

WILLIAN HYTALO LÜDKE

ASSOCIAÇÃO GENÔMICA PARA RESISTÊNCIA PARCIAL DE SOJA À
Phytophthora sojae

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

L944a Lüdke, Willian Hytalo, 1991-
2015 Associação genômica para resistência parcial de soja à
Phytophthora sojae / Willian Hytalo Lüdke. – Viçosa, MG,
2015.
x, 23f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Felipe Lopes da Silva.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.19-23.

1. Soja - Doenças e pragas. 2. Resistência a doenças e
pragas. 3. *Phytophthora sojae*. 4. Marcadores genéticos.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitotecnia.
Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento.
II. Título.

CDD 22. ed. 633.34

WILLIAN HYTALO LÜDKE

ASSOCIAÇÃO GENÔMICA PARA RESISTÊNCIA PARCIAL DE SOJA À
Phytophthora sojae

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADO:

Ivan Schuster
(Coorientador)

Tatiane Dalla Nora Montecelli
(Coorientadora)

Fabiane Lazzari

Felipe Lopes da Silva
(Orientador)

Aos meus pais Eloir Lüdke e Valdete Camargo da Cruz Lüdke
À minha irmã Schelly Kyary Lüdke
À toda minha família e amigos
Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus por ser a base de tudo em minha vida e por sempre me guiar pelos melhores caminhos;

Aos meus pais, Eloir e Valdete, por todo o amor recebido e por toda educação e ensinamentos morais nos quais eu me espelho para alcançar meus objetivos, vocês são os verdadeiros MESTRES!

À minha irmã Schelly, meus sobrinhos Matheus e Murilo e meu cunhado Leandro, por sempre me apoiarem em todos os desafios;

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), ao Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento e todo seu corpo docente e quadro de funcionários, pelo excelente ensino ofertado, sendo este, público, gratuito e de qualidade inigualável.

À COODETEC, pela disponibilidade de uso da excelente infraestrutura para desenvolvimento das atividades práticas das atividades de mestrado.

Ao meu orientador e amigo Felipe Lopes da Silva, pelo constante apoio, conselhos, incentivos e pelas horas de conversa, nas quais aprendi a me espelhar em seu exemplo pessoal e profissional.

Aos meus coorientadores, Ivan Schuster e Tatiane Dalla Nora Montecelli, por terem me recebido na COODETEC e aberto, além das portas da empresa, a minha visão ao fascinante mundo da pesquisa científica.

Ao meu coorientador Aluizio de Oliveira Borém, que me recebeu na UFV de braços abertos, com imenso carisma e humildade, me apoiando constantemente no decorrer da elaboração desta dissertação.

À pesquisadora Fabiane Lazzari, pela prestatividade no esclarecimento de minhas dúvidas e pelas valiosas dicas para melhorar este trabalho

Aos meus amigos Michelli Possobom, Ricardo Cabral, Rafael Tassinari Rezende, Fagner Souto Dias e Diego Santos, que são irmãos de coração que ganhei nesta jornada.

Aos amigos do Programa Soja, pelo alegre convívio no laboratório e constante aprendizado.

Aos amigos da COODETEC, em especial aos colegas dos setores de Fitopatologia e Biotecnologia, que contribuíram muito para a condução das atividades, pela troca de ideias para a dissertação e pela ótima convivência.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES),
pela concessão dos auxílios financeiros.

BIOGRAFIA

WILLIAN HYTALO LUDKE, filho de Eloir Lüdke e Valdete Camargo da Cruz Lüdke, nasceu no dia 17 de fevereiro de 1991 em Cascavel, Paraná.

Cursou Primeiro Grau no Colégio Harpa e conclui o Segundo Graúdo no Colégio Alfa, em Cascavel, Paraná.

Em setembro de 2009 ingressou na Universidade Federal de Santa Maria, recebendo o título de Engenheiro Agrônomo em Agosto de 2014.

Em agosto de 2014, iniciou o Curso de Mestrado em Genética e Melhoramento, na Universidade Federal de Viçosa, defendendo a dissertação para obtenção do título de “*Magister Scientie*” em 10 de agosto de 2014.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMO	ix
INTRODUÇÃO	1
MATERIAL E MÉTODOS.....	6
Material genético	6
Extração de DNA.....	6
Genotipagem de SNPs	7
Fenotipagem para resistência parcial à podridão radicular de fitóftora	8
Associação genômica	9
RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
CONCLUSÕES	18
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Genes associados à resistência de diferentes raças fisiológicas de <i>Phytophthora sojae</i>	15
Tabela 2. Cultivares de soja utilizadas na associação genômica para resistência parcial à <i>Phytophthora sojae</i>	18
Tabela 3. Escala de notas para avaliação do sistema radicular de soja quanto à infecção de <i>P. sojae</i> , proposta por Dorrance et al. (2003)	20
Tabela 4. Classificação de reação para avaliação de resistência parcial a podridão radicular de fitóftora, proposta por Dorrance et al. (2003)	20
Tabela 5. Marcadores candidatos associados à resistência parcial à podridão radicular de fitóftora de acordo com a análise de Modelos Lineares Mistos	25
Tabela 6. Marcadores candidatos associados à resistência parcial a <i>P. sojae</i> de acordo com a análise de regressão múltipla pelo modelo de <i>stepwise</i>	26

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição das frequências de reações das 68 cultivares de soja à <i>Phytophthora sojae</i>	23
Figura 2. Distribuição gráfica dos valores de $-\text{Log}_{10}$ (valor de p) dos marcadores SNPs nos 20 cromossomos da soja	26

RESUMO

LUDKE, Willian Hytalo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2015. **ASSOCIAÇÃO GENÔMICA PARA RESISTÊNCIA PARCIAL DE SOJA À *Phytophthora sojae***. Orientador: Felipe Lopes da Silva. Coorientadores: Ivan Schuster, Tatiane Dalla Nora Montecelli e Aluizio Borém de Oliveira.

A podridão radicular de fitóftora (PRF) é uma das doenças mais agressivas para a cultura da soja, causando danos que podem levar a morte das plantas. O uso de cultivares resistentes é a principal estratégia para redução das perdas causadas por *Phytophthora sojae*. Por este motivo, estudos de identificação de genes e QTLs (*Quantitative Trait Loci*) associados à resistência parcial à PRF e associação de marcadores moleculares ligados à estes são de extrema importância. Neste trabalho foi realizada a genotipagem ampla de 68 cultivares de soja utilizando 5353 marcadores SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*), objetivando encontrar marcadores associados a resistência parcial de soja à *Phytophthora sojae* através de metodologias de genética de associação. Como resultado, neste trabalho foram localizados via metodologia de modelos lineares mistos (MLM) 23 marcadores candidatos associados à resistência parcial à PRF, dispostos em 9 cromossomos e, dentre estes marcadores, destacou-se o Gm16_29528259_T_C, por ser o com maior valor de associação ($-\log_{10}(p)=2,9175$) e os marcadores Gm05_8656389_T_C e Gm05_8695812_A_G, que apresentaram os maiores valores de r^3 (0,18769), explicando, individualmente, 18,769% da variação fenotípica. Via metodologia de *stepwise* foram localizados 5 marcadores candidatos associados à resistência parcial à PRF (Gm10_37469103_C_A, Gm07_5417760_T_C, Gm11_37106045_C_T, Gm09_41620640_G_T e Gm09_45586982_T_C), dispostos em 4 cromossomos. Estes marcadores juntos obtiveram alto valor de r^2 (0,6884), explicando 68,84% da variação fenotípica. Os marcadores SNPs associados à resistência parcial à podridão radicular de fitóftora estão distribuídos em dez grupos de ligação, sendo que, os grupos O, M, B1, A1 e A2, ainda não foram descritos como portadores de regiões controladoras da resistência. Os marcadores candidatos associados à resistência parcial à PRF localizados neste trabalho, após devidamente validados, podem ser utilizados para estabelecer um eficiente programa de seleção assistida por marcadores moleculares para resistência parcial de soja à PRF.

