

ROSÂNGELA MARIA BARBOSA

**ASSOCIAÇÃO GENÔMICA PARA RESISTÊNCIA DE SOJA À
PÚSTULA-BACTERIANA**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

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

T

B238a
2017 Barbosa, Rosângela Maria, 1988-
 Associação genômica para resistência de soja à pústula-
 bacteriana / Rosângela Maria Barbosa. - Viçosa, MG, 2017.
 x, 34f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Felipe Lopes da Silva.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.28-34.

1. Soja - Doenças e pragas. 2. Melhoramento genético.
3. *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Fitotecnia. Programa de Pós-graduação em
Fitotecnia. II. Título.

CDD 22 ed. 633.349

ROSÂNGELA MARIA BARBOSA

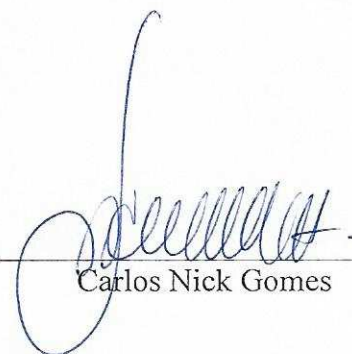
ASSOCIAÇÃO GENÔMICA PARA RESISTÊNCIA DE SOJA À
PÚSTULA-BACTERIANA

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

APROVADA: 29 de Agosto de 2017.



Jorge Luis Badel Pacheco
(Coorientador)



Carlos Nick Gomes



Rogério Faria Vieira



Felipe Lopes da Silva
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela proteção e bênçãos em minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), em especial ao Departamento de Fitotecnia, pela oportunidade de realização do curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), à fundação Arthur Bernardes (FUNARBE), pelo financiamento dos projetos, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa.

Ao meu orientador Felipe Lopes da Silva, pela oportunidade, pelo apoio, por sua paciência, conselhos e por acreditar em mim. Um exemplo de pessoa e pesquisador.

Aos meus coorientadores Jorge Badel e Ivan Schuster, por toda a paciência e apoio concedido na realização desse trabalho.

Ao pesquisador Rogério Faria Vieira pelo apoio, conselhos e por permitir a realização do experimento nas instalações da EPAMIG Sudeste.

À Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG Sudeste), por permitir a realização do experimento em suas instalações.

Ao meu querido pai, José Geraldo Barbosa (*In memorian*) sempre presente em meu coração. Pelos ensinamentos para toda uma vida e pelo amor incondicional.

À minha mãe, pelo apoio, por entender todas as minhas escolhas e por compreender a minha ausência.

À minha irmã, por sempre me incentivar, por ser meu porto seguro em meio a tantos desafios e pelo exemplo de vida.

Aos meus sobrinhos, Analice, Caíque, Cairon e Pedro Henrique. O sorriso de cada um de vocês enche o meu coração de alegria e renova minha esperança de um mundo melhor.

À minha amiga Telma Falliere Nascimento Queiroz (*In memorian*) por sua amizade, apoio e ajuda para o ingresso de uma nova fase da minha vida.

Às amigas Dandara, Dora, Èrika e Thays, por toda a ajuda, principalmente na fase final do trabalho. Contar com vocês deixou essa jornada menos árdua.

Aos companheiros da soja, pela ajuda, por compartilhar conhecimentos e pelo excelente convívio no ambiente de trabalho.

Às amigas do laboratório de Bacteriologia, Yane, Lílian e Carol pelo apoio e paciência em me ensinar todos os protocolos fitopatológicos, explicando cada detalhe.

Obrigada.

BIOGRAFIA

ROSÂNGELA MARIA BARBOSA, filha de Isabel Coelho Barbosa e José Geraldo Barbosa (*In memorian*), nasceu em 16 de março de 1988, em Belo Horizonte, Minas Gerais.

Em março de 2014, graduou-se em Agronomia pela Universidade Federal de Viçosa em Viçosa-Minas Gerais.

Em março de 2015, ingressou no programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa da dissertação em Agosto de 2017.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	2
2.1. Soja e as principais doenças que acometem a cultura.....	2
2.2. Pústula bacteriana.....	3
2.3. Estudo de associação genômica ampla na identificação de genes de resistência ..	4
3. MATERIAL E MÉTODOS	6
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	11
5. CONCLUSÕES	27
REFERÊNCIAS	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Cultivares utilizados no experimento para resistência à <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i>	7
Tabela 2. Resumo da análise de variância da severidade da doença causada pelas estirpes XAG2440 ^P e XAG2447 de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i> em 118 cultivares de soja.....	11
Tabela 3. Reação de cultivares de soja à estirpe XAG2440 ^P de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i> , médias agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, média fenotípica do grupo e intervalo de notas dentro do grupo.....	13
Tabela 4. Reação de cultivares de soja à estirpe XAG2447 de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i> , médias agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, média fenotípica do grupo e intervalo de notas dentro do grupo.....	14
Tabela 5. Marcadores SNPs identificados e possivelmente associados à resistência da soja à pústula-bacteriana causada pela estirpe XAG2440 ^P de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i>	16
Tabela 6. Marcadores SNPs identificados e possivelmente associados à resistência da soja à pústula-bacteriana causada pela estirpe XAG2447 de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i>	18
Tabela 7. Marcadores SNPs identificados e os respectivos genótipos predominantes em cada loco nas cultivares de soja pertencente aos diferentes haplótipos quanto a reação à estirpe XAG2440 ^P	24
Tabela 8. Genótipos de soja, grupos de reação à pústula-bacteriana causada pela estirpe XAG2440 ^P de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i> (entre parênteses) e alelos favoráveis referentes aos marcadores SNPs associados com a resistência à pústula-bacteriana	26

