e na América do Sul**. Londrina: Embrapa Soja, 204. 27p.

CAPÍTULO 3

MAPEAMENTO DE QTLS ENVOLVIDOS NA RESISTÊNCIA PARCIAL A FERRUGEM ASIÁTICA EM SOJA

RESUMO

A ferrugem asiática da soja é a doença de maior importância na cultura, seu controle é realizado principalmente pela aplicação de fungicidas, o que onera os custos de produção, além de prejudicar o meio ambiente. Uma alternativa a esta problemática é o uso de genótipos resistentes à doença. Devido a baixa durabilidade de genes de resistência vertical, a busca por genótipos com resistência parcial é de extrema importância. Dessa forma o objetivo deste trabalho foi identificar QTLs associados à resistência parcial a ferrugem asiática em soja. Foram utilizadas 87 progênies F₄ derivadas do cruzamento entre os genótipos contrastantes IAC100 (Resistência Parcial) e Caiapônia (Suscetível), previamente fenotipadas a campo. A partir dos dados da fenotipagem foram confeccionados dois *bulks* segregantes de DNA. Oitenta e nove marcadores Microsatélites, previamente identificados para soja foram testados nos genitores e nos *bulks*. Destes, 38 foram polimórficos para os parentais e os *bulks* sendo utilizados para genotipar as plantas da geração F₄. Um mapa de ligação foi obtido, onde 29 destes marcadores foram distribuídos em nove grupos de ligação, cobrindo 285,9 cM. Seis QTLs foram mapeados em quatro destes grupos (C2, D2, G e N), sendo dois dos QTLs detectados de maior efeito, responsáveis por 37,05 % da variação fenotípica para a resistência a ferrugem asiática da soja.

Palavras-chave: Resistência Horizontal, Mapeamento Genético, Microsatélites.

¹Orientador: Fernando Cézar Juliatti – UFU.

ABSTRACT

Asian soybean rust is the most important disease in the crop, the control is carried out mostly through the application of fungicides what make production onerous, and harm the environment. An alternative to this problem is the use of resistant cultivars to the disease. Due to low durability of vertical resistance genes, the research for cultivars with partial resistance is of extreme importance. Thus the objective of this work was to identify QTLs associated with partial resistance to Asian rust in soybeans. 87 F₄ progenies derived from the cross between the cultivars contrasting IAC100 (Partial resistance) and Caiapônia (Susceptible) previously phenotyped in field, were used. From the phenotyping were made two segregating bulks of DNA. 89 microsatellite markers previously identified for soybeans, were tested on parents and in bulk. Of these 38 were polymorphic for the parents and the bulks it is used to genotype the plants of the F₄ generation. A linkage map was obtained, and 29 of these markers were distributed in nine linkage groups, covering 285.9 cM of genome. Six QTLs were mapped in four of these groups (C2, D2, G and N), two of QTLs detected it was higher effect and, accounting for 37.05% of the phenotypic variation for resistance to Asian soybean rust.

Keywords: *Phakopsora pachyrhizi*, horizontal resistance, SSR, molecular markers, breeding.

¹ Adviser: Prof. Fernando Cezar Juliatti – UFU.

INTRODUÇÃO

A soja é a cultura de maior importância no agronegócio brasileiro. O Brasil é o segundo maior produtor mundial e tem um grande potencial para aumentar a produção no futuro, dada a existência de áreas ainda não cultivadas e o aumento mundial da demanda de produtos oriundos da soja.

Vários fatores limitam economicamente o cultivo da soja, entre eles estão as pragas e doenças. Por isto, os programas de melhoramento genético de soja conduzidos no Brasil sempre se preocuparam em lançar cultivares que, além de mostrarem altos rendimentos, também fossem tolerantes às principais doenças da soja. Com o aparecimento da ferrugem, o cultivo de soja no Brasil passou a sofrer severos prejuízos econômicos em todas regiões de plantio.

O principal método de controle é aplicação de fungicidas, o qual aumenta substancialmente os custos da produção e é uma contínua fonte de contaminação ambiental. O desenvolvimento de genótipos de soja resistentes pode fornecer um método durável e sustentável de proteção da cultura contra doenças. A eficiência da resistência vertical tem sido questionada. Dessa forma a alternativa seria o uso da resistência horizontal, condicionada por vários genes que proporcionam uma variação fenotípica contínua na reação do hospedeiro, reduzindo a intensidade da doença. Desse modo, torna-se essencial o estabelecimento de estratégias de melhoramento para se obter resistência duradoura.

Visto que os recursos aplicados em um programa de melhoramento genético são altos, devido principalmente às avaliações extensivas dos genótipos, existe a necessidade de obtenção de novas estratégias para aumentar sua eficiência. Mecanismos ou ferramentas de seleção que possibilitem identificar genótipos promissores, logo no início da fase de avanço de gerações, após os cruzamentos, são de grande interesse. Uma dessas ferramentas é a identificação de marcadores moleculares ligados a genes, ou blocos gênicos, que confirmam resistência a patógenos, o que permite monitorar e acelerar a introdução desses genes no germoplasma cultivado.

Dessa forma, os objetivos deste trabalho foram identificar, mapear e quantificar os efeitos de QTLs envolvidos na resistência a ferrugem asiática da soja utilizando marcadores moleculares Microsatélites.

1. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios de Micologia e Proteção de Plantas (LAMIP), e Biologia Molecular do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG e na Estação Experimental Agroteste, em Uberlândia-MG, localizada na latitude Sul 21°12'58'' e 45°03'18'' longitude Oeste, a 900 metros acima do nível do mar.

1.1. Material Genético

A escolha dos genitores foi realizada de acordo com a reação dos mesmos frente à ferrugem asiática da soja. Os genótipos IAC 100 e BRS Caiapônia se mostraram contrastantes quanto a esse caráter. A cultivar IAC 100 tem ciclo precoce, tipo de crescimento determinado e segundo estudos prévios apresenta resistência parcial à ferrugem da soja, já a cultivar BRS Caiapônia, tem ciclo precoce, tipo de crescimento indeterminado e é altamente suscetível a ferrugem asiática.

Foram utilizadas 87 progênes F₄, derivadas do cruzamento entre os genótipos BRS Caiapônia e IAC 100. Os cruzamentos foram realizados em casa de vegetação no ano de 2007, onde foram obtidas as gerações F₁. O avanço da geração F₁, F₂ e a multiplicação dos parentais foram realizadas também em casa de vegetação, no período de 2008 a 2009. As progênes F₂ e F₃ e os parentais foram avaliados nos anos 2009 e 2010, em um experimento para o estudo do controle genético da resistência a ferrugem asiática (MARTINS, 2011), as progênes F₄ utilizadas nesse trabalho foram semeadas no ano de 2011. O delineamento foi de blocos aumentados de Federer.

1.2. Avaliação fenotípica

As progênes F₄ e os parentais foram avaliados em campo quanto à severidade da doença. A severidade foi avaliada de acordo com o percentual da área foliar infectada com

base na escala diagramática proposta por Juliatti (dados não publicados) que considera as porcentagens 0,5, 5, 20, 40, 60 e 80% do tecido foliar infectado (ANEXO).

A severidade da ferrugem da soja foi avaliada, aos 80 dias após a semeadura, pela estimativa visual de três folhas do terço médio da planta, por três avaliadores diferentes, obtendo-se assim a média para cada progênie e parentais.

1.3. Extração e quantificação de DNA

Amostras de tecido foliar de cada progênie e dos parentais foram coletadas durante o estádio R3, armazenadas em sacos plásticos, devidamente identificados e armazenados em ultrafreezer (-80 °C) até o momento da extração.

O DNA genômico dos parentais e de cada progênie foi purificado seguindo o protocolo baseado na técnica do CTAB, proposto por Doyle & Doyle (1990), com algumas modificações. Cerca de 50 mg de tecido foliar de cada amostra foi macerado e colocado em microtubos de 1,5 mL. Adicionou-se em cada amostra 650 µL do tampão de extração [Tris 1 M (pH 8,0), EDTA 0,5 M (pH 8,0), NaCl 5 M, CTAB 2 % (m/v), PVP 1 % (m/v); β-mercaptoetanol 2 % (v/v)] a solução foi encubada a 65 °C por uma hora, sendo agitada a cada 20 minutos. Em seguida, prosseguiu-se a extração, 650 µL clorofórmio – álcool isoamílico (24:1 v/v) foi adicionando e os tubos foram posteriormente centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos, 600 µL de sobrenadante do material centrifugado foi transferido para microtubos de 1,5 mL e seu DNA precipitado com o mesmo volume de isopropanol gelado. Após a precipitação, o DNA foi centrifugado novamente a 14.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o DNA foi lavado com a solução de lavagem [Etanol P.A 76%, 10 mM de acetato de amônio] repousando por 20 minutos, o material foi novamente centrifugado por 5 minutos a 10.000 rpm, o sobrenadante descartado e 50 µL de tampão TE foi adicionado. Para uma melhor purificação do DNA o mesmo foi novamente precipitado com 5 µL de acetato de sódio e 100 µL de etanol P.A. 95%, e centrifugado a 14.000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o DNA encubado a 37 °C por duas horas. Para eliminação de resíduos de RNA foram adicionados 50 µL de RNase (10 ng.µL⁻¹) e os tubos encubados por 30 minutos a 37 °C. Posteriormente o DNA foi armazenado a -20 °C para conservação.

Após a extração, a concentração de cada amostra foi determinada em NanoDrop 1.000 *Spectrophotometer* (Thermo Scientific) e a integridade verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com *Gel Red* (Biotium). Após a determinação da concentração e qualidade do DNA, as amostras foram diluídas para uma concentração de 10 ng.μL⁻¹ e armazenadas a -20 °C.

1.4. Amplificação dos Microssatélites

Os 87 marcadores Microssatélites utilizados neste trabalho foram previamente identificados para a cultura da soja (TABELA 1A), os mesmos estão distribuídos nos 20 grupos de ligação do mapa genético consenso (CREGAN, 1999; SONG et al., 2004), as sequências dos *primers* e posicionamento dos mesmos, encontram-se disponíveis no site do Soybase (<http://soybase.agron.iastate.edu/>). No presente trabalho marcadores, distribuídos nos 20 grupos de ligação foram utilizados.

As reações de PCR foram realizadas em aparelho *My Cycler Thermal Cycler* (Bio Rad), utilizando as seguintes condições: Tampão de PCR 1X, cloreto de magnésio (MgCl₂) 1,5 mM, dNTPs 0,4 mM (40 μM de cada nucleotídeo), *primer forward* 0,3 μM, *primer reverse* 0,3 μM, *Taq DNA Polimerase*® Invitrogen 1 U, 1 μL do DNA (25 ng.μL⁻¹) e água deionizada autoclavada para completar o volume final de 12 μL. Para a amplificação dos fragmentos foi utilizado o programa *Touchdown* (TD) PCR (DON et al., 1991) com temperaturas de anelamento entre 45 e 60 °C.

Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose (Invitrogen) a 4% (p/v) e corados com *Gel Red* (Biotium) diluído 1:500. Os fragmentos gerados foram visualizados em transluminador (Hoefer MacroVue UV-20) e fotodocumentados.

1.5. Confecção dos *bulks* segregantes

A partir da avaliação fenotípica, treze progênies avaliadas como resistentes e outras treze avaliadas como suscetíveis foram selecionadas e quantidades equimolares de seus DNAs foram combinados para formação dos dois *bulks* segregantes. Segundo Michelmore (1991), o número de amostras por *bulk* deve ser superior a doze, dessa forma, treze genótipos foram selecionados para a formação dos bulks.

Para essa seleção, consideraram-se como resistentes progênies com notas médias de severidade inferior a 20% e como suscetíveis progênies com notas médias superiores a 60% aos 80 dias após a semeadura.