ABSTRACT

LUDKE, Willian Hytalo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2015. **GENOMIC ASSOCIATION FOR PARTIAL RESISTANCE TO *Phytophthora soja* IN SOYBEAN.** Adviser: Felipe Lopes da Silva. Co-advisers: Ivan Schuster, Tatiane Dalla Nora Montecelli and Aluizio Borém de Oliveira.

Phytophthora root and stem rot (PRSR) is one of the most aggressive diseases for the soybean crop, causing damage that can cause plant death. The uses of resistant cultivars is the main strategy to reduce losses cause by *Phytophthora sojae*. For this reason, studies for identifying genes or QTLs (*Quantitative Trait Loci*) associated with the partial resistance between this disease and the association of molecular markers linked to these genes or QTLs are paramount. In this research was carried out wide genotyping of 68 soybean cultivars using 5353 SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) markers. The objective of this research was to identify markers associated with partial resistance to *Phytophthora sojae*, in soybeans through genetic screening methodology. Were located in the mixed linear models (MLM) methodology 23 candidate markers associated with partial resistance to PRSR, arranged on 9 chromosomes. The SNP Gm16_29528259_T_C stands out for being the higher value of association ($-\log_{10}(p)=2,9175$), the SNPs Gm05_8656389_T_C and Gm05_8695812_A_G showed the highest r^2 values (0,18769), explained individually 18,769% of the phenotypic variation. Using stepwise methodology 5 markers associated with partial resistance to PRST were located (Gm10_37469103_C_A, Gm07_5417760_T_C, Gm11_37106045_C_T, Gm09_41620640_G_T and Gm09_45586982_T_C), arranged on four chromosomes. These markers together achieve high r^2 value (0,6884), explaining 68,84% of the phenotypic variation. SNPs markers associated with partial resistance to PRSR are spread in ten linkage groups, wherein then groups O, F, B1, A1 and A2 have not been described as having the resistance controlling regions. The candidates markers associated with partial resistance to PRSR located in this research, after being properly validated, can be used to establish and effective marker-assisted selection (MAS) program for partial resistance to PRSR in soybean.

INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma das espécies de maior destaque no cenário mundial de *commodities* agrícolas, sendo considerada uma das principais fontes de proteína e óleo vegetal. A previsão da área plantada de soja no Brasil para a safra de 2015/2016 é de 33 milhões de hectares, com uma produção de 97 milhões de toneladas, ficando atrás apenas dos Estados Unidos da América, que apresenta uma área 33,79 milhões de hectares destinada à cultura da soja e com previsão de produzir 105,732 milhões de toneladas nessa mesma safra (USDA, 2015).

Em condições de campo, diversos fatores afetam a produtividade das culturas agrícolas, sendo estes fatores relacionados a estresses abióticos e bióticos. Em relação aos fatores bióticos, atenção especial tem sido dada aos estresses causados por plantas daninhas, insetos praga, nematoides, oomicetos e doenças bacterianas, fúngicas e virais (FRITSCHÉ-NETO & BORÉM, 2012). Especificamente para a soja, estima-se que anualmente 15% a 20% da perda de produção se dá em virtude da ocorrência de doenças (EMBRAPA, 2013). No Brasil foram identificadas 46 doenças que causam danos à soja, sendo: 32 doenças fúngicas, quatro doenças bacterianas, quatro doenças causadas por vírus e seis doenças causadas por nematoides.

As doenças mais comuns para a cultura da soja e que apresentam maior importância econômica são: ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*), oídio (*Microsphaera diffusa*), mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*), mancha purpura (*Cercospora kikuchii*), mancha alvo (*Corynespora cassiicola*), mancha olho-de-rã (*Passalora sojae*), antracnose (*Colletotrichum truncatum*), podridão de carvão (*Macrophomina phaseolina*), nematoides (*Meloidogyne* spp., *Heterodera glycines*, *Rotylenchulus reniformis*, *Pratylenchus brachyurus*) e podridão radicular de fitóftora (*Phytophthora sojae*) (EMBRAPA, 2013; HENNING, 2009; MATSUO et al., 2012).

A podridão radicular de fitóftora (PRF) é uma doença extremamente agressiva, sendo responsável por perdas, em escala global, na casa de dois bilhões de dólares anuais em virtude dos seus danos, que podem causar desde acentuada redução na produção de grãos até a morte da planta (TYLER, 2007). Seu agente causal foi classificado por Kaufmann & Gerdemann (1958) e a taxonomia do gênero *Phytophthora* permanece controversa (COSTAMILAN, et al., 2007), mesmo seu patógeno não sendo classificado como fungo, comumente encontra-se na literatura

citações de que PRF é uma doença fúngica, pois apresenta uma série de semelhanças quanto a biologia, fisiologia e morfologia dos fungos (COSTAMILAN, 2001).

Schmitthenner (1985) relatou que a PRF é uma doença monocíclica, em que os oósporos (esporos sexuados com paredes espessas e lisas) podem permanecer dormentes durante vários anos no solo ou em restos culturais. Posteriormente, há formação dos esporângios que, com a saturação do solo por água, liberam zoósporos (estrutura que apresenta um flagelo anterior e outro posterior), que se locomovem até as raízes através de quimiotactismo, sendo atraídos pelos isoflavonóides genisteína e daidzeína e, ao encontrarem o tecido vegetal, realizam a fixação, encistam, germinam e penetram na planta, infectando-a e causando a doença.

Costamilan et al. (2007) relataram que a doença é favorecida em condições ambientais específicas, como água disponível no solo, comum em solos argilosos e compactados, em situações de prolongado períodos de saturação de umidade, assim como em temperaturas iguais ou superiores a 25°C. Os sintomas da doença podem ser expressados em qualquer fase de desenvolvimento das plantas de soja. Na fase inicial da cultura, ocorre o apodrecimento das sementes ou flacidez nas radículas, avançando até o nó cotiledonar; na emissão do primeiro trifólio a extremidade da raiz principal apresenta maior flacidez e também descoloração, que estende-se até o cotilédono; e em estádios mais avançados de desenvolvimento, a gravidade dos sintomas depende do grau de suscetibilidade ou resistência da planta.

Dentre as medidas de controle, pode-se utilizar fungicidas (ANDERSON & BUZZELL, 1982), técnicas de drenagem do solo (SCHMITTHENNER, 1985), correção do solo com compostos de cálcio (SUGIMOTO, 2010) e cultivares resistentes (DORRANCE et al., 2003). A resistência genética é a estratégia mais utilizada contra a doença, podendo esta ser completa (resistência à raça específica) ou parcial. A resistência completa se dá através da ação monogênica de certos genes *Rps*, contudo, devido a ampla gama de raças patogênicas existentes, a resistência completa torna-se limitada em áreas infestadas de múltiplas raças do patógeno. Neste sentido, a resistência parcial se torna mais eficiente por possuir amplo potencial de restringir a capacidade de colonização do patógeno no tecido vegetal.

De acordo com Tooley & Grau (1984), a resistência parcial, reduz em nível de campo, o progresso da doença, a taxa de infecção e a incidência em plantas em diferentes estádios de crescimento. As cultivares com resistência parcial podem

desenvolver PRF, contudo, seus danos são limitados em relação à materiais suscetíveis, com isso, tornou-se uma grande alternativa de manejo para a doença, visto que não impõe grande pressão de seleção sobre o patógeno.

Atualmente são conhecidos 14 genes, que, na presença de alelos dominantes e expressando-se através de reação hipersensitiva de gliceolina (KASUGA *et al.*, 1997), conferem resistência à PRF, sendo eles: *Rps1a*, *Rps1b*, *Rps1c*, *Rps1d*, *Rps1k* (BERNARD *et al.*, 1957; BUZZELL & ANDERSON, 1992; MUELLER *et al.*, 1978), *Rps2* (KILEN *et al.*, 1974), *Rps3a*, *Rps3b*, *Rps3c* (MUELLER *et al.*, 1978; PLOPER *et al.*, 1985), *Rps4* (ATHOW *et al.*, 1980), *Rps5* (BUZZELL & ANDERSON, 1981), *Rps6* (ATHOW & LAVIOLETTE, 1982), *Rps7* (ANDERSON & BUZZELL, 1992) e *Rps8* (GORDON *et al.*, 2006; SANDHU *et al.*, 2005).

