

**REAÇÃO DE CULTIVARES DE SOJA AOS VÍRUS DO
AMARELO DO BROTO (*Soybean yellow shoot virus* – SYSV) E DO
MOSAICO DA SOJA (*Soybean mosaic virus* – SMV) E SELEÇÃO DE
MARCADORES SSR PARA IDENTIFICAÇÃO DO ALELO DE
RESISTÊNCIA AO SYSV**

RITA DE CÁSSIA SANTOS

2004

RITA DE CÁSSIA SANTOS

**REAÇÃO DE CULTIVARES DE SOJA AOS VÍRUS DO
AMARELO DO BROTO (*Soybean yellow shoot virus* – SYSV) E DO
MOSAICO DA SOJA (*Soybean mosaic virus* – SMV) E SELEÇÃO
DE MARCADORES SSR PARA IDENTIFICAÇÃO DO ALELO
DE RESISTÊNCIA AO SYSV**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de “Doutor”.

Orientador

Profa. Dra. Antonia dos Reis Figueira

**LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2004**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Santos, Rita de Cássia

Reação de cultivares de soja aos vírus do amarelo do broto (*Soybean yellow shoot virus* – SYSV) e do mosaico da soja (*Soybean mosaic virus* – SMV) e seleção de marcadores SSR para identificação do alelo de resistência ao SYSV / Rita de Cássia Santos. -- Lavras : UFLA, 2004.

77 p. : il.

Orientadora: Antonia dos Reis Figueira.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia:

1. Soja. 2. Virus. 3. Inoculação. 4. Cruzamento. 5. Marcador molecular. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.3498

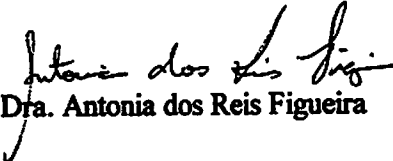
RITA DE CÁSSIA SANTOS

**REAÇÃO DE CULTIVARES DE SOJA AOS VÍRUS DO
AMARELO DO BROTO (*Soybean yellow shoot virus* – SYSV) E DO
MOSAICO DA SOJA (*Soybean mosaic virus* – SMV) E SELEÇÃO
DE MARCADORES SSR PARA IDENTIFICAÇÃO DO ALELO
DE RESISTÊNCIA AO SYSV**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração Fitopatologia, para a obtenção do título de “Doutor”.

Aprovada em 14 de julho de 2004

Dr. Álvaro Manoel Rodrigues de Almeida	Embrapa Soja
Prof. Dr. Eduardo Alves	UFLA
Prof. Dr. João Bosco dos Santos	UFLA
Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza	UFLA

 Prof. Dra. Antonia dos Reis Figueira	UFLA
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

Valeu a pena? Tudo vale a pena
Se a alma não é pequena.
Quem quer passar além do Bojador
Tem que passar além da dor.
Deus ao mar o perigo e o abismo deu,
Mas nele é que espelhou o céu.

Fernando Pessoa

Aos meus adorados sobrinhos, Estela, Gaetan e Felipe,
Às minhas queridas irmãs, Izabel e Francisca,
e à minha amada mãe Luzia,
que sempre torceram por mim,

OFEREÇO

Ao meu querido Manga, que tornou essa caminhada mais suave e
esteve presente em todos os momentos,

DEDICO

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

1 Resumo geral	i
2 Abstract	iii
3 Introdução	1
4 Referencial teórico	4
4.1 Origem e importância da soja no Brasil	4
4.2 Viroses que ocorrem na soja	5
4.3 Viroses da soja no Brasil	8
4.4 Vírus do amarelo do broto da soja	12
4.5 Métodos de controle para os vírus da soja	16
4.6 Uso de marcadores moleculares para resistência a vírus	19
5 Referências bibliográficas	24

CAPÍTULO 2 Reação de cultivares de soja aos vírus do amarelo do broto (*Soybean yellow shoot virus* – SYSV) e a três isolados do vírus do mosaico da soja (*Soybean mosaic virus* – SMV)

1 Resumo	35
2 Abstract	36
3 Introdução	37
4 Material e métodos	39
4.1 Origem e manutenção dos isolados	39
4.2 Obtenção das plantas e inoculação mecânica	39
4.3 Montagem do experimento	40
5 Resultados e discussão	42
5.1 Avaliação dos componentes da produção	42
6 Conclusões	54
7 Referências bibliográficas	55

Capítulo 3 Identificação de marcadores microssatélite ligados ao

----- " " " " "-----

RESUMO GERAL

SANTOS, Rita de Cássia. Reação de cultivares de soja aos vírus do amarelo do broto (*Soybean yellow shoot virus* – SYSV) e do mosaico da soja (*Soybean mosaic virus* – SMV) e seleção de marcadores SSR para identificação do alelo de resistência ao SYSV. 2004. 77 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG.¹

O vírus do amarelo do broto da soja (*Soybean yellow shoot virus* – SYSV) é um *Potyvirus* que foi encontrado em Lavras – MG, no início da década de 80, e desde então vem sendo estudado no DFP-UFLA, quanto às suas características biológicas e moleculares. Resultados de trabalhos anteriores mostraram a cultivar de soja Doko como resistente ao SYSV e suscetível ao SMV, enquanto a cv. Numbaíra se comportou de modo contrário. Neste trabalho, inicialmente sete cultivares de soja, importantes para o Brasil (Confiança, Conquista, DM 339, Liderança, Monsoy, Uirapuru e Vitória), foram mecanicamente inoculadas com o SYSV e com mais três isolados do vírus do mosaico comum da soja (*Soybean mosaic virus* – SMV) para determinar o efeito comparativo desses vírus na produção das plantas. A cultivar Numbaíra foi empregada como controle. Em seguida foi feito cruzamento entre as cvs. Doko e Numbaíra para a obtenção da população segregante, que foi empregada nos testes de identificação do alelo de resistência por meio de marcadores moleculares do tipo microssatélite. As plantas da população F₂ foram inoculadas com o SYSV e os sintomas induzidos foram avaliados empregando-se uma escala de notas variando de 1 (planta sem sintoma ou com mosaico leve) a 5 (necrose severa dos brotos e nanismo da planta). As cultivares de soja reagiram de modo diferente aos diferentes isolados testados. A cultivar Numbaíra, quando infectada com o SYSV, apresentou 100% de perda na produção e não foi afetada pelo SMV787, como já havia sido observado em experimentos anteriores. As demais cultivares testadas mostraram perdas entre 12,7 e 30,7%, com o SYSV. As perdas induzidas pelos isolados de SMVFT10 e SMV da Embrapa, na cv. Numbaíra, foram de 23,8 e 16,7%, respectivamente. As cultivares Monsoy e Vitória apresentaram as maiores perdas de produção (78,7 e 69,3%, respectivamente) quando infectadas com o SMV 787, e a cv. Conquista, infectada com o SMV, teve 52,4% de perda. O SYSV não provocou o aparecimento de manchas nas sementes das plantas infectadas, mas o SMV provocou manchas na maioria das cultivares inoculadas. Apenas as cultivares Numbaíra, infectada com o SMV787, e Uirapuru, infectada com esse isolado e com o SMV, não mostraram perdas nem sementes manchadas. Entretanto, a cv. Uirapuru apresentou alta incidência de sementes manchadas

¹Orientador: Antonia dos Reis Figueira

quando infectada com o SMVFT10. As cultivares Confiança e Liderança, mesmo se comportando como resistentes ao SMV Embrapa e ao SMV787, respectivamente, apresentaram mais de 85% das sementes manchadas. Na análise dos “bulks” resistentes e suscetíveis por PCR, com os “primers” tipo microssatélite, descobriu-se que o controle genético é monogênico com dominância incompleta, sendo o alelo de resistência denominado de *Sysv*. Esse alelo foi identificado por meio do primer *Satt* 418, que amplificou um fragmento de DNA (250 pb) com frequência de recombinação de 0,124. A distância entre o marcador e o alelo foi de 14,25 cM. Mesmo com essa distância o marcador foi considerado eficiente, pois foi capaz de identificar 98% das plantas resistentes de uma população F₂.

2 ABSTRACT

SANTOS, Rita de Cássia. Reaction of soybean cultivars at *Soybean yellow shoot virus* (SYSV) and Soybean mosaic virus (SMV) and selection of SSR markers for the identification of resistance allele at SYSV. 2004. 77p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG.²

The *Soybean yellow shoot virus* (SYSV) is a *Potyvirus*, which was found in Lavras-MG-Brazil, in the beginning of the 80's, and since then has had its biological and molecular characteristics studied in DFP-UFLA. Earlier results showed that Doko soybean cultivar was resistant to SYSV and susceptible to *Soybean mosaic virus* (SMV) and cv. Numbaíra was susceptible to SYSV and resistant to SMV. In this work seven important Brazilian soybean cultivars (Confiança, Conquista, DM 339, Liderança, Monsoy, Uirapuru and Vitória) were mechanically inoculated with SYSV and with three SMV isolates in order to compare the virus effect in the grain yield. The cv. Numbaíra was employed as susceptible control. After that cv. Doko was crossed with cv. Numbaíra in order to obtain the F₂ generation and use microsatellite markers for the identification of resistance allele. The soybean plants from F₂ generation were mechanically inoculated with SYSV and the induced symptoms were rated on a scale from 1 (symptomless plant or showing mild mosaic) to 5 (severe shoot necrosis and dwarfing). The soybean cultivars reacted in a different way to the virus isolates. The cv. Numbaíra showed 100% yield losses when infected with SYSV and did not show any losses when infected with SMV787. The others soybean cultivars showed losses between 12,7 and 30,7% when infected with SYSV. The yield losses induced by SMVFT10 e SMV Embrapa isolates in cv. Numbaíra were 23,8 and 16,7, respectively. The Monsoy and Vitória cultivars presented the higher yield losses (78,7 and 69,3% respectively), when infected with SMV787, and the cv. Conquista showed 52,4% with SMV Embrapa isolate. The SYSV did not induce seed spots in infected plants but SMV isolates induced spots in the majority of the soybean seeds. Only the Numbaíra infected with SMV787 and Uirapuru infected with this isolate and/or with SMV Embrapa, neither showed losses nor spotted seeds. However the cv. Uirapuru showed a high incidence of spotted seeds when infected with SMVFT10. The Confiança and Liderança cultivars were resistant to SMV Embrapa and SMV787, respectively, but showed 85% of spotted seeds. The *Satt* 418 primer allowed obtaining a polymorphic band, which was able to identify the resistant allele, here named *Sysv*. The phenotypic proportions in F₂ were 1:2:1, making monogenic inheritance. The recombination frequency between the marker and allele was 0,124 (LOD 18,22) and the distance was 14,25 cM. Even with this

² Adviser: Antonia dos Reis Figueira

great distance the *Satt* 418 was considered a good marker because it was able to identify 98% of the resistant plants of the F_2 population.

3 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* L. Merrill) ocupa hoje um papel de destaque na agricultura nacional, sendo a cultura mais importante no agronegócio brasileiro. Desde sua introdução no país, é visível o seu crescimento a cada nova safra, e o Brasil já é o segundo maior produtor e assumiu a liderança das exportações com uma safra de 52 milhões de toneladas em 2003/2004, em uma área plantada de 18,5 milhões de hectares (Embrapa, 2003).

Embora apresente altos rendimentos, a produção de soja pode ser limitada por diversos fatores bióticos e abióticos, dentre os quais se destacam as doenças. Aproximadamente 40 doenças, causadas por fungos, bactérias, nematóides e vírus, já foram identificadas no Brasil. Com a expansão da soja para novas áreas, na forma de monocultura, esse número continua aumentando, sendo que a importância de cada doença varia de região para região e depende também das condições climáticas de cada safra. As perdas anuais causadas pelas doenças estão em torno de 15 a 20%, porém algumas doenças podem causar perdas de até 100%.

Entre os vírus que infectam soja, o principal é o *Soybean mosaic virus* (SMV), que tem a sua ocorrência relatada em todo o mundo. Atualmente, no Brasil, este vírus não tem causado perdas na produção, o que, basicamente, se deve ao uso de cultivares resistentes, obtidas em programas de melhoramento intensivo. Porém, nos Estados Unidos e Ásia, o SMV vem causando sérios prejuízos devido à ocorrência do afídeo *Aphis glycines*, que tem transmitido o SMV de fontes primárias, que são as plantas oriundas de sementes contaminadas (Hill et al, 2001). Porém, recentemente foi registrada a ocorrência de plantas de soja com sintomas típicos de infecção viral, apresentando necrose da haste e do pecíolo, nanismo e deformação do limbo foliar, provocando perdas significativas nas lavouras onde esse vírus foi encontrado. O agente causal dessa doença foi

identificado como um vírus pertencente ao gênero *Carlavirus* (Almeida, 2002), mostrando que o aparecimento de doenças viróticas é um processo dinâmico, não devendo, portanto, serem estas negligenciadas.

O Vírus do amarelo do broto da soja (*Soybean yellow shoot virus* – SYSV) pertence ao gênero *Potyvirus* e causa sintomas distintos em soja quando comparado com outros isolados do SMV e com outros vírus já descritos para essa planta. O SYSV foi encontrado infectando naturalmente plantas de soja em Lavras – MG, tendo demonstrado um grande potencial para causar perdas na produção quando inoculado em diferentes cultivares de soja (Deslandes et al., 1984; Santos, 2000). A presença do SYSV em campos produtores de soja no Brasil ainda não foi relatada; porém, devido à sua alta virulência e agressividade, tem merecido atenção especial, de modo que algumas das suas propriedades biológicas e moleculares têm sido investigadas.

Uma das principais investigações, que têm sido feitas no Departamento de Fitopatologia da UFLA, visa encontrar fontes de resistência a esse vírus nas cultivares de soja existentes no país. Santos (2000) inoculou mecanicamente o SYSV em oito cultivares de soja, para determinar a sua reação a esse vírus. Foram então selecionadas duas cultivares: a Numbaíra, altamente suscetível, apresentando 100% de perdas quando inoculada mecanicamente com o SYSV, 15 dias após a germinação da planta; e Doko, resistente, apresentando perdas inferiores a 10%, mesmo quando inoculada na mesma fase do ciclo de vida. Essas duas cultivares foram consideradas ideais para serem utilizadas em testes para determinação do controle genético e obtenção de marcadores moleculares de resistência ao SYSV em soja.

Neste trabalho, foram feitos experimentos com o objetivo de determinar o efeito do SYSV em cultivares de soja de importância econômica para o Brasil, em comparação ao SMV e cruzamentos entre as cultivares de soja Numbaíra e

Doko, para conhecer o controle genético e identificar marcadores moleculares do tipo microssatélite, para o alelo de resistência ao SYSV.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 Origem e importância da soja no Brasil

A soja (*G. max*), originária do nordeste da China, é cultivada em todo o mundo. Foi levada do continente asiático para a Europa e de lá para os Estados Unidos. No Brasil a soja foi introduzida na Bahia, em 1882, vinda dos Estados Unidos, e os primeiros estudos de avaliação de cultivares foram realizados por Gustavo Dutra. Em 1891, testes semelhantes foram conduzidos no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) e nesta época os estudos eram voltados para a produção de soja forrageira. Em 1900 e 1901, o IAC realizou a primeira distribuição de sementes de soja para produtores paulistas, mas existem registros do primeiro cultivo de soja no Rio Grande do Sul, nesta mesma época (Câmara, 1998).

A cultura da soja encontrou condições ideais para se desenvolver e se expandir na região sul, devido à semelhança climática com o sul dos Estados Unidos, de onde vieram os primeiros materiais genéticos existentes no Brasil. Em meados dos anos 50, a cultura da soja foi incentivada como a melhor alternativa de verão para suceder o trigo cultivado no inverno. A partir da década de 1960, a soja se estabeleceu como cultura economicamente importante para o Brasil, sendo que 98% do volume eram produzidos na Região Sul, em plantios de verão. Na década de 1970 a soja se consolidou como a principal cultura do agronegócio brasileiro, passando de 1,5 milhão de toneladas para 15 milhões de toneladas em nove anos. Esse crescimento deveu-se ao aumento da área cultivada e também ao aumento da produtividade, que foi de 1,14 para 1,73 t/ha (Embrapa, 2003).

Nas décadas de 1980 e 1990 houve um crescimento explosivo na região Centro Oeste do Brasil, onde a produção da soja passou de 2% (1970) para 40%

da produção nacional (1990). Em 2003 esta produção representou cerca de 60% da produção nacional, com tendência de aumentar a cada nova safra, promovendo o estado do Mato Grosso de produtor marginal a líder nacional de produção. Hoje a produtividade média está em torno de 2764kg/ha e em 2003/2004 a soja respondeu por uma receita cambial direta, para o Brasil, de mais de sete bilhões de dólares anuais, superior a 11% do total das receitas cambiais brasileiras (Agrianual, 2004; Embrapa, 2003).