Os *bulks* foram avaliados juntamente com os parentais nos testes de *primers*, a fim de se identificar o polimorfismo relacionado à resistência à *P. pachyrhizi*.

1.6. Análises dos Microssatélites

Para verificar se as diferenças existentes entre os dados coletados em campo eram estatisticamente significativas, foram realizadas análises de variância (ANAVA), com auxílio do programa Selegen-REML/BLUP (RESENDE, 2002) entre tratamentos, compreendendo os parentais e as progênies.

Os marcadores identificados como polimórficos para os genótipos parentais e *bulks* contrastantes foram utilizados para a genotipagem das progênies F₄, a segregação dos marcadores foi avaliada aplicando o teste de conformidade do modelo (χ^2) (NIKULIN, 1973) para cada um dos marcadores, a fim de verificar a adequação ao modelo de distribuição genotípica de 7:2:7 (RAMALHO et al., 2005). Somente marcadores com segregações adequadas foram considerados.

1.6.1. Construção do mapa de ligação genético

Após as análises realizadas foi construído um mapa genético de ligação para os marcadores Microssatélites polimórficos, baseado nos dados fenotípicos, utilizando o programa MAPMAKER/Exp versão 3.0 (LANDER et al., 1987). Os critérios adotados para formação dos grupos de ligação foram LOD *score* mínimo 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.

1.6.2. Mapeamento de QTLs associados a resistência

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 WinQTL *Cartographer* versão 2.5 (WANG et al., 2007), utilizando primeiramente

mapeamento por marca simples e posteriormente para verificar a independência entre os QLTs encontrados, foi realizado o mapeamento por intervalo composto (*composite interval mapping* – CIM), o LOD (*Logarithm Of Odds* – LYNCH; WALSH, 1998) *score* foi de 2,5.

O LOD é um teste de significância para testar a hipótese de ligação entre dois loci, baseado na razão de verossimilhança, utilizando logaritmo na base 10. Dessa forma, um LOD *score* com valor três indica que a ocorrência de ligação é mil vezes mais provável que a segregação independente (CARNEIRO; VIEIRA, 2002). Trabalhos que mapeiam QTLs em soja normalmente aceitam valores de LOD *Score* entre 2,0 e 3,0 para determinar uma associação significativa (KASSEM et al., 2006; GUZMAN et al., 2007; GUTIERREZ-GONZALEZ et al. 2009; ZHANG et al., 2004). Neste trabalho, o valor utilizado de LOD *Score* foi de 2,5, já que se trata de estudos iniciais de identificação de QTLs sob ação da ferrugem asiática da soja.

Analises de regressão múltipla foram realizadas para detectar possíveis interações e quantificar os efeitos dos QTLs identificados, a probabilidade de 5 % foi adotada para o modelo (DRAPER; SMITH, 1996).

2. RESULTADOS DE DISCUSSÃO

2.1. Análises de variância e componentes de média

De acordo com a análise de variância (ANAVA) realizada, os resultados obtidos pelo teste de F ($P \leq 0,1\%$) sugerem que existem diferenças significativas entre os genótipos parentais e as progênes F₄ (Tabela 1). A severidade da doença é uma característica quantitativa, logo, altamente influenciada pelo ambiente, o que eleva a variância ambiental, consequentemente os valores de herdabilidade esperados são menores. Além disso, o coeficiente de variação foi elevado (≥ 30), porém, experimentos de comparação entre delineamentos experimentais demonstraram que os delineamentos em blocos aumentados tendem a maiores CVs (DUARTE et al., 2001; BEARZOTI, 1994; SOUZA, 1997).

TABELA 1 – Quadro resumo da ANAVA entre as progênes e genótipos parentais.

CRUZAMENTO	GL	QM	F
Bloco (cruzamentos)	21	332.35	14.71 ^{**}
Tratamento (ajustado)	4	173.56	7.68 ^{**}
Interação Tratamento x Testemunhas	1	47.5	2.10 ^{ns}
Resíduo intrabloco	68	22.58	
Total	94		
Média	36.89		
σ_G^2	5.10		
σ_E^2	171.73		
h^2	69.40		
CV(%)	30.28		

GL, Graus de Liberdade; QM, Quadrado Médio; CV%, Coeficiente de Variação em porcentagem; σ_G^2 , variância genética; σ_E^2 , variância ambiental; h^2 %, herdabilidade em porcentagem; **, *, significativo a 0,1 e 0,5% de probabilidade, pelo teste de F; ^{ns}, não significativo pelo teste de F.

2.2. Construção do mapa de ligação genético

Para a identificação de polimorfismo entre os parentais IAC 100 e BRS Caiapônia e entre os *bulks* segregantes foram testados 89 marcadores moleculares Microsatélites distribuídos nos 20 grupos de ligação da soja descritos por Cregan et al. (1999) e Song et al.

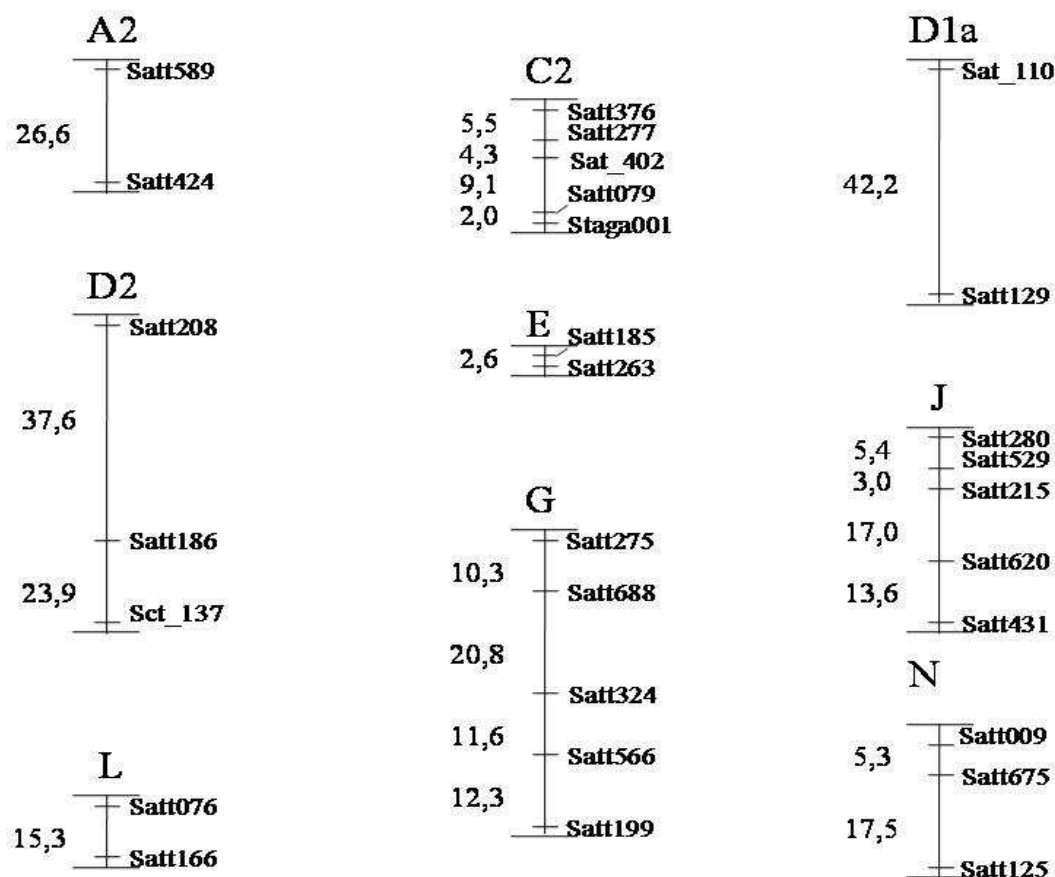
(2004). Destes, 52 pares de *primers* identificaram polimorfismo entre os parentais, porém apenas 38 foram polimórficos para os parentais e os *bulks* simultaneamente (Tabela 1A), ou seja, os outros os 16 pares de *primers* identificaram polimorfismo ligado a outras características contrastantes nos parentais que não estão relacionadas à resistência à ferrugem asiática da soja. Os *primers* polimórficos foram utilizados para a genotipagem das progênes F₄.

Apesar do grande número de genótipos de soja existente no Brasil, estudos têm relatado que o germoplasma brasileiro possui pouca variabilidade genética, oriundo de poucos ancestrais, resultando em uma estreita base genética (KUSSLER; BONETTI, 2008, ALCÂNTARA NETO, 2001; MIRANDA et al., 2007). Estes estudos corroboram com os resultados obtidos neste trabalho, evidenciado pelo baixo polimorfismo identificado entre os parentais pode ser explicado em parte pela base genética estreita da cultura da soja, o que contribui para uma distância genética menor entre eles.

Embora a cobertura do genoma fornecida pelos 37 marcadores SSR seja baixa, os dados obtidos neste trabalho estabelecem o estágio inicial de estudos de QTLs envolvidos na resistência à ferrugem asiática da soja. Destes 37 marcadores utilizados, apenas Satt440 apresentou desvio da proporção esperada de indivíduos (7:5:7) e não foi utilizado nas análises e na construção do mapa genético. Dos 36 marcadores restantes, 29 foram mapeados em um mapa de ligação genética.

Nove grupos de ligação foram detectados, grupos esses representativos dos 20 grupos descritos por Song et al. (2004) (Figura 1). Dos 36 marcadores utilizados para construção do mapa de ligação, sete não foram mapeados em nenhum grupo de ligação, por estarem a uma distância genética maior que 50 cM, a ordem dos marcadores e a distância dos mesmos, podem ser comparadas ao mapa integrado de ligação da soja (SONG et al., 2004), exceto para o grupo de ligação C2 onde houve inversão na ordem dos marcadores Satt277 e Sat_402. A cobertura total do mapa foi de 285,9 cM.

FIGURA 1. Mapa de ligação parcial da soja baseado em informações genotípicas de 29 marcadores SSR de uma população de mapeamento F₄ originada do cruzamento entre os genótipos de soja IAC 100 e Caiapônia. Os loci marcadores são mostrados a direita de cada grupo de ligação (A2, C2, D1a, D2, E, G, J, L e N) e as distâncias genéticas são indicadas à esquerda. Fonte: SANTOS, 2015.



Embora a cobertura não seja muito ampla, foi possível encontrar QTLs para características de interesse mesmo em mapas de ligação pouco saturados. Outros trabalhos relatam mapas com coberturas parciais do genoma usados para mapeamento de características agronômicas específicas para a cultura da soja. Brogin (2005) construiu um mapa de ligação com 41 marcadores SSR, ligados em nove grupos, onde mapeou QTLs para septoriose, e identificou genes de resistência à ferrugem asiática. QTLs relacionados a teor de proteína e óleo foram mapeados em nove GL formados por 25 marcadores SSR (RODRIGUES et al., 2010). Santos et al., 2006 mapeou 24 marcadores Microsatélites em seis grupos de ligação, a fim de mapear QTLs associados a fixação de nitrogênio. Genes que conferem tolerância a salinidade da água foram mapeados por Guan e colaboradores (2014) usando 12 marcadores

SSR mapeados no grupo de ligação C. Porém, uma futura saturação de regiões cromossômicas que possam estar relacionadas aos QTLs é válida, pois desta maneira pode-se estimar melhor o efeito de cada um deles.

2.3. Mapeamento de QTLs associados à resistência à ferrugem asiática

No mapeamento de QTLs por marca simples foi possível identificar quinze picos na curva de LOD *score* que ultrapassam o nível de significância (2,5), em seis grupos de ligação (FIGURA 2). Picos que ultrapassam o limite indicam a existência de possíveis QTLs associados à resistência a doença. Porém no mapeamento por intervalo composto (CIM), apenas seis picos, em quatro diferentes grupos de ligação, foram confirmados como QTLs. De acordo com a análise de regressão múltipla, os efeitos aditivos prevassem nestes QTLs (TABELA 2).