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Escala de notas para severidade à pústula bacteriana. Severidade dos sintomas (baseada no número, tamanho e intensidade das pústulas) foi avaliada de 5 a 1. Sendo as notas 5 e 1 para maior e menor severidade, respectivamente. Nota de pústula bacteriana para CD244RR (controle resistente) e TMG7161RR (controle suscetível) foi 1 e 5, respectivamente.....9

Figura 2. Distribuição gráfica dos valores de $-\text{Log}_{10}(P)$ dos marcadores SNPs nos 20 cromossomos da soja associados com a resistência à estirpe XAG2440^P de *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*. Marcadores SNPs localizados acima da linha preta (posição $-\text{Log}_{10}(P)$ igual a 3) foram considerados associados com a resistência à pústula-bacteriana... 17

Figura 3. Distribuição gráfica dos valores de $-\text{Log}_{10}(P)$ dos marcadores SNPs nos 20 cromossomos da soja associados com a resistência à estirpe XAG2447 de *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*.....19

Figura 4. QTLs identificados e descritos nos cromossomos 3 (A), 8 (B) e 13 (C) pela plataforma SoyBase e que estão associados a resistência à doenças e tolerância a estresses abióticos (à direita), localizados em regiões cromossômicas próximas aos marcadores associados à severidade de pústula-bacteriana (à esquerda) causada pela estirpe XAG2440^P de *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*. Números à esquerda, na barra indicam o número de milhões de pares de bases em cada cromossomo.....21

Figura 5. QTLs identificados e descritos nos cromossomos 6 (A), 15 (B) e 17 (C) pela plataforma SoyBase e que estão associados a resistência à doenças e tolerância a estresses abióticos (à direita), localizados em regiões cromossômicas próximas aos marcadores associados à severidade de pústula-bacteriana (à esquerda) causada pela estirpe XAG2447 de *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*. Números à esquerda, na barra indicam o número de milhões de pares de bases em cada cromossomo.....22

RESUMO

BARBOSA, Rosângela Maria, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2017. **Associação genômica para resistência de soja à pústula-bacteriana.** Orientador: Felipe Lopes da Silva. Coorientadores: Jorge Luis Badel Pacheco e Ivan Shuster.

A pústula-bacteriana em soja é causada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*. Esta doença teve aumento expressivo em sua agressividade nos cultivares de soja nas últimas safras. O principal método de controle da pústula-bacteriana é o uso de cultivares resistentes. A identificação de fontes de resistência à pústula-bacteriana é um desafio para os melhoristas, uma vez que existem várias estirpes da fitobactéria e interação genótipos x estirpes para a resistência ao patógeno. O que pode ser resolvido com o auxílio de marcadores moleculares SNPs via análise de associação genômica ampla. Diante disso, objetivou-se caracterizar fenotipicamente 118 genótipos de soja quanto à resistência a *X. axonopodis* pv. *glycines*; identificar marcadores moleculares do tipo SNPs ligados a genes responsáveis pela resistência à pústula-bacteriana e identificar cultivares de soja portadores de alelos de resistência à pústula bacteriana. Foram inoculados 118 genótipos de soja com os isolados XAG2440^P e XAG2447. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizados, com sete repetições. A parcela experimental foi um pote plástico de 200 ml de volume com uma planta. A severidade da doença foi avaliada 15 dias após a inoculação com uma escala de notas de severidade de pústula bacteriana de 1 a 5, em que 1= a ausência de pústulas e 5= maior severidade de pústula bacteriana. O agrupamento das médias de severidade da doença dos genótipos pelo teste de Skott-Knott permitiu a formação de cinco grupos de genótipos quando se usou a estirpe XAG2440^P e três grupos com a estirpe XAG2447. O genótipo CD244RR foi resistente a ambas as estirpes. Já o genótipo TMG 7161RR foi o primeiro a apresentar sintomas de pústula bacteriana, mostrando-se altamente suscetível à ação de ambas as estirpes. Foram identificados onze potenciais marcadores SNPs em cinco cromossomos associados com a resistência à pústula-bacteriana causada pela estirpe XAG2440^P. O marcador Gm03_46214163_C_T é o mais fortemente associado com a resistência à pústula-bacteriana causada pela estirpe XAG2440^P e está localizado no cromossomo 3. Para a estirpe XAG2447 foram identificados cinco potenciais marcadores SNPs em três cromossomos. O marcador Gm17_7280661_C_T localizado no cromossomo 17 é o marcador mais fortemente associado à resistência à pústula-bacteriana causada pela estirpe XAG2447. Com base nos marcadores recomendamos

cruzamentos envolvendo as cultivares CD244RR, CD243RR, CD5969, FUNDACEP55RR e FUNDACEP58RR para obter genótipos portadores de todos os alelos de resistência à estirpe XAG2440^P. Esses marcadores, depois de validados, poderão ser utilizados para seleção assistida por marcadores, de forma a aumentar a frequência de alelos de resistência à ação das estirpes XAG2440^P e XAG2447.