4.2 Viroses que ocorrem na soja

A soja é suscetível a mais de 100 vírus ou estirpes de vírus, sendo que alguns ocorrem naturalmente no campo e outros só foram observados em condições experimentais. Apesar da suscetibilidade da soja a esse grande número de espécies ou estirpes de vírus, aos quais a soja é suscetível, poucos causam perdas econômicas para a cultura. Isso é devido, sobretudo, a trabalhos de melhoramento visando a obtenção de cultivares resistentes, principalmente aos vírus mais importantes (Sinclair e Backman, 1989).

Entre os vírus mais importantes para a cultura da soja destaca-se o *Soybean mosaic virus* (SMV). O SMV pertence ao gênero *Potyvirus* e causa uma das principais doenças viróticas da soja, capaz de reduzir a produção de 8 a 35%, ocorrendo em todas as áreas de produção de soja do mundo. O SMV causa redução do porte das plantas, afeta o tamanho e formato dos folíolos, causa enrugamento e formação de bolhas no limbo foliar. Tem também efeito direto na redução do número e tamanho das vagens e das sementes, bem como no prolongamento do ciclo vegetativo, com o sintoma característico conhecido como haste verde (Domier et al., 2003; Embrapa, 2003).

Entre os sintomas causados pelo SMV em soja destaca-se a mancha - café nas sementes, que se apresenta como um derramamento do hilo, afetando a

sua qualidade. Normalmente, sementes oriundas de plantas infectadas transmitem o vírus, constituindo a fonte de infecção primária no campo. Muitos fatores afetam a magnitude das perdas causadas pelo SMV, incluindo a estirpe do vírus, a cultivar de soja, o estágio de desenvolvimento da planta e a incidência de infecção. Se a infecção ocorre antes do florescimento há substancial redução da produção; entretanto, infecções ocorridas após o florescimento não induzem reduções drásticas e a transmissão pelas sementes também é menor (Wilcox e Laviollete, 1969; Ren et al., 1997a; Ren et al., 1997b).

Sete estirpes de SMV (G1 a G7) foram inicialmente detectadas e classificadas com base na virulência e resistência de cultivares de soja. As cultivares separadoras utilizadas foram Clark e Rampage, consideradas suscetíveis ao SMV, e Buffalo, Davis, Kwanggyo, Marshall, Ogden e York, consideradas resistentes. A estirpe G1 não infecta nenhuma das cultivares resistentes, a estirpe G2 causa necrose local e sistêmica em Marshall e não infecta as outras cultivares resistentes. As estirpes G3 e G4 causam necrose local e sistêmica em Marshall e Ogden e a G4 infecta também as cultivares Davis e York. A estirpe G5 causa necrose em Kwanggyo, enquanto a G6 induz esse sintoma em Kwanggyo e Marshall. A estirpe G7 infecta todas as cultivares testadas, causando necrose em Kwanggyo, Marshall, Ogden e Buffalo (Tabela 1). Com base nesses resultados de inoculações, em que foram testados 98 isolados do SMV, Cho e Goodman (1979) desenvolveram um método para diferenciação e classificação de isolados do SMV. Posteriormente, quatro outras estirpes do SMV foram encontradas, tendo sido denominadas de G8 a G11. Essas novas estirpes foram classificadas com base na diversidade de patogenicidade de isolados presentes na China (Domier et al., 2003).

A transmissão do SMV por sementes manchadas e não manchadas foi estudada em onze cultivares e linhagens mais plantadas nos Estados Unidos. As

Tabela 1. Reações de cultivares de soja a sete estirpes do *Soybean mosaic virus* (SMV) (Cho e Goodman, 1979)

Cultivares	Sintomas causados pelas estirpes do SMV						
	SMV G1	SMV G2	SMV G3	SMV G4	SMV G5	SMV G6	SMV G7
Clark	-/M	-/M	-/M	-/M	-/M	-/M	-/M
Rampage	-/M	-/M	-/M	-/M	-/M	-/M	-/M
Davis	-/-	-/-	-/-	-,N/M,N	-/M	-/M	-/M
York	-/-	-/-	-/-	-,N/M,N	-/M	-/M	-/M
Marshall	-/-	N/N	N/N	N/N	-/-	N/N	N/N
Ogden	-/-	-/-	N/N	N/N	-/-	-/-	N/N
Kwanggyo	-/-	-/-	-/-	-/-	N/N	N/N	N/N
Buffalo	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	N/N

Símbolos: - (sem sintomas); M (mosaico); N (necrose).

Reação nas folhas inoculadas/reação nas folhas não inoculadas

sementes foram obtidas por infecção natural no campo e os resultados indicaram que a presença do SMV em plântulas de soja não diferiu quando estas foram obtidas a partir de sementes manchadas ou não. Ambos os tratamentos deram origem a plântulas infectadas pelo SMV quando observados na mesma linhagem ou cultivar. Porém, a presença do SMV em plântulas de diferentes cultivares e linhagens foi significativamente diferente, tendo a porcentagem de transmissão variado de 25,7 a 91,7%. Esses estudos revelam que as sementes manchadas não podem ser consideradas como um indicador da taxa de transmissão do SMV em soja e que a severidade da doença no campo depende da cultivar utilizada (Pacumbaba, 1995).

A transmissão por sementes foi também investigada para as sete estirpes do SMV. Nesse estudo, não foi encontrada diferença significativa entre a estirpe do vírus e o peso e emergência da plântula proveniente de semente infectada. Ao contrário das demais, as sementes provenientes de plantas infectadas com a

estirpe G5 deram origem a plântulas com uma baixa incidência do SMV, indicando que a estirpe G5 tem uma baixa capacidade para infectar tecidos da semente de soja. De modo geral, as análises estatísticas revelaram uma interação entre a linhagem de soja e a estirpe do SMV para a incidência de sementes manchadas (Bowers e Goodman, 1991; Pacumbaba, 1995).

Perdas causadas por vírus em campos de soja nos principais países produtores do mundo foram estimadas por Wrather et al. (1994). Foram coletados dados das principais doenças que ocorriam na Argentina, Brasil, Bolívia, Paraguai, Estados Unidos, Canadá, China, Índia, Indonésia e Itália. Nessa ocasião não foi relatada a ocorrência da ferrugem, sendo que as principais doenças foram o cancro da haste (*Diaporthe phaseolorum*) e a causada pelo nematóide do cisto (*Heterodera glycines*). As doenças causadas por vírus nos dez países estudados causaram uma redução de 721.400 toneladas e, entre os vírus detectados, o SMV teve a maior ocorrência, principalmente na China, Índia, Argentina e Estados Unidos.

Outros vírus de menor importância e incidência já foram detectados em campos de soja, como *Tobacco ringspot virus* (TRSV), *Bean pod mottle virus* (BPMV), *Soybean chlorotic mottle virus* (SbCMV), *Soybean indonesian dwarf virus* (ISDV), *Soybean mild mosaic virus* (SbMMV), *Soybean crinkle leaf virus* (SCLV), *Soybean dwarf virus* (SbDV), *Soybean spherical virus* e *Soybean yellow vein virus*, entre outros (Brunt, et al., 1996; Sinclair e Backman, 1989).

4.3 Víroses da soja no Brasil

O SMV foi identificado pela primeira vez no país em 1955, no estado de São Paulo. Na década de 80, com a grande expansão da soja para a região Centro Oeste, o SMV foi identificado em praticamente todos os campos produtores de soja, causando alta incidência de sementes manchadas, sobretudo

na cultivar Santa Rosa, resultando em prejuízos significativos para os produtores de sementes. Em estudos conduzidos sob condições de campo, observou-se redução de até 70% na produção dependendo da cultivar utilizada (Embrapa, 2003).

Lima Neto (1980), na época da expansão da soja para o Centro Oeste, fez uma triagem de variedades, linhagens e introduções de soja para resistência ao SMV. Foram testados 94 genótipos de soja, através de inoculação mecânica e pelo vetor, o afideo *Myzus persicae*. Foram testados oito isolados do SMV, sendo que, das 94 variedades testadas, 26 foram resistentes aos oito isolados, reagindo com lesões locais nas folhas inoculadas. As demais cultivares foram invadidas sistemicamente, mostrando variação da sintomatologia. Os isolados mais severos induziram redução no porte da planta e no tamanho do folíolo, bem como sintomas foliares de mosaico, bolhosidade e estreitamento do limbo foliar. Todas as sementes originadas das plantas suscetíveis apresentaram-se manchadas, sendo que o tamanho da área manchada e o número de sementes com manchas foram maiores quando essas foram produzidas por plantas inoculadas com os isolados mais severos.

Diversos estudos foram realizados para elucidar o potencial de perdas do SMV, detectado em campos de soja no Brasil, bem como sua transmissão por vetores. Observou-se que afideos pertencentes ao gênero *Dactynotus*, normalmente encontrados em plantas de picão (*Bidens pilosa*), são menos eficientes na transmissão do SMV quando comparados com *M. persicae*. Com relação à influência da idade da planta e do número de vetores na transmissão do SMV, constatou-se que a suscetibilidade das variedades Santa Rosa e Hardee, muito utilizadas na época, diminuía com o aumento da idade da planta. Nesse estudo foi utilizado também o afideo *M. persicae* para inoculação (Almeida, 1979; Lima Neto e Costa, 1979).

A transmissão por sementes foi também estudada para isolados do SMV no estado do Paraná, utilizando-se diversas cultivares. As sementes foram coletadas imediatamente após a colheita, de campos comerciais, tendo sido observada a presença de sementes manchadas em praticamente todas as regiões produtoras do estado. Diferenças encontradas na incidência e área das manchas, em sementes de um mesmo local, indicaram que as cultivares se comportaram de modo distinto quanto a este aspecto. Costa et al. (1970) relataram a transmissão por sementes de até 45%. Em estudos posteriores, essa transmissão variou de 1,3 a 7,8%, sugerindo uma possível associação com as novas cultivares utilizadas, ou uma alteração da estirpe do vírus. Estudos também mostraram que uma maior quantidade de sementes manchadas foi encontrada quando se utilizaram grandes porcentagens de sementes manchadas no plantio (Costa e Lima Neto, 1974; Porto e Hegedorn, 1975; Costa, 1977; Almeida e Miranda, 1979; Almeida, 1981).

A relação entre suscetibilidade e idade da planta mostrou que plantas inoculadas aos 20 dias após a germinação apresentaram redução no rendimento de 77 a 61,4% nas cultivares Santa Rosa e Bossier, respectivamente. Inoculações mais tardias, aos 40 dias, apresentaram essas reduções nos valores de 22 e 11% e não houve diferença em relação à testemunha quando as plantas foram inoculadas aos 70 dias após a germinação. Pelo fato de os danos maiores terem sido observados em plantas inoculadas aos 20 dias de idade, inferiu-se que a taxa de multiplicação do vírus, em plantas mais velhas, provavelmente tenha sido menor, resultando numa ação também reduzida sobre o hospedeiro (Almeida e Silveira, 1983).

Estudos realizados por Anjos et al. (1985), com um isolado do SMV detectado em campos de soja no Brasil, concluíram que ele não pertencia a nenhum dos grupos descritos por Cho e Goodman (1979). Neste estudo não houve correspondência das reações de cultivares diferenciais inoculadas



mecanicamente com o SMV, mas os autores concluíram ser este um isolado do SMV por ter sido transmitido pelo afídeo *Myzus persicae*, de maneira não circulativa, pela coincidência de sintomas em um grande número de hospedeiras já relatadas como suscetíveis ao SMV, pela formação de inclusões lamelares do tipo catavento e, sobretudo, pela reação positiva com antissoro de dois isolados americanos do SMV.

Um novo isolado do SMV foi encontrado infectando naturalmente plantas de *Senna occidentalis* por Almeida et al. (2002). As plantas, que apresentavam sintoma de mosaico e formação de bolhas no limbo foliar, foram coletadas e analisadas por microscopia eletrônica, além de serem medidas a gama de hospedeiras e a sorologia. Fez-se também análise molecular, com amplificação de um fragmento de 1,9 kb correspondente às regiões 3'NTR, CP e N1b. Esse fragmento amplificado, após seqüenciamento, apresentou homologia de nucleotídeos variando de 91 a 99% em relação a outros isolados do SMV. Essas análises demonstraram que este vírus é similar ao vírus do mosaico comum da soja e que pertence ao grupo G5. O vírus foi denominado de SMV-Soc, sendo este o primeiro relato da ocorrência natural do SMV em plantas de *S. occidentalis*, indicando seu potencial como hospedeira natural deste vírus no Brasil.

Outras viroses foram detectadas no Brasil, como a queima do broto da soja, causada pelo *Tobacco streak virus* (TSV); o mosaico cálico da soja, causado pelo *Alfafa mosaic virus* (AMV); mosaico rugoso da soja, causado pelo *Bean rugose mosaic virus* (BRMV); o mosqueado do feijão, causado por *Bean pod mottle virus* (BPMV); o mosaico amarelo, causado por estirpes do *Bean common mosaic virus* (BCMV); e o mosaico crespo, causado por *Abutilon mosaic virus* (AbMV) (Almeida et al., 1997).

A soja pode ser infectada também por três *Geminivirus*: *Bean golden mosaic virus* (BGMV), *Euphorbia mosaic virus* (EMV) e *Serrano golden*

mosaic virus (SGMV). Mello et al. (2002) analisaram amostras obtidas em Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais e Paraná. Foram utilizados primers degenerados para *Geminivirus* e o material amplificado foi seqüenciado direto do produto da PCR. Os autores concluíram que provavelmente existe um novo *Geminivirus* infectando soja no Brasil.

Recentemente, plantas de soja em um campo para multiplicação de sementes, em Barreiras – BA, apresentaram sintomas de necrose da haste, necrose do pecíolo e curvatura do broto e algumas plantas apresentavam nanismo e deformação do limbo foliar com presença de bolhas. Fotos de cortes ultrafinos observados ao microscópio eletrônico de transmissão mostraram a presença de partículas características de infecção por *Carlavirus*. A partir daí fez-se a análise molecular por RT-PCR com primers específicos para *Carlavirus* e a análise da seqüência apresentou 88,4% de similaridade com o *Cowpea mild mosaic virus* (CMMV). Este vírus não foi transmitido por pulgões, e sim por mosca branca, quando os sintomas apareceram de 8 a 10 dias após a inoculação. A transmissão pelas sementes foi negativa quando se utilizou a cultivar Mirador. A vulnerabilidade dos campos de soja no Brasil a este vírus é alta porque muitas das cultivares plantadas mostraram-se suscetíveis à sua transmissão também pela mosca branca, um inseto de ocorrência generalizada nas lavouras de soja (Almeida et al., 2002).

4.4 Vírus do amarelo do broto da soja (*Soybean yellow shoot virus* – SYSV)

O *Soybean yellow shoot virus* foi identificado em 1984 por Deslandes et al. (1984) em Lavras – MG, sendo identificado como um *Potyvirus* que induzia, em diferentes cultivares de soja, sintomas bastante distintos dos causados pelo SMV, como, por exemplo, o amarelecimento atípico da parte apical da planta, motivo pelo qual foi inicialmente denominado de Vírus do amarelo do broto da

soja (VABS). De um modo geral, esses sintomas variam de acordo com a cultivar infectada e costumam ser mais drásticos do que os causados pelo SMV nas cultivares suscetíveis. Na cultivar Santa Rosa inicialmente aparece mosaico, clareamento das nervuras e bolhosidade, sintomas facilmente reconhecidos pelo amarelecimento generalizado e encrespamento dos brotos novos. Pode ou não ocorrer necrose, mas geralmente há paralização no crescimento dos ponteiros. Posteriormente a planta torna-se enfezada, com encurtamento dos entrenós e superbrotamento. As folhas mais novas ficam enrugadas, encarquilhadas, com tamanho bastante reduzido, e a produção é praticamente nula (Figura 1).



Figura 1. Planta de soja cultivar Santa Rosa infectada com o *Soybean yellow shoot virus*.

Inicialmente, acreditava-se ser o SYSV uma estirpe do BCMV ou do SMV. Porém, estudos conduzidos através de inoculação mecânica apresentaram sintomas bastante distintos dos causados pelo BCMV em feijão (*Phaseolus vulgaris*) e pelo SMV em soja. Estudos também mostraram que o SYSV apresentou relacionamento sorológico com duas estirpes de um *Potyvirus* da canavalia e do maracujá (*Passiflora* sp) e não com o BCMV e SMV.

Em testes iniciais de transmissão por vetor não se conseguiu sucesso com os afídeos *M. persicae*, *Aphys gossypii* e com a mosca branca *Bemisia tabaci*, com períodos de aquisição e transmissão variáveis. Porém, Santos (2000) obteve sucesso na transmissão com os afídeos citados em uma porcentagem que variou de 70 e 40% para *M. persicae* e *A. gossypii*, respectivamente. Não se verificou a transmissão por sementes, as quais também não apresentaram manchas.