Segundo Verneti & Verneti Jr. (2009), são conhecidas atualmente 55 raças fisiológicas de *P. sojae*, com diferentes capacidades patogênicas, onde os genes que conferem resistência à algumas dessas raças são descritos na Tabela 1. De acordo com Schmitthenner (1985), muito embora exista grande variabilidade genética do patógeno, um único gene de resistência pode proporcionar um efetivo manejo da doença, podendo ser eficaz, dependendo do ambiente, por oito a quinze anos. Contudo, a piramidação de diferentes genes *Rps*, caracterizando resistência parcial, reduz o progresso da doença, retardando a penetração, colonização e multiplicação nos tecidos, fazendo com que a quebra de resistência seja dificultada (DORRANCE & ST. MARTIN, 2000), sendo mais durável que a resistência completa (DORRANCE, et al., 2003).

As pesquisas que abordam a identificação de QTLs que estejam relacionados à resistência parcial de soja à PRF são relativamente recentes em relação aos estudos de mapeamento de genes para resistência parcial. Contudo, com a evolução dos marcadores moleculares e das plataformas de genotipagem, que são cada vez mais eficientes e com menor custo, somados ao conhecimento do controle genético da característica, existe a necessidade da identificação de novos QTLs associados à resistência parcial à PRF e, conseqüentemente, da validação destes, para que os mesmos possam ser explorados em programas de seleção assistida por marcadores (SAM).

Tabela 1. Genes associados à resistência de diferentes raças fisiológicas de *Phytophthora sojae*.

Genes	Raças fisiológicas
<i>Rps1a</i>	1, 2, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 24, 26 e 27
<i>Rps1b</i>	1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 13, 15, 18, 21 e 22
<i>Rps1c</i>	1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 17, 21, 23, 24 e 26
<i>Rps1d</i>	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 18, 21, 22, 24 e 25
<i>Rps1k</i>	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 17, 18, 21, 22, 24 e 26
<i>Rps2</i>	1, 2, 10 e 12
<i>Rps3a</i>	1, 2, 3, 4, 5, 8, 9, 11, 13, 14, 16, 18, 23 e 25
<i>Rps3b</i>	1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 11, 12 e 16
<i>Rps3c</i>	1, 2, 3, 4, 12 e 13
<i>Rps4</i>	1, 2, 3, 4, 10, 12, 13, 14, 15 e 16
<i>Rps5</i>	1, 2, 3, 4, 5, 8, 9, 11, 13, 14 e 16
<i>Rps6</i>	1, 2, 3, 4, 10, 12, 14, 15, 16, 18, 19, 20 e 21
<i>Rps7</i>	12, 16, 18 e 19
<i>Rps8</i>	Não apresenta informações sobre raças

Neste sentido, devido à resistência parcial se comportar como uma característica poligênica, o estudo da associação genômica ampla (*Genome Wide Association Studies*– GWAS) pode ser utilizado como ferramenta para a identificação de marcadores associados aos genes ou *Quantitative Trait Loci* (QTLs) sabidamente relacionados à resistência à PRF e/ou identificar marcadores associados à novos genes ou QTLs que também estão relacionados à resistência. Em ambos os casos, após a validação dos marcadores identificados, os mesmos podem ser utilizados em programas de seleção assistida por marcadores.

Alguns trabalhos foram realizados visando localizar QTLs, via análise de mapa de ligação, para resistência parcial à PRF em soja. Burnham et al. (2003), utilizando marcadores microssatélites (SSR – *Single Sequence Repeats*) encontraram QTLs para resistência parcial à PRF nos grupos de ligação F e D1b, explicando no máximo 35 a 20,7% da variação fenotípica, respectivamente. Wang et al. (2010), utilizando marcadores microssatélites e SNPs em 186 RILs (*Recombinant Inbred Lines*) provindas de cruzamento entre as cultivares Conrad (resistente) e Sloan (Suscetível), encontraram QTLs localizados nos grupos de ligação H, F, B2, D2 e L. Tucker et al. (2010), utilizando marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e microssatélites em 298 RILs provindas de um cruzamento interespecífico entre a cultivar V71-370 (moderadamente resistente) e o acesso PI407162 (espécie *Glycine*

soja), que possui baixo nível de resistência, encontraram QTLs localizados nos grupos de ligação J, I, G e F, explicando 42%, 12%, 11% e 7% da variação fenotípica, respectivamente. Lee et al. (2014), utilizando marcadores microssatélites em 705 RILs provindas de diversos cruzamentos entre genótipos resistentes e suscetíveis, encontraram um QTL em cada um dos grupos de ligação D1a, N, C1, K, H, F, B2, J e G, explicando de 10 a 45% da variação fenotípica.

A GWAS contempla o estudo de genes e QTLs baseados em análise de ligação e desequilíbrio de ligação (RESENDE et al., 2014) e os marcadores moleculares mais utilizados são os do tipo SNP (*Single Nucleotide Polymorphism* – Polimorfismo de base única). Os SNPs são a forma mais abundante de variação do DNA em genomas, visto que se baseiam na variação de sequências de DNA pela mudança de uma única base em posição específica do genoma. Além disso, são preferidos em relação à outros marcadores devido a sua baixa taxa de mutação e facilidade de genotipagem, somados ao baixo custo, são marcadores co-dominantes, bialélicos, abundantes e com alta transferibilidade entre indivíduos e espécies (RESENDE et al., 2013).

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi utilizar a metodologia de genética de associação, GWAS, para identificação de marcadores SNPs relacionados à resistência parcial à podridão radicular de fitóftora em soja.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Centro de Pesquisas Elói Gomes, da COODETEC – Desenvolvimento, produção e comercialização agrícola Ltda, no município de Cascavel – Paraná.

Material genético

Na condução dos experimentos, foram utilizadas 68 cultivares (Tabela 2), algumas delas históricas e de grande expressão na sojicultura nacional e outras mais recentes e recomendadas para cultivo, com isso, são cultivares de diferentes épocas e empresas, com potencial para serem utilizadas em hibridações nos programas de melhoramento genético da soja.

Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada de acordo com protocolo descrito por McDonald et al. (1994), com algumas modificações.

Sementes de cada genótipo foram moídas e 50 mg do material foi colocado em microtubos com capacidade de 1,5 mL. Posteriormente, adicionou-se 500 µL de tampão de extração contendo 0,1 M Tris HCl (pH 7,5), 5 M EDTA, 5M NaCl e SDS 10%. Para uma maceração mais precisa e homogênea, foi adicionada uma esfera de vidro com diâmetro de 3 mm em cada microtubo, que foram submetidos à agitação em Tissue Lyzer (Qiagen) durante 2 minutos. Após agitação, foram adicionados mais 500 µL de tampão de extração, seguido de centrifugação à 18.000 giros, durante 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, onde foi adicionado 10 µL de proteinase K (10 mg.mL⁻¹) para remoção das proteínas. As amostras foram colocadas em banho-maria à 37°C durante 30 minutos. Para precipitar o DNA, foram adicionados 500 µL de isopropanol gelado (~2,5°C) e após 2 minutos de repouso, as amostras foram centrifugadas à 18.000 giros durante 15 minutos. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi mantido à temperatura ambiente durante 15 minutos para secagem. Para eliminar o RNA, o precipitado foi ressuspenso com 300 µL de TE (Tris HCl pH 7,5 e 5 M EDTA) contendo 40 µg.µL⁻¹ de RNase (10 mg.mL⁻¹) em banho-maria, precipitando DNA. Novamente a amostra foi centrifugada com posterior descarte do sobrenadante e ressusensão do

precipitado com TE. Por fim, foi determinada a concentração de DNA de cada amostra através de absorvância à 250nm em espectrofotômetro Nanodrop 1000, sendo cada unidade de absorvância correspondente à concentração de 50 µg.mL⁻¹ de DNA de fita dupla (SAMBROOK et al., 1989).