Nesse trabalho foram identificados e mapeados de seis QTLs que contribuem para a resistência parcial da ferrugem asiática da soja. O resumo de todos os QTLs encontrados, os grupos de ligação correspondentes, posição que foram identificados, os valores de LOD, efeito aditivo e porcentagem de variação fenotípica podem ser observados na Tabela 1. Os QTLs explicam em conjunto mais de 54 % do caráter, sendo que 37,05 % da variação é explicada por dois QTLs de maior efeito (QTL 3 e QTL 5), flanqueados pelos marcadores Satt208, Satt186, Satt688 e Satt324. Esses marcadores podem ser utilizados para seleção assistida por marcadores moleculares (SAM).

TABELA 2 – Descrição dos QTLs significativos detectados para resistência a ferrugem asiática da soja na população de mapeamento F₄.

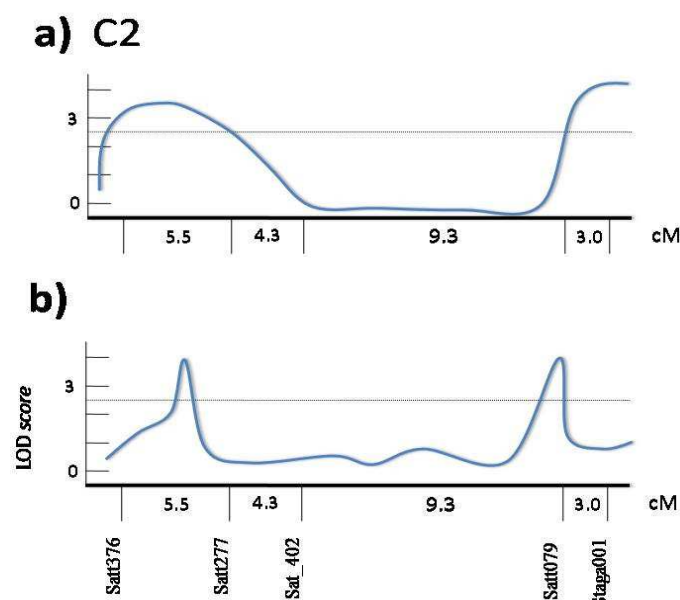
QTL	GL	Intervalo	Posição cM	LOD	Efeito Aditivo	R ² (%)
QTL 1	C2 (6)	Satt376 - Satt277	3.83	4.0	- 0.85	2.80
QTL 2	C2 (6)	Satt079 - Staga001	19.51	4.3	- 0.58	1.36
QTL 3	D2 (17)	Satt208 - Satt186	17.20	5.3	- 1.49	10.70
QTL 4	D2 (17)	Satt186 - Sct_137	48.34	3.6	- 0.27	0.83
QTL 5	G (18)	Satt688 - Satt324	18.31	10.1	- 6.73	26.35
QTL 6	N (3)	Satt009 - Satt675	3.00	6.6	- 3.77	12.65

GL, grupo de ligação, sendo os valores entre parenteses o correspondente ao número do cromossomo; LOD score; Efeito, efeito aditivo; R² (%), coeficiente de determinação em porcentagem.

No mapeamento por marca simples do grupo de ligação C2, pode-se observar que dois picos ultrapassaram o limite de 2,5 para o LOD (FIGURA 2A). O mapeamento CIM

confirmou a significância e magnitude destes picos, como dois QTLs independentes associados a resistência a ferrugem (Figura 3). De acordo com a análise de regressão múltipla os dois QTLs indentificados possuem pequeno efeito, explicando 2,8 % e 1,36 % do caráter respectivamente (TABELA 2). O QTL 1 flanqueado pelos marcadores Satt376 e Satt277, é responsável por uma diminuição de 0.85 pontos percentuais na média para severidade enquanto que o QTL 2 flanqueado pelos marcadores Satt079 e Staga001 diminui apenas 0,58 pontos na média (Tabela 2). O QTL 2 encontra-se a apenas 0,40 cM do marcador Satt079. Este marcador foi relatado em outros trabalhos de indentificação de QTLs em soja, como resistência à síndrome da morte súbita da soja (SDS) (KAZI et al., 2008), produção de sementes (REINPRECHT et al. 2006), porém não existem na literatura trabalhos que o relatem como polimórfico para resistência à ferrugem.

FIGURA 2. Curva de LOD score para severidade de ferrugem asiática da soja no grupo de ligação C2. A distancia entre os marcadores, em cM, está indicada entre as marcas. O nível de significância do LOD (2,5) está indicado pela linha pontilhada horizontal. Sendo: a) Mapeamento por marca simples e B) Mapeamento por intervalo composto (CIM). Fonte: SANTOS, 2015.



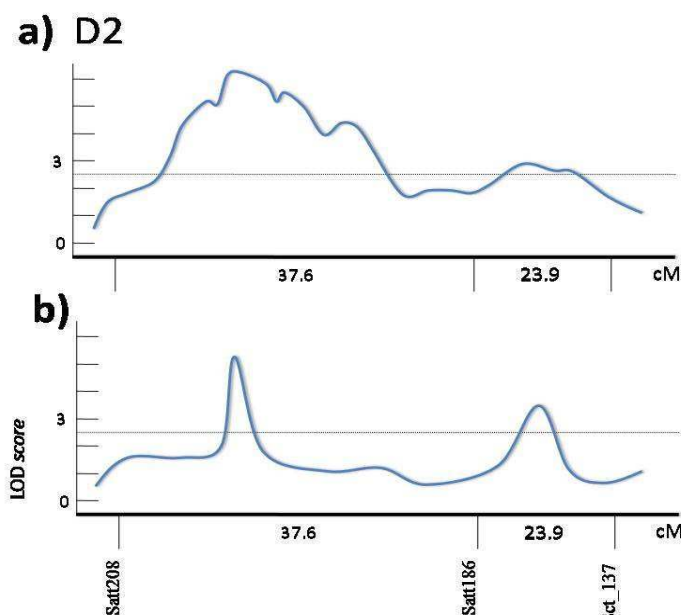
De acordo com o mapa integrado de QTL para doenças fungicas em soja (WANG et al., 2010) o grupo de ligação C2 também possui QTLs para resistência a *Rhizoctonia solani*, e a podridão vermelha da raiz. No mapa consenso da soja (SONG, et al., 2004), também são relatados QTLs ligados a resistência a *Phytophthora sojae* (WU et al., 2010) e a *Sclerotinea*

sclerotiorum (HUYNH et al., 2010).

No grupo de ligação D2 o mapeamento de marca simples indicou a existência de seis possíveis QTLs atuando no caráter (FIGURA 3), porém a análise de por intervalo composto evidenciou que apenas dois QTLs independentes atuam nesse grupo (FIGURA 3), sendo o QTL 3 entre os marcadores Satt208 e Satt186, atua diminuindo 1,49 pontos na média explicando 10,70 % da variação do caráter (TABELA 1). O QTL 4 identificado é de pequeno efeito, se encontra entre os marcadores Satt186 e Sct_137, esse marcador explica apenas 0,83 % da variação na média da severidade (TABELA 1).

FIGURA 3. Curva de LOD score para severidade de ferrugem asiática da soja no grupo de ligação D2. A distância entre os marcadores, em cM, está indicada entre as marcas. O nível de significância do LOD (2,5) está indicado pela linha pontilhada horizontal. Sendo, a) Mapeamento por marca simples e B) Mapeamento por intervalo composto (CIM). Fonte: SANTOS, 2015.

No mapa integrado de QTLs relacionados a doenças fungicas, proposto por Wang e

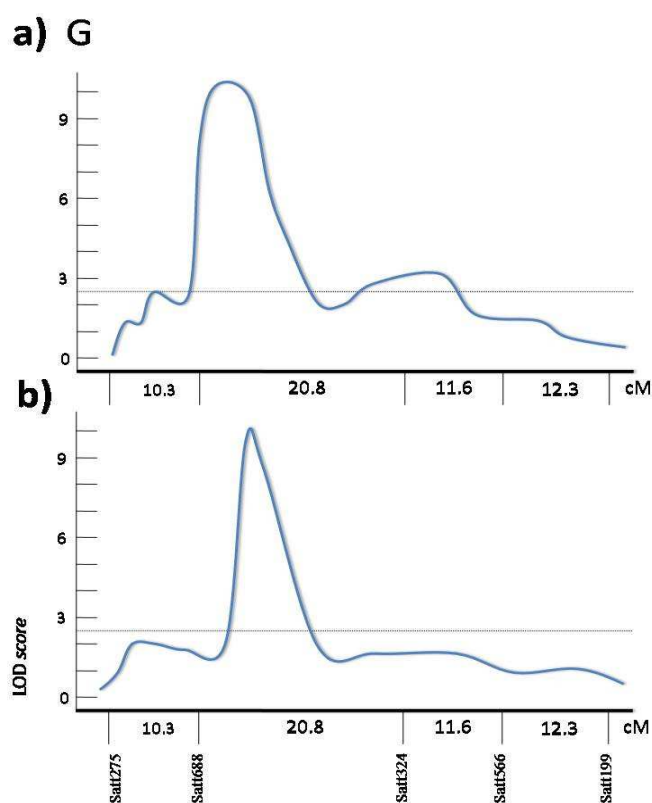


colaboradores (2010), essa região também é contemplada por QTLs para resistência à *Sclerotinea sclerotiorum* e síndrome da morte súbita da soja (SDS). Além disso, um QTL de grande efeito relacionado à resistência ao nematóide de cisto também foi relatado próximo a essa região mapeada no GL D2 (SCHUSTER et al., 2001).

O mapeamento por marca simples evidenciou dois picos superiores ao limite de significância do LOD no grupo de ligação G, desses apenas um QTL de efeito maior foi confirmado pelo mapeamento por intervalo composto (CIM) (Figura 4). Esse QTL, localizado

entre os marcadores Satt688 e Satt324, explica sozinho, 26,35 % da variação fenotípica para a resistência a ferrugem, sendo responsável por um decréscimo de 6,73 pontos percentuais na média de severidade (Tabela 1). Vários QTLs relacionados características de importância agronomica já foram relatados em regiões próximas e esta, como, resistência à síndrome da morte súbita em soja (KAZI et al., 2008; IGBAL *et al.*, 2001; ABDELMAJID et al., 2012) e à *Sclerotinia sclerotiorum* (ARAHANA et al., 2001).

FIGURA 4. Curva de LOD *score* para severidade de ferrugem asiática da soja no grupo de ligação G. A distância entre os marcadores, em cM, está indicada entre as marcas. O nível de significância do LOD (2,5) está indicado pela linha pontilhada horizontal. Sendo, a) Mapeamento por marca simples e b) Mapeamento por intervalo composto (CIM). Fonte: SANTOS, 2015.