O SYSV é caracterizado como o único *Potyvirus* capaz de causar lesões locais em folhas de mamoeiros Solo e Baiano. Além disso, há plantas indicadoras diferentes do SMV, como *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *Alternanthera tenella* e *Nicotina benthamiana*. Apesar de o SMV causar lesões locais em *C. quinoa*, Lima Neto (1981) testou 246 espécies de diferentes famílias de plantas e não conseguiu um isolado que apresentasse lesões locais nesta planta. Já algumas variedades de feijoeiro foram bastante eficientes neste aspecto. Almeida et al. (2002), estudando o isolado SMV-Soc, encontraram plantas indicadoras diferentes dos demais, como *C. amaranticolor*, *Helianthus annuus* e *N. benthamiana*. Esses dados indicam que o SYSV é realmente diferente do SMV, sobretudo em relação às propriedades biológicas. por apresentar plantas diferenciadoras distintas (Veja et. al., 1985; Santos, 2000).

Para verificar o potencial de perdas na produção causadas pelo SYSV, fez-se uma triagem de cultivares de soja. Verificou-se que as cultivares reagiram de forma diferenciada quando inoculadas com um isolado do SMV (isolado 787,

UFLA) e com o SYSV. Dentre essas cultivares destacaram-se Doko e Numbaíra, que apresentaram sintomas distintos quando inoculadas com os dois vírus. A cultivar Doko foi suscetível ao SMV787 e resistente ao SYSV, enquanto a cultivar Numbaíra reagiu de forma contrária, ou seja, foi resistente ao SMV787 e altamente suscetível ao SYSV. A cultivar Numbaíra teve uma redução de 100% na produção quando inoculada com o SYSV. Esses dados foram bastante interessantes, pois sugerem que a resistência a esses dois *Potyvirus* é controlada por genes distintos e que a cultivar Doko pode ser usada em programas de melhoramento para se chegar a um marcador para resistência ao SYSV (Figueira et al., 1986; Santos, 2000).

Realizou-se o seqüenciamento de parte do genoma do SYSV, correspondente a um fragmento com 463 nucleotídeos da região da Proteína Nib, traduzidos em 154 aminoácidos. A análise da seqüência obtida mostrou maior identidade do SYSV com isolados do SMV, sendo de 98% com um isolado severo chinês Huangzhou (AJ312439), Aa15-M2 (AB100443), Aa (AB100442) e SMV N (D00507); 97% com as estirpes G7 (AF241739), G7H (AY294045), G5 (AY294044) do SMV e com o isolado chinês Huanghuai (AJ310200); a menor identidade com o SMV foi com a estirpe G2 (S42280) (96%). Nota-se, portanto, que provavelmente a diferença entre o SMV e o SYSV deve estar localizada em outra região genômica que não a Nib (Santos, 2000).

Sabe-se que a região da proteína Nib é a mais conservada dentro do gênero *Potyvirus* possivelmente devido à sua função, que envolve o reconhecimento de seqüências regulatórias do RNA viral e a interação com fatores do hospedeiro (Shukla et al., 1994; Zerbini e Maciel-Zambolim, 1999). No entanto, estudando a diversidade de seqüências das proteínas P1, HC, P3, Nib e CP de vários *Potyvirus* isolados do inhame, Aleman-Verdaguer et al. (1997) observaram que as seqüências da proteína Nib puderam dividir esses

isolados em dois grupos e esse mesmo padrão foi observado para as proteínas P1, HC e P3.

As maiores diferenças entre isolados de *Potyvirus* têm sido observadas na seqüência de nucleotídeos da capa protéica. A proteína capsial é a parte do genoma dos *Potyvirus* que melhor avalia o seu relacionamento com outros já descritos (Shukla et al., 1994; Fang et al., 1995). Portanto, esta alta homologia observada para o SYSV com isolados do SMV na Proteína N1b não é indicativo de que esses pertençam a uma mesma espécie. Shukla & Ward (1988) observaram que a seqüência de aminoácidos da capa protéica pode discriminar, de modo bastante eficiente, os diferentes *Potyvirus*, bem como as suas estirpes, de modo que esses dados poderiam, então, servir como base para identificação e classificação do SYSV dentro do gênero *Potyvirus*.

4.5 Métodos de controle para os vírus da soja

O controle de viroses de um modo geral deve ser de caráter preventivo, pois, devido ao tipo de associação vírus-planta, não existem, até o momento, métodos que possibilitem a recuperação da planta infectada. Deve-se, portanto, procurar impedir ou retardar o máximo possível a entrada do vírus na lavoura e fazer o controle de insetos vetores para impedir a disseminação do vírus. Sendo o SMV um vírus transmissível pelas sementes, o uso de sementes sadias pode efetivamente controlar o SMV em áreas onde faltam outras formas de sobrevivência deste vírus de uma safra para outra. Com este procedimento existe a possibilidade de redução do inóculo primário em dez vezes ou mais (Bowers e Goodman, 1991).

Entretanto, o uso de cultivares resistentes é o mais comum e eficiente método de controle para as fitoviroses. Levantamento realizado em 1994, utilizando 185 cultivares de soja disponíveis no Brasil, mostrou que 64% desse

material possuía resistência ao SMV. Locus independentes, denominados de *Rsv₁*, *Rsv₂* e *Rsv₃*, têm sido descritos para resistência ao SMV, sendo que o *Rsv₁* foi o mais freqüentemente encontrado e melhor estudado. Vários alelos foram identificados nesse loco e denominados de *Rsv*, *Rsv₁^t*, *Rsv₁^y*, *Rsv₁^m*, *Rsv₁^k*, *Rsv₁^s* e *rsv* nos materiais Epps, Ogden, York, Marshal, Kwangyo, PI 486355 e Hill, respectivamente. O loco *Rsv₂* está presente na cultivar Raiden e confere resistência a todas as estirpes do SMV; e o loco *Rsv₃*, encontrado em Columbia, expressa reação necrótica (Kiihl e Hartwig, 1979; Buzzell e Tu, 1989; Chen et al., 1991).

A ocorrência de novas estirpes do SMV requer um constante monitoramento da variabilidade genética pelos melhoristas e fitopatologistas. Um novo isolado da estirpe G5, identificado no Brasil em 1995, quebrou a resistência da cultivar FT10, e genótipos resistentes a esse novo isolado foram identificados por Silva et al. (2004). Foi montado um ensaio com as cultivares Epps (*Rsv₁*), Ogden (*Rsv₁^t*), Hill (suscetível às estirpes G1 e G5) e FT10 (resistente à estirpe G1 e suscetível à G5). As plantas F₂ obtidas de cada cruzamento foram inoculadas e classificadas em três categorias, de acordo com a reação apresentada ao vírus, ou seja, sem sintomas (R), mosaico típico (S) e necrose sistêmica (N). Plantas resultantes do cruzamento entre Epps/Hill e Ogden/Hill, quando inoculados com ambas as estirpes, apresentaram segregação de 3 resistentes para uma suscetível (3:1), indicando que a resistência em cada uma era controlada por um alelo dominante. Cruzamento entre Epps/Ogden produziu somente plantas resistentes, a ambas as estirpes, sendo que esta falta de segregação indicou que os alelos de resistência, nessas duas cultivares, estão em um mesmo loco. As famílias do cruzamento de FT10/Hill apresentaram segregação, sugerindo que um simples gene controla a resistência à estirpe G1, mas todas as plantas foram suscetíveis à estirpe G5. Isso indica que o alelo confere resistência à estirpe G1, e não à G5. Todas as plantas F₂ de FT-

10/Ogden e FT-10/Epps foram resistentes à G1, indicando que o gene de resistência nessas cultivares são alélicos. Já a inoculação com a estirpe G5 resultou em 3R:1S, indicando que o alelo em FT10 difere dos alelos presentes em Ogden e Epps. Com este trabalho constatou-se que FT10 possui um gene simples no loco *Rsv₁*, para resistência ao SMV, diferente do encontrado em Epps, Ogden e Hill. O nome sugerido para este novo alelo foi *Rsv₁^d*, provavelmente por ser derivado da cultivar Davis, amplamente usada em programas de melhoramento no Brasil.

Muitos dos resultados da resistência genética ao SMV em soja têm encontrado alelos dominantes no loco *Rsv₁*. Estudos adicionais podem tornar possível a expansão da gama de cultivares resistentes a estirpes do SMV. No estudo realizado para encontrar a herança da resistência ao SMV, em quatro cultivares de soja da China, previamente identificadas como resistentes ao SMV, observou-se que o cruzamento das quatro cultivares com Williams apresentou uma segregação de 3R:1S nas plantas F₂ e 1:2:1 nas famílias F₃. Os resultados deste trabalho mostraram que, das cultivares Da bai ma, Ke feng No. 1, Feng shou huang e Xu dou No. 1, três possuem um gene simples dominante, que confere resistência à estirpe G1 do SMV e que não está no loco *Rsv¹* (Wang et al., 1998; Gunduz et al., 2002).

Resultado semelhante foi obtido no cruzamento das cultivares Tousan e Hourei com a suscetível Lee 68. Nessa ocasião ficou claro que as duas cultivares resistentes possuíam dois genes para resistência ao SMV e que cada cultivar tinha um gene no loco *Rsv₁* e *Rsv₃*. A vantagem da presença de ambos os genes nas cultivares é que esses poderiam permitir resistência efetiva a mais estirpes, o que não aconteceria com um gene simples (Wang et al., 1998; Gunduz et al., 2002)

Santos et al. (2000) utilizaram um isolado de SMV para comparar a reação induzida por esse vírus em cultivares de soja com a induzida pelo SYSV.

Eles observaram que algumas das cultivares testadas, como a Doko, foram resistentes ao SYSV e suscetíveis ao SMV, enquanto outras, como a Numbaíra, foram suscetíveis ao SYSV e resistentes ao SMV, indicando que provavelmente os genes de resistência a ambos os vírus eram distintos. Os autores alertaram então para a necessidade de estudar a origem dessa resistência, bem como de encontrar um método seguro para identificar o gene que confere resistência ao SYSV em cultivares de soja, pois, se esse vírus vier a se tornar importante no futuro, o trabalho de melhoramento genético, visando a incorporação da resistência em cultivares comerciais de interesse, pode ser bastante simplificado.

4.6 Uso de marcadores moleculares para resistência a vírus

Os marcadores moleculares têm alcançado lugar de destaque no melhoramento de plantas, pois ajudam a acelerar os métodos convencionais, diminuindo o tempo de liberação de materiais, o tamanho da população para análise e os custos para avaliação. Marcadores são definidos como elementos capazes de prever, mapear e caracterizar um determinado fenótipo. Inicialmente esses marcadores eram características morfológicas de fácil identificação no organismo, mas apresentavam-se com um número reduzido, limitando sua utilização (Guimarães e Moreira, 1999; Carneiro, 2002).

Com as técnicas de biologia molecular foi possível a manipulação do DNA, o que deu origem ao desenvolvimento de vários tipos de marcadores moleculares, que se encontram disponíveis atualmente. Os marcadores moleculares apresentam diversas vantagens sobre os morfológicos porque fornecem um número ilimitado de polimorfismos, distribuídos aleatoriamente ao longo do genoma, e por serem independentes de efeitos ambientais e do estágio fenológico da planta. Com isso consegue-se a identificação precisa de genótipos nos estádios iniciais de desenvolvimento da planta. A aplicação dessas técnicas

para acelerar e monitorar os programas de melhoramento genético permite grandes avanços no desenvolvimento de variedades melhoradas (Lanza et al., 2000).


Os marcadores do tipo microssatélite ou SSR (Simple Sequence Repeats) foram criados a partir do genoma dos eucariotos, que possuem várias classes de seqüências repetidas de um a quatro nucleotídeos. As seqüências de DNA que flanqueiam estas regiões, contendo repetições curtas, são conservadas dentro de cada espécie. Estas seqüências conservadas permitem então a confecção de primers que podem ser utilizados para amplificar determinados fragmentos do genoma. Em plantas, os microssatélites são bastante freqüentes, distribuídos ao acaso ao longo do genoma e amplamente utilizados para construção de mapas genéticos. Os microssatélites apresentam-se como uma das classes de marcadores mais promissoras nos programas de melhoramento porque são co-dominantes e multialélicos, constituindo a classe mais polimórfica de marcadores moleculares disponíveis hoje e permitindo um elevado nível de informação genética por loco (Ferreira e Grattapaglia, 1998; Lanza et al., 2000).

Em soja, diversos grupos de pesquisa no mundo desenvolvem marcadores e mapas genéticos baseados em SSR. Isto se deve não somente à grande expressão e valor comercial da cultura, mas também aos baixos níveis de diversidade genética no DNA dos germoplasmas cultivados, o que torna a construção de mapas genéticos baseados em RFPL (Restriction Fragment Length Polymorphism) ou RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) uma tarefa bastante difícil, considerando a baixa repetibilidade do RAPD. Rongwen et al. (1995) utilizaram sete primers microssatélites para caracterizar 96 genótipos de soja e encontraram de 11 a 26 alelos por cada loco, mostrando, com isso, a quantidade de informação que pode ser obtida com um pequeno número de primers (Ferreira e Grattapaglia, 1998; Cregan et al., 1999).

O uso de marcadores moleculares tem sido bastante empregado, com evidente sucesso, na identificação de genes de resistência às doenças de plantas (Webb et al., 1995; Silva et al., 2003; Dias, 2003). Yu et al. (1993) utilizaram RFLP e microssatélite para identificar o gene de resistência a SMV nas cultivar PI 96983, realizando cruzamento entre essa e a cultivar Lee 68, considerada suscetível ao SMV. Inicialmente esses autores testaram as sondas com três enzimas de restrição (*HindIII*, *EcoRI* e *DraI*) para detecção de polimorfismos entre os dois parentais e obtiveram polimorfismo somente para 19% dos clones, com uma das três enzimas testadas. Por outro lado, os resultados que eles obtiveram com microssatélites foram mais promissores, pois três marcadores testados propiciaram a obtenção de polimorfismo entre os parentais. Eles construíram então um mapa genético, com o auxílio do programa Mapmaker, em que o marcador SSR (SM176) e dois marcadores RFLP (pA186 e pK644a) se apresentaram estritamente ligados ao *Rsv*, com distâncias de 0.5, 1.5 e 2.1 cM, respectivamente. O gene para o pigmento antocianina foi também mapeado neste trabalho, com o auxílio da sonda pK390, tendo esse apresentado uma distância de 48.8 cM.

Uma forma mais rápida de se detectar um marcador é a análise de “bulks” segregantes (BSA). Este método, desenvolvido por Michelmore et al. (1991), envolve a comparação de duas misturas (“bulks”) de amostras de DNA de uma população segregante originada de um cruzamento simples. Dentro de cada “bulk” os indivíduos são idênticos para um gene de interesse, mas são diferentes para todos os outros genes. Dois “bulks” contrastantes para um gene, que pode ser resistência ou suscetibilidade a uma doença, por exemplo, são analisados então para identificar marcadores que irão distinguí-los.

A região cromossômica ao redor do gene *Rsv*₁ parece ser uma região para ocorrência de diversos genes de resistência, que incluem *Rps*₃, *Rpg*₁ e *Rpv*₁, e todos são flanqueados pelos marcadores RFLP K644 e B212. Hayes e Saghai



Maroof (2000) utilizaram o DNA de 12 linhagens resistentes e suscetíveis para formar um “bulk” resistente e um “bulk” suscetível para serem submetidos a estudos com marcadores do tipo RFLP. Quando esses foram digeridos com as enzimas de restrição *EcoRI* e *MseI*, esses autores observaram um total de 33 polimorfismos nas cerca de 960 bandas obtidas. Foram identificados quatro marcadores dominantes, R11 (518 pb), R12 (171 pb), R13 (261 pb) e R14 (312 pb), ligados ao *Rsv1*. Todos os quatro marcadores se localizaram a 3.5 cM e dois deles, a 0.6 cM do gene *Rsv1*.

Mais um marcador molecular para resistência, a todas as estirpes conhecidas do SMV, foi identificado por Hayes et al. (2000). Neste estudo eles empregaram a análise BSA (Bulk Segregant Analysis) e AFLP para determinar a localização cromossômica do loco denominado de *Rsv₄*, no mapa genético da soja. Um total de 101 combinações de primers foi testado, nos parentais e nos “bulks”, e uma média de 50 bandas AFLP foi detectada por combinação. Entre essas bandas foram encontrados apenas 141 polimorfismos, sendo que dois deles pareciam estar ligados ao gene *Rsv₄*, denominados de R4-1 e R4-2. O R4-1 foi facilmente distinguido do parental e do “bulk” suscetível, apresentando uma banda de 250 pb localizada a 4,8 cM do gene em estudo. O marcador R4-2, localizado a 18 cM do *Rsv₄*, apresentou um produto de 120 pb e foi codominante.