ABSTRACT

BARBOSA, Rosângela Maria, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2017. **Genome-wide association study of resistance to bacterial-pustule in soybean.** Adviser: Felipe Lopes da Silva. Co-advisers: Jorge Luis Badel Pacheco and Ivan Shuster.

Bacterial pustule in soybean is caused by the bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*. This disease had an expressive increase in its aggressiveness in soybean cultivars in the last harvests. The main method control of bacterial pustule is the use of resistant cultivars. The identification of sources of resistance to bacterial pustule is a challenge for breeders as there are several strains of this phyto-bacteria and interaction genotypes x strains for resistance to the pathogen. What can be solved with the identification of molecular markers SNPs with Genome-wide association studies. On this, the objective of this study was to characterize phenotypically 118 soybean genotypes for resistance to *X. axonopodis* pv. *glycines*; to identify molecular markers of the SNPs type linked to genes responsible for resistance to bacterial pustule and to identify soybean cultivars carrying resistance alleles to bacterial pustule. 118 soybean genotypes were inoculated with the isolates XAG2440p and XAG2447. The experimental design was the completely randomized with seven replications. The experimental plot was a plastic pot of 200 ml volume with a plant per pot. After 15 days of inoculation plants were examined for lesions characteristic of bacterial pustule with a scale of bacterial pustule severity scores from 1 to 5, where 1 = absence of pustules and 5 = greater severity of bacterial pustule. The clustering of disease severity averages of the genotypes by the Skott-Knott test allowed the formation of five genotype groups when using the strain XAG2440p and three groups with the strain XAG2447. The genotype CD244RR was resistant to both strains. The genotype TMG 7161RR was the first to present symptoms of bacterial pustule, being highly susceptible to the action of both strains. Eleven potential SNPs markers were identified on five chromosomes associated with resistance to bacterial pustule caused by strain XAG2440p. The marker Gm03_46214163_C_T is most strongly associated with resistance to bacterial pustule caused by strain XAG2440p and is located on chromosome 3. For the strain XAG2447 were identified five potential SNPs markers on three chromosomes. The marker Gm17_7280661_C_T located on chromosome 17 is the marker most strongly associated with resistance to bacterial pustule caused by strain XAG2447. Based on the markers

we recommend crosses involving the cultivars CD244RR, CD243RR, CD5969, FUNDACEP55RR and FUNDACEP58RR to obtain genotypes carrying all the strain resistance alleles XAG2440p. These markers, once validated, may be used for marker-assisted selection in order to increase the frequency of resistance alleles to strains XAG2440p and XAG2447.

1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma planta anual, herbácea, ereta, pertencente á classe Magnoliopsia, ordem Fabales, família Fabaceae (Leguminosae), gênero *Glycine* (SEDIYAMA, 2009). A sua produção é uma das atividades que mais tem crescido no agronegócio mundial nas ultimas décadas (ZHANG et al., 2015). O aumento dessa produção está relacionado com a redução de fatores limitantes como a ocorrência de doenças (SEDIYAMA et al., 2015).

Uma das doenças de importância na soja é a pústula-bacteriana, que teve aumento expressivo em sua agressividade nos cultivares de soja nas últimas safras (GORADIA et al., 2009). A pústula-bacteriana possui como agente causador a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (Nakano 1919) Vauterin et al., 1995. Umidade e temperatura elevadas e muita chuva são condições que favorecem o fitopatógeno, que penetra as plantas através de estômatos e ferimentos (CHATNAPARAT et al., 2016; GORADIA et al., 2009). Seus principais sintomas são manchas amareladas com pústulas na parte abaxial das folhas. Estas podem se desenvolver em regiões necróticas e causa a queda prematura das folhas, o que reduz a produtividade das lavouras (NARVEL et al., 2001).

O principal método de controle da pústula-bacteriana é o uso de genótipos resistentes (GODOY et al., 2014). Para obter genótipos resistentes, é preciso, inicialmente identificar e selecionar fontes de resistência à doença por meio da caracterização fenotípica de cultivares de soja. Um fator limitante a essa seleção de fontes de resistência é o desconhecimento do número de genes envolvidos na resistência e da interação genótipos x estirpes bacterianas, visto que essa interação confere alteração no fenótipo de reação à resistência. Essa variabilidade do patógeno requer a utilização de mecanismos de resistência eficientes (CASTRO et al., 2015).

Logo, é necessário obter novas fontes de resistência ao patógeno *X. axonopodis* pv. *glycines* (HARTWIG e LEHMAN; 1951). Para aumentar a eficiência do processo de seleção de genótipos resistentes às diversas doenças, os melhoristas têm investido nos estudos de associação genômica ampla (GWAS, *Genome-wide association studies*). GWAS é a identificação de variantes causais no genoma, via marcadores SNPs, de grande número de indivíduos para descobrir associações significativas entre marcadores e fenótipos de interesse (RESENDE et al., 2012).