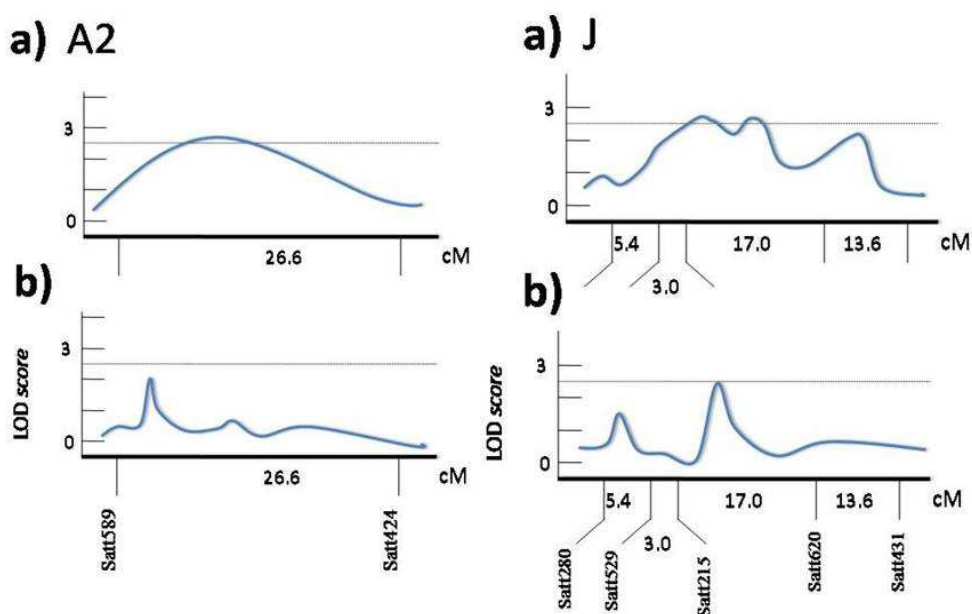


O último QTL foi mapeado no grupo de ligação N, de efeito médio, flanqueado pelos marcadores Satt009 e Satt675, esse QTL explica 12,65 % da variação do caráter, sendo responsável por menos 3,77 pontos percentuais na nota média de severidade (Tabela 1). O Grupo de ligação N apresenta vários QTLs relacionados a resistência à doença em plantas, e especificamente nesta região, foram relatados QTLs para resistência parcial à *Phytophthora sojae* (LEE et al., 2013) e *Sclerotiorum* (ARAHANA et al., 2001).

Nos grupos de ligação A2 e J pequenos picos, porém, significantes foram identificados

pelo mapeamento de marcas simples, no entanto, quando analisados pelo CIM, os picos não ultrapassaram o nível de significância de 2,5 para o LOD (Figura 5). Nas análises de regressão múltiplas os efeitos dos QTLs, também não foram significativos.

FIGURA 5. Curva de LOD score para severidade de ferrugem asiática da soja nos grupos de ligação A2 e J. A distância entre os marcadores, em cM, está indicada entre as marcas. O nível de significância do LOD (2,5) está indicado pela linha pontilhada horizontal. Sendo, a) Mapeamento por marca simples e B) Mapeamento por intervalo composto (CIM). Fonte: SANTOS, 2015.



Os grupos de Ligação C2 (cromossomo 6), G (18), J (16), N (3) e são conhecidos na literatura pela existência de genes verticais relacionados à resistência a ferrugem asiática da soja (SILVA et al., 2008; HYTEN et al., 2009; GARCIA et al., 2008; LI et al., 2012). Foram identificados QTLs nos grupos C2, G e N. Sendo que o QTL mais próximo a um destes genes de resistência foi o QTL 6, mapeado no grupo N, identificado em uma região separada por aproximadamente 20 cM da região onde o gene de resistência *Rpp5* foi mapeado (GARCIA et al., 2008 e MORCELI et al., 2008), de acordo com o mapa consenso da soja (SONG et al., 2004). Os outros QTLs mapeados encontram-se em regiões distintas das dos genes *Rpps*. Os QTLs são regiões cromossômicas onde se encontram vários genes de pequeno efeito, e não precisam estar necessariamente nas mesmas regiões dos genes que conferem resistência vertical a doença (GARCIA et al., 2008). Santos (2010) relatou a existência de QTLs em regiões distintas daquelas mapeadas para os genes de resistência a ferrugem. Não foram

detectados QTLs para o grupo J, a ausência de QTLs para esse grupo pode ser explicada pela falta de saturação do mapa de ligação, visto que a maioria dos marcadores ficaram concentrados em uma única região.

Acredita-se que esses QTLs sejam importantes para que os genótipos 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.

A utilização de mais marcadores a fim de saturar o mapa genético é necessária, no intuito de aumentar a cobertura do genoma e diminuir o espaçamento entre os marcadores, que é relativamente alto, este fato pode ter dificultando a identificação de outros QTLs presentes nessas regiões, além de refinar a localização dos QTLs identificados.

Existem poucos estudos voltados para o mapeamento de QTLs que possam influenciar a resistência horizontal à ferrugem asiática da soja, o que tornam promissores os dados obtidos. Ainda assim, esses resultados necessitam ser validados, para isso devem-se utilizar os marcadores para seleção em uma ou mais populações segregantes e em diferentes ambientes.

3. CONCLUSÕES

O mapa de ligação construído cobre 285,9 cM do genoma, em nove diferentes grupos de ligação.

Ao todo seis QTLs ligados a resistência da ferrugem asiática da soja foram mapeados, juntos estes explicam mais de 54 % da variação para o caráter.

Os marcadores mais eficientes para seleção assistida são Satt208, Satt186, Satt688 e Satt324, pois selecionam dois QTLs de maior efeito, capazes de explicar mais de 37 % da variação fenotípica do caráter.

4. REFERÊNCIAS

- ABDELMAJID, K. et al. The 'PI 438489B' by 'Hamilton' SNP-based genetic linkage map of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. **Journal of Plant Genome Sciences**, [S.l.], v.1, n.1, p.18-30, 2012.
- ALCÂNTARA NETO, F. **Marcadores microssatélites na identificação de cultivares de soja**. 2001. 46f. Dissertação (Mestrado em Melhoramento de Plantas e Biotecnologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.
- ARAHANA, V. S. et al. Identification of QTLs for resistance of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Crop Science**, Madison, v.41, p.180-188, 2001.
- BEARZOTI, E. et al. Comparação entre métodos estatísticos na avaliação de clones em um programa de melhoramento de batata. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.32, p.877-884, 1997.
- BROGIN, R. L. **Mapeamento de genes de resistência à ferrugem e de QTLs envolvidos na resistência à septoriose em soja**. 2005. 93f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2005.
- CARNEIRO, M. S.; VIEIRA, M. L. C. Mapas genéticos em plantas. **Bragantia**, Campinas, v.61, p.89-100, 2002.
- CREGAN, P. B. et al. An integrated genetic linkage map of the soybean genome. **Crop Science**, Madison, v.39, n.5, p.1464-1491, 1999.
- DON, R. et al. Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.19, n.14, p.4008, 1991.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rochester, v.12, p.13-15, 1990.
- DRAPER, N. R.; SMITH, R. **Applied regression analysis**. 3.ed. New York: Wiley, 1996. 706p.
- DUARTE, J. B.; VENKOVSKY, R.; DIAS, C. T. S. Estimadores de componentes de variância em delineamento de blocos aumentados com tratamentos novos de uma ou mais populações. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, p.1155-1167, 2001.
- GARCIA, A. et al. Molecular mapping of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) resistance genes: discovery of a novel locus and alleles. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.117, p.545-553, 2008.
- GUAN, R. et al. Mapping and validation of a dominant salt tolerance gene in the cultivated soybean (*Glycine max*) variety Tiefeng 8. **The Crop Journal**, [S.l.], v.2, n.6, p.358-365, 2014.

GUTIERREZ-GONZALES, J. et al. Genetic control of soybean seed isoflavone content: importance of statistical model and epistasis in complex traits. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.119, n.6, p.1069-1083, 2009.

GUZMAN, P. S. et al. QTL associated with yield in three backcross-derived populations of soybean. **Crop Science**, Madison, v.47, p.111-122, 2007.

HUYNH, T. et al. Identification of QTLs associated with partial resistance to white mold in soybean using field-based inoculation. **Crop Science**, Madison, v.50, n.3, p.969-979, 2010.

HYTEN, D. L. et al. Bulk segregant analysis using the goldengate assay to locate the *Rpp3* locus that confers resistance to soybean rust in soybean. **Crop Science**, Madison, v.49, p.265-271, 2009.

IQBAL, M. J. et al. Microsatellite markers identify three additional quantitative trait loci for resistance to soybean sudden-death syndrome (SDS) in Essex × Forrest RILs. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.102, n.2/3, p.187-192, 2001.

KASSEM, M. A. et al. An updated 'Essex' by 'Forrest' linkage map and first composite map of QTL underlying six soybean traits. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.113, p.1015-1026, 2006.

KAZI, S. et al. Separate loci underlie resistance to root infection and leaf scorch during soybean sudden death syndrome. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.116, n.7, p.967-977, 2008.

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

KUSSLER, R.; BONETTI, L. P. Ancestralidade de cultivares transgênicas de soja indicadas para cultivo no Rio Grande do Sul e Santa Catarina. In: INTERINSTITUCIONAL DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 13., 2006/2007, Cruz Alta. **Anais...** Cruz Alta, 2008.

LANDER, E. S. et al. MAPMAKER: an interactive computer program for constructing genetic linkage maps of experimental and natural populations. **Genomics**, San Diego, v.1, p.174-181, 1987.

LEE, S. et al. Novel quantitative trait loci for partial resistance to *Phytophthora sojae* in soybean PI 398841. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.126, n.4, p.1121-1132, 2013.

LI, S. et al. Identification of a new soybean rust resistance gene in PI 567102B. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.125, p.133-142, 2012.

LYNCH, M.; WALSH, B. **Genetics and analysis of quantitative traits**. Sunderland, Massachusetts, USA: Sinauer Associates, Inc., 1998. 980p.

MARTINS, J. A. S. **Controle genético da resistência parcial, adaptabilidade e estabilidade frente à ferrugem asiática da soja**. 2011. 172f. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

- MICHELMORE, R. W.; PARAN, I.; KESSELI, R. V. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulk segregant analysis a rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.88, n.1, p.9828-9832, 1991.
- MIRANDA, Z. F. S. et al. Genetic characterization of ninety elite soybean cultivars using coefficient of parentage. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, p.363-396, 2007.
- MORCELI, T. G. S. et al. Identificação e validação de marcadores Microsatélites ligados ao gene *Rpp5* de resistência à ferrugem-asiática-da-soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, n.11, p.1525-1531, 2008.
- NIKULIN, M. S. Chi-squared test for normality. In: INTERNATIONAL VILNIUS CONFERENCE ON PROBABILITY THEORY AND MATHEMATICAL STATISTICS, 1., 1973, [S.l.]. **Anais...** p.119-122, 1973.
- RAMALHO, M. A. P.; FERREIRA, D. F.; OLIVEIRA, A. C. **Experimentação em genética e melhoramento de plantas**. 2.ed. Lavras: UFLA, 2005. 326p.
- REINPRECHT, Y. et al. Seed and agronomic QTL in low linolenic acid, lipoxygenase-free soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) germplasm. **Genome**, Ottawa, v.49, p.1510-1527, 2006.
- RESENDE, M. D. V. **Software Selegen-REML/BLUP**. Curitiba: Embrapa Florestas, 2002. 67p.
- RODRIGUES, J. I. S. et al. Mapeamento de QTL para conteúdos de proteína e óleo em soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.45, n.5, p.472-480, 2010.
- SANTOS, J. V. M. **Mapeamento de QTLs de características sob influência da ferrugem asiática da soja**. 2010. 107f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.
- SANTOS, M. A. dos; NICOLAS, M. F.; HUNGRIA, M. Identificação de QTL associados à simbiose entre *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii* e soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.1, p.67-75, 2006.
- SCHUSTER, I. et al. Identification of a new QTL associated with resistance to soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.102, p.91-96, 2001.
- SILVA, D. C. G. et al. Molecular mapping of two loci that confer resistance to Asian rust in soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.117, p.57-63, 2008.
- SONG, Q. J. et al. **A new integrated genetic linkage map of the soybean**. Nebraska: Agronomy & Horticulture - Faculty Publications, 2004. 9p.
- SOUZA, E. A. **Alternativas experimentais na avaliação de progênies em programas de melhoramento genético vegetal**. 1997. 122f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1997.

WANG, J. et al. An integrated QTL map of fungal disease resistance in soybean (*Glycine max* L. Merr): a method of meta-analysis for mining R genes. **Agricultural Sciences in China**, [S.l], v.9, n.2, p.223-232, 2010.