Tabela 2. Cultivares de soja utilizadas na associação genômica para resistência parcial à *Phytophthora sojae*.

CULTIVARES		
5D660RR	CD 205	FMT MATRINXÃ
5D688RR	CD 206	FT-ESTRELA
5D690RR	CD 208	FT-GUAIRA
5D711RR	CD 215	M6707RR
5G830RR	CD 218	M7211RR
BMX APOLLO RR	CD 219 RR	MG/BR (GARIMPO RCH)
BMX MAGNA RR	CD 221	MSOY 2001
BMX TITAN RR	CD 224	MSOY 8001
BRS 133	CD 228	NIDERA A4725RG
BRS 184	CD 231 RR	OCEPAR14
BRS 185	CD 234 RR	OCEPAR3 PRIMAVERA
BRS 243 RR	CD 237 RR	R7
BRS 246 RR	CD 238 RR	SPRING53
BRS 256 RR	CD 243 RR	TMG 103RR
BRS 259	CD 248 RR	TMG 1066RR
BRS 268	CD 249RR STS	TMG 1067RR
BRS 282	CD 252	TMG 115RR
BRS 284	CD 254 RR	TMG 4001RR
BRSMG LIDERANCA	CD 2630 RR	TMG 7161RR
BRSMG RENASCENCA	CD 2737 RR	TROPICAL RR
BRSMS LAMBARI	CD FAPA 220	USP1
CAC 1	EMBRAPA 1 (IAS 5-RC)	VENCEDORA
CD 201	EMBRAPA 59	-

Genotipagem de SNPs

A genotipagem foi realizada na Deoxi Biotecnologia Ltda, em Araçatuba/SP, utilizando-se a plataforma Illumina *iScan* e o painel *Infinium iSelect HD Custom Genotyping BeadChips* 6k (Illumina, Inc,m San Diego, CA, USA), customizado para soja com 24 amostras por BeadChip. Foi realizada a aquisição de oito BeadChips contendo 6.000 assays (SNPs) por amostra. A genotipagem foi realizada de acordo com protocolo descrito pela fabricante (ILLUMINA, 2015). Conforme descrito por

Adler et al. (2013), o procedimento de genotipagem consiste em seis etapas principais, sendo elas: amplificação, fragmentação, hibridização, extensão de base única, coloração e visualização de imagens.

Fenotipagem para resistência parcial à podridão radicular de fitóftora

Para a fenotipagem, o inóculo de *P. sojae* utilizado foi obtido de uma área infestada no município de Coxilha/RS em março de 2009, com a fórmula de virulência 1d, 2, 5, 6 e 7. O inóculo de *P. sojae* foi multiplicado em placas de Petri com meio de cultura ágar-V8 contendo 40mL de suco V8[®], 20g de ágar, 0,6g de carbonato de cálcio, 0,2g de extrato de levedura e 1g de sacarose, que foram misturados e diluídos em 1 litro de água destilada e incubado à temperatura de 25°C±1°C durante 14 dias.

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições com inóculo e uma sem inóculo e unidade experimental constituída por um copo plástico de 500 ml e 15 sementes por copo. A repetição sem inóculo foi utilizada como testemunha, para observar o comportamento das cultivares na ausência de inoculação.

Em pré-semeadura, realizou-se a desinfestação das sementes, o substrato utilizado foi composto de vermiculita e areia na proporção 2:1, a areia foi lavada em água corrente para remoção de impurezas e a esterilização da areia e vermiculita foi realizada em estufa à 100°C.

A inoculação ocorreu no mesmo momento da semeadura, utilizando-se o método da camada de micélio (SCHMITTHENNER & BHAT, 1994). Para isso foram depositadas, em cada copo e na seguinte ordem, uma camada de 2cm de substrato, o meio de cultura com inóculo de *P. sojae* e sobre este, uma camada de 5cm de substrato, onde foram semeadas 15 sementes que foram cobertas com uma última camada de 2cm de vermiculita.

A fenotipagem foi realizada 21 dias após a semeadura, retirando-se as plantas do substrato, lavando-as em água corrente e avaliando-se as raízes de acordo com escala e classificação propostas por Dorrance et al. (2003), seguindo a escala de notas para avaliação do sistema radicular (Tabela 3) e a classificação de reação para avaliação de resistência parcial à podridão radicular de fitóftora (Tabela 4).

Tabela 3. Escala de notas para avaliação do sistema radicular de soja quanto à infecção de *P. sojae*, proposta por Dorrance et al. (2003).

Notas	Descrição
1,0	Sem podridão na raiz
2,0	Traços de podridão na raiz
3,0	Podridão no terço inferior da raiz
4,0	Podridão nos dois terços inferiores da raiz
5,0	Toda raiz podre e 10% de plântulas mortas
6,0	Toda raiz podre e 50% de plântulas mortas
7,0	Toda raiz podre e 75% de plântulas mortas
8,0	Toda raiz podre e 90% de plântulas mortas
9,0	Todas as plântulas mortas

Tabela 4. Classificação de reação para avaliação de resistência parcial a podridão radicular de fitóftora, proposta por Dorrance et al. (2003).

Notas	Classificação
1,0 a 4,0	Alta resistência parcial
4,1 a 5,0	Moderada resistência parcial
5,1 a 6,0	Moderada suscetibilidade
6,1 a 9,0	Alta suscetibilidade

Associação genômica

Para as análises de associação, locos com genótipo heterozigoto para os SNPs foram considerados dados perdidos, foram utilizados apenas marcadores SNPs com menos de 10% de dados perdidos (*Call Rate* igual a 90%) e cuja frequência do alelo menos frequente, MAF (*Minor allele frequency*) fosse maior do que 5%.

O *Call rate* (taxa de atendimento) é uma medida utilizada para eliminar SNPs com grande quantidade de dados perdidos, calculada pela razão do número de observações (SNPs) válidas e número total de observações. Portanto, *Call Rate* de 90% indica que SNPs com mais de 10% de valores perdidos foram eliminados.

A MAF está relacionada com o polimorfismo dos locos marcadores na população. Alelos pouco polimórficos (poucos variáveis) são pouco informativos e não apresentam relevância genética na população. Assim, alelos com frequência, p ou q , inferior a 5% também foram eliminados.

A análise de associação dos dados genotípicos com o fenótipo foi realizada pelo método de Modelos Lineares Mistos (MLM) para as 68 cultivares relatados

anteriormente, utilizando-se o Software Tassel 5 (BRADBURY et al., 2007), e o modelo:

$$y = X\beta + Zu + e$$

em que y é o vetor de observações fenotípicas, β é um vetor contendo os efeitos fixos, incluindo os marcadores moleculares e a estrutura da população (Q); u é um vetor de efeitos genéticos aditivos aleatórios dos múltiplos QTLs no background das cultivares; X e Z são as matrizes de incidência; e e é o vetor de efeitos residuais aleatórios. Os vetores u e e têm distribuição normal, com média zero e variância:

$$\text{var} \begin{pmatrix} u \\ e \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} G & 0 \\ 0 & R \end{pmatrix}$$

sendo que $G = \sigma_a^2 K$ em que σ_a^2 é a variância genética aditiva, e K a matriz de parentesco (Kinship). A matriz de parentesco (K) é calculada pela proporção de SNPs idênticos entre pares de indivíduos. Assume-se variância homogênea para o efeito residual, com média $R = I\sigma_e^2$ em que σ_e^2 é a variância residual. Marcadores com valores de probabilidade $p < 0,01$ foram considerados significativos na análise de associação SNP/fenótipo. Uma vez que os valores de probabilidades foram muito baixos, eles foram expressos através de $-\log_{10}p$.

A análise de estrutura da população foi realizada por meio da metodologia Markov Chain Monte Carlo (MCMC), algoritmo de estimação Bayesiana, utilizando-se o software InStruct (GAO et al., 2007). Esse método não assume que os marcadores estejam em equilíbrio de Hardy-Weinberg e as frequências genotípicas esperadas são estimadas com base em taxas de endogamia e autofecundação.