A identificação de marcadores associados às características de interesse auxilia a seleção de plantas nos Programas de Melhoramento de Soja. Depois de se validar os marcadores encontrados, estes podem ser utilizados na seleção rápida de potenciais genótipos com uma alta frequência dos alelos de interesse.

Nosso objetivo foi caracterizar fenotipicamente 118 genótipos de soja quanto à resistência a *X. axonopodis* pv. *glycines*, identificar marcadores moleculares do tipo SNPs ligados a genes responsáveis pela resistência à pústula-bacteriana e identificar cultivares de soja portadores de alelos de resistência à pústula bacteriana.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Soja e as principais doenças que acometem a cultura

A soja é originária do nordeste da China (HYMOWITZ, 1970). Essa leguminosa possui grande importância econômica no cenário mundial, por ser uma excelente fonte de proteínas e óleo vegetal (ÁVILA et al., 2007). Juntos, Estados Unidos, Brasil e Argentina são responsáveis por cerca de 80% da soja produzida no mundo (USDA, 2017). A estimativa da produção brasileira na safra de 2016/17 é de 113,9 milhões de toneladas em uma área de 33,2 milhões de hectares (CONAB, 2017).

Os avanços devido ao melhoramento genético da soja são evidentes, principalmente no que diz respeito à ampliação da adaptação da cultura, possibilitando seu cultivo desde as altas latitudes do sul do Brasil até as baixas latitudes equatoriais e tropicais (SEDIYAMA et al., 2015). Contudo, ainda verificam-se alguns fatores limitantes à obtenção de maiores rendimentos, como o perceptível aumento da ocorrência de doenças.

Sabe-se que de 15 a 20% de perdas na produtividade nas lavouras de soja ocorrem devido o ataque de fitopatógenos (ALMEIDA et al., 2005; HENNING et al., 2009; EMBRAPA, 2011). No Brasil já foram identificadas 46 doenças que causam danos à cultura, sendo: 32 causadas por fungos, quatro por bacterianas, quatro por vírus e seis por nematoides (SEDIYAMA et al., 2015).

As doenças mais comuns para a cultura da soja e que apresentam maior importância econômica são: ferrugem-asiática (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow, H.; Sydow, P., 1914), oídio (*Microsphaera diffusa* Cooke, M.C.; Peck, C.H., 1872), mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum* Bary, A.de., 1884), mancha-purpura (*Cercospora kikuchii* Matsumoto, T.;

Tomoyasu, 1927), mancha-alvo (*Corynespora cassiicola* (Berkeley; M.A. Curtis) Wei, C.T. 1950), mancha-olho-de-rã (*Passalora sojae* (Hara) H.D. Shin & U. Braun, 1996), antracnose (*Colletotrichum truncatum* (Schwein.) Andrus; W.D. Moore, 1935), podridão-de-carvão (*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidànich, 1947), nematoides (*Meloidogyne* spp., *Heterodera glycines*, *Rotylenchulus reniformis*, *Pratylenchus brachyurus*), podridão-radicular de-fitóftora (*Phytophthora sojae* Kaufmann; Gerdemann, 1958) e pústula-bacteriana (*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (Nakano 1919) Vauterin et al., 1995) (EMBRAPA, 2013; HENNING, 2009; MATSUO et al., 2012). Portanto, pesquisas são fundamentais para obter genótipos resistentes e minimizar a perda em produtividade de grãos.

2.2. Pústula-bacteriana

A pústula-bacteriana é uma doença foliar comumente encontrada em países produtores de soja como Brasil, China, Índia, Argentina e Estados Unidos (GORADIA et al., 2009). Essa doença ocorre principalmente em regiões quentes e úmidas e com alto índice de chuvas. O agente causador da pústula-bacteriana é a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, (GORADIA et al., 2009). Este agente permanece na superfície de plantas saudáveis antes de entrar no apoplasto através de aberturas naturais, como estômatos e ferimentos (CHATNAPARAT et al., 2016).

O principal sintoma da doença em soja é a presença de manchas amareladas com pústulas na parte abaxial das folhas. Estas manchas podem desenvolver-se em regiões necróticas e causam a queda prematura de folhas. O patógeno também pode infectar hastes, pecíolos e vagens (GODOY et al., 2014). Com o progresso da doença, principalmente em genótipos de soja susceptíveis, formam-se fortes halos amarelos ao redor de áreas amarronzadas bem definidas, denominadas pústulas, que é característica marcante a essa doença. Em genótipos de soja resistentes, os halos têm cor menos intensa e as pústulas não são bem definidas como nos genótipos susceptíveis (ZINSOU et al., 2015).

O agente causador *X. axonopodis* pv. *glycines*, pode ser transmitido através de sementes aparentemente saudáveis e por restos de cultura. Uma vez presente na lavoura, infecções secundárias na planta são favorecidas por condições de alta umidade e temperatura elevada (GORADIA et al., 2009). Os principais métodos de controle do patógeno são: uso de sementes saudáveis, manejo de restos culturais e o uso de cultivares resistentes (GODOY et al., 2014).