WANG, S.; BASTEN, C. J.; ZENG, Z. B. **Windows QTL cartographer 2.5**. North Carolina State: Department of Statistics, 2007.

WU, X. et al. Identification of quantitative trait loci for partial resistance to *Phytophthora sojae* in soybean. **Plant Breeding**, [S.l], v.130, p.144-149, 2010.

ZHANG, W. K. et al. QTL mapping of ten agronomic traits on the soybean (*Glycine max* L. Merr.) genetic map and their association with EST markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.108, n.6, p.1131-1139, 2004.

CAPITULO 4

MAPEAMENTO E COMPARAÇÃO DE QTLS ENVOLVIDOS NA RESISTÊNCIA PARCIAL A FERRUGEM ASIÁTICA EM SOJA EM GERAÇÕES AVANÇADAS

RESUMO

A ferrugem asiática da soja, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* é uma doença importante da soja em várias regiões do mundo. Atualmente tem causado grandes perdas de produtividade nos principais países produtores. O objetivo desse trabalho foi identificar marcadores Microsatélites ligados a QTLs para resistência a *P. pachyrhizi*, utilizando uma população de plantas F₇ derivada do cruzamento entre os genótipos IAC 100 (resistência parcial) e BRS Caiapônia (suscetível), e posteriormente comparar os QTLs identificados com QTLs identificados em uma população F₄ derivada deste mesmo cruzamento. 37 marcadores Microsatélites polimórficos para os genitores, foram utilizados para genotipar as plantas da geração F₇, previamente avaliada para resistência/suscetibilidade à ferrugem. Foi construído um mapa de ligação genética, onde 29 marcadores foram mapeados em nove diferentes grupos de ligação, cobrindo 266,4 cM do genoma, esse mapa foi praticamente idêntico ao mapa obtido para a geração F₄. Quatro dos seis QTLs identificados na geração F₄ foram identificados na geração F₇, demonstrando estabilidade para essas regiões genômicas, indicando que os marcadores flancueadores destas regiões podem ser ferramentas úteis para a seleção assistida por marcadores moleculares.

Palavras-chave: *Phakopsora pachyrhizi*, Resistência Horizontal, Marcadores Moleculares, Microsatélites, Melhoramento

¹Orientador: Fernando Cézar Juliatti – UFU.

ABSTRACT

Asian soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* is an important disease of soybean in several regions of the world. Currently it has caused major yield losses in major producing countries. The objective of this study was to identify microsatellite markers linked to QTLs for resistance to *P. pachyrhizi*, using a population of F7 plants derived from the cross between the cultivars IAC 100 (partial resistance) and BRS Caiapônia (susceptible), and then compare the QTLs identified with QTLs identified in an F4 population derived from this same crossing. 37 microsatellite polymorphic markers for the parents, were used to genotype the plants F7 generation, previously evaluated for resistance / susceptibility to rust. A genetic linkage map, where 29 markers were mapped in nine different linking groups, covering 266.4 cM genome was constructed, this map is virtually identical to map obtained for the F4 generation. Four of the six QTLs identified in the F4 generation were identified in the F7 generation, that showing stability for these genomic regions, indicating that the markers flanking these regions can be useful tools in Marker assisted selection.

Keywords: *Phakopsora pachyrhizi*, horizontal resistance, molecular markers, SSR, breeding.

¹ Adviser: Prof. Fernando Cezar Juliatti – UFU

1. INTRODUÇÃO

A ferrugem asiática da soja, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, é uma das doenças mais sérias na cultura da soja. Essa doença tem causado preocupação, tanto para os produtores quanto para pesquisadores, devido sua agressividade, causando perdas de até 80 % nas lavouras, além de fácil disseminação, acometendo quase todas as áreas cultivadas atualmente.

A principal forma de controle é o uso de fungicidas, que incrementa os custos de produção. Por essa razão, as pesquisas que visam à obtenção de genótipos resistentes têm se intensificado. A busca por genótipos com genes que confirmem resistência total a doença é muito difícil, pois genes responsáveis pela resistência vertical são rapidamente quebrados devido à variabilidade elevada do patógeno. Dessa forma, espera-se que a resistência poligênica possa ser mais efetiva, reduzindo a taxa de infecção da doença.

A identificação de marcadores moleculares ligados a QTLs que confirmem resistência a patógenos é uma ferramenta importante para os programas de melhoramento, visto que reduz consideravelmente o tempo gasto com avaliações, permitindo monitorar e acelerar a introdução genes responsáveis pela resistência no germoplasma cultivado.

Além de identificar esses QTLs, é importante que estes sejam estáveis no genoma, permitindo a seleção em qualquer fase ou geração durante o processo de melhoramento. Dessa forma, os objetivos deste trabalho foram identificar mapear e quantificar os efeitos de QTLs na geração de mapeamento F₇, além de compará-los com QTLs previamente mapeados em uma população F₄ derivada do mesmo cruzamento.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios de Micologia e Proteção de Plantas (LAMIP) e Biologia Molecular do Instituto de Ciências Agrárias no Campus Umuarama e na estação experimental do Campus Glória, localizada na latitude Sul 18°56'56" e 48°12'21" longitude Oeste, a 919 metros acima do nível do mar, da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG.

2.1. Material genético

Foram utilizadas 70 progênies F₇ derivadas do cruzamento entre as entre os genótipos BRS Caiapônia e IAC 100. Os cruzamentos foram realizados em 2007 e o avanço de gerações nos anos seguintes, sendo que a geração F₇ foi semeada no ano de 2014.

A escolha dos genitores foi tomada de acordo com a reação dos mesmos frente à ferrugem asiática da soja. Os genótipos IAC 100 e BRS Caiapônia se mostraram contrastantes quanto a esse caráter (MARTINS, 2011). A cultivar IAC 100 tem ciclo precoce, hábito de crescimento determinado e segundo estudos prévios apresenta resistência parcial à ferrugem da soja (SILVA, JULIATTI, SILVA, 2007), já a cultivar BRS Caiapônia, tem ciclo precoce, hábito de crescimento indeterminado e é altamente suscetível a ferrugem asiática.

2.2. Preparo do inoculo e inoculação com *P. pachyrhizi*

A inoculação do patógeno foi realizada para garantir a incidência da doença no campo. Como o agente causal da ferrugem é um parasita obrigatório, o *bulk* contendo os isolados do patógeno usado para este experimento foi obtido de folhas infectadas com abundante esporulação coletadas em campo.

Após a obtenção dos esporos, estes foram suspensos em água destilada e contados em câmara de contagem de células (Neubauer). A solução foi diluída em água destilada para uma concentração de 10⁵ esporos.mL⁻¹, como espalhante adesivo utilizou-se óleo vegetal na proporção de 0,5 mL.L⁻¹ de solução.

Com o auxílio de pulverizador manual, o inoculo de ferrugem foi aplicado nas entrelinhas. A inoculação foi realizada ao anoitecer para evitar a inviabilização dos uredosporos pela falta de água livre nas folhas e baixa umidade do ambiente, causados pelas temperaturas mais altas durante os horários de maior insolação. Este processo ocorreu no momento em que as plantas alcançaram o estágio R1 (FEHR; CAVINESS, 1981).

2.3. Avaliação fenotípica

As progênes F₇ foram avaliadas em condições de campo quanto à severidade da doença. A escala diagramática proposta por Juliatti (dados não publicados) (Figura 1A), que considera as porcentagens 0.5, 5, 20, 40, 60 e 80% do tecido foliar infectado foi utilizada.

A severidade da ferrugem da soja foi avaliada, aos 80 dias após a semeadura, pela estimativa visual de três folíolos do terço médio da planta, por dois avaliadores diferentes, obtendo-se assim a média para cada progênie.

2.4. Extração e quantificação de DNA

Amostras de tecido foliar de cada progênie foram coletadas durante o estágio R3, armazenadas em sacos plásticos, devidamente identificados e armazenados em ultrafreezer (-80 °C) até o momento da extração.

O DNA genômico foi purificado seguindo o protocolo baseado na técnica do CTAB, proposto por Doyle e Doyle, (1990) com algumas modificações. Cerca de 50 mg de tecido foliar de cada amostra foi macerado e colocado em microtubos de 1,5 mL. Adicionou-se em cada amostra 650 µL do tampão de extração [Tris 1 M (pH 8,0), EDTA 0,5 M (pH 8,0), NaCl 5 M, CTAB 2 % (m/v), PVP 1 % (m/v); β-mercaptoetanol 2 % (v/v)] a solução foi encubada a 65 °C por uma hora, sendo agitada a cada 20 minutos. Em seguida, prosseguiu-se a extração, 650 µL clorofórmio – álcool isoamílico (24:1 v/v) foi adicionando e os tubos foram posteriormente centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos, 600 µL de sobrenadante do material centrifugado foi transferido para microtubos de 1,5 mL e seu DNA precipitado com o mesmo volume de isopropanol gelado. Após a precipitação, o DNA foi centrifugado novamente a 14.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o DNA foi lavado com a solução de lavagem [Etanol P.A 76%, 10 mM de acetato de amônio] repousando por 20

minutos, o material foi novamente centrifugado por 5 minutos a 10.000 rpm, o sobrenadante foi descartado e 50 µL de tampão TE foi adicionado. Para purificar ainda mais o DNA o mesmo foi novamente precipitado com 5 µL de acetato de sódio e 100 µL de etanol P.A. 95%, e centrifugado a 14.000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o DNA encubado a 37 °C por duas horas. Para eliminação de resíduos de RNA foram adicionados 50 µL de RNase (10ng.µL⁻¹) e os tubos encubados por 30 minutos a 37 °C. Posteriormente o DNA foi armazenado a -20 °C para conservação.

Após a extração, a concentração de cada amostra foi determinada em NanoDrop 1.000 *Spectrophotometer* (Thermo Scientific) e a integridade verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com *Gel Red* (Biotium). Após a determinação da concentração e qualidade do DNA, as amostras foram diluídas para uma concentração de 10 ng.µL⁻¹ e armazenadas a -20 °C.

2.5. Amplificação dos Microssatélites

Os 37 marcadores Microssatélites utilizados neste trabalho foram previamente identificados como ligados a resistência parcial a ferrugem asiática da soja. As sequências dos *primers* e posicionamento dos mesmos, no mapa genético consenso da soja (SONG et al., 2004), encontram-se disponíveis no site do Soybase (<http://soybase.agron.iastate.edu/>).

As reações de PCR foram realizadas em aparelho *My Cycler Thermal Cycler* (Bio Rad), utilizando as seguintes condições: Tampão de PCR 1X, cloreto de magnésio (MgCl₂) 1,5 mM, dNTPs 0,4 mM (40 µM de cada nucleotídeo), *primer forward* 0,3 µM, *primer reverse* 0,3 µM, *Taq DNA Polimerase* ® Invitrogen 1 U, 1 µL do DNA (25 ng/µL) e água deionizada autoclavada para completar o volume final de 12 µL. Para a amplificação dos fragmentos foi utilizado o programa *Touchdown* (TD) PCR (DON et al., 1991), com temperaturas de anelamento entre 45 e 60 °C.

Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose (Invitrogen) a 4% (p/v) e corados com *Gel Red* (Biotium) diluído 1:500. Os fragmentos gerados foram visualizados em transluminador (Hoefer MacroVue UV-20) e fotodocumentados.

2.6. Análises dos Microssatélites

Os 38 marcadores SSR utilizados para genotipagem da geração F₇ foram previamente identificados como polimórficos para os genótipos parentais (Tabela 1A), a segregação dos marcadores foi avaliada aplicando o teste de conformidade do modelo (χ^2) (NIKULIN, 1973) para cada um dos marcadores, a fim de verificar a adequação ao modelo de distribuição genotípica (1:1) (RAMALHO et al., 2005). Somente marcadores com segregações adequadas foram considerados para as análises.