Em outro trabalho, Gore et al. (2002) estudaram a resistência da linhagem de soja PI 96983 a dois vírus, o SMV e o PMV (*Peanut mottle virus*), utilizando, nos cruzamentos, a linhagem suscetível Lee 68. Os autores utilizaram os dados relacionados com a reação das plantas às viroses, associados ao polimorfismo obtido com marcadores moleculares, para identificar os genes de resistência e determinar a relação entre os genes *Rsv1* e *Rpv1*. Quatro marcadores microssatélite (*Hsp176*, *64-A8C*, *Satt510* e *Satt120*) foram empregados para construção de um mapa de alta resolução. Esses marcadores

SSR, combinados com um marcador RAPD e 19 RFLP e com a reação ao SMV e PMV, mostraram que esses dois genes de resistência estão a 1.1 cM de distância um do outro.

Os marcadores tipo SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) também são considerados uma boa ferramenta para a identificação de genes de resistência a doenças. Zheng et al. (2003) utilizaram uma linhagem de soja suscetível e uma resistente ao SMV, do banco de germoplasma da China, com o intuito de encontrar um marcador RAPD/SCAR para o gene de resistência a esse vírus. Em uma análise de “bulks” segregantes, eles encontraram um marcador RAPD codominante, o que constitui um evento relativamente raro em análises desse tipo. Eles amplificaram uma banda com cerca de 980 pb no DNA do pai resistente, “bulk” resistente e plantas F₂ resistentes com o primer OPN11₉₈₀, e outra com 1070 pb no pai, “bulk” e plantas F₂ suscetíveis, com o primer OPN11₁₀₇₀. A análise de segregação do marcador OPN11_{980/1070} mostrou que este marcador estava ligado a 3.03 cM do gene de resistência. Esse fragmento foi clonado, seqüenciado e o marcador foi convertido em um SCAR, denominado SCN11_{980/1070}. Os marcadores SCAR apresentam vantagens sobre RAPD porque identificam somente um loco geneticamente definido, enquanto os primers RAPD amplificam múltiplos fragmentos não específicos do DNA.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL – Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2004, 496 p.

ALEMAN-VERDAGUER, M. E.; URBINO-GOUDOU, C. et al. Analysis of the sequence diversity of the P1, HC, P3, N1b and CP genomic regions of several yam mosaic potyvirus isolates: implications for the intraspecies molecular diversity of potyviruses. *Journal of General Virology*, Washington, v. 78, p. 1253-1264, 1997.

ALMEIDA, A. M. R. Efeito da utilização de sementes de soja manchadas pelo vírus do mosaico comum sobre a emergência, rendimento e percentagem de sementes colhidas com mancha. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 16, n. 2, p. 241-244, mar. 1981.

ALMEIDA, A. M. R. Transmissão experimental do vírus do mosaico comum da soja com afídeo que ocorre em picão preto (*Bidens pilosa*). *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 4, n. 3, p. 509-510, out. 1979.

ALMEIDA, A. M. R.; FERREIRA, L. P.; YORINORI, J. T.; SILVA, J. F. V.; HENNING, A. A. Doenças da Soja (*Glycine max* L.) In: GALLI, F. (Coord.). *Manual de fitopatologia*. 3. ed. São Paulo: Ceres, 1997.

ALMEIDA, A. M. R.; MARIN, S. R. R.; VALENTIN, N. et al. Necrose das haste: uma nova virose da soja no Brasil. Londrina – PR, 2002a. (Circular Técnica, 36).

ALMEIDA, A. M. R.; MIRANDA, L. C. Ocorrência do vírus do mosaico comum da soja no estado do paraná e sua transmissibilidade pelas sementes. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 4, n. 2, p. 293-298, jun. 1979.

ALMEIDA, A. M. R.; SAKAI, J.; SOUTO, E. R.; KATAJIMA E. W.; FUKUJI, T. S.; HANADA, K. Mosaic in *Senna occidentalis* in southern Brazil induced by a new strain of soybean mosaic virus. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 2, p. 151-156, abr. 2002b.

ALMEIDA, A. M. R.; SILVEIRA, J. M. Efeito da idade de inocula o de plantas de soja com o vírus do mosaico comum da soja e da porcentagem de plantas infectadas sobre o rendimento e algumas características econ micas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 8, n. 2, p. 229-236, jun. 1983.

ANJOS, J. R. N.; LIN, M. T.; KITAJIMA, E. W. Caracteriza o de um isolado do vírus do mosaico da soja. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 10, n. 1, p. 143-158, fev. 1985.

BOWERS, G. R.; GOODMAN, R. M. Strain specificity of Soybean mosaic virus seed transmission in soybean. **Crop Science**, Madison, v. 31, n. 5, p. 1171-1174, Sept./Oct. 1991.

BRUNT, A. A.; CRABTREE, K.; DALLWITZ, M. J. et al. **Viruses of plants: descriptions and lists from the VIDE Database**. Cambridge: CAB Internacional, 1996. 1484 p.

BUZZELL, R. I E TU, J. C. Inheritance of a soybean stem-tip necrosis reaction to Soybean mosaic virus. *Journal of Heredity*, Baltimore, v. 80, n. 5, p. 400-401, Sept./Oct. 1989.

CÂMARA, G. M. S. (Coord.). Soja: tecnologia de produção. Piracicaba: ED. ESALQ, 1998. 293 p.

CARNEIRO, N. P. Tipos de marcadores utilizados no melhoramento de plantas. In: SIMPÓSIO DE ATUALIZAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS: melhoramento de plantas na era dos marcadores moleculares, 6., 2002, Lavras. 51 p.

CHEN, P.; BUSS, G. R.; ROANE, C. W. E TOLIN, S. A. Allelism among genes for resistance to soybean mosaic virus in strain-differential soybean cultivars. *Crop Science*, Madison, v. 31, n. 2, p. 305-309, Mar./Apr. 1991.

CHO, EUI-KYOO; GOODMAN, R. M. Strains of *Soybean mosaic virus*: classification based on virulence in resistant soybean cultivars. *Phytopathology*, St. Paul, v. 69, n. 5, p. 467-470, May 1979.

COSTA, A. S. Investigação sobre moléstia da soja no Estado de São Paulo. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, v. 3, n. 1, p. 3-30, jan./mar. 1977.

COSTA, A. S.; LIMA NETO, V. C. Baixa transmissão pela semente do vírus do mosaico da soja em São Paulo. In: REUNIÃO SOC. BRAS. FITOPATOLOGIA, 7., 1974, Brasília.

COSTA, A. S.; MIYASAKA, S.; KIIHL, R. A. S.; DEMATTÉ, J. D. Moléstias do vírus da soja em São Paulo. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DA SOJA, 1., 1970, Campinas, SP.

CREGAN, P.; JARVIK, T.; BUSH, A. L.; SHOENAKER, R. C.; LARK, K. G.; KAHLER, A. L.; KAYA, N. Na integrated genetic linkage map of the soybean. *Crop Science*, Madison, v. 39, n. 5, p. 1464-1490, Sept./Oct. 1999.

DESLANDES, J. A.; COSTA, A. S.; FIGUEIRA, A. R.; VEGA, J. Amarelo do broto da soja causado por *Potyvirus* diferente do mosaico comum, registrado em Minas Gerais. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, v. 10, n. 1, p. 25-26, jan./mar. 1984.

DIAS, W. P. Genética da resistência da soja à raça 4+ do nematóide do cisto, *Heterodera glycines*. 2003. 83 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

DOMIER, L. L.; LATORRE, I. J.; STEINLAGE, T. A.; McCOPPIN, N.; HARTMAN, G. L. Variability and transmission by *Aphis glicines* of north american and asian *Soybean mosaic virus* isolates. *Archives of Virology*, Vienna, v. 148, n. 10, p. 1925-1941, Oct. 2003.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - Embrapa. **Sistemas de produção 4, tecnologias de produção de soja – Região Central do Brasil**. Londrina, PR, 2003. 237 p.

FANG, G. W.; ALLISON, R. F.; ZAMBOLIM, E. M.; MAAXWELL, D. P.; GILBERTSON, R. L. The complete nucleotide sequence and genome

organization of bean common mosaic virus (NL3 strain). **Virus Research**, Amsterdam, v. 39, n. 1, p. 13-26, Nov. 1995.

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

FIGUEIRA, A. R.; REIS, C. H.; DESLANDES, J. A. Suscetibilidade de cultivares de soja ao Vírus do amarelo do broto (VABS). **Fitopatologia Brasileira**, v. 11, n. 2, p. 373, jun. 1986.

GORE, M. A.; HAYES, A. J.; JEONG, S. C.; YUE, Y. G.; BUSS, G. R.; MAROOF, M. A. S. Mapping tightly linked genes controlling potyvirus infection at the *Rsv1* and *Rpv1* region on soybean. **Genome**, Ottawa, v. 45, n. 3, p. 592-599, June 2002.

GUIMARÃES, C. T. E MOREIRA, M. A. Genética molecular aplicada ao melhoramento de plantas. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. p. 715-740.

GUNDUZ, I.; BUSS, G. R.; CHEN, P.; TOLIN, S. A. Characterization of SMV resistance genes in Tousan 140 e Hourei Soybean. **Crop Science**, Madison, v. 42, n. 1, p. 90-95, Jan./Feb. 2002.

HAYES, A. J.; MA, G.; BUSS, G. R.; SAGHAI MARROF, M. A. Molecular marker mapping of RSV4, a gene conferring resistance to all known strains of Soybean mosaic virus. **Crop Science**, Madison, v. 40, p. 1434-1437, 2000.

HAYES, A. J.; SAGHAI MAROOF, M. A. Target resistance gene mapping in soybean using modified AFLPs. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 100, n. 5, p. 1279-1283, Oct. 2000.

HILL, J. H.; ALLEMAN, R.; HOGG, D. B. First report of transmission of *Soybean mosaic virus* and *Alfafa mosaic virus* by *Aphis glycines* in the New World. **Plant Disease**, Sst. Paul, v. 85, n. 5, p. 561, May 2001.

KIHL, R. A. S.; HARTWIG, E. E. Inheritance of reaction to *Soybean mosaic virus* in soybean. **Crop Science**, Mdison, v. 19, n. 3, p. 372-375, May/June 1979.

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

LIMA NETO, V. C. Triagem de plantas para reação local ao vírus do mosaico comum da soja. **Revista do Setor de Ciências Agrárias**, Curitiba, v. 3, p. 101-106, 1981.

LIMA NETO, V. C. Triagem de variedades, linhagens e introduções de soja para resistência ao vírus do mosaico comum da soja. **Revista do Setor de Ciências Agrárias**, Curitiba, v. 2, p. 4-8, 1980.

LIMA NETO, V. C.; COSTA, A. S. Influência da idade da planta e do número de vectores na transmissão do mosaico comum da soja. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 4, n. 3, p. 397-400, out. 1979.

MELLO, R. N.; ALMEIDA, A. M. R.; ZERBINI, F. M. Detection and identification of geminiviruses infecting soybean and associated weeds in Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 25 p. 444, 2002. Suplemento.

MICHELMORE, R. W.; PARAN, I. E. KESSELI, R. V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proceedings of National Academy Science of the United States of America*, Washington, v. 88, n. 21, p. 9828-9832, Nov. 1991.

PACUMBABA, R. P. Seed transmission of Soybean mosaic virus in mottled and nonmottled soybean seeds. *Plant Disease*, St Paul, v. 79, n. 2, p. 193-195, Feb. 1995.

PORTO, M. D. M.; HAGEDORN, D. J. Seed transmission of a Brazilian isolate of Soybean mosaic virus. *Phytopathology*, St. Paul, v. 65, n. 6, p. 713-716, June 1975.

REN, Q.; PFEIFFER, T. W.; GHABRIAL, S. A. Soybean mosaic virus incidence level and infection time: Interaction effects on soybean. *Crop Science*, Madison, v. 37, n. 6, p. 1706-1711, Nov./Dec. 1997a.

REN, Q.; PFEIFFER, T. W.; GHABRIAL, S. A. Soybean mosaic virus resistance improves productivity of double-cropped soybean. *Crop Science*, Madison, v. 37, n. 6, p. 1712-1719, Nov./Dec. 1997b.

RONGWEN, J.; AKKAYA, M. S.; BHAGWAT, A. A.; LAVI, U.; CREGAN, P. B. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype

identification. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 90, n. 1, p. 43-48, Jan. 1995.

SANTOS, R. C. **Caracterização parcial de um novo *Potyvirus* detectado em *Glycine max* L. (Merrill)**. 2000. 64 p. Tese (Mestrado) – Universidade federal de Lavras, Lavras, MG.

SHUKLA, D. D. et al. **The Potyviridae**. Wallingford: CAB International, 1994. 516 p.

SHUKLA, D. D.; WARD, C. W. **Amino acid sequence homology of coat proteins as a basis for identification and classification of the *Potyvirus* group**. **Journal of General Virology**, London, v. 69, n. 11, p. 2703-2710, Nov. 1988.

SILVA, G. F.; SANTOS, J. B.; RAMALHO, M. A. P. **Identification of SSR and RAPD markers linked to a resistance allele for angular leaf spot in the common bean (*Phaseolus vulgaris*) line ESAL 550**. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 26, n. 4, p. 459-463, Dec. 2003.

SILVA, M. F.; KIIHL, R. A. S.; ALMEIDA, A. M. R. **Inheritance of resistance to Soybean mosaic virus in FT-10 soybean**. **Euphytica**, Wageningen, v. 135, n. 3, p. 339-343, 2004.

SINCLAIR, J. B.; BACKMAN, P. A. (Ed.). **Compendium of soybean diseases**. 3. ed. Auburn, Illinois: APS Press, 1989. 106 p.

VEGA, J.; REZENDE, J. A. M.; COSTA, A. S. Aspectos ultraestruturais das lesões locais induzidas pelo Vírus do amarelo do broto da soja em mamoeiro. *Summa Phytopathologica*, São Paulo, v. 11, n. 1/2, p. 64-65, jan./jun. 1985.

WANG, Y.; NELSON, R. L.; HU, Y. Genetic analysis of resistance to *Soybean mosaic virus* in four soybean cultivars from China. *Crop Science*, Madison, v. 38, n. 4, p. 922-925, July/Aug. 1998.

WEBB, D. M.; BALTAZAR, B. M.; RAO-ARELLI, A. P.; CLAYTON, K.; KEIN, P.; BEAVIS, W. D. Genetic mapping of soybean cyst nematode race-3 resistance loci in the soybean PI 347654. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 91, n. 4, p. 574-5871, Sept. 1995.

WILCOX, J. R.; LAVIOLLETE, F. A. Seedcoat mottling response of soybean genotypes to infection with soybean mosaic virus. *Phytopathology*, St. Paul, v. 58, n. 10, p. 1446-1447, Oct. 1969.

WRATHER, J. A.; ANDERSON, T. R.; ARSYAD, D. M.; GAI, Y.; PLOPER, L. D.; RAM, G. B. M. Soybean diseases loss estimates for the top 10 soybean producing countries in 1994. *Plant Disease*, St. Paul, v. 81, n. 1, p. 107-117-110, Jan. 1996.

YU, Y. G.; SAGHAI MAROOF, M. A.; BUSS, G. R.; MAUGHAN, P. J.; TOLIN, S. A. RFLP and microsatellite mapping of a gene for soybean mosaic virus resistance. *Phytopathology*, St. Paul, v. 84, n. 1, p. 60-64, 1993.

ZERBINI, F. M.; MACIEL-ZAMBOLIM, E. A família Potyviridae – parte I. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, Passo Fundo, v. 7, p. 1-65, 1999.



ZHENG, C. M.; CHANG, R.; QIU, L.; CHEN, P Y.; WU, X.; CHEN, S. Y.
Identification and characterization of a RAPS/SCRA marker linked to a
resistance gene for Soybean mosaic virus in soybean. *Euphytica*, Wageningen,
v. 132, n. 2, p. 199-210, July 2003.



CAPÍTULO 2

Reação de cultivares de soja ao Vírus do amarelo do broto (*Soybean yellow shoot virus- SYSV*) e a três isolados do vírus do mosaico da soja (*Soybean mosaic virus- SMV*).