Em busca de fontes de resistência à pústula-bacteriana, HARTWIG e LEHMAN (1951) observaram que o cultivar CNS era praticamente imune a doença em condições de campo. A observação desse fato possibilitou a identificação do gene recessivo *rxp* como fonte de resistência à pústula-bacteriana. A partir desta descoberta, a manutenção do gene *rxp* nos cultivares de soja foi o principal método de controle da doença adotado (NARVEL et al., 2001). No entanto, o uso do gene *rxp* não tem sido eficiente em reduzir perdas devido a doença na produtividade da soja (WRATHER et al., 2006).

Uma razão para essa ineficiência é a interação genótipos x estirpes bacterianas, visto que essa interação confere uma alteração no fenótipo de reação à resistência. GORADIA et al. (2009) verificaram a existência de mais de um gene de resistência envolvido com a resistência à pústula-bacteriana, pois os genótipos apresentaram diferentes níveis de severidade da doença. O que indica que a característica resistência à *X. axonopodis* pv. *glycines* possui herança oligogênica.

2.3. Estudo de associação genômica ampla na identificação de genes de resistência

Para obter novas fontes de resistência ao patógeno *X. axonopodis* pv. *glycines* se faz necessário. E neste sentido visando aumentar a eficiência do processo de seleção de genótipos resistentes às diversas doenças, os melhoristas têm investido na seleção assistida por marcadores moleculares.

As principais vantagens do uso de marcadores moleculares são: grande variabilidade que se observa entre os indivíduos de uma espécie; não sofrem influência do ambiente; independentemente do estágio de desenvolvimento da planta pode-se fazer análises e possibilitam a seleção de indivíduos em gerações precoces, o que gera uma economia de tempo na escolha do genótipo a ser utilizado pelo melhorista (BORÉM e CAIXETA, 2009).

Dentre os marcadores moleculares existentes, os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) 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 (BUSH e MOORE, 2012).

Além disso, são preferidos em relação a outros marcadores devido a sua baixa taxa de mutação adicional e facilidade de genotipagem, são marcadores co-dominantes, bialélicos, abundantes e com alta transferibilidade entre indivíduos e espécies (RESENDE et al., 2013). Ao usar estes marcadores é possível detectar a substituição de uma única base nucleotídica

por outra, mais uma vantagem é que os SNPs são considerados estáveis na evolução das espécies, o que permite a sua utilização em estudos de genética de populações (VINHOLES, 2014).

Assim, a identificação de variantes causais no genoma, via marcadores SNPs, de grande número de indivíduos para descobrir associações significativas entre marcadores e fenótipos de interesse é conhecida como associação genômica ampla (GWAS) (RESENDE et al., 2012). Ou seja, as variações na sequência do DNA de todo o genoma são analisadas para identificar as características fenotípicas de interesse.

A GWAS é utilizada como uma poderosa técnica para detectar a variação natural relacionada aos caracteres complexos de interesse agrônomico em diversas culturas (RAFALSKI, 2010), uma vez que essa técnica explora a ligação mais próxima que existe entre marcadores moleculares e as características quantitativas de interesse (QTLs) (KORTE et al., 2013).

A técnica de GWAS fundamenta-se no desequilíbrio de ligação (DL) presente nos genomas, já que para explicar toda a variação genética de um caráter é necessário que exista um DL entre alelos dos marcadores e alelos dos genes que controlam o mesmo. Logo, se a população em estudo estiver em desequilíbrio de ligação, a associação de um marcador com um alelo que confere resistência a determinada característica fenotípica será mantida (VINHOLES, 2014).

PEARSON e MANOLIO (2008) preconizam que a técnica de GWAS é composta por quatro partes: seleção de grande número de indivíduos com a característica de interesse; genotipagem e fenotipagem de qualidade; modelos e testes estatísticos para associações entre SNPs e as características de interesse e a validação das associações encontradas. A qualidade da genotipagem depende da relação entre a base genética genotipada e a sequência referência (SNP); da qualidade do material biológico (amostras de DNA); da variabilidade genética da população genotipada e da clareza da análise de alinhamentos (LAURIEL et al., 2010).

Métodos estatísticos podem ser usados nos estudos de associação genômica ampla (RESENDE et al., 2012). Um deles é o método de Modelos Lineares Mistos (MLM) (BRADBURY et al., 2007). Pelo MLM LUDKE (2015) identificou 23 marcadores provavelmente associados com resistência parcial à podridão radicular de fitóftora em soja.

No trabalho de HWANG et al. (2014), em que utilizou o MLM, foram identificados 40 SNPs em 17 regiões do genoma possivelmente associados com teor de proteína em sementes de soja. Assim como se detectou 25 SNPs em 13 regiões do genoma associados com teor de

óleo em soja. Entre os marcadores identificados, sete apresentam associação significativa com os teores de proteína e óleo. VINHOLES (2014) identificou 12 marcadores no cromossomo 13 associados à resistência genética ao fitonematóide *Meloidogyne javanica*.