2.7. Construção do grupo de ligação genético

Após as análises realizadas foi construído um mapa genético de ligação para os marcadores Microssatélites polimórficos, baseado nos dados fenotípicos, utilizando o programa MAPMAKER/Exp. versão 3.0 (LANDER et al., 1987). Os critérios adotados para formação dos grupos de ligação foram LOD *escore* mínimo 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. O mapa obtido foi comparado com o mapa previamente obtido para geração F₄.

2.8. Mapeamento de QTLs associados à resistência

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 WinQTL Cartographer versão 2.5 (WANG et al., 2007), utilizando primeiramente mapeamento por marca simples e posteriormente para verificar a independência entre os QTLs encontrados, foi realizado o mapeamento por intervalo composto (*composite interval mapping* – CIM), o LOD (Logarithm Of Odds – LYNCH; WALSH, 1998) *score* foi de 2,5.

O LOD é um teste de significância para testar a hipótese de ligação entre dois loci, baseado na razão de verossimilhança, utilizando logaritmo na base 10. Dessa forma, um LOD *score* com valor três indica que a ocorrência de ligação é mil vezes mais provável que a segregação independente (CARNEIRO; VIEIRA, 2002). Trabalhos que mapeiam QTLs em soja normalmente aceitam valores de LOD *Score* entre 2,0 e 3,0 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 2,5, já que se trata de estudos iniciais de identificação de QTLs sob ação da ferrugem asiática da soja.

Analises de regressão múltipla foram realizadas para detectar possíveis interações e quantificar os efeitos dos QTLs identificados, a probabilidade de 5 % foi adotada para o modelo (DRAPER; SMITH, 1996).

A fim de verificar a estabilidade dos QTLs encontrados, os mesmos foram comparados, quanto à magnitude e localização, com QTLs mapeados na geração F₄ oriunda do mesmo cruzamento.

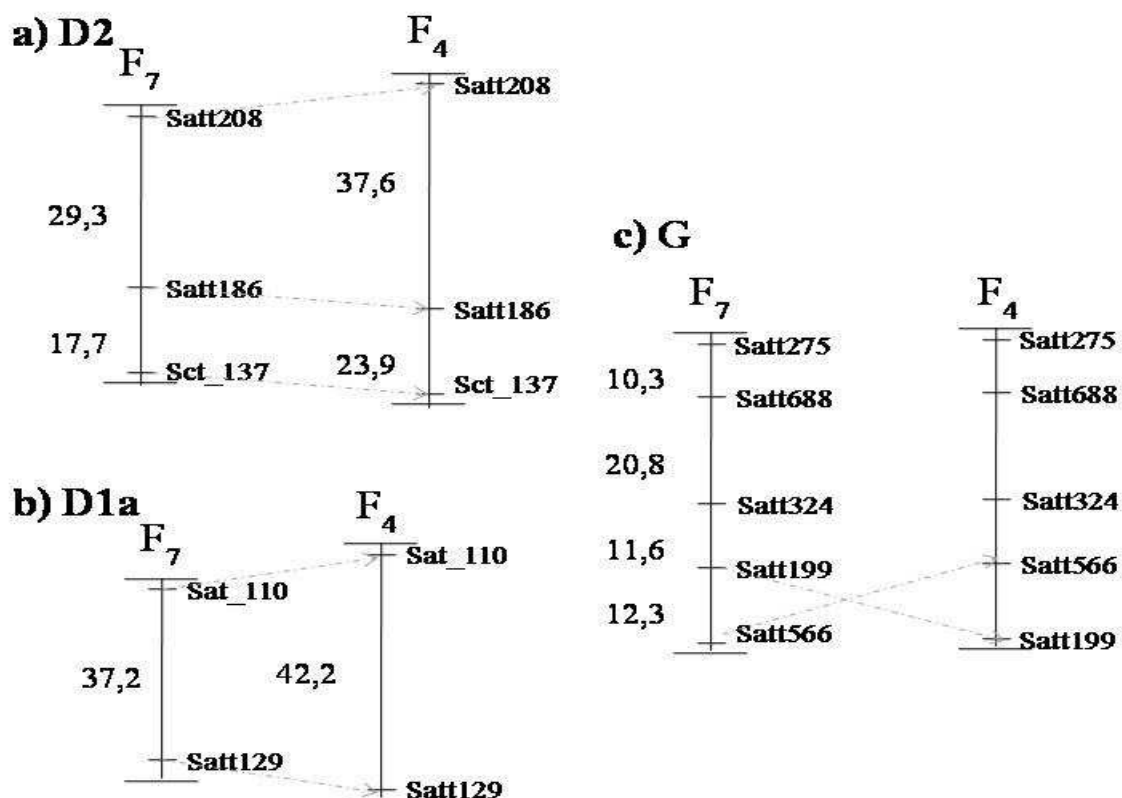
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Construção e comparação do mapa de ligação genético

Foram utilizados 38 marcadores Microsatélites (Tabela 1A), previamente identificados como polimórficos para os parentais foram utilizados para genotipar as 70 progênies F₇. Dois destes 38 marcadores (Satt440 e Satt260) apresentaram desvio da proporção esperada (1:1) pelo teste de (χ^2) e não foram utilizados nas análises e na construção do mapa genético. Dos 36 marcadores restantes, 29 foram mapeados em um mapa de ligação genética.

Nove grupos de ligação foram detectados, grupos esses comparáveis aos 20 grupos de ligação do mapa consenso da soja (SONG et al., 2004; CREGAN et al., 1999) (Figura 1). Dos 36 marcadores utilizados para construção do mapa de ligação, seis não foram mapeados em nenhum grupo de ligação, por estarem a uma distancia genética maior que 50 cM

FIGURA 1. Comparação entre os grupos de ligação D2, D1a e G das populações de mapeamento F₇ e F₄ originadas do cruzamento entre os genótipos de soja IAC 100 e Caiapônia. Os loci marcadores são mostrados a direita de cada grupo de ligação e as distâncias genéticas são indicadas à esquerda. Fonte: SANTOS, 2015.



O mapa de ligação obtido para a geração F₄ é semelhante ao mapa obtido para a geração F₄, cobrindo 266,4 cM, (285,9 cM na geração F₄) (Figura 2A). Em apenas três dos nove grupos houveram diferenças, os marcadores Satt199 e Satt566 aparecem invertidos no grupo de ligação G, e as distancias entre os marcadores Sat_110 e Satt129 no grupo D1a e entre os marcadores Satt208, Satt186 e Sct_137 no grupo de ligação D2 foram menores no mapa obtido na população F₇ (Figura 1). Essas diferenças devem ter ocorrido devido a baixa saturação do mapa .

Austin e Lee (1996) construíram mapas de ligação entre populações F2:3 e F6:7, e obtiveram mapas praticamente identicos em ambas populações, com apenas 1 cM de diferença entre eles, as posições dos marcadores também foram semelhantes, ocorrendo a inversão na posição de dois marcadores.

3.2. Mapeamento e comparação de QTLs associados à resistência a ferrugem asiática.

No mapeamento de QTLs por marca simples foi possível identificar oito picos na curva de LOD *score* que ultrapassam o nível de significância (2,5), mapeados em três grupos de ligação. Picos que ultrapassam o limite indicam existência de possíveis QTLs associados à resistência a doença. Porém no mapeamento por intervalo composto (CIM), apenas quatro picos, nesses mesmos três grupos de ligação, foram confirmados como QTLs .

TABELA 1. Descrição dos QTLs significativos detectados para resistência para resistência a ferrugem asiática da soja na população de mapeamento F₇. Fonte: SANTOS, 2015.

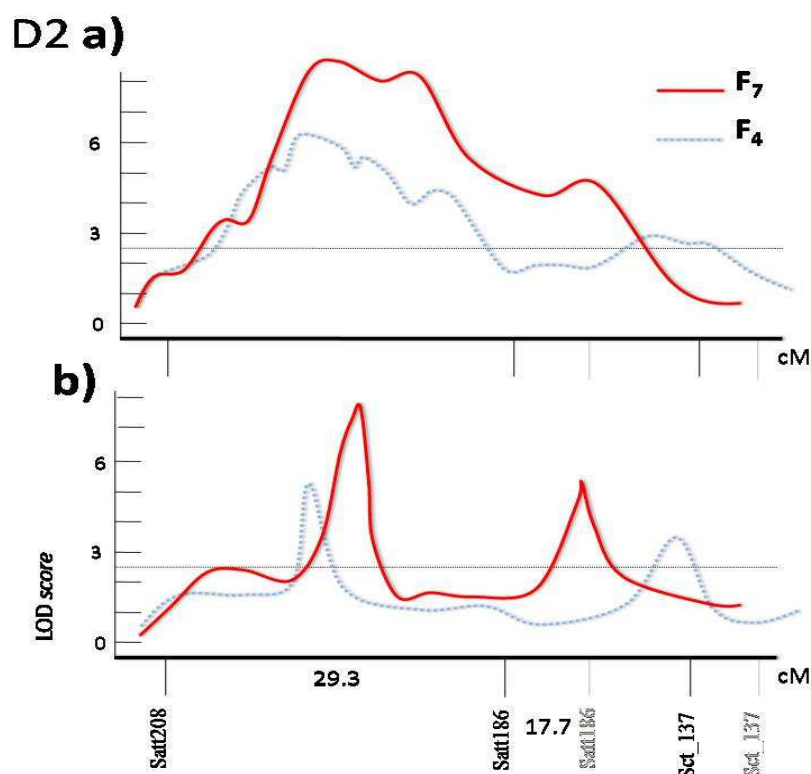
QTL	GL	Intervalo	Posição cM	LOD	Efeito Aditivo	R ² (%)
QTL 1	D2 (17)	Satt208 - Satt186	20.30	7.9	- 4.38	14.50
QTL 2	D2 (17)	Satt186 - Sct_137	31.20	5.4	- 2.76	5.15
QTL 3	G (18)	Satt688 - Satt324	20.31	13.1	- 8.73	30.64
QTL 4	N (3)	Satt675 - Satt125	9.78	7.2	- 4.35	12.77

GL, grupo de ligação sendo os valores entre parenteses o correspondente ao número do cromossomo; LOD *score*; Efeito, efeito aditivo; R² (%), coeficiente de determinação em porcentagem.

No grupo de ligação D2 quatro picos significativos foram identificados, a análise intervalo composto evidenciou que dois QTLs indepentres eram responsáveis por esses picos. O QTL 1, de maior efeito, com LOD *score* 7,9 explica sozinho 14,5 % da variação fenotípica para a severidade. Na geração F₄ também foi identificado um QTL para essa mesma região, porém com menor efeito (10,7 %) (TABELA 1). O segundo QTL identificado neste grupo

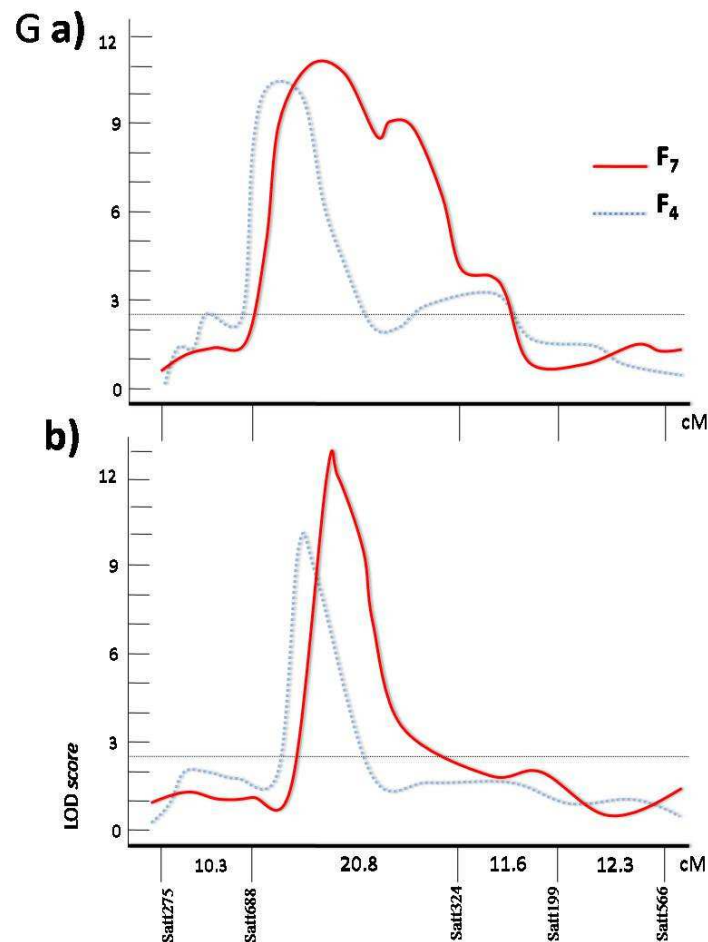
explica 5,15 % da variação fenópica, reduzindo 2,76 pontos da média de severidade (TABELA 1).