1 RESUMO

SANTOS, Rita de Cássia. Reação de cultivares de soja ao vírus do amarelo do broto (*Soybean yellow shoot virus- SYSV*) e a três isolados do vírus do mosaico da soja (*Soybean mosaic virus- SMV*). 2004. 77 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG.¹

O vírus do amarelo do broto da soja (*Soybean yellow shoot virus - SYSV*) é um *Potyvirus* encontrado em 1984, no município de Lavras –MG, infectando naturalmente plantas de soja no campo. Experimentos anteriores revelaram que o SYSV tem uma interação patógeno-hospedeira diferente da apresentada pelo *Soybean mosaic virus* (SMV), de modo que cultivares de soja resistentes a um podem ser altamente suscetíveis ao outro. Nesse trabalho foram testadas sete cultivares de soja, escolhidas entre as mais plantadas no país: Confiança, Conquista, DM 339, Liderança, Monsoy, Uirapuru e Vitória, além da cultivar Numbaíra, que serviu como controle positivo para o SYSV. Elas foram inoculadas com o SYSV e outros três isolados do SMV (SMV787 da UFLA, SMVFT10 e SMV da Embrapa Soja) e mantidas em casa-de-vegetação até o final do ciclo, quando então as vagens foram colhidas para avaliação da produção. Foram analisados os diversos parâmetros quantitativos e qualitativos, como número de vagens, número e peso das sementes e proporção de sementes manchadas. Conforme observado anteriormente, a cultivar Numbaíra mostrou perda de 100% da produção quando infectada com o SYSV e nenhuma perda de produção com o SMV787. Com os outros dois isolados de SMV as perdas foram de 2,4 e 16,7%, respectivamente. Entre as sete outras cultivares testadas, as perdas induzidas pelo SYSV variaram entre 12,7 e 30,7%. As maiores perdas de produção foram observadas na cv. Monsoy (78,7%) e na cv. Vitória (69,3%), quando infectadas com o SMV787, seguidas pela cv. Conquista (52,4%), infectada com o SMV. Houve, portanto, uma reação diferencial das cultivares tanto entre como dentro do mesmo isolado, mostrando uma grande diversidade genética entre as oito cultivares de soja testadas nesse trabalho. As plantas infectadas com o SYSV não apresentaram manchas nas sementes. Nem sempre houve correlação entre a suscetibilidade ao SMV e a porcentagem de sementes manchadas, pois cultivares como a Confiança, resistente ao isolado SMV, e Embrapa e Liderança, resistentes ao SMVFT10, apresentaram mais de 85% das sementes manchadas.

¹ Orientador: Antonia dos Reis Figueira

2 ABSTRACT

SANTOS, Rita de Cássia. Reaction of soybean cultivars to *Soybean yellow shoot virus* (SYSV) and to three *Soybean mosaic virus* (SMV) isolates. 2004. 77 p. Thesis (Doctorate program in Phytopathology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG-Brazil.¹

The *Soybean yellow shoot virus* (SYSV) is a *Potyvirus*, which was found in Lavras –MG-Brazil, in 1984, naturally infecting soybean plants in the field. Earlier studies revealed that a given soybean cultivar can be susceptible to SYSV and resistant to *Soybean mosaic virus* (SMV), showing a different virus host interaction. In this work seven soybean cultivars, chosen among the more important cultivars in Brazil, were tested: Confiança, Conquista, DM 339, Liderança, Monsoy, Uirapuru e Vitória, in addition to cv. Numbaira which was used as SYSV susceptible control. These eight soybean cultivars were mechanically inoculated with SYSV and also with three SMV isolates (SMV787, SMVFT10 and SMV from Embrapa Soybean) and maintained in greenhouse. At the end of their life cycle, the pods were harvested in order to evaluate the quantitative and qualitative parameters as pod number, seed number, seed weight and rate of spotted seeds. As seen before, the cv. Numbaira showed 100% yield loss when infected with SYSV and did not show any losses when infected with SMV787. When infected with the two other SMV isolates this soybean cultivar showed 2,4 and 16,7% of yield loss, respectively. Among the other seven tested soybean cultivars, the yield losses induced by SYSV ranged from 12,7 to 30,7%. The higher yield losses were shown by cv. Monsoy (78,7%) and cv. Vitoria (69,3%) infected with SMV 787 isolate, followed by cv. Conquista (52,4%) infected by SMV Embrapa. The eight tested soybean cultivars presented a different reaction to the same isolate as well as among isolates, indicating that they have a large genetic diversity. The soybean plants infected with SYSV did not present brown spots in their seeds. There was no correlation between every susceptible soybean cultivar and the spotted seeds. Some cultivars such as Confiança, which was resistant to SMV Embrapa and Liderança, which was resistant to SMVFT10 isolate, presented both more than 85% of spotted seeds.

² Adviser: Antonia dos Reis Figueira

3 INTRODUÇÃO

O Vírus do amarelo do broto da soja (*Soybean yellow shoot virus* – SYSV) foi detectado em Lavras – MG, em meados de 1984, infectando naturalmente plantas de soja em um experimento para avaliação de cultivares. A princípio acreditava-se ser um variante do complexo do SMV (*Soybean mosaic virus*) ou do BCMV (*Bean common mosaic virus*), mas os estudos mostraram que se tratava de um vírus diferente dos demais descritos para a cultura da soja. Figueira et al. (1991) verificaram que o SYSV é sorologicamente relacionado com duas estirpes de um *Potyvirus* da *Canavalia* e com um *Potyvirus* do maracujá, não tendo apresentado nenhum relacionamento com o BCMV ou o SMV.

Os sintomas induzidos pelo SYSV dependem da cultivar inoculada e da idade em que a planta foi infectada. Mas o que predomina na maioria das cultivares de soja, em todas as fases de infecção, é o amarelecimento generalizado dos brotos novos. A infecção se inicia com mosaico seguido de clareamento das nervuras, podendo ou não ser acompanhado de necrose. Posteriormente a planta se torna enfezada, com encurtamento dos entrenós e superbrotamento, com a produção podendo ser muito reduzida ou até nula, dependendo da cultivar utilizada.

Trabalhos anteriores testaram o efeito do SYSV e do SMV sobre a produção de oito cultivares de soja: Cristalina, Doko, IAC-8, Numbaíra, Paraná, UFV-1, UFV-4 e UFV-5. Os autores verificaram que as cultivares reagiram de forma diferenciada para os dois vírus, sendo que a cultivar Numbaíra foi resistente ao SMV e suscetível ao SYSV, enquanto a Doko reagiu de modo contrário (Figueira et al., 1986; Santos, 2000).

Com a expansão da cultura da soja para novas áreas, existe um trabalho intensivo no sentido de obter cultivares melhoradas geneticamente para atender

às diferentes exigências de precocidade, clima, solo e resistência a doenças diversas, incluindo as viroses. Todavia, nem sempre é possível avaliar esses materiais, sobretudo visando a resistência a viroses. Isso ocorre devido ao fato de os vírus não serem causadores de grandes perdas para a cultura da soja e pela ausência de afídeos vetores colonizando a soja no país. Entretanto, essas informações têm a sua relevância, pois mudanças nas condições ecológicas são frequentes, favorecendo a ocorrência de novas epidemias envolvendo doenças até então sem importância.

Desse modo, esse trabalho teve como objetivo estender as investigações iniciadas anteriormente com o SYSV para outras cultivares de soja de importância comercial para o Brasil, no momento, utilizando três outros isolados do SMV para comparação. Para isso, sete novas cultivares de soja: BRSMG Confiança, MG/BR 46 (Conquista), DM339, BRSMG Liderança, Monsoy 109, BRSMT Uirapuru e DM Vitória, além da cv. Numbaíra, que foi utilizada como controle positivo ao SYSV, foram inoculadas mecanicamente com o SYSV e mais três isolados do SMV com a finalidade de comparar o efeito desses vírus em sua produção. Desse modo, foram obtidos resultados que evidenciam a verdadeira importância em potencial desses agentes virais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Origem e manutenção dos isolados

O vírus do amarelo do broto da soja (SYSV) foi mantido em plantas de soja, cultivar Santa Rosa, sob condições de casa-de-vegetação, sendo repicado, aproximadamente a cada três semanas, para plantas jovens, por inoculação mecânica. Periodicamente, o SYSV foi inoculado em plantas de mamoeiro cv. Solo e recuperado das lesões locais necróticas para plantas de soja, para assegurar a sua pureza. O SYSV foi também mantido dessecado em freezer, a -20 °C e em ultrafreezer a -80 °C, sendo periodicamente inoculado em plantas de soja e de mamoeiro cv. Solo para renovação do inóculo.

Foram empregados três isolados do vírus do mosaico comum da soja: SMV787, proveniente da coleção de vírus do Laboratório de Virologia Vegetal do DFP/UFLA; e SMVFT10 e SMV, provenientes da Embrapa Soja – Londrina-PR. Esses isolados foram mantidos em plantas de soja cv. Santa Rosa e repicados periodicamente, conforme descrito acima.

4.2 Obtenção das plantas e inoculação mecânica

Foram empregadas as cultivares de soja BRSMG Confiança, MG/BR 46 Conquista, DM339, BRSMG Liderança, Monsoy 109, BRSMU Uirapuru e DM Vitória, que normalmente são plantadas nos campos comerciais do Brasil, e a cultivar suscetível Numbaira, utilizada como controle positivo nesse experimento. As plantas foram obtidas por semeadura em vasos de 5 kg, contendo como substrato terra, areia e esterco bovino na proporção de 3:1:1, devidamente esterilizado. Inicialmente foram colocadas quatro sementes por

vaso, fazendo-se o desbaste após a germinação, de modo a serem mantidas duas plantas vaso.

A inoculação mecânica foi realizada com o extrato foliar obtido por trituração de folhas, infectadas com os respectivos isolados virais, em tampão fosfato de sódio 0,01M, contendo sulfito de sódio na mesma molaridade, na proporção de 1:5 (p:v). Esse extrato foi friccionado nas folhas das plantas de soja, previamente polvilhadas com carborundum (500 mesh), aproximadamente quinze dias após a germinação, quando as plantas apresentaram as primeiras folhas trifolioladas. Em seguida as folhas foram lavadas com água corrente e as plantas foram mantidas em casa-de-vegetação até o final do experimento, na fase de colheita das sementes.

4.3 Montagem do experimento

O experimento visando determinar a reação dos quatro isolados virais, nas oito cultivares de soja citadas, foi montado em condições de casa-de-vegetação. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com duas plantas por parcela e seis repetições, em esquema fatorial com oito cultivares, quatro vírus e uma testemunha.

As plantas foram inoculadas, conforme descrito anteriormente, com os isolados virais SYSV, SMV787, SMVFT10 e SMV, sendo que as testemunhas foram inoculadas somente com o tampão. Foram tomados todos os cuidados necessários para não permitir a contaminação entre os isolados empregados. No final do ciclo as vagens de cada planta foram colhidas separadamente e levadas para o laboratório, onde se avaliou o número de vagens e de sementes, o número de sementes manchadas, o peso de 100 sementes, a produção por planta, a porcentagem de sementes manchadas e a porcentagem de redução em relação à testemunha. Na avaliação do peso de 100 sementes foi feita a correção da

umidade. Para isso, as sementes foram pesadas e deixadas em estufa a 100 °C por um período de 24 horas, após o qual foram novamente pesadas, fazendo-se então a correção da umidade através da fórmula $PC = PR (100 - UR) / 100 - UC$, em que PC representou o peso corrigido; PR, o peso real antes da secagem em estufa; UR, a umidade real inicial e UC, a umidade corrigida. Os dados foram analisados por ANOVA e as diferenças entre os tratamentos foram comparadas pelo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Para essas análises utilizou-se o Sistema de Análise Estatística da Universidade Federal de Viçosa (SAEG).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação dos componentes da produção das oito cultivares de soja inoculadas com o SYSV e isolados de SMV

As plantas das cultivares Uirapuru e Confiança, inoculadas mecanicamente com cada um dos quatro isolados virais testados, não apresentaram redução no número médio de vagens por planta quando comparadas com as não inoculadas (Tabela 1). As demais cultivares apresentaram resultados distintos quando foram inoculadas com os diferentes isolados virais. A maior redução na produção de vagens, causada pela infecção pelo SYSV, foi observada nas cultivares Numbaíra (25,8%) e Vitória (22,2%), seguidas pela cv. Conquista (15,8%). As cultivares DM339, Liderança, Monsoy e Uirapuru não apresentaram redução no número médio de vagens por planta em relação à testemunha quando inoculadas mecanicamente com esse vírus (Tabela 1).

Quando inoculadas com isolados do SMV, as plantas das cvs. DM339 e Monsoy, que não mostraram alteração com o SYSV, também não tiveram o número de vagens afetado pelo SMVFT10, mas apresentaram uma alta redução no número de vagens com o SMV787 (35,2 e 59,2%, respectivamente) e uma redução menor com o SMV (13,3 e 22,8%, respectivamente). As plantas da cv. Liderança apresentaram redução (23,2%) apenas com o SMV 787, enquanto a cv. Conquista apresentou redução com todos os isolados, variando de 35,1% com o SMV a 15,3% com o SMVFT10. A Numbaíra não apresentou redução com o SMV 787 e pequena redução com o SMVFT10 (12,6%) e SMV (6,3%).

Além da diminuição do número de vagens por plantas, outros caracteres, como número de sementes por vagem (Tabela 2), número de sementes por planta (Tabela 3) e peso das sementes (Tabela 4), interferiram na quantidade de

produção de grãos por plantas (Tabela 5). Desse modo, cultivares como a Numbaíra, que quando infectada pelo SYSV apresentou uma perda de 25,8% de vagens, tiveram uma perda de produção de 100%, pois as sementes produzidas foram muito pequenas, inviáveis para utilização e/ou comercialização. O mesmo pode ser observado na cultivar Uirapuru, infectada com esse vírus, que não apresentou redução no número médio de vagens, mas mostrou redução de 16,8% na produção total da planta porque reduziu o tamanho das sementes.

TABELA 1. Número de vagens por plantas de soja sadias e infectadas com diferentes vírus.

CULTIVARES	Número de vagens/ planta de soja sadia (testemunha) e infectada com os diferentes isolados virais e porcentagem de Redução em relação à testemunha (% Red)								
	Test.	SYSV	SMV 787	SMV FT10	SMV	% Red SYSV	% Red SMV 787	% Red SMVFT10	% Red SMV
CONFIANÇA	29,96 bA	30,58 bA	23,67 bA	29,63 aA	31,96 bA	0,0 bA	21,6 cA	9,1 aA	0,0 cA
CONQUISTA	25,62 cA	21,83 cB	20,12 cB	21,63 bB	16,38 cC	15,8 aB	21,2 cB	15,3 aB	35,1 aA
DM339	30,92 bB	45,67 aA	19,79 cC	32,50 aB	26,54 cB	0,0 bC	35,2 bA	0,0 aC	13,3 cB
LIDERANÇA	30,96 bA	30,20 bA	23,83 bB	31,92 aA	30,08 bA	3,6 bB	23,2 cA	0,0 aB	5,3 cB
MONSOY	32,79 bA	35,63 bA	13,21 dC	32,88 aA	25,04 cB	0,0 bC	59,2 aA	0,0 aC	22,8 bB
NUMBAÍRA	20,67 dA	15,92 dB	23,67 bA	18,00 bB	19,63 dA	25,8 aA	0,0 dA	12,6 aA	6,3 cA
UIRAPURU	34,37 aA	34,80 bA	35,58 aA	34,21 aA	34,08 aA	0,0 bA	0,0 dA	7,1 aA	4,1 cA
VITÓRIA	37,69 aA	29,04 bB	18,12 cC	30,75 aB	27,58 cB	22,2 aB	51,5 aA	17,6 aB	26,2 bB

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste

Scott & Knott ($P \leq 0,05$).

TABELA 2. Número de sementes por vagens em plantas de soja saudáveis e infectadas com diferentes vírus.

CULTIVARES	Número de sementes por vagem em plantas de soja sadia (testemunha) e infectada com os diferentes isolados virais e porcentagem de Redução em relação à testemunha (% Red)								
	Test.	SYSV	SMV 787	SMV FT10	SMV	% Red	% Red	% Red	% Red
						SYSV	SMV787	SMVFT10	SMV
CONFIANÇA	2,04 bA	1,92 aA	1,92 bA	1,90 aA	1,96 bA	5,9 fA	5,9 gA	6,9 fA	3,9 dB
CONQUISTA	2,09 bA	1,70 bB	1,80 bB	1,85 aB	1,70 cB	18,7 cA	13,9 eB	11,5 dC	18,7 bA
DM339	2,39 aA	1,71 bC	1,69 cC	1,96 aB	1,82 cB	28,5 bA	29,3 bA	18,0 bC	23,9 aB
LIDERANÇA	2,03 bA	1,68 bB	1,63 cB	1,92 aA	1,80 cB	17,3 cB	19,7 dA	5,4 gD	11,3 cC
MONSOY	2,11 bA	2,10 aA	1,24 eC	1,83 aB	1,73 cB	0,5 gD	41,2 aA	13,3 cC	18,0 bB
NUMBAÍRA	1,92 bA	0,77 cB	1,77 bA	1,72 aA	1,69 cA	59,9 aA	7,8 fD	10,4 cC	12,0 cB
UIRAPURU	2,31 aA	1,99 aB	2,36 aA	1,85 aB	2,19 aA	13,9 dB	0,0 hD	19,9 aA	5,2 dC
VITÓRIA	2,02 bA	1,83 bB	1,47 dC	1,82 bB	1,76 cB	9,4 eC	27,2 cA	9,9 cC	12,9 cB

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott & Knott ($P \leq 0,05$).