Assim, com os vários trabalhos que vêm sendo feitos, percebe-se que a identificação e validação de marcadores associados às características de interesse auxiliam a seleção de plantas nos programas de melhoramento. Logo, acredita-se que o uso da GWAS possibilita a identificação de genes associados com a resistência à pústula-bacteriana, o que auxiliaria no desenvolvimento de cultivares resistentes à fitobactéria.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliadas 118 cultivares de soja (Tabela 1). As sementes das cultivares foram provenientes de multiplicação no campo, entre março a julho de 2016, realizada pelo Programa Soja do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Para avaliar a reação das cultivares à fitobactéria *X. axonopodis* pv. *glycines*, dois isolados foram obtidos da coleção de culturas de fitobactérias do Instituto Biológico de Campinas, denominados de XAG2440^P e XAG2447. O isolado XAG2440^P corresponde à estirpe patótipo, que serve como referência para o patovar.

A reativação e preservação dos isolados foram feitas no Laboratório de Bacteriologia da UFV. Primeiramente, os isolados foram reidratados com 200 µL de água destilada estéril e as ampolas mantidas a temperatura ambiente por 60 minutos. A suspensão bacteriana das ampolas foi transferida para placas de Petri com meio 523 sólido (KADO e HESKETT, 1970) e espalhada com uma alça de Drigalsky, com posterior incubação das placas em B.O.D a 28°C por 48 horas. Posteriormente, uma suspensão bacteriana foi preparada em tubos criogênicos contendo 500 µL de glicerol a 30%. Após a homogeneização da solução suspensão os tubos foram armazenados no freezer -80°C.

Os isolados bacterianos foram sujeitos a testes de patogenicidade mediante inoculação de plantas de fumo (*Nicotina tabacum*) para observação da reação de hipersensibilidade (HR). Para tanto, cada isolado foi cultivado em meio 523 sólido (KADO e HESKETT, 1970) a 28°C por 48 horas. Adicionaram-se células de cada isolado em tubos de ensaio com solução de MgCl₂ a 10 mM para a preparação de suspensões bacterianas de aproximadamente 10⁸ unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL). Com o auxílio de seringa, as

suspensões foram infiltradas no mesófilo de folhas jovens de fumo, completamente desenvolvidas. Após 24 horas procedeu-se à avaliação para observar sintomas típicos de HR.

Tabela 1. Cultivares utilizados no experimento para resistência à *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*.

CULTIVARES			
5D660 RR	BRS282	CD239 RR	FUNDACEP57 RR
5D690 RR	BRS284	CD240 RR	FUNDACEP58 RR
5D711 RR	CAC-1	CD242 RR	FUNDACEP59 RR
5G770 RR	CD201	CD243 RR	FUNDACEP61 RR
5G830 RR	CD204	CD244 RR	FUNDACEP63 RR
A6001	CD205	CD245 RR	IGRARA516 RR
A8000	CD206	CD246	IGRARA518 RR
ANTA	CD206 RR	CD248 RR	IGRARA 626 RR
BMXFORÇA RR	CD208	CD249 RRSTS	IGRARA628 RR
BMXMAGNA RR	CD213 RR	CD250 RR STS	M6009 RR
BMXPOTENCIA RR	CD214 RR	CD251 RR	M6707 RR
BMXTURBO RR	CD215	CD252	M7211 RR
Bragg	CD216	CD253	M7639 RR
BRS133	CD217	CD254 RR	M7908 RR
BRS184	CD218	CD2630 RR	M9144 RR
BRS185	CD219 RR	CD2737 RR	MERCEDES70A
BRS213	CD221	CD2792 RR	MGBR48(GARIMPO)
BRS230	CD224	CD2800	M-SOY6101
BRS232	CD225 RR	CD2840	M-SOY7901
BRS243 RR	CD226 RR	CD2860	M-SOY8001
BRS246 RR	CD228	CD5969	NK3358
BRS256 RR	CD229 RR	CDFAPA	P98Y 51
BRS257	CD230 RR	EMBRAPA48	P98Y 70
BRS258	CD232	EMBRAPA59	R7
BRS259	CD233 RR	EMGOPA304	TMG1066 RR
BRS262	CD234 RR	FUNDACEP33	TMG115 RR
BRS268	CD235 RR	FUNDACEP39	TMG7161 RR
BRSMGRENASCENÇA	CD236 RR	FUNDACEP53 RR	UFV16(CAPINOPOLIS)
BRSMTPINTADO	CD237 RR	FUNDACEP55 RR	
BRSMG68(VENCEDORA)	CD238 RR	FUNDACEP56 RR	

Os experimentos foram instalados no dia 1 de outubro de 2016 e conduzidos separadamente para cada isolado. Foram realizados em casa de vegetação, localizada na Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais - EPAMIG Sudeste, localizada no Campus da UFV, município de Viçosa, Minas Gerais.

O delineamento experimental foi o de tratamentos inteiramente casualizados (DIC) com sete repetições. A parcela experimental foi constituída de um pote plástico de 200 mL de volume com uma planta. As sementes das 118 cultivares foram semeadas a uma profundidade de 3 cm em potes preenchidos com substrato comercial Tropstrato HT Hortaliças.