Para inferir a estrutura da população e as taxas de autofecundação em soja, foi utilizada a função (modo) dois no software InStruct. Em suma foi utilizada uma análise de MCMC para amostragem do número de grupos (parâmetro K), variando de 2 até 10, sem informações preliminares da população com um *burn in* de 5.000 e um *run length periods* de 50.000 iterações. A melhor estimativa dos valores K de grupos foi determinada de acordo com o menor valor de *Deviance Information Criterion* dentre os 10 valores dos K simulados (GAO et al., 2007).

A análise de associação por regressão múltipla, por meio do modelo *stepwise*, utilizando o Software Tassel 5 (BRADBURY et al., 2007), também foi realizada, visando identificar diferenças e similaridades na seleção de SNPs com a metodologia via MLM.

A análise de regressão múltipla trata-se de um conjunto de técnicas estatísticas que possibilita a avaliação do relacionamento de uma variável dependente com diversas outras variáveis independentes (TABACHNIK & FIDEL, 2013). Para esse tipo de análise, tem-se um conjunto de n variáveis independentes, contudo, o modelo de regressão não precisa necessariamente incluir todas as variáveis, portanto, há necessidade da escolha de um modelo que melhor explique as variações na variável dependente em que são incluídas apenas as variáveis independentes que contribuam de forma mais eficiente para o modelo. A metodologia de análise de regressão múltipla mais utilizada para análises de QTLs é a de *stepwise*, que compara os marcadores par a par em todo o conjunto, discriminando os marcadores que sejam iguais ou inferiores, utilizando apenas os marcadores que são superiores, ou seja, há uma eliminação dos marcadores redundantes (SCHUSTER & CRUZ, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela distribuição de frequências das reações das 68 cultivares (Figura 1) observaram-se 9 cultivares altamente suscetíveis, 14 moderadamente suscetíveis, 12 moderadamente resistente e 33 altamente resistentes. Além disso, os padrões de resistência CD 201 e CD 206 obtiveram notas de reação à resistência parcial à PRF de 2,3 e 3,3 respectivamente, sendo classificadas como altamente resistentes, os padrões de suscetibilidade BRS 256 RR e BRS 268, obtiveram notas de reação à resistência parcial à PRF de 9,0 e 7,7 respectivamente, sendo classificados como altamente suscetíveis. Portanto, a metodologia utilizada, em condições controladas, foi eficiente para discriminar a reação das cultivares à inoculação com *P. sojae*.

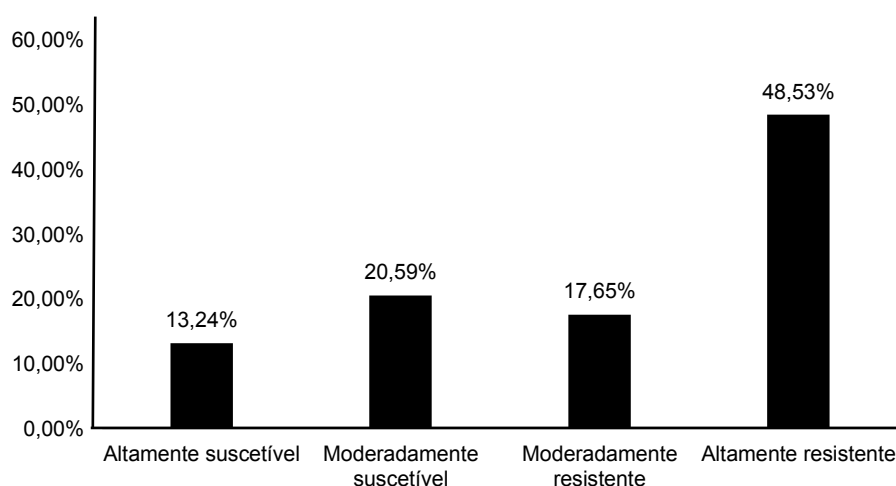


Figura 1. Distribuição das frequências de reações das 68 cultivares de soja à *Phytophthora sojae*.

Confirmada a variabilidade entre as cultivares testados quanto à reação destes à *P. sojae*, realizou-se a análise de associação dos marcadores moleculares com o fenótipo. Do kit customizado de 6000 SNPs, 5353 marcadores foram utilizados na genotipagem. Após análise de controle de qualidade dos resultados obtidos com esses marcadores e, da utilização de *call rate* de 90% e MAF menor que 95% foram eliminados 441 marcadores, totalizando 4912 marcadores validos para análise de associação. Para análise de estrutura da população via metodologia MCMC, dentre os 10 valores simulados, a melhor estimativa do parâmetro k foi de 9 grupos.

Dentre os fatores que influenciam a associação genótipo-fenótipo, a identificação de marcadores com baixo *call rate* e sua remoção é importante pelo

fato de que a presença destes reduz a eficiência de se encontrarem associações verdadeiras. Anderson et al. (2010) relatam que marcadores com *call rate* menores que 95% devem ser removidos e alguns pesquisadores são mais criteriosos quanto ao *call rate*, onde marcadores com *call rate* menores que 99% devem ser removidos (THE WELLCOME TRUST CASE CONTROL CONSORTIUM, 2007). Todavia, Ziegler (2008) afirma que marcadores com *call rate* inferiores à 10% podem ser utilizados para garantir a qualidade da associação genômica.

Através da análise via MLM, foram identificados 23 marcadores associados com a característica resistência parcial à PRF (Tabela 5). Como a associação foi realizada com base em 4912, o valor de p utilizado foi de $p < 0,01$, mantendo-se assim o valor de falsos positivos dentro de níveis aceitáveis. Como estudos com GWAS frequentemente identificam associações com vários SNPs em uma única região cromossômica, para realizar a exposição gráfica, a associação estatística foi expressa em $-\text{Log}_{10}$ dos valores de p (PEARSON & MANOLIO, 2008). Portanto, utilizando-se um valor de $p < 0,01$, foram considerados marcadores associados aqueles que estão acima da linha vermelha, que representa o valor de $-\text{Log}_{10}(0,01)$ igual a 2,00 (Figura 2).

Destes marcadores candidatos que foram identificados, dez estão localizados no grupo de ligação I, três no grupo de ligação A1, três no grupo de ligação A2, dois no grupo de ligação O e um em cada um dos grupos de ligação N, K, B1, F e J. Os valores de R^2 variaram de 0,1401 à 0,1877, ou seja, os marcadores candidatos explicam de 14,01% a 18,77% da variação fenotípica observada nas 68 cultivares avaliadas.

De acordo com Zhang et al. (2010), o método de MLM é uma ferramenta útil no controle da estrutura populacional e do parentesco dentro dos estudos de associação genômica.

Da mesma forma foi realizada a análise de associação utilizando a regressão múltipla de *stepwise*. Cinco potenciais marcadores associados com a característica de resistência parcial à PRF foram identificados (Tabela 6), com valor de $R^2=0,6884$, o que significa que o modelo adotado explica 68,84% da variação fenotípica observada por meio dos marcadores, comprovando consistência destes na associação. Esses marcadores possuem um alto potencial para serem utilizados como ferramentas em

programas de seleção assistida por marcadores moleculares SAM para resistência parcial à PRF.

A análise de regressão múltipla via o modelo *stepwise* confirmou a existência de QTL grupo de ligação B1, indicando a presença de dois marcadores associados nesta região. Além desses, foram encontrados outros marcadores associados à característica, sendo um no grupo de ligação O, um no grupo de ligação M e um no grupo de ligação K.

Tabela 5. Marcadores candidatos associados à resistência parcial à podridão radicular de fitóftora de acordo com a análise de Modelos Lineares Mistos.