TABELA 3. Número médio de sementes por plantas de soja saudas e infectadas com diferentes vírus.

CULTIVARES	Número de sementes/ planta de soja sadia (testemunha) e infectada com os diferentes isolados virais e porcentagem de Redução em relação à testemunha (% Red)								
	Test.	SYSV	SMV 787	SMV FT10	SMV	% Red	% Red	% Red	% Red
						SYSV	SMV787	SMVFT10	SMV
CONFIANÇA	61,04 bA	58,50 bA	45,50 bA	56,79 aA	62,58 bA	8,7 cA	25,1 dA	12,9 aA	4,1 cA
CONQUISTA	52,54 cA	37,00 cC	35,92 cC	39,88 bB	27,75 fD	29,1 bB	30,8 dB	23,2 aB	46,9 aA
DM339	73,87 aA	76,08 aA	33,25 cD	63,75 aB	48,29 cC	0,0 cD	54,6 cA	13,5 aC	34,2 bB
LIDERANÇA	62,63 bA	50,58 bB	38,92 bC	61,25 aA	54,08 cB	18,1 bB	36,9 dA	3,3 aB	13,2 cB
MONSOY	69,42 aA	74,92 aA	16,13 eD	60,00 aB	43,08 dC	0,0 cC	76,1 aA	12,8 aC	36,9 bB
NUMBAÍRA	39,71 dA	0,0 dC	41,67 bA	31,21 cB	33,17 eB	100,0 aA	0,0 eC	21,2 aB	16,7 cB
UIRAPURU	79,62 aA	69,42 aB	82,42 aA	61,63 aB	74,58 aA	14,3 cA	0,0 eA	21,8 aA	8,3 cA
VITÓRIA	76,21 aA	53,33 bB	26,63 dD	56,00 aB	48,50 cC	29,2 bB	64,8 bA	25,5 aB	35,8 bB

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott & Knott ($P \leq 0,05$).

TABELA 4. Peso de 100 sementes produzidas por plantas de soja saudáveis e infectadas com diferentes vírus

CULTIVARES	Peso de 100 sementes de soja sadia (testemunha) e infectada com os diferentes isolados virais e porcentagem de Redução em relação à testemunha (% Red)								
	Test.	SYSV	SMV 787	SMV FT10	SMV	% Red	% Red	% Red	% Red
						SYSV	SMV787	SMVFT10	SMV
CONFIANÇA	10,57 aA	9,60 bA	9,77 aA	10,02 aA	10,98 aA	6,5 bA	12,5 aA	6,2 aA	3,8 aA
CONQUISTA	11,91 aA	12,80 aA	12,16 aA	10,97 aA	10,66 aA	0,0 bA	0,0 aA	12,2 aA	11,0 aA
DM339	6,57 bB	9,90 bA	10,49 aA	6,11 aB	6,36 bB	0,0 bA	0,0 aA	10,3 aA	3,6 aB
LIDERANÇA	11,42 aA	12,30 aA	12,85 aA	11,30 aA	10,66 aA	0,0 ba	0,0 aA	7,3 aA	8,2 aA
MONSOY	12,81 aA	12,34 aA	11,87 aA	10,27 aA	10,62 aA	10,5 bA	9,8 aA	19,5 aA	16,8 aA
NUMBAÍRA	10,60 aA	0,00 cB	12,26 aA	10,27 aA	10,35 aA	100,0 aA	0,0 aB	16,7 aB	2,4 aB
UIRAPURU	11,86 aA	11,40 aA	10,54 aA	10,66 aA	11,69 aA	9,8 bA	14,1 aA	11,8 aA	10,1 aA
VITÓRIA	11,63 aA	11,35 aA	10,22 aA	10,88 aA	11,26 aA	6,2 bA	15,6 aA	11,0 aA	11,3 aA

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott & Knott ($P \leq 0,05$).

TABELA 5. Efeito dos isolados virais na produção total da planta

CULTIVARES	Produção média de grãos (gramas) por cada planta infectada com os diferentes isolados virais e Redução de produção em relação à testemunha (%Red)								
	Test.	SYSV	SMV 787	SMV FT10	SMV	%Red	%Red	%Red	%Red
						SYSV	SMV787	SMVFT10	SMV
CONFLANÇA	6,5 bA	5,6 cB	4,5 bB	5,7 aB	6,9 bA	13,8 eB	31,0 cA	12,3 cB	0,0 fC
CONQUISTA	6,3 bA	4,7 cB	4,4 bB	4,4 bB	3,0 cC	25,4 cC	30,2 cB	30,2 aB	52,4 aA
DM339	4,9 cB	7,5 dB	3,5 cB	3,9 bB	3,0 cB	0,0 fD	28,6 cB	20,4 bC	38,8 cA
LIDERANÇA	7,1 bA	6,2 cA	5,0 bA	6,9 aA	5,8 bA	12,7 eC	29,6 cA	2,8 dD	18,3 dB
MONSOY	8,9 aA	9,2 aA	1,9 cD	6,2 aB	4,6 cC	0,0 fD	78,7 aA	30,3 aC	48,3 bB
NUMBAÍRA	4,2 cA	0,0 dC	5,1 bA	3,2 bB	3,5 cB	100,0 aA	0,0 eD	2,4 dC	16,7 dB
UIRAPURU	9,5 aA	7,9 bA	8,7 aA	6,6 aB	6,7 bB	16,8 dB	8,4 dC	30,5 aA	8,4 eC
VITÓRIA	8,8 aA	6,1 cB	2,7 cC	6,1 aB	5,5 bB	30,7 bC	69,3 bA	32,4 aC	37,5 cB

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott & Knott ($P \leq 0,05$).

Quando as cultivares empregadas foram inoculadas com os outros isolados virais, as cvs. Confiança, Conquista, Liderança, Monsoy, Uirapuru e Vitória, quando inoculadas com o SMV787, apresentaram redução de vagens entre zero e 59,2%. Quando analisadas as respectivas produções de grãos (Tabela 5), estas apresentaram perdas entre 8,4 e 78,7%. Isso também ocorreu quando a maioria das cultivares foram inoculadas com SMVFT10 e com o SMV. Nesse caso, as reduções nos números de vagens variaram entre zero e 17,6%, enquanto as reduções na produção foram de 2,8 a 32,4%. Finalmente, as reduções no número médio de vagens nas cultivares inoculadas com o SMV estiveram entre zero e 35,1% e as de produção, entre zero e 52,4%. A única exceção foi observada na cv. DM339 inoculada com o SMV787, que apresentou uma redução de 35,2% no número médio de vagens por planta e apenas 28,6% na produção total. Essa diferença se deveu ao fato de as sementes produzidas pelas plantas infectadas, embora em menor número, terem pesado, em média, mais de 37% que as sementes produzidas pelas testemunhas. Nesse caso, a diminuição do número de vagens por planta e de sementes por vagem parece ter favorecido o desenvolvimento dos grãos.

A maior redução de produção total foi observada na cultivar Numbaíra, infectada pelo SYSV, que não produziu sementes viáveis, seguida pelas cvs. Monsoy (78,7%) e Vitória (69,3%), infectadas pelo SMV787, e Conquista, infectada pelo SMV (52,4% de perda). Por outro lado, as quantidades de produção das cvs. DM339 e Uirapuru, infectadas com o SYSV; Numbaíra, infectada com o SMV787; Liderança, infectada com SMVFT10; e Confiança, infectada com o SMV, não foram alteradas quando comparadas com a testemunha. Goodman e Hoard (1980) observaram reduções na produção que variaram de 45 a 86% em vários genótipos de soja inoculados com a estirpe G2 do SMV.

Como pode ser observado, as cultivares apresentaram uma interação diferencial com a maioria dos isolados virais testados, mostrando que a diferença de reação das cultivares ocorreu não apenas entre os dois diferentes vírus, mas também entre os isolados do mesmo vírus, ou seja, do vírus mosaico da soja. A cv. Confiança foi resistente apenas ao SMV, apresentou pequenas perdas (menores que 15%) com o SYSV e o SMVFT10 e 31,0% de perdas com o SMV 787. Por outro lado, a Conquista foi suscetível a todos os isolados, apresentando perdas superiores a 25% para todos eles. A DM339 foi resistente ao SYSV, mas apresentou perdas de 20,4 a 38,8% com os isolados do SMV. A Liderança foi resistente ao SMVFT10 e mostrou perdas entre 12,7 e 29,6% para os demais isolados virais. A Monsoy também foi resistente ao SYSV, mas apresentou suscetibilidade entre 30,3 e 78,7% para os isolados do SMV. A Numbaíra foi totalmente suscetível ao SYSV e resistente ao SMV787, tendo apresentado pequena perda de 2,4 para o SMVFT10 e 16,7% com o SMV. Ultimamente essa cultivar não tem sido mais plantada por apresentar baixa produtividade e por ser suscetível a outras doenças da soja. A Uirapuru apresentou perdas de 30,5% com o isolado SMVFT10, 16,8% com o SYSV e 8,4% para os demais isolados. Das cultivares testadas, a única reconhecidamente resistente ao vírus SMV é a Uirapuru, e o isolado FT10 parece ter sido responsável pela quebra dessa resistência, apresentando uma alta redução na produção. Finalmente, a cv. Vitória apresentou perdas entre 30,7% (para o SYSV) e 69,3% (para o SMV 787).

Considerando o efeito na produção de grãos, entre os isolados do SMV o FT10 foi o menos agressivo, induzindo perdas de, no máximo, 32,4% nas oito cultivares testadas. O SMV787 chegou a induzir perdas de 78,7, enquanto a perda máxima induzida pelo SMV foi de 52,4%. O SYSV induziu 100% de perda na cv. Numbaíra, mas a perda induzida nas demais cultivares variou de

12,7 e 30,7%, sendo que as cultivares DM339 e Monsoy não apresentaram nenhuma redução com este vírus (Tabela 5).

Em relação à proporção de sementes manchadas (Tabela 6), a única cultivar que apresentou algumas sementes manchadas quando infectada com o SYSV foi a DM339; entretanto, esse resultado não foi considerado estatisticamente significativo. Santos (2000) também não observou o aparecimento de manchas nas sementes de outras sete cultivares de soja quando estas foram infectadas com esse vírus. Ao contrário, a maioria das cultivares aqui testadas apresentaram sementes manchadas apenas quando infectadas com os isolados do SMV. Exceção foi observada na cultivar Uirapuru, que apresentou manchas nas sementes apenas quando foi infectada com o isolado SMVFT10, confirmando a possível quebra da resistência, e na cv. Numbaira, que não apresentou sementes manchadas com o isolado SMV 787 e apenas 39,01% com o isolado SMV FT10, enquanto a maioria das outras cultivares apresentou mais de 80% de sementes manchadas (Tabela 6). Lima Neto (1981) também observou uma variação entre cultivares para manchamento de sementes. Entre as cultivares testadas, o autor observou que Santa Rosa apresentou a maior porcentagem de sementes manchadas, seguida pelas cultivares Paraná e Bragg. Essa alta incidência de sementes manchadas foi encontrada por Porto e Hegedorn (1975), segundo os quais, nas cultivares mais suscetíveis, esse manchamento chegou a 100%. Os dados encontrados no presente trabalho mostram que mesmo havendo um intenso trabalho de melhoramento, as cultivares atuais continuam apresentando altos índices de sementes manchadas quando inoculadas com o SMV.

Esses dados são muito interessantes porque mostram que a resistência da planta aos isolados de SMV, quando se considera a produtividade por planta, nem sempre parece estar relacionada com a porcentagem de sementes manchadas. No caso da cv. Numbaira, infectada com SMV787, e da Uirapuru,

infectada com SMV787 e SMV, houve coincidência entre resistência da planta, em termos de produtividade, e ausência ou baixa incidência de sementes manchadas. Entretanto, em outros casos extremos, como o observado na cv. Confiança, não houve redução na produção da planta infetada pelo isolado SMV, mas essa apresentou mais de 85% de sementes manchadas. A cv. Liderança também apresentou apenas 2,8% de redução na produção, porém mostrou 87,29% de sementes manchadas quando infectada com o isolado SMV FT10.

Isso confirma que o controle genético que confere resistência ao SMV é distinto daquele que confere resistência ao aparecimento de manchas nas sementes, como descrito por Cooper (1966) e Kennedy e Cooper (1967), devendo ser considerado separadamente nos programas de melhoramento genético. A identificação de marcadores moleculares relacionados a cada um desses caracteres poderia ser bastante útil na detecção e utilização dessas duas modalidades de resistência no melhoramento genético da soja visando resistência ao SMV.

TABELA 6. Produção de sementes manchadas por planta de soja sadia e inoculada com diferentes vírus.

CULTIVARES	Número e porcentagem de sementes manchadas por planta de soja sadia (testemunha) e infectada com diferentes isolados virais								
	TEST.	SYSV	SMV 787	SMV FT10	SMV	% SYSV	% SMV787	%SMVFT10	% SMV
CONFIANÇA	0,0 aD	0,0 aD	44,4 aB	23,5 cC	53,5 aA	0,0 aD	97,4 aA	45,2 cC	85,3 bD
CONQUISTA	0,0 aD	0,0 aD	32,6 bB	38,3 bA	27,5 bC	0,0 aB	90,5 aA	96,2 aA	99,0 aA
DM 339	0,0 aC	4,9 aC	32,9 bB	55,9 aA	42,5 aB	5,5 aC	99,0 aA	87,7 bB	87,9 bB
LIDERANÇA	0,0 aD	0,0 aD	38,5 aC	53,4 aA	46,4 aB	0,0 aC	98,9 aA	87, 3 bB	85,7 bB
MONSOY	0,0 aD	0,0 aD	14,9 cC	56,4 aA	31,1 bB	0,0 aC	94,2 aA	93,9 aA	72,1 bB
NUMBAÍRA	0,0 aC	0,0 aC	1,04 dC	12,0 cB	26,0 bA	0,0 aC	2,6 bC	39,0 cB	79,3 bA
UIRAPURU	0,0 aB	0,0 aB	0,0 dB	52,0 aA	0,0 cB	0,0 aB	0,0 bB	84,2 bA	0,0 aB
VITÓRIA	0,0 aD	0,0 aD	26,4 bC	54,5 aA	46,4 aB	0,0 aC	99,2 aA	97,1 aB	95,6 aB

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott & Knott ($P \leq 0,05$).

6 CONCLUSÕES

6.1 Houve uma interação diferencial entre as cultivares, o SYSV e os isolados de SMV, demonstrando diferentes níveis de suscetibilidade.

6.2 Os isolados virais demonstraram diferentes agressividades, sendo o SYSV menos agressivo que os isolados do SMV, para sete das oito cultivares testadas, e o isolado SMV787, o mais agressivo entre os isolados de SMV.

6.3 O SYSV não causa manchas nas sementes das plantas de soja suscetíveis.

6.4 Não houve correlação entre suscetibilidade ao SMV e porcentagem de sementes manchadas em todas as cultivares testadas.

6.5 A cultivar Uirapuru teve a resistência quebrada pelo isolado SMVFT10.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

COOPER, R. L. A. A major gene for resistance to seed coat mottling in soybeans. *Crop Science*, Madison, v. 6, n. 3, p.290-292, May/June 1966.

FIGUEIRA, A. R.; ALVES, A. M. C.; KITAJIMA, E. W. Studies with Soybean yellow shoot vírus: a new *Potyvirus* detected in Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 16, n.6, p. 205, jun. 1991. (Resumo).

FIGUEIRA, A. R.; REIS, C. H.; DESLANDES, J. A. Suscetibilidade de cultivares de soja ao Vírus do amarelo do broto (VABS). *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 11, n. 2, p. 373, jun. 1986.

GOODMAN, R. M.; OARD, J. H. Seed transmission and yield losses in tropical soybeans infected by Soybean mosaic virus. *Plant Disease*, St. Paul, v. 64, n. 10, p. 913-914, Oct. 1980.

KENNEDY, B. W.; COOPER, R. L. A. Association of virus infection with mottling of soybean seed coats. *Phytopathology*, St. Paul, v. 57, n. 1, p. 35-37, Jan. 1967.

LIMA NETO, V. C. Influência da localização dasvagens na planta e da posição das sementes na vagem na produção de sementes manchadas e na transmissão do vírus do mosaico comum da soja, em soja. *Revista do Setor de Ciências Agrárias*, v. 3, p. 12-18, 1981.