FIGURA 2. Curvas de LOD *score* para severidade de ferrugem asiática da soja no grupo de ligação D2, nas populações F₄ e F₇. A distancia entre os marcadores, em cM, está indicada entre as marcas (marcas em cinza representam as distâncias encontradas para F₄). O nível de significância do LOD (2,5) está indicado pela linha pontilhada horizontal. Sendo a) Mapeamento por marca simples e B) Mapeamento por intervalo composto (CIM). Fonte: SANTOS, 2015.



O mapeamento por marca simples do GL G revelou um QTL de grande efeito entre os marcadores Satt688 e Satt324, sendo responsável por 30,64 % da variação para o caráter, reduzindo 8,73 pontos percentuais na nota média para severidade. Esse mesmo QTL foi mapeado na geração F₄ explicando 26,35 % da variação fenotípica.

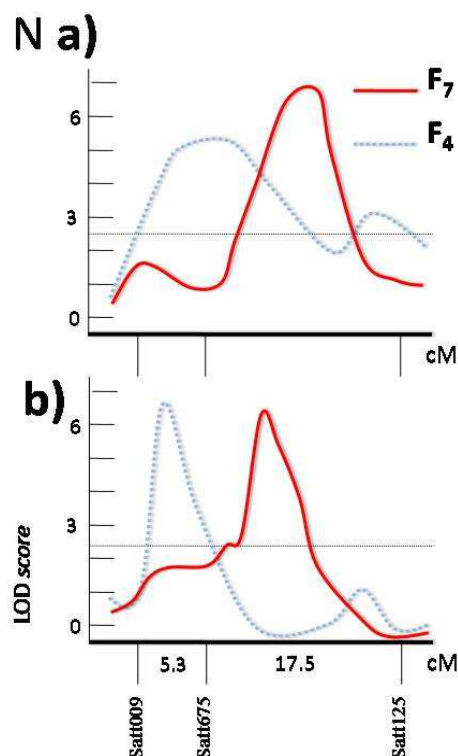
FIGURA 3. Curvas de LOD *score* para severidade de ferrugem asiática da soja no grupo de ligação G, nas populações F₄ e F₇. A distância entre os marcadores, em cM, está indicada entre as marcas. O nível de significância do LOD (2,5) está indicado pela linha pontilhada horizontal. Sendo a) Mapeamento por marca simples e B) Mapeamento por intervalo composto (CIM). Fonte: SANTOS, 2015.



No grupo de ligação N tanto no mapeamento por marca simples, quanto no mapeamento por intervalo composto, um pico significativo foi identificado entre os marcadores Satt675 e Satt125, representando um QTL de médio efeito, que explica 12,77 % da variação fenotípica. Esse QTL não foi mapeado na geração F₄ nessa região, e sim entre os marcadores Satt009 e Satt675, evidenciando uma possível recombinação cromossômica entre esses loci durante o avanço de gerações. Porém, mesmo com a mudança de posicionamento, o QTL está sendo flanqueado nas duas populações pelos marcadores Satt009 e Satt125. O loco representado pelo marcador Satt009 foi descrito como associado a outros QTLs relacionados com a resistência a doenças em soja, como mofo branco (ARAHANA et al., 2001) e *Phytophthora sojae* (LEE et al., 2013). No entanto o marcador Satt125, até o momento, não havia sido relatado com ligado a QTL envolvidos na resistência a doenças em soja.

FIGURA 3. Curvas de LOD *score* para severidade de ferrugem asiática da soja no grupo de ligação N, nas populações F₄ e F₇. As distancias entre os marcadores, em cM, estão indicadas entre as marcas. O nível de significância do LOD (2,5) está indicado pela linha pontilhada

horizontal. Sendo a) Mapeamento por marca simples e B) Mapeamento por intervalo composto (CIM). Fonte: SANTOS, 2015.



Ao todo foram identificados e mapeados quatro QTLs relacionados à resistência parcial da ferrugem asiática da soja na geração F₇. Os grupos de ligação correspondentes, posição que foram identificados, os valores de LOD, efeito aditivo e porcentagem de variação fenotípica para cada QTL, podem ser observados na Tabela 1.

Os quatro QTLs detectados explicam, em conjunto, 63,03 % do caráter. Na geração F₄ foram mapeados seis QTLs, que explicam, juntos, 54,69 % do efeito do caráter (TABELA 1). A diferença entre os QTLs identificados nas duas populações de mapeamento podem estar ligadas a baixa saturação do mapa de ligação para ambas as populações, além da instabilidade dos QTLs de menor efeito evidenciando uma possível interação entre os QTLs e as gerações. Além disso, pode existir interação entre os QTLs e os ambientes, uma vez que os experimentos foram conduzidos em diferentes locais e épocas. Austin e Lee (1996), também relatam diferenças no mapeamento entre diferentes gerações de mapeamento, derivadas do mesmo cruzamento. Estes autores detectaram nas gerações F_{2:3} e F_{6:7} QTLs de diferentes magnitudes e posições, além de detectarem apenas 13, dos 40 QTLs mapeados na geração F_{2:3}, na geração F_{6:7}.

Os três grupos de ligação que apresentam QTLs significativos na geração F₇, G, D2 e N, também apresentaram QTLs significativos pra a geração F₄, e coincidentemente foram os QTLs de maior efeito nas duas populações de mapeamento, evidenciando a estabilidade desses QTLs.

Takuno e colaboradores (2012) comparam, através de simulações, populações de mapeamento F₄ e F₇ e propõem que a identificação de QTLs em gerações iniciais é tão eficiente quanto em gerações avançadas, e pode reduzir os gastos inerentes com o avanço das gerações. Porém, os resultados obtidos no presente estudo, demonstram que apesar de os QTLs, de maior efeito, identificados serem coincidentes nas duas gerações de mapeamento (F₄ e F₇), na geração F₄, foram identificados QTLs de menor efeito, e estes não foram identificados na geração F₇, demonstrando a instabilidade com o avanço de gerações. Dessa forma, o uso de gerações iniciais para o mapeamento de QTLs deve ser considerado eficiente, porém é cauteloso desconsiderar QTLs de pequeno efeito, e dessa forma, evitar falsos positivos durante a seleção assistida por marcadores.

Os marcadores flanqueadores das regiões cromossômicas, onde se encontram dos QTLs de maior efeito: Satt208, Satt186, Satt688, Satt324, Satt 009, Satt675 e Satt125 podem ser efetivos para a seleção assistida por marcadores.

Ainda assim, os QTLs detectados precisam ser validados, e para isso devem ser testados em populações segregantes, em diferentes locais, a fim de confirmar suas efetividades.

4. CONCLUSÕES

O mapa de ligação construído cobriu 266,4 cM do genoma, em nove diferentes grupos de ligação.

Ao todo quatro QTLs, em três grupos de ligação (D2, G e N), relacionados à resistência da ferrugem asiática da soja foram mapeados, juntos estes explicam 63,03 % da variação para o caráter. Três QTLs se mostraram estáveis e de maior efeito sobre o caráter.

Os marcadores mais eficientes para seleção assistida são Satt208, Satt186, Satt688 e Satt324, pois selecionam dois QTLs estáveis e de maior efeito, capazes de explicar mais de 45 % da variação fenotípica do caráter.

5. REFERÊNCIAS

- ARAHANA, V. S. et al. Identification of QTLs for resistance of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Crop Science**, Madison, v.41, p.180-188, 2001.
- AUSTIN, D. F.; LEE, M. Detection of quantitative trait loci for grain yield and yield components in maize across generations in stress and nonstress environments. **Crop Science Society of America**, [S.l.], v.38, n.5, p.1296-1308, 1998.
- CARNEIRO, M. S.; VIEIRA, M. L. C. Mapas genéticos em plantas. **Bragantia**, Campinas, v.61, p.89-100, 2002.
- CREGAN, P. B. et al. An integrated genetic linkage map of the soybean genome. **Crop Science**, Madison, v.39, n.5, p.1464-1491, 1999.
- DON, R. et al. Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.19, n.14, p.4008, 1991.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rochester, v.12, p.13-15, 1990.
- DRAPER, N. R.; SMITH, R. **Applied regression analysis**. 3.ed. New York: Wiley, 1996. 706p.
- FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stage of soybean development**. Ames: Iowa State University, 1981. 12p.
- GUTIERREZ-GONZALES, J. et al. Genetic control of soybean seed isoflavone content: importance of statistical model and epistasis in complex traits. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.119, n.6, p.1069-1083, 2009.
- GUZMAN, P. S. et al. QTL associated with yield in three backcross-derived populations of soybean. **Crop Science**, Madison, v.47, p.111-122, 2007.
- KASSEM, M. A. et al. An updated 'Essex' by 'Forrest' linkage map and first composite map of QTL underlying six soybean traits. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.113, p.1015-1026, 2006.
- KOSAMBI, D. D. The estimation of map distance from recombination values. **Annuaire of Eugenetics**, [S.l.], v.12, p.172-175, 1944.
- LANDER, E. S. et al. MAPMAKER: an interactive computer program for constructing genetic linkage maps of experimental and natural populations. **Genomics**, San Diego, v.1, p.174-181, 1987.
- LEE, S. et al. Novel quantitative trait loci for partial resistance to *Phytophthora sojae* in soybean PI 398841. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.126, n.4, p.1121-1132, 2013.

LYNCH, M.; WALSH, B. **Genetics and analysis of quantitative traits**. Sunderland, Massachusetts, USA: Sinuauer Associates, Inc., 1998. 980p.

MARTINS, J. A. S. **Controle genético da resistência parcial, adaptabilidade e estabilidade frente à ferrugem asiática da soja**. 2011. 172f. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

NIKULIN, M. S. Chi-squared test for normality. In: INTERNATIONAL VILNIUS CONFERENCE ON PROBABILITY THEORY AND MATHEMATICAL STATISTICS, 1., 1973, [S.l.]. **Anais...** p.119-122, 1973.

SILVA, V. A. S.; JULIATTI, F. C.; SILVA, L. A. S. Interação entre resistência genética parcial e fungicidas no controle da ferrugem asiática da soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.9, p.1261-1268. 2007.

SONG, Q. J. et al. **A new integrated genetic linkage map of the soybean**. Nebraska: Agronomy & Horticulture - Faculty Publications, 2004. 9p.

TAKUNO, S.; TERAUCHI, R.; INNAN, H. The power of QTL mapping with RILs. **PLoS ONE**. [S.l.], v.7, n.10, e46545, 2012.