Marcador	Grupo de ligação	p	r ²	-Log ₁₀ p
Gm05_8656389_T_C	A1	0.00243692	0.18769143	2.613158324
Gm05_8695812_A_G	A1	0.00243692	0.18769143	2.613158324
Gm05_8597246_C_T	A1	0.00262431	0.18513136	2.580984791
Gm10_37469103_C_A	O	0.00330482	0.17720615	2.480851671
Gm16_29528259_T_C	J	0.00120919	0.16234206	2.917505617
Gm20_26836040_G_T	I	0.00625377	0.15561407	2.203857949
Gm20_27884457_A_G	I	0.00625377	0.15561407	2.203857949
Gm20_28070832_A_G	I	0.00625377	0.15561407	2.203857949
Gm20_29865868_C_T	I	0.00625377	0.15561407	2.203857949
Gm20_29983050_A_G	I	0.00625377	0.15561407	2.203857949
Gm20_30048849_G_T	I	0.00625377	0.15561407	2.203857949
Gm20_28017701_T_C	I	0.00625377	0.15561407	2.203857949
Gm20_29711410_T_C	I	0.00625377	0.15561407	2.203857949
Gm20_28389137_C_T	I	0.00691483	0.15225614	2.160218294
Gm20_29594697_A_G	I	0.00691483	0.15225614	2.160218294
Gm13_33688582_C_T	F	0.00745478	0.14975134	2.127565406
Gm08_4667338_C_T	A2	0.00750426	0.14953125	2.124692109
Gm03_4468196_C_T	N	0.00761561	0.14904141	2.118295038
Gm08_46881874_G_A	A2	0.00762979	0.14897957	2.117487169
Gm08_46804090_A_G	A2	0.00780293	0.14823391	2.107742092
Gm11_8363320_T_C	B1	0.00843820	0.14563756	2.073750100
Gm09_45659797_T_C	K	0.00908852	0.14318136	2.041506926
Gm10_42920895_C_T	O	0.00997824	0.14010061	2.000945933

p - Significância de associação entre marcador e QTL

r² - Proporção da variação fenotípica explicada pelo marcador

Pelo fato de ter sido feita duas análises diferentes, via MLM e via regressão múltipla *stepwise*, foram encontrados marcadores diferentes. Contudo, os SNPs identificados pela análise de regressão múltipla estão localizados nos mesmos

cromossomos que os marcadores encontrados via MLM, salvo para o marcador Gm07_5417760_T_C, localizado no grupo de ligação M.

Tabela 6. Marcadores associados à resistência parcial a *P. sojae* de acordo com a análise de regressão múltipla pelo modelo de *stepwise*.

Marcador	Grupo de ligação
Gm10_37469103_C_A	O
Gm07_5417760_T_C	M
Gm11_37106045_C_T	K
Gm09_41620640_G_T	B1
Gm09_45586982_T_C	B1

R²: 0,68844552

Sugimoto et al. (2012) descreveram, em trabalho de revisão, a localização dos 14 genes *Rps* que conferem resistência à PRF, no mapa genético da soja. Todos os genes da série alélica do gene *Rps1* (a, b, c, d, k) e o gene *Rps7* encontram-se no grupo de ligação N, o gene *Rps2* está localizado no grupo de ligação J, a série alélica do gene *Rps3* (a, b, c) e o gene *Rps8* encontram-se no grupo de ligação F e os genes *Rps4*, *Rps5* e *Rps6* estão no grupo de ligação G.

Diante do exposto nas análises de associação via MLM e *stepwise*, observa-se que os marcadores candidatos mais fortemente associados à PRF, com maiores valor de explicação da variação fenotípica, com exceção do marcador GM16_29528259_T_C, não estão localizados em cromossomos que possuem os genes *Rps*. Neste sentido a GWAS permitiu identificar novos QTLs associados a esta característica, se mostrando uma boa ferramenta para programas de melhoramento que se baseiam na seleção assistida por marcadores.

Para resistência parcial à PRF em soja, alguns trabalhos foram realizados visando localizar QTLs, via análise de mapa de ligação. Burnham et al. (2003), utilizando marcadores microssatélites (SSR – *Single Sequence Repeats*) em populações biparentais de cruzamentos envolvendo a cultivar Conrad (padrão de resistência parcial) com cultivares suscetíveis a PRF (Sloan, Harosoy e Williams), encontraram QTLs para resistência parcial à PRF no grupo de ligação F e no grupo de ligação D1b. Para os biparentais Conrad x Sloan, Conrad x Harosoy e Conrad x Willian o QTL localizado no cromossomo 13 explicou 32,4%, 35% e 21,4% da variação fenotípica, respectivamente para as três populações originadas de

cruzamentos biparentais e o QTL localizado no grupo de ligação D1b explicou 10,6%, 15,9% e 20,7% da variação fenotípica para as mesmas populações, respectivamente.

Utilizando marcadores microssatélites e SNPs em 186 RILs (*Recombinant Inbred Lines*) provindas de cruzamento entre as cultivares Conrad (resistente) e Sloan (Suscetível), Wang et al. (2010) encontraram cinco QTLs localizados em cada um dos grupos de ligação: H, F, B2, D2 e L, em que o QTL localizado em cada grupo explicou 4,9%, 6,0%, 8,0%, 6,9%, 7,3% e 5,8% da variação fenotípica, respectivamente.

Marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e microssatélites foram utilizados em 298 RILs provindas de um cruzamento interespecífico entre a cultivar V71-370 (*Glycine max* L. Merrill), que é moderadamente resistente e o acesso PI407162 (*Glycine soja*), que apresenta baixo nível de resistência (TUCKER et al., 2010). Foram encontrados quatro QTLs, localizados nos grupos de ligação J, I, G e F, explicando 42%, 12%, 11% e 7% da variação fenotípica, respectivamente.

Utilizando marcadores microssatélites em 705 RILs provindas de diversos cruzamentos entre genótipos resistentes e suscetíveis, Lee et al. (2014) encontraram QTLs grupo de ligação D1a, N, C1, K, H, F, B2, J e G, explicando de 10 a 45% da variação fenotípica.

Analizando os resultados obtidos no presente estudo, pelas análises de associação via *stepwise* e MLM, dos dez grupos de ligação onde foram localizados marcadores SNPs associados à resistência parcial à PRF, cinco ainda não foram descritos como portadores de regiões controladoras desta resistência, sendo eles, O, M, B1, A1 e A2. Assim, futuros trabalhos devem ser realizados visando a validação dos marcadores associados e estes grupos de ligação sejam utilizados em programas de seleção assistida por marcadores.

A identificação de novos QTLs associados à resistência à PRF e que estejam em regiões cromossômicas distintas é vantajosa pelo fato de possibilitar uma resistência mais duradoura e, após validação, poderão ser utilizados como ferramenta adicional no processo de seleção em programas de melhoramento.