PORTO, M. D. M.; HEGEDORN, D. J. Seed transmission of a brazilian isolate of Soybean mosaic virus. *Phytopathology*, St. Paul, v. 65, n. 6, p. 713-716, June 1975.

SANTOS, R. C. Caracterização parcial de um novo *Potyvirus* detectado em *Glycine max* L. (Merrill). 2000. 64 p. Tese (Mestrado) – Universidade federal de Lavras, Lavras, MG.

CAPÍTULO 3

Identificação de marcadores microssatélite ligados ao alelo de resistência ao SYSV (*Soybean yellow shoot virus*) em soja

1 RESUMO

SANTOS, Rita de Cássia. Identificação de marcadores microssatélite ligados ao alelo de resistência ao vírus do amarelo do broto (*Soybean yellow shoot virus* - SYSV) em soja. 2004. 77 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG.

O vírus do amarelo do broto da soja (*Soybean yellow shoot virus* - SYSV) é um *Polyvirus* detectado em Lavras-MG e é capaz de causar sintomas severos em diversas cultivares de soja. Entretanto, algumas cultivares apresentaram uma resistência a esse vírus, o que significa uma opção promissora para o controle desse vírus no campo. Neste trabalho foram testados diversos oligonucleotídeos do tipo *Scm* com a finalidade de encontrar um marcador molecular para o gene que confere resistência ao SYSV em soja. Para isso, duas cultivares de soja, sendo uma resistente (Doko) e outra suscetível (Numbata) ao SYSV, foram cruzadas com o objetivo de obter a população segregante para identificação do alelo de resistência. Cento e oito plantas da população F₂ foram plantadas, inoculadas com o SYSV e classificadas, com o auxílio de uma escala diagramática, em resistente (nota 1), suscetível (nota 5) ou intermediária (notas 2, 3 e 4). A reação dessas plantas mostrou uma segregação de 1:2:1, sugerindo ser herança monogênica. Após a avaliação e identificação das plantas fez-se a extração do DNA das resistentes e suscetíveis para análise molecular pelo método "bulks" segregantes, misturando-se o DNA das plantas resistentes ("bulks" resistente) e o das plantas suscetíveis ("bulks" suscetível). Esses "bulks" foram analisados por PCR utilizando os primers *Scm*, desenhados com base no genoma da soja, na busca de um marcador que fosse polimórfico entre o resistente e o suscetível. Foi então verificado que o primer *Scm* 418 apresentou o polimorfismo desejado. A partir dessa descoberta, foram testadas individualmente as plantas suscetíveis e resistentes e as demais plantas F₂. O marcador *Scm* 418 foi eficiente para identificar as plantas resistentes, suscetíveis e heterozigotas, obedecendo à distribuição alélica de 1:2:1, segundo o modelo da segregação mendeliana, como é o esperado, por se tratar de um marcador codominante. O valor de LOD "score" encontrado foi 18,22, considerado altamente significativo, indicando que o marcador está realmente ligado ao alelo de resistência. A frequência de recombinação estimada (12,4%) indicou que este marcador pode ser utilizado com sucesso para a seleção de plantas resistentes ao SYSV. Embora a distância entre o marcador e o alelo tenha sido alta (14,25 cM), estima-se que ele será eficiente para detectar cerca de 98,46% das plantas resistentes de uma população F₂, o que o qualifica como um bom marcador molecular para o alelo *Sysv* em plantas de soja.

2 ABSTRACT

SANTOS, Rita de Cássia. Identification of SSR markers linked to *Soybean yellow shoot virus* (SYSV) resistance allele in soybean. 2004. 77p. Thesis (Doctorate Program in Phytopathology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG.²

The *Potyvirus* named *Soybean yellow shoot virus* (SYSV), which was detected in Lavras –MG-Brazil, can cause severe symptoms in soybean cultivars. However, some soybean cultivars show a high virus resistance, what can be considered as a good alternative for controlling this virus at field conditions. In this work several *Satt* like oligonucleotides were tested aiming to find any molecular marker linked to the SYSV resistance allele in soybean plants. Therefore, a segregating population was obtained by crossing Doko (resistant) and Numbaira (susceptible) cultivars, for the identification of SYSV resistant allele. One hundred and eight F₂ plants were inoculated with the SYSV, and scored as resistant (score 1), susceptible (score 5) and intermediate (scores 2, 3, and 4). The SYSV plant response showed the segregation 1:2:1, suggesting a monogenic inheritance. The DNA was extracted from all F₂ plants and those from resistant and susceptible were mixed for obtaining two bulks, for the bulked segregant analysis. The susceptible and resistant bulks were PCR analyzed, using the *Satt* primers based on the soybean genome, in order to find a polymorphic marker to differentiate resistant from susceptible plants. The primer named *Satt* 418, which showed the desired polymorphism, was used to test each resistant, susceptible and intermediate soybean plants from F₂ generation. The *Satt* 418 segregated in F₂ following the 1:2:1 proportions, typical of the monogenic inheritance and co-dominant interaction. The LOD score value was 18,22, which is considered highly significant, indicating that the marker is really gene linked. The recombination frequency (12,4%), is an evidence that this marker can be successfully used for selecting SYSV soybean resistant plants. Even though the high distance between the marker and the resistant allele (14,25 cM), it will be efficient to detect about 98,46% of the resistant plants, within a given soybean population, what makes the *Satt* 418 a good molecular marker for the *Sysv* allele in soybean plants.

² Adviser: Antonia dos Reis Figueira

3 INTRODUÇÃO

A soja é a cultura de maior expressão do agronegócio nacional, colocando o Brasil na liderança das exportações de produtos do complexo soja. Desde a sua introdução no país a soja passa por um processo de crescente expansão, tanto na área plantada quanto na produtividade. Desde os primeiros plantios comerciais a produtividade passou de 1089 kg/há, na década de 60, para 2700 kg/ha em 2003 (Agrianual, 2004).

Apesar de todo esse crescimento e produtividade, a soja está sujeita ao ataque de diversos patógenos que podem limitar a sua produtividade. Entre os patógenos da soja, os vírus podem afetar a sua produção de modo significativo, dependendo da espécie e da estirpe que se encontra na planta. Um dos principais vírus da soja é o *Soybean mosaic virus* (SMV), havendo relatos de sua ocorrência em todo o mundo. Outros vírus de menor importância e ocorrência já foram identificados em campos de soja, mas sem causar grandes perdas na produção.

No Brasil, o SMV normalmente é controlado pelo uso de cultivares resistentes e a ocorrência de outras viroses não tem sido muito freqüente. Recentemente, Almeida et al. (2002) detectaram a ocorrência de plantas com sintomas típicos de infecção por vírus, como curvatura e queima do broto, levando a planta à morte ou causando nanismo. Esse vírus foi identificado como pertencente ao gênero *Carlavirus*, transmitido pela mosca branca *Bemisia tabaci*, e denominado vírus da necrose da haste da soja. Os pesquisadores ressaltaram que o uso de cultivares resistentes constitui, atualmente, a principal arma contra a necrose.

De fato, entre as diversas estratégias utilizadas no controle de doenças viróticas, o uso de cultivares resistentes é o mais desejável, por ser o método mais eficiente e por não onerar o custo de produção. Além disso, essa estratégia

Um novo *Potyvirus* infectando plantas de soja foi detectado em experimento de campo em Lavras - MG, sendo denominado de vírus do amarelo do broto da soja (*Soybean yellow shoot virus* – SYSV) devido ao sintoma típico de amarelecimento generalizado dos brotos (Deslandes et al., 1983; Figueira et al., 1999). Em um estudo de avaliação de cultivares, Santos (2000) identificou a ocorrência de cultivares resistentes e suscetíveis ao SYSV. Entre estas cultivares destacaram-se a Doko e a Numbaíra como sendo resistente e suscetível ao SYSV, respectivamente.

A identificação de resistência a esse vírus foi considerada importante para o estabelecimento de medidas preventivas devido à sua importância potencial para a cultura, gerada pela sua capacidade de provocar perdas significativas em algumas cultivares de soja. Desse modo, a identificação da fonte dessa resistência através do uso de marcadores moleculares poderia permitir um ganho de tempo, prestando uma importante assessoria aos programas de melhoramento direcionados à obtenção de plantas resistentes a doenças. Os alelos de resistência estão sendo identificados, através dos marcadores moleculares, com maior velocidade do que por meio dos métodos convencionais, e têm permitido também a localização precisa do gene no genoma, além do mapeamento e seqüenciamento desses genes.

Considerando os aspectos apresentados, o presente trabalho teve como objetivo utilizar marcadores microsatélite, com os primers *Satt* desenhados a partir do genoma da soja, para a identificação do alelo de resistência ao SYSV na população segregante, oriunda do cruzamento entre as cultivares de soja suscetível e resistente, denominadas Numbaíra e Doko, respectivamente.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Estudo da herança da resistência ao SYSV

Este experimento foi realizado no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, em condições de casa-de-vegetação.

4.1.1 Material genético

Os parentais utilizados para o cruzamento realizado no presente estudo foram as cultivares Doko e Numbaíra, resistente e suscetível ao SYSV, respectivamente. As hibridações foram realizadas em casa-de-vegetação e, para haver coincidência de floração, cada parental foi semeado semanalmente durante um mês. A semeadura foi feita em vasos plásticos de 5 kg, contendo como substrato terra, areia e esterco bovino na proporção de 3:1:1, tendo sido estabelecidas três sementes por vaso. Os cruzamentos artificiais foram realizados diariamente, pela manhã, utilizando-se a cultivar Doko como mãe e a Numbaíra como doadora do pólen, sempre que havia flores adequadas.

Para confirmar se as sementes eram híbridas ou oriundas de autofecundação, foi utilizado como marcador morfológico a cor da flor. Como em soja a flor roxa é dominante sobre a branca e o parental materno possuía flores brancas, todas as plantas oriundas dos cruzamentos deveriam, obrigatoriamente, possuir flores roxas. Deste modo, as plantas F_1 com flores brancas foram eliminadas.

Das sementes F_2 obtidas dos cruzamentos foram retiradas 108, que foram plantadas separadamente. Cerca de 30 dias após a emergência das plantas F_2 coletaram-se, aproximadamente, 3 g de folhas novas de cada planta, que foram armazenadas em freezer a $-72\text{ }^\circ\text{C}$ para posterior extração de DNA.

4.1.2 Avaliação da reação das plantas de soja ao SYSV

Uma semana após a coleta das folhas, as plantas F_2 foram inoculadas mecanicamente com o SYSV e mantidas em casa-de-vegetação para observação dos sintomas. Foi elaborada uma escala diagramática para avaliação das plantas F_2 quanto à resistência e suscetibilidade ao SYSV. A escala (Figura 1) foi constituída pelas seguintes notas:

Nota 1: planta sem sintoma ou com mosaico leve

Nota 2: mosaico e bolhosidade médios

Nota 3: mosaico severo e bolhosidade intensa

Nota 4: necrose leve nas folhas, superbrotamento e bolhosidade intensa

Nota 5: necrose severa dos brotos e nanismo da planta.

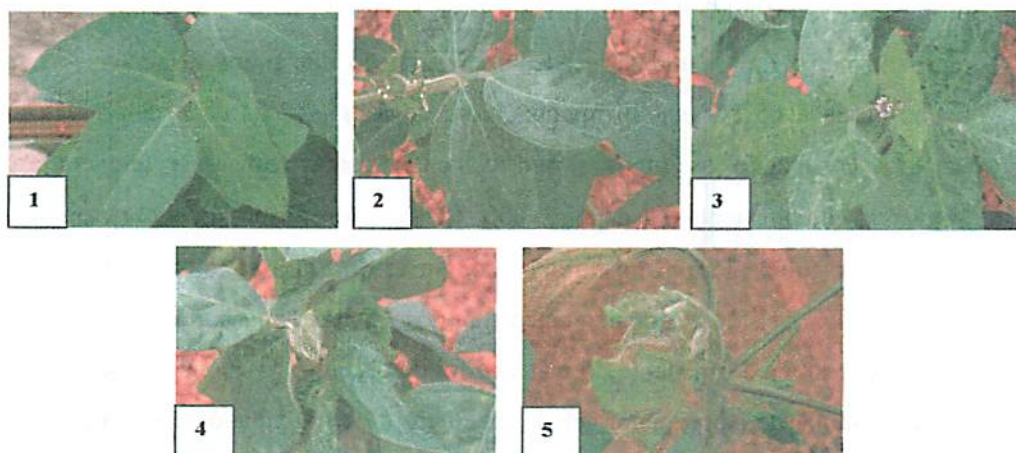


Figura 1. Escala diagramática para avaliação das plantas F_2 . Os números nas fotos correspondem às notas 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente.

Esta escala foi validada por cinco avaliadores antes de seu uso para classificação das plantas como resistentes ou suscetíveis. Foram consideradas suscetíveis todas as plantas que tiveram nota 5 e resistentes, as plantas com nota 1.

4.1.3 Extração de DNA total

A extração do DNA foi feita, a princípio, para as plantas consideradas resistentes e suscetíveis. Realizou-se a extração de DNA segundo Wang (1993): 0,1 g de folhas foram maceradas em nitrogênio líquido, em tubos com capacidade de 1,5 mL, e homogeneizadas com 700 µl do tampão de extração CTAB 2X (2% de CTAB – Cetyltrimethylammonium bromide; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl pH 8.0; 1% PVP e 0,2% de 2-Mercaptoethanol antes do uso). Em seguida procedeu-se a agitação dos tubos e incubação em banho-maria a 65 °C por 30 minutos, com nova agitação a cada dez minutos. Após a incubação os tubos foram colocados para resfriar à temperatura ambiente, adicionando-se, depois, 600 µl de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). Os tubos foram misturados por inversão durante cinco minutos e centrifugados a 14000 rpm por cinco minutos. A fase superior foi transferida para novos tubos e o restante do material foi descartado. Adicionaram-se, então, 2/3 do volume de isopropanol gelado, os quais foram incubados em freezer a – 20 °C por 30 minutos, para precipitação do DNA. Após esse período procedeu-se a centrifugação a 7500 rpm, por cinco minutos, descartou-se o sobrenadante, o precipitado foi lavado duas vezes com 1 mL de etanol 70%, uma vez com etanol absoluto e secado a vácuo. O DNA foi ressuspensão em 50 µl de TE pH 8.0 e quantificado com o auxílio de um fluorímetro (Hoffer Scientific), utilizando-se 2 µl da solução de DNA em 2 mL de tampão (Tris 10 mM; EDTA 1,0 mM; NaCl 0,1 M pH 7,4) acrescidos de 0,1 µl/mL do corante H32258. Após

a quantificação as amostras foram diluídas em TE à concentração de 10 ng/μl, para utilização nas reações de amplificação.

4.1.4. Montagem dos “bulks” segregantes

Foram obtidas 21 plantas F₂ resistentes e 25 suscetíveis, cujos DNAs foram utilizados para a montagem dos “bulks” segregantes (Michelmore, 1991). Os “bulks” foram obtidos misturando-se quantidades iguais de DNA de cada planta, resistentes e suscetíveis, separadamente, constituindo os “bulks” contrastantes.

4.1.5 Reação de PCR utilizando os primers SSR

As reações de amplificação foram realizadas em um termociclador PTC 100 MJ Research, empregando primers de microssatélites (SSR) desenhados a partir do genoma da soja (Cregan, 1999). Foram testados 158 primers (*Satt* 1, 3, 12, 20, 22, 30, 31 a 33, 36, 39 a 46, 50, 52, 55, 62 a 64, 66, 69, 71, 72, 74, 76, 82 a 84, 86 a 97, 99, 100, 103, 106 a 109, 111 a 113, 116 a 123, 125, 132, 134 a 136, 143 a 145, 147 a 155, 158 a 160, 163 a 165, 167 a 170, 174, 175, 177 a 180, 182, 185, 187, 188, 190, 191, 364, 365, 367, 368, 413 a 437, 439 a 463) em reações constituídas por 3 μl de DNA (10 ng/μl); 3 μl de água ultrapura autoclavada; 1 μl de tampão de PCR 10X, 0,3 μl de MgCl₂ (50 mM); 0,52 μl de dNTPs (10 mM); 0,5 μl da *Taq* DNA Polimerase e 1,0 μl de cada primer “forward” e “reverse”, totalizando um volume final de 10,32 μl. O programa utilizado para amplificação foi: 94 °C por 7 minutos, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 50 °C por um minuto, 72 °C por 2 minutos e um ciclo final de 72 °C por 7 minutos.

O produto das ampliações foi analisado em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídeo, e o primer polimórfico nos “bulks” foi utilizado para análise de toda a população F₂.