A inoculação das células bacterianas foi feita 25 dias após o plantio em soja nos estádios de desenvolvimento V3 e V4 (Fehr e Caviness, 1977), no primeiro trifólio completamente desenvolvido. Para tanto, suspensões bacterianas de cada isolado em solução de MgCl₂ a 10 mM, ajustadas a 10⁸ UFC/mL, foram preparadas utilizando cultivos em meio 523 sólido (KADO e HESKETT, 1970) crescidos a 28°C por 48 horas.

Vinte e quatro horas antes e depois da inoculação as plantas permaneceram em nevoeiro com 100% de umidade relativa do ar para favorecer a penetração das células bacterianas. Em cada folíolo do trifólio foram feitos vinte e oito furos com auxílio de alfinetes de cabeça Iara, número 29, com 2,9 cm de comprimento e 0,65 mm de diâmetro. Posteriormente foi feita a inoculação da suspensão bacteriana com auxílio de um pulverizador Milla, modelo AM-13062A (1,5 L) com 100 mL de suspensão bacteriana para cada 28 potes.

A avaliação nos genótipos da severidade da doença causada pelas duas estirpes de *X. axonopodis* pv. *glycines* foi realizada 15 dias após a inoculação. Para essa avaliação foi empregada escala de notas de severidade desenvolvida a partir da resposta fenotípica dos genótipos deste estudo à estirpe XAG2440^P. Essa escala é similar à definida por GORADIA et al. (2009) com notas que variaram de 1 a 5, em que 1= ausência de pústulas e 5 = maior severidade da doença conforme escala definida com resultados do próprio experimento (Figura 1). Com base nessa escala de notas, as cultivares foram classificadas como: resistentes (R), nota 1; moderadamente resistentes (MR), nota 2; moderadamente suscetíveis (MS), nota 3; suscetíveis (S), nota 4 e altamente suscetíveis (AS), nota 5. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com o software Genes (CRUZ, 2013) e as médias foram agrupadas pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Para estudo de GWAS, resultados da genotipagem das cultivares foram gentilmente cedidos pela COODETEC – Desenvolvimento, Produção e Comercialização Agrícola Ltda. A genotipagem foi realizada com marcadores SNPs na empresa Deoxi Biotecnologia Ltda®, em Araçatuba/SP, utilizando-se a plataforma Illumina *iScan* e o painel *Infinium iSelect HD Custom Genotyping BeadChips* 6k (Illumina, Inc, San Diego, CA, USA), customizado para soja.

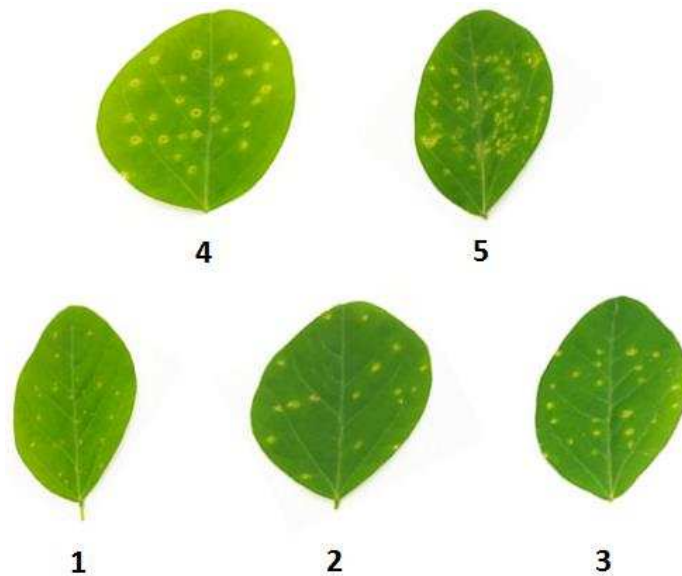


Figura 1. Escala de notas para severidade à pústula bacteriana. Severidade dos sintomas (baseada no número, tamanho e intensidade das pústulas) foi avaliada de 5 a 1. Sendo as notas 5 e 1 para maior e menor severidade, respectivamente. A nota de pústula bacteriana para CD244RR (controle resistente) e TMG7161RR (controle suscetível) foi 1 e 5, respectivamente.

Antes de submeter os dados à GWAS, avaliou-se a qualidade dos dados obtidos pela genotipagem. Foram utilizados apenas marcadores SNPs com menos de 10% de dados perdidos (*call rate* igual a 90 %) e eliminados os SNPs que apresentaram alelos menos frequentes (MAF) com frequência menor do que 5% (caso houvesse grande variabilidade fenotípica para a reação dos genótipos à fitobactéria) ou os SNPs monomórficos (caso houvesse baixa variabilidade fenotípica para a reação dos genótipos à fitobactéria).

Para a análise de associação genótipo/fenótipo, foi utilizado um painel de marcadores SNPs com 3.807 marcadores informativos para a estirpe XAG2440^P e 2.233 para a XAG2447 obtidos nesse mesmo conjunto de cultivares.

Para evitar a identificação de associação falso-positiva entre os dados fenotípicos e moleculares, foi realizada análise prévia de estrutura de populações.