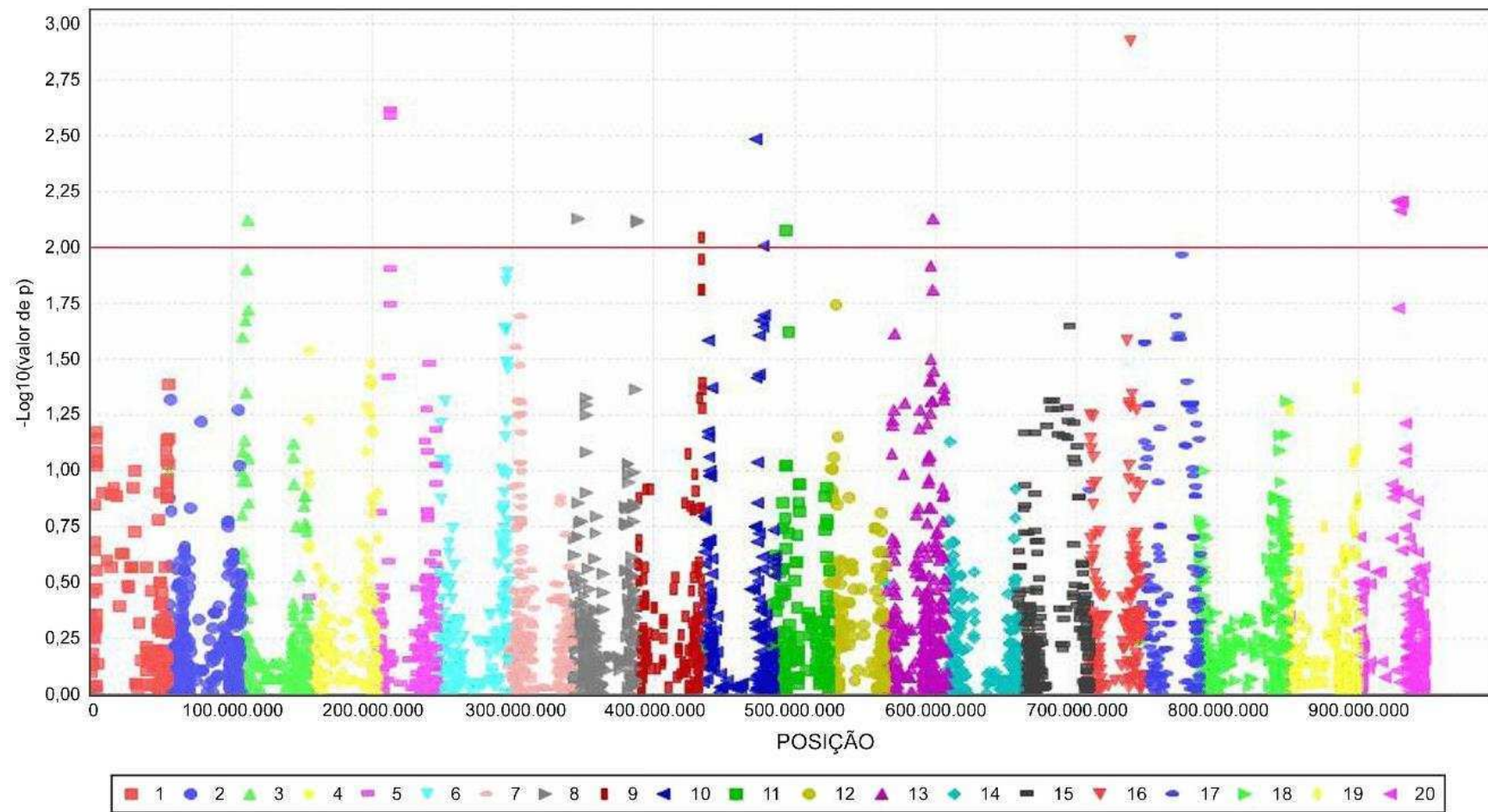


Figura 2. Distribuição gráfica dos valores de $-\log_{10}(\text{valor de } p)$ dos marcadores SNPs nos 20 cromossomos da soja.

CONCLUSÕES

A utilização da GWAS via análise de modelos lineares mistos permitiu a identificação de vinte e três marcadores candidatos que estão associados com resistência parcial à podridão radicular de fitóftora. Já, pela análise via regressão múltipla, utilizando o modelo *stepwise*, foram localizados cinco marcadores associados com a característica.

Os marcadores SNPs associados à resistência parcial à podridão radicular de fitóftora estão distribuídos em dez grupos de ligação, sendo que, os grupos O, M, B1, A1 e A2, ainda não foram descritos como portadores de regiões controladoras da resistência.

Os marcadores identificados são potenciais candidatos para serem utilizados em programas de melhoramento de soja na seleção assistida por marcadores moleculares visando resistência parcial à podridão radicular de fitóftora e devem ser validados em futuros trabalhos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, A.J.; WILEY, G.B.; GAFFNEY, P.M. Infinium assay for large-scale SNP genotyping applications. **Journal of Visualized Experiments (JOVE)**. 2013. Disponível em: <<http://www.jove.com/video/50683/infinium-assay-for-large-scale-snp-genotyping-applications>>. Acesso em: 19 Jul. 2015.
- ANDERSON, C.A.; PETTERSSON, F.H.; CLARKE, G.M.; CARDON, L.R.; MORRIS, A.P.; ZONDERVAN, K.T. Data quality control in genetic case-control association studies. **Nat Protoc.** v. 9, ed. 5, p. 1564-1573, 2010.
- ANDERSON, T.R. & BUZZELL, R.I. Inheritance and linkage of the *Rps 7* gene for resistance to *Phytophthora* rot of soybean. **Plant Disease.** v. 76, p. 958-959, 1992.
- ANDERSON, T.R. & RUZZELL, R.I. Efficacy of metalaxyl in controlling *Phytophthora* root and stalk roto of soybean cultivars differencing in field resistance. **Plant disease.** v. 66, p. 1144-1145, 1981.
- ATHOW, K.L.; LAVIOLETTE, F.A.; MUELLER, E.H. & WILCOX, J.R. A new major gene for resistance to *Phytophthora megasperma* var. *sojae* in soybean. **Phytopathology.** v. 70, p. 977-980, 1980.
- ATHOW, K.L. & LAVIOLETTE, F.A. *Rps6*, a major gene for resistance to *Phytophthora megasperma* f. sp. *Glycinea* in soybean. **Phytopathology.** v. 72, p. 1564-1567, 1982.
- BERNARD, R.L.; SMITH, P.E.; KAUFMANN, M.J.; SCHMITTHENNER, A.F. Inheritance of resistance to *Phytophthora* root and stem rot in soybean. **Agronomy Journal.** v. 47, p. 391, 1957.
- BRADBURY, P. J.; ZHANG, Z.; KROON, D. E.; CASSTEVENS, T. M.; RAMDOSS, Y.; BUCKLER. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. **Bioinformatics applications note**, v. 23, n. 19, p. 2633-2635, 2007.
- BURNHAM, K.D.; DORRANCE, A.E.; VAN TOAI, T.T.; ST. MARTIN, S.K. Quantitative Trait Loci for Partial Resistance to *Phytophthora sojae* in Soybean. **Crop Science.** v. 43, p. 1610-1617, 2003.
- BUZZELL, R.I. & ANDERSON, T.R. Another major gene for resistance to *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. **Soybean Genetics Newslatter.** v.18, p. 30-33, 1981.

- BUZZELL, R.I. & ANDERSON, T.R. Inheritance and race reaction of a new soybean *Rps1* allele. **Plant Disease**. v. 76, p. 600-601, 1992.
- COSTAMILAN. L. M. A podridão de raiz e haste de soja. In: LUZ. E.D.M.N.; SANTOS. A.F.; MATSUOKA. K.; BEZERRA. J.L. **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**. Campinas: Rural. p. 678-730. 2001.
- COSTAMILAN. L. M.; BERTAGNOLLI. P. F.; MORAES. R.M.A. Podridão radicular de fitóftora em soja. **Documentos Online**. 79. Passo Fundo. RS: Embrapa Trigo. 2007. 23 p.
- DORRANCE. A.E.; ST. MARTIN. S. *Phytophthora sojae*: is it time for a new approach? **American Phytopathological Society**. St. Paul. 2000.
- DORRANCE. A.E.; MCCLURE. S.A.; ST MARTIN. S.K. Effect of partial resistance on *Phytophthora* stem rot incidence and yield of soybean in Ohio. **Plant disease**. v. 87. p. 308-312. 2003.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Tecnologia de Produção de Soja** – Região Central do Brasil 2014. Londrina. PR: Embrapa Soja. 2013. 266 p.
- FRITSCHÉ-NETO. R.; BORÉM. A. **Melhoramento de plantas para condições de Estresses Bióticos**. 2012. 240 p.
- GAO, H.; WILLIAMSON, S.; BUSTAMANTE, C.D. A Markov Chain Monte Carlo approach for joint inference of population structure and inbreeding rates from multilocus genotype data. **Genetics**. v. 176, ed.3, p. 1635-1651, 2007.
- GORDON, S.G.; ST. MARTIN, S.K. & DORRANCE, A.E. *Rps8* maps to a resistance gene rich region on soybean molecular linkage group F. **Crop Science**. v. 46, p. 168-173, 2006.
- HENNING. A.A.; ALMEIDA. A.M.R.; GODOY. C.V.; SEIXAS. C.D.S.; YORINORI. J.T.; COSTAMILAN. L.M.; FERREIRA. L.P.; MEYER. M.C.; SOARES. R.M.; DIAS. W.P. **Manual de identificação de doenças da soja**. 3 ed. Londrina. PR: Embrapa Soja. 74 p. 2009.
- ILLUMINA. **Product literature**. 2015. Disponível em: <<http://www.illumina.com/applications/genotyping.html>>. Acesso em: 19 Jul. 2015.
- KASUGA, T.; SALIMATH, S.S.; SHI, J.; GIJZEN, M.; BUZZELL, R.I.; BHATTACHARYYA, M.K. High resolution genetic and physical mapping of

molecular markers linked to the *Phytophthora* resistance gene *Rps1-k* in soybean. **Molecular Plant Microbe Interaction**. v.10, p. 1035-1044, 1997.