WANG, S.; BASTEN, C. J.; ZENG, Z. B. **Windows QTL cartographer 2.5**. North Carolina State: Department of Statistics, 2007.

ZHANG, W. K. et al. QTL mapping of ten agronomic traits on the soybean (*Glycine max* L. Merr.) genetic map and their association with EST markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.108, n.6, p.1131-1139, 2004.

6. CONCLUSÕES GERAIS

O cruzamento melhor ranqueado neste trabalho foi entre os genótipos entre IAC 100 e BRS Caiapônia, por apresentar maiores ganhos de seleção preditos, com alta acurácia de seleção e boa herdabilidade para a resistência a ferrugem asiática. E por isso este foi escolhido para o avanço de gerações, a fim de identificar marcadores polimórficos e mapear QTLs ligados a resistência a ferrugem asiática da soja.

Ao todo seis QTLs foram mapeados na geração F_4 , e quatro foram mapeados na geração F_7 . Sendo esses quatro os QTLs de maior efeito, coincidentes em ambas as populações de mapeamento. A geração F_7 foi mais eficiente para o mapeamento, pois apenas os QTLs estáveis e de maior efeito foram identificados.

Os marcadores mais eficientes para seleção assistida são Satt208, Satt186, Satt688 e Satt324, pois selecionam dois QTLs estáveis e de maior efeito, capazes de explicar mais de 45 % da variação fenotípica do caráter.

7. ANEXOS

FIGURA 1A: Escala diagramática para avaliar a severidade da ferrugem da soja (dados não publicados).

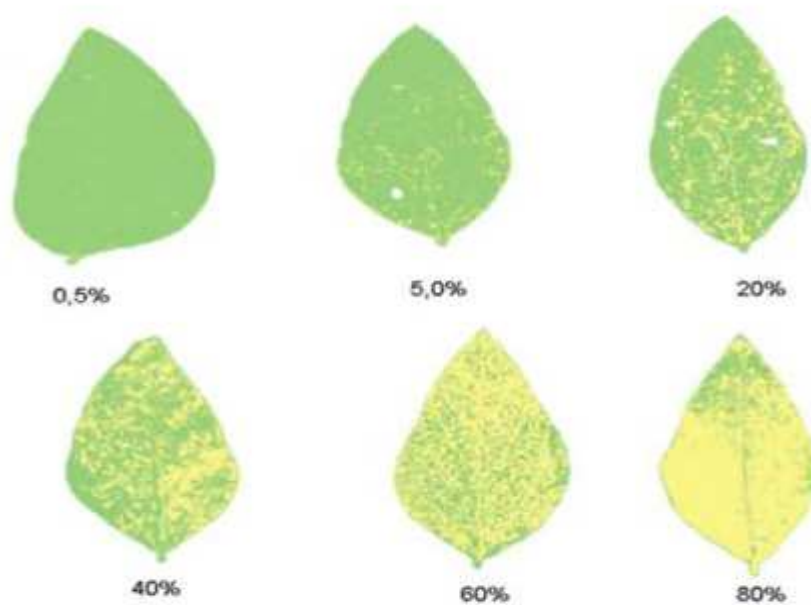


FIGURA 2A - Mapa de ligação parcial da soja baseado em informações genótípicas de 29 marcadores SSR de uma população de mapeamento F₇ originada do cruzamento entre os genótipos de soja IAC 100 e Caiapônia. Os loci marcadores são mostrados a direita de cada grupo de ligação (A2, C2, D1a, D2, E, G, J, L e N) e as distâncias genéticas são indicadas à esquerda.

Fonte: SANTOS, 2015.

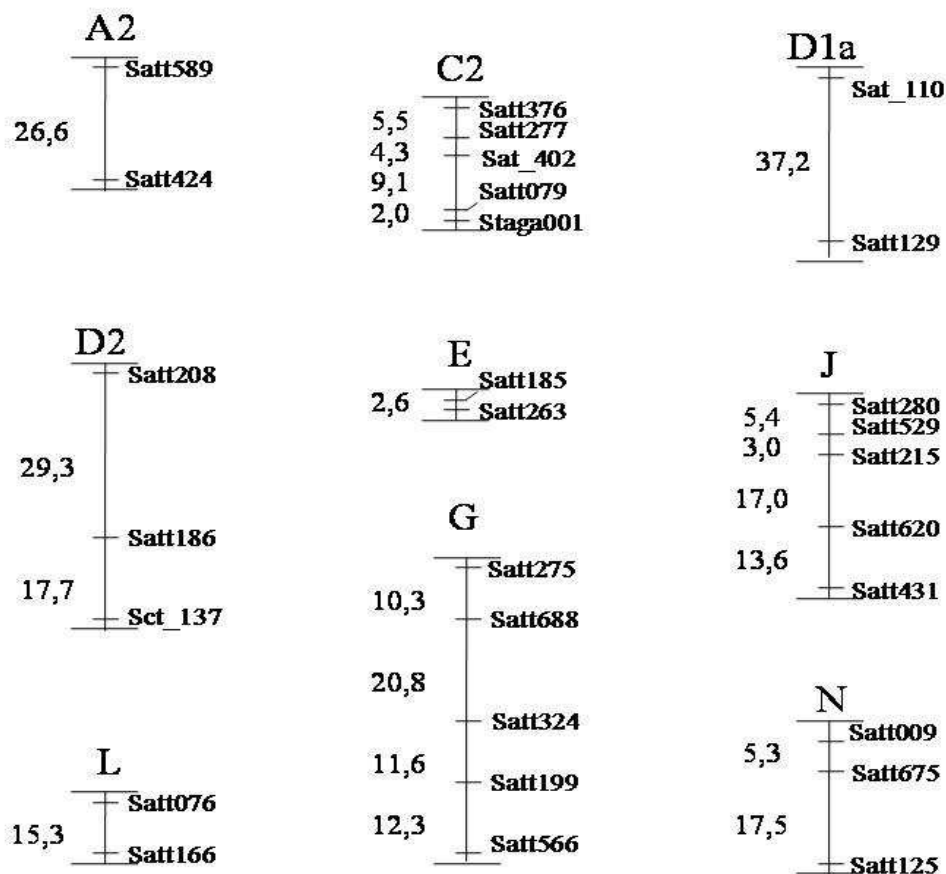


TABELA 1 A – Marcadores Microssatélites polimórficos para o cruzamento IAC 100 e Caiapônia utilizados para construção do mapa genético. Fonte: SANTOS, 2015.

SSR	GL	Posição cM	<i>Upper primer sequence (5'-->3')</i>	<i>Lower primer sequence (5'-->3')</i>
Satt589	A2	34.0	GCGCAGACAATTTTCAGTGGCAGATAGA	GCGAAAAAGTAATATAAGTAGAAAAAGG
Satt424	A2	60.6	CAACCTGTATTCCACAAAAAATCTCACC	GCGCCCCAATTTGACTATAAATAAAAAGT
Satt168	B2	55.2	CGCTTGCCCCAAAAATTAATAGTA	CCATTCTCCAACCTCAATCTTATAT
Satt338	C1	55.2	GCGCCCAAGTATTATGAGATATTTGAT	GCGATAATTTTAAAACTGGACCA
Satt376	C2	97.8	GCTACGCATTTGGTTTGTTA	ACATGCAATACTTTTTTTTCAT
Sat_402	C2	103.3	GCGACACGTTGCCTTCTTTACTCACAT	GCGAGCGGAGGATACGAACACTCTAT
Satt277	C2	107.6	GGTGGTGGCGGGTTACTATTACT	CCACGCTTCAGTTGATTCTTACA
Satt489	C2	113.4	GCGTGTGCTTGCTTCTCTTAGACTGACT	GCGTACTACTTACCCTGTTTGTCTAAAA
Satt079	C2	117.9	AGTCGAAGATACACAATTAGAT	CTTTTAGACACAAATTTATCACT
Staga001	C2	119.9	GCGGAGGGGAGTTTGCAGATTA	GCGGCAAGGGCAACTGAAAAAT
Sat_110	D1A	62.5	AACATTTTTCATCGCTTTTCTTAG	TCTTCTCAGGAAGTTGAATTACTCA
Satt129	D1A	109.7	TTCAGTACAAGTCGGGTGAATAATAATA	TCACATGTTTCGGGACTTAAGGTAT
Satt186	D2	10.5	GGGAAGTTATAAGCAGAT	GGGAATCCATTCCTGATGAGT
Satt208	D2	67.9	GCGATCGTATTGGGTCT	CCCGTTATTTTCGTATGA
Sct_137	D2	129.0	TGCTCTTGGAATCTG	CTCAATAATTCATCATCACTTC
Satt185	E	44.8	GCGCATATGAATAGGTAAGTTGCACTAA	GCGTTTTCTTACAATAATATTTTCAT
Satt263	E	45.4	CACCCAATCATGATAGCATTTTAT	CTCATGGAATTGTCTTTCAGTTTC
Satt275	G	2.2	GCGGGATAATTGGTTTTACGAAAATGC	GCGCCTAATCACCTAAAAAAACGTTTA
Satt688	G	12.5	ATGCCTCCAAAGAGAAAT	CTGCCCATTGACCCATCT
Satt324	G	33.3	GTTCCCAGGTCCCACCATCTATG	GCGTTTCTTTTATACCTTCAAG

continua...

TABELA 1 A – Cont.

Satt566	G	49.9	GCGGCTTTTTTCGTAATATAGGATGAT	GCCGTTAGGACATAAGAGGCATT
Satt199	G	62.2	GCGGTAAATGGTGAAAATCATTTATGGTT	GCGTTTTTCATACGGTGTTTTGCCTAT
Satt314	H	69.1	CCTGAGCAATTCATACTCC	TAACCGATCCGATCCTTGACA
Satt440	I	112.7	TGAGAACGTTTGAAAAGAGAT	GAAGAGATTAAGCATAAAGAATACTT
Satt280	J	38.7	GCGGAATCTGCTTATTCATTGTGTG	GCGCCATGCTGTAAACACGTCAAT
Satt529	J	41.9	GCGCATTAAGGCATAAAAAAGGATA	GCACAATGACAATCACATACA
Satt215	J	44.1	GCGCCTTCTTCTGCTAAATCA	CCCATTCAATTGAGATCCAAAATTAC
Satt620	J	53.7	GCGGGACCGATTAAATCAATGAAGTCA	GCGCATTTAATAAGGTTTACAAATTAGT
Satt431	J	78.6	GCGTGGCACCCCTTGATAAATAA	GCGCACGAAAGTTTTTCTGTAACA
Satt242	K	14.4	GCGTTGATCAGGTCGATTTTTATTTGT	GCGAGTGCCAACTAACTACTTTTATGA
Satt260	K	80.1	GCGCCAAATGTATACTTTAAATTCTT	GCGGGTTTAGCTAAAATAGTTCGTGC
Satt076	L	61.3	TAATCGAGATTTAATAGAAAACA	TGGATGGACATTTTCAG
Satt166	L	66.5	TTGCACAGTTGATTTTTGTTT	GCATCGAATTTCTGGATTTAC
Satt152	N	22.7	GCGCTATTCCTATCACAAACACA	TAGGGTTGTCACTGTTTTGTTCTTA
Satt009	N	28.5	CCAACCTGAAATTACTAGAGAAA	CTTACTAGCGTATTAACCCTT
Satt675	N	34.6	GCGCTATTTCCGTCCTATTATCATTTTCGTC	GCGTCTAACACGTATTTATTATTGGTCAATT
Satt125	N	40.6	CAAATAAAAACATATACCTCTTGT	TGCCTTACTCTACTCTGTTTC
Satt128	O	56.1	CCTTCTCCCTCTCATAC	CAAGTTTTATACCATTCATC

SSR, marcador microsatélite; GL, grupo de ligação da soja; P, posição do marcador no mapa genético consenso da soja em cM (SONG *et al.*, 2004) .