A estrutura populacional (matriz Q) foi determinada pelo algoritmo Markov Chain Monte Carlo (MCMC) (GAO et al., 2007) utilizando o método de agrupamento Bayesiano generalizado implementado no software *InStruct* (MEYER, 2013). Esse método não precisa assumir equilíbrio de Hardy-Weinberg dentro de cada loco, e as frequências genotípicas esperadas são estimadas com base em taxas de endogamia ou autofecundação.

A melhor estimativa do número K de grupos foi determinada de acordo com o valor mais baixo de deviança (DIC - *Deviance Information Criterion*) entre todos os valores de K simulados.

A análise de associação dos dados genotípicos com o fenótipo foi realizada pelo método de Modelos Lineares Mistos, 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 com 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 dos genótipos; X e Z são as matrizes de incidência; e é o vetor de efeitos residuais aleatórios. Os vetores u e e têm distribuição normal, com média zero e variância dada por:

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

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 $P < 0,001$ foram considerados significativos na análise de associação SNP/fenótipo. Para facilitar a apresentação dos valores de probabilidade, estes foram expressos por $-\text{Log}_{10}(P)$, em que valores de $-\text{Log}_{10}(P)$ maiores ou iguais a 3 foram considerados significativos.

Uma vez que para a estirpe XAG2447, do painel de 118 cultivares de soja, apenas uma é suscetível, a análise de associação é limitada, pela baixa frequência da classe suscetível. Uma análise exploratória, incluindo também marcadores moleculares que apresentaram apenas um polimorfismo neste painel de variedades, foi conduzida para identificar regiões candidatas a conter um gene ou QTL de resistência. Neste caso, os marcadores com maior significância foram utilizados para a avaliação de haplótipos consistentes com a variação fenotípica, ou seja, marcadores que apresentassem o mesmo alelo em todas as variedades, exceto na variedade suscetível, que apresentasse um alelo diferente das demais.

Uma vez que os valores de probabilidades foram muito baixos, eles foram expressos por $-\text{Log}_{10}(P)$. A significância de cada marcador SNP, e sua posição no genoma foram plotados em gráficos do tipo Manhattan Plot.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo mostram a importância de conhecer a reação de resistência de genótipos de soja à doença pústula-bacteriana, visto a necessidade de obtenção de fontes de resistência à mesma.

A fonte de variação genótipos de soja apresentou efeito significativo ($P < 0,01$) pelo teste F (Tabela 2) sob a severidade da pústula-bacteriana causada pelas estirpes XAG2440^P e XAG2447. Esses resultados indicam haver reação diferencial entre os cultivares, o que evidencia a existência de variabilidade genética dentro da população de genótipos avaliados.

A precisão experimental, com coeficientes de variação ambiental de 18,6% e 7,9% para as estirpes XAG2440^P e XAG2447 respectivamente, indicou maior influência ambiental durante o experimento para a primeira, refletindo em maior variância ambiental. Ser acometida por maior influência ambiental é típico de características quantitativas, o que nesse trabalho pode-se levar à hipótese que o controle genético da resistência à estirpe XAG2440^P é realizado por maior número de genes que para o controle da resistência à estirpe XAG2447. Outras evidências deste fato são as maiores variâncias fenotípicas e genotípicas apresentadas para a severidade à estirpe XAG2440^P.

Tabela 2. Resumo da análise de variância da severidade de pústula-bacteriana causada pelas estirpes XAG2440^P e XAG2447 de *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* em 118 cultivares de soja.

Fonte de variação	GL	Estirpe 2440 ^P	Estirpe 2447
		QM	QM
Genótipos	117	3,65**	0,99**
Resíduo	708	0,45	0,01
Média		3,62	3,62
Coefficiente de variação ambiental (%)		18,57	7,88
Variância fenotípica (%)		52,16	14,12
Variância ambiental (%)		6,44	0,09
Variância genotípica (%)		45,71	14,02
Herdabilidade (%)		87,64	99,32

** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

QM: Quadrados médios

GL: Graus de liberdade

Os genótipos foram agrupados em cinco quando se usou a estirpe XAG2440^P (Tabela 3). Obtiveram-se 35 genótipos altamente susceptíveis, 35 susceptíveis, 42 moderadamente susceptíveis, cinco moderadamente resistentes e um resistente. Esses resultados condizem

com os encontrados por GORADIA et al. (2009). Estes avaliaram a resposta à pústula-bacteriana de 45 cultivares de soja, inoculados com a estirpe ATCC 17915 de *X. axonopodis* pv. *glycines* e observaram diferentes níveis de severidade de pústula bacteriana.

RIBEIRO et al. (2017) avaliaram a resistência de 58 linhagens de feijão à *X. axonopodis* pv. *phaseoli* e encontraram 6 linhagens resistentes, 21 moderadamente resistentes e 31 susceptíveis. Estes mesmos autores citaram a conclusão obtida no estudo de MARQUEZ et al. (2007) em que relatam que a baixa porcentagem de genótipos resistentes à *X. axonopodis* pv. *phaseoli* pode ser explicada pela ocorrência de efeitos aditivos e não aditivos, o que resulta em herança complexa.

Com a estirpe XAG2447, foram formados três grupos (Tabela 4). Dos 118 genótipos