KAUFMANN. M.K.; GERDEMANN. J.W. Root and stem rot of soybean caused by *Phytophthora sojae* n. sp. **Phytopathology**. v. 48. p. 201-208. 1958.

KILEN, T.C.; HARTWIG, E.E. & KEELING, B.L. Inheritance of a second major gene for resistance to *Phytophthora* root rot in soybeans. **Crop Science**. v. 14, p. 260-262, 1974.

LEE, S.; MIAN, M.A.R.; SNELLER, C.H.; WANG, H.; DORRANCE, A.E.; MCHALE, L.K. Joint linkage QTL analyses for partial resistance to *Phytophthora sojae* in soybeans using six nested inbred populations with heterogeneous conditions. **Theor. Appl. Genet.** v. 127, p. 429-444, 2014.

MATSUO. É.; FERREIRA. P.A.; SEDIYAMA. T.; FERRAZ. S.; BORÉM. A.; FRITSCHÉ-NETO. R. Breeding for nematode resistance. In: BORÉM. A.; FRITSCHÉ-NETO. R. **Plant breeding for biotic stress resistance**. Springer. p. 81-102. 2012.

MCDONALD. M.B.; ELLIOT. L.J.; SWEENEY. M.P. DNA extraction from dry seeds for RAPD analyses in varietal identification studies. **Seed Science & Technology**. v.22. p. 171-176. 1994.

MUELLER, E.H.; ATHOW, K.L. & LAVIOLETTE, F.A. Inheritance of resistance to four physiologic races of *Phytophthora megasperma* var *sojae*. **Phytopathology**. v. 68, p. 1318-1322, 1978.

PEARSON, T.A.; MANOLIO, T.A. How to interpret a genome-wide association study. **Jama**. v.299, n.11, p. 1335-1344, 2008.

PLOPER, L.D.; ATHOW, K.L. & LAVIOLETTE, F.A. A new allele at *Rps 3* locus for resistance to *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* in soybean. **Phytopathology**. v. 75, p. 60-694, 1985.

RESENDE, M.D.V.; SILVA, F.F.; RESENDE JR, M.F.R. Genética de associação (GWAS). In: BORÉM. A.; FRITSCHÉ-NETO. R. **Biotecnologia Aplicada ao Melhoramento de Plantas**. Visconde do Rio Branco:Suprema. p. 119-150, 2013.

RESENDE, M.D.V.; SILVA, F.F.; AZEVEDO, C. F. **Estatística matemática, biométrica e computacional: modelos mistos, multivariados, categóricos e generalizados (REML/BLUP), inferência bayesiana, regressão aleatória, seleção**

genômica, QTL- GWAS, estatística espacial e temporal, competição, sobrevivência. Viçosa-MG: Suprema, 2014. 881 p.

SAMBROOK. J.; FRITSCH. E.F.; MANIATIS. T. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor University Press. **Cold Spring Harbor.** New York. 1989.

SANDHU, D.; SCHALLOCK, K.G.; RIVERA-VELEZ, N.; LUNDEEN, P.; CIANZIO, S. & BHATTACHARYYA, M.K. Soybean *Phytophthora* resistance gene *Rps8* maps closely to the *Rps3* region. **J. Hered.** v. 96, p. 536-541, 2005.

SCHMITTHENNER. A. F. Problems and progress in controlo of *Phytophthora* root roto of soybean. **Plant Disease.** v. 69. p. 362-368. 1985.

SCHMITTHENNER. A.F.; BHAT. R.G. Useful methods for stydying *Phytophthora* in the laboratory. **Res. Dev. Cent.** Spec. Circ. v. 143. 10 p. The Ohio State University. Department of Plant Pathology. Wooster. 1994.

SCHUSTER, I.; CRUZ, C.D. **Estatística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados.** ed. 2, Viçosa, MG. 2008. 568 p.

SUGIMOTO, T.; WATANABE, K.; YOSHIDA, S.; AINO, M.; FURIKI, M.; SHIONO, M.; MATOH, T.; BIGGS, A. R. Fiel application of calcium to reduce *Phytophthora* stem roto f soybean, and calcium distribution in plants. **Plant disease.** v. 94, p. 812-819, 2010.

SUGIMOTO, T.; KATO, M.; YOSHIDA, S.; MATSUMOTO, I.; KOBAYASHI, T.; KAGA, A.; HAJIKA, M.; YAMAMOTO, R.; WATANABE, K.; AINO, M.; MATOH, T.; WALKER, D.R.; BIGGS, A.; ISHIMOTO, M. Pathogenic diversity of *Phytophthora sojae* and breeding strategies to develop *Phytophthora*-resistant soybeans. **Breeding Science.** v. 51, p. 511-522, 2012.

TABACHNIK, B.; FIDELL, L.S. **Using multivariate statistics.** ed.6, New York: Harper Collins. 2013. 963 p.

THE WELLCOME TRUST CASE CONTROL CONSORTIUM. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. **Nature.** v. 447, p. 661-678, 2007.

TOOLEY, P. & GRAU, C.R. The relationship between rate-reducing resistance to *Phytophthora megasperma* f. sp. *Glycinea* in soybean. **The American Phytopathological Society.** v. 74, n. 10, p. 1201-1208, 1984.

TUCKER, D.M.; MAROOF, M.A.S.; MIDEROS, S.; SKONECZKA, J.A.; NABATI, D.A.; RUSS, G.R.; HOESCHELE, I.; TYLER, B.M.; ST. MARTIN, S.K.; DORRANCE, A.E. Mapping quantitative trait loci for partial resistance to *Phytophthora sojae* in a soybean interespecific cross. **Crop Science**. v. 50, p. 628-635, 2010.

TYLER, B.M. *Phytophthora sojae*: root rot pathogen of soybean and model oomycete. **Molecular Plant Pathology**. v. 8, n. 1, p. 1-8, 2007.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – USDA. **Foreign Agriculture Service**. 2015. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/psdonline>>. Acesso em: 10 Jul. 2015.

VERNETTI, F.J.; VERNETTI JR., F.J. **Genética da soja: caracteres qualitativos e diversidade genética**. Pelotas, RS: Embrapa Clima Temperado. 2009. 221 p.

WANG, H.; WALLER, L.; TRIPATHY, S.; ST. MARTIN, S.K.; ZHOU, L.; KRAMPIS, K.; TUCKER, D.M.; MAO, Y.; HOESCHELE, I.; MAROOF, M.M.S.; TYLER, B.M.; DORRANCE, A.E. Analysis of genes underlying soybean quantitative trait loci conferring partial resistance to *Pytophthora sojae*. **The Plant Genome**. v. 3, n. 1, p. 23-40, 2010.

ZHANG, Z.; ERSOZ, R.; LAI, C.; TODHUNTER, R.J.; TIWARI, H.K.; GORE, M.A.; BRADBURY, P.J.; YU, J.; ARNETT, D.K.; ORDOVAS, J.M.; BUCKLER, E.S. Mixed linear model approach adapted for genome-wide association studies. **Nature genetics**. v. 42, n. 4, p. 355-362, 2010.

ZIEGLER, A.; KÖNING, I.R.; THOMPSON, J.R. Biostatistical aspects of genome-wide association studies. **Biometric Journal**. v. 50, p. 8-28, 2008.