4.1.6 Análise de dados

Procederam-se as análises de segregação das reações e do marcador na população F₂. As proporções fenotípicas esperadas foram testadas pelo teste χ^2 . Foi realizada a análise de co-segregação do marcador e da reação e testada a independência deles também pelo teste χ^2 . A estimativa da frequência de recombinação entre o marcador e o alelo de resistência foi obtida por meio do método da máxima verossimilhança, utilizando-se o software GQMOL (Cruz e Schuster, 2001). A distância, em cM, entre o marcador e o alelo de resistência, foi calculada pela transformação da frequência de recombinação de acordo com a função de Haldane, em que $cM = [-\ln(1-2r)]/2$, utilizando o mesmo software.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Segregação das plantas F₂ para reação ao SYSV

Dentre as plantas F₂ inoculadas, foram identificadas 21 plantas que reagiram com mosaico leve ou não apresentaram nenhum sintoma (nota 1), 25 plantas com sintomas mais severos (nota 5) e 62 plantas com notas intermediárias (Figura 2). Portanto, a segregação observada nessa geração foi de 1:2:1, caracterizando herança monogênica e dominância incompleta. Nesse caso, as plantas que receberam notas 2, 3 e 4 foram consideradas como sendo heterozigóticas. Conseqüentemente, as proporções fenotípicas obtidas se encontram dentro do esperado, ou seja, 1 resistente: 2 resistência parcial: 1 suscetível. Quando se utilizou o teste Qui-quadrado para comparar os resultados observados e esperados, o valor obtido foi de 2,67 (p= 22,42%), confirmando essa herança monogênica. Sugere-se, então, que o alelo responsável pela resistência seja denominado de *Sysv* e o responsável pela suscetibilidade, *sysv*. Sendo a dominância incompleta, as plantas *Sysv sysv* provavelmente apresentam resistência incompleta.

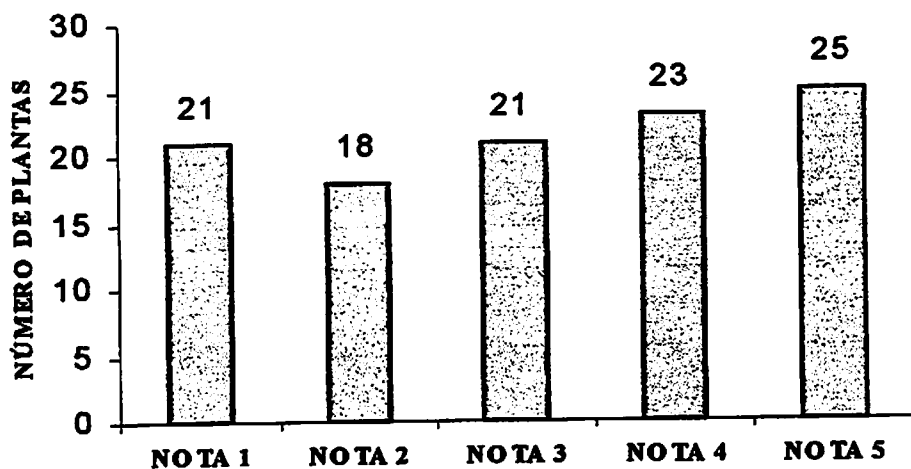


Figura 2. Distribuição das plantas F₂ por escala de notas. Nota 1 (plantas resistentes ao SYSV); notas 2, 3 e 4, plantas classificadas como intermediárias; e nota 5, plantas suscetíveis.

5.2 Identificação do marcador SSR para resistência ao SYSV

Entre os 158 pares de primers desenhados para *Glycine max* (Cregan, 1999) testados nesse trabalho, o denominado *Satt* 418, cuja seqüência é GCG AAA GCA CAT ATG GGT TTG AAT (“forward”) e GCG AGG GCA TAT ATA TGA TG GGT A (“reverse”), permitiu a amplificação de um fragmento de DNA com cerca de 250 pb para o genitor resistente e “bulk” resistente e outro com aproximadamente 220 pb para o genitor suscetível (Figura 3). A banda de 220 pb foi observada também no “bulk” resistente, o que comprova a característica de co-dominância desse tipo de marcador e também que algumas plantas resistentes eram heterozigóticas para o marcador. De fato, quando as plantas resistentes e suscetíveis desses “bulks” foram analisadas individualmente, algumas apresentaram somente a banda de 250 pb, indicando

serem homozigóticas para esse alelo SSR, enquanto outras apresentaram as duas bandas por serem heterozigóticas (Figura 4, Tabela 1). Como a banda de 250 pb ocorreu apenas no “bulk” resistente, constituído pelas plantas com o nível máximo de resistência, provavelmente com o genótipo *Sysv Sysv*, existe uma grande chance de ela estar ligada ao alelo *Sysv*.

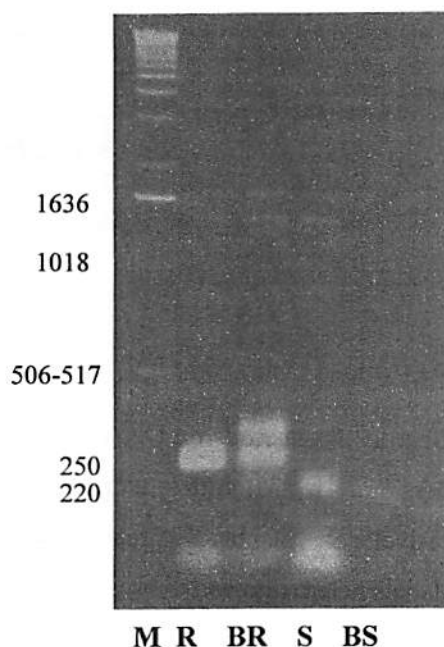


Figura 3. Padrão eletroforético dos fragmentos de DNA amplificados por PCR com o par de primers *Satt 418*. **M:** marcador 1 kb ladder; **R:** resistente; **BR:** “bulk” resistente; **S:** pai suscetível e **BS:** “bulk” suscetível.

Na análise das demais plantas F_2 (notas de 2 a 4), utilizando o primer *Satt 418*, também foram encontradas plantas homozigóticas para os alelos de 250 pb e o de 220 pb e heterozigóticas apresentando os dois alelos (Figura 4, Tabela 1). Esses resultados confirmaram a segregação observada anteriormente

na população F_2 , ou seja, que o mecanismo da herança é do tipo monogênico, com uma interação co-dominante, como seria esperado para este tipo de marcador. Isso o qualifica como marcador genético com potencial para ser utilizado na identificação do alelo *Sysv*.



Figura 4. Padrão eletroforético dos fragmentos de DNA amplificados por PCR com o par de primers *Satt* 418. **M:** 1 kb ladder; **PR:** padrão resistente; **PS:** padrão suscetível; **R:** plantas F_2 resistentes, **S:** plantas F_2 suscetíveis e **H:** plantas heterozigotas.

Considerando simultaneamente a segregação do gene da reação e o loco de microsatélite (Tabela 2), nota-se que os resultados observados não são explicados pelas proporções esperadas, indicando uma independência dos dois locos ($\chi^2 = 2,88$). Portanto, esses locos devem estar ligados, como indicado pelo polimorfismo dos “bulks”.

Tabela 1. Distribuição alélica das plantas F₂ com base na reação da planta ao vírus (nota) e na resposta ao uso do marcador.

Marcador/ Nota	1 (BB)	2,3,4 (Bb)	5 (bb)	FO	FE	χ^2 /prob.(%)
AA (R)	16	13	-	29	27	
Aa (RS)	5	45	3	53	54	
aa (S)	-	4	22	26	27	
FO	21	62	25			
FE	27	54	27			2,99/22,42

Tabela 2. Padrões de segregação das bandas na população F₂ genotipada com o marcador *Satt* 418.

População	Padrões de segregação								
	AABB	AABb	AAbb	AaBB	AaBb	Aabb	aaBB	aaBb	aabb
FO	16	13	0	5	45	3	0	4	22
FE	6,75	13,5	6,75	13,5	27	13,5	6,75	13,5	6,75

Verifica-se que os padrões de segregação apresentaram o esperado quando testadas com o marcador, ou seja, presença da banda polimórfica nas resistentes e ausência nas suscetíveis. Apenas sete plantas dessa população não foram marcadas corretamente, o que corresponde a 12,58% do total. Entretanto, essa marcação incorreta pode também ser relacionada a algum tipo de escape no momento da inoculação mecânica. Esses mesmos padrões de segregação foram observados por diversos autores trabalhando com populações segregantes de soja para obtenção de materiais resistentes ao SMV (Gunduz et al., 2001; Hayes et al., 2000).

Com base nesses resultados, procedeu-se então a estimativa da frequência de recombinação (r) entre o alelo de resistência e o marcador de 250 pb, bem como do respectivo LOD “score” e distância em cM. Considerando que quando somente um marcador genético é testado o ponto de corte de um LOD “score” é de 0,83 (Lander e Botstein, 1989), o resultado da análise dos dados aqui obtidos, que foi de 18,22, é altamente significativo, confirmando que o marcador está realmente ligado ao alelo de resistência.

A frequência de recombinação estimada foi de 12,4%, com desvio padrão de 0,024 (Tabela 3). Mesmo com esta frequência de permuta relativamente alta, esses marcadores não perdem a sua utilidade na avaliação de plantas para resistência a doenças, especialmente porque ele é um marcador codominante. Pode-se assim selecionar, na população segregante, as plantas homozigóticas para o marcador do alelo de resistência, principalmente no caso de vírus, em que o processo de inoculação mecânica é muito estressante para a planta, o que pode acarretar avaliações visuais equivocadas quanto à resistência e à suscetibilidade. Com o uso de um marcador, mesmo com frequência de recombinação mais alta, esses erros da avaliação visual são descartados. Outros autores também têm empregado marcadores em modelos em que a recombinação também é alta. Castanheira et al. (1999) descreveram dois marcadores RAPD, com frequências de recombinação de 0,133 e de 0,115, com boa eficiência para a identificação do gene de resistência à antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) em feijoeiro.

A distância obtida foi de 14,25 cM (Tabela 3), considerada relativamente alta se for considerado que o ideal seria até 5 cM. Entretanto, embora essa distância entre o marcador *Satt* 418 e o alelo *Sysv* seja alta, isso não diminui a sua utilidade, como já foi mencionado, pois selecionando-se somente as plantas homozigóticas para o marcador em uma população F_2 por exemplo, consegue-se identificar 98,46% das plantas resistentes.

Diversos autores já obtiveram marcadores com distâncias acima de 5 cM e mesmo assim esse material foi usado com sucesso em programas de melhoramento. Silva et al. (2003) identificaram marcadores em uma população segregante de feijão. Esses marcadores situavam-se a distâncias de 7,6 cM ($r = 7,08$) para um SSR e de 24,4 cM ($r = 19,2$) para um marcador RAPD do alelo de resistência à mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*).

Como a tendência geralmente é de encontrar um marcador localizado o mais próximo possível do alelo de resistência, a região situada entre o alelo de resistência ao SYSV e o marcador *Satt* 418 poderá ser futuramente mapeada, buscando outros marcadores com distâncias menores. Gore et al. (2002) identificaram 20 marcadores RFLP, RAPD e SSR em uma região ao redor dos genes *Rsv1* e *Rpv1*, correspondente a apenas 6,8 cM. Yu et al. (1993) encontraram marcadores SSR e RFLP fortemente ligados ao gene *Rsv* a distâncias de 0,5 a 2,1 cM. Mais recentemente, Zheng et al. (2003) encontraram um marcador RAPD a uma distância de 3,73 cM deste mesmo gene. Do mesmo modo, outros marcadores mais próximos ao *Sysv* poderão também ser encontrados.

Tabela 3. Frequência de recombinação (r) entre o alelo de resistência e o marcador *Satt* 418 e respectiva distância de Haldane (cM), LOD “score” e desvio padrão.

Marcador	Distância (cM)	r (%)	LOD “score”	Desvio padrão
<i>Satt</i> 418	14,25	12,4	18,22	0,024

6 CONCLUSÕES

6.1 O marcador *Satt 418* está ligado ao alelo de resistência *Sysv* a uma distância de 14,25 cM.

6.2 O fragmento gerado pelo microssatélite constitui um bom marcador para ser utilizado em programas de melhoramento.

6.3 A herança da resistência ao *Soybean yellow shoot virus* em plantas de soja é do tipo monogênica com dominância incompleta.

6.4 O marcador *Satt 418*, apesar de estar situado a 14,25 cM do alelo de resistência *Sysv*, demonstrou uma boa eficiência para a identificação das plantas de soja resistentes ao *Soybean yellow shoot virus*, por ser um marcador codominante.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL – Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2004. 496 p.

ALLARD, R. W. Formulas and tables to facilitate the calculation of recombination values in heredity. *Hilgardia*, Berkeley, v. 24, n. 10, p. 235-278, Jan. 1956.

ALMEIDA, A. M. R.; MARIN, S. R. R.; VALENTIN, N. et al. Necrose das haste: uma nova virose da soja no Brasil. Londrina – PR, 2002. (Circular Técnica, 36).

CASTANHEIRA, A. L. M.; SANTOS, J. B.; FERREIRA, D. F.; MELO, L. C. Identification of common bean alleles resistant to anthracnose using RAPD. *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v. 22, n. 4, p. 565-569, Dec. 1999.

CREGAN, P.; JARVIK, T.; BUSH, A. L.; SHOCNAKER, R. C.; LARK, K. G.; KAHLER, A. L.; NAYA, N. J. An integrated genetic linkage map of the soybean. *Crop Science*, Madison, v. 39, n. 5, p. 1464-1490, Sept./Oct. 1999.

CRUZ, C. D.; SCHUSTER, I. GQMOL: Programa para análise de genética quantitativa molecular. Desenvolvido pelo setor de Genética da Universidade Federal de Viçosa. 2001.

DESLANDES, J. A.; COSTA, A. S.; FIGUEIRA, A. R.; VEGA, J. Amarelo do broto da soja causado por *Potyvirus* diferente do mosaico comum, registrado em

Minas Gerais. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, v. 10, n. 1, p. 25-26, jan./mar. 1984.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.

FIGUEIRA, A. R.; REIS, C. H.; DESLANDES, J. A. Suscetibilidade de cultivares de soja ao Vírus do amarelo do broto (VABS). *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 11, n. 2, p. 373, jun. 1986.

GORE, M. A.; HAYES, S. C.; JEONG, Y. G.; YUE, YL. G.; BUSS, G. R.; MAROOF, M. A. S. Mapping tightly linked genes controlling potyvirus infection at the Rsv1 e Rpv1 region on soybean. *Genome*, Ottawa, v. 45, n. 3, p. 592-599, June 2002.

GUNDUZ, I.; BUSS, G. R.; MA, G.; CHEN, P.; TOLIN, S. A. Genetic analysis of resistance to Soybean mosaic virus in OX670 and Harosoy soybean. *Crop Science*, Madison, v. 41, n. 6, p. 1785-1791, Nov./Dec. 2001.

HAYES, A. J.; SAGHAI MAROOF, M. A. Target resistance gene mapping in soybean using modified AFLPs. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 100, n. 5, p. 1279-1283, Sept. 2000.

LANDER, E. S.; BOTSTEIN, D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics*, Berlin, v. 121, n.1, p. 185-199, Jan. 1989.

MICHELMORE, R. W.; PARAN, I.; KESSELL, R. V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proceedings of National Academy Science of the United States of America**, Washington, v. 88, n. 21, p. 9828-9832, Nov. 1991.

SANTOS, R. C. **Caracterização parcial de um novo *Potyvirus* detectado em *Glycine max* L. (Merrill)**. 2000. 64 p. Tese (Mestrado) – Universidade federal de Lavras, Lavras, MG.

SILVA, G. F.; SANTOS, J. B.; RAMALHO, M. A. P. Identification of SSR and RAPD markers linked to a resistance allele for angular leaf spot in the common bean (*Phaseolus vulgaris*) line ESAL 550. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 26, n. 4, p. 459-463, Dec. 2003.

WANG, H.; QI, M. Q.; CUTLER, A. J. A simple method of preparing plant samples for PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 21, n. 17, p. 4153-4154, Aug. 1993.

YU, Y. G.; SAGHAI MAROOF, M. A.; BUSS, G. R.; MAUGHAN, P. J.; TOLIN, S. A. RFLP and microsatellite mapping of a gene for soybean mosaic virus resistance. **Phytopathology**, St. Paul, v. 84, n. 1, p. 60-64, Jan. 1993.

ZHENG, C.; CHANG, R.; QIU, L.; CHEN, P. Y.; WU, X.; CHEN, S. Y. Identification and characterization of a RAPS/SCRA marker linked to a resistance gene for Soybean mosaic virus in soybean. **Euphytica**, Wageningen, v. 132, n. 2, p. 199-210, July 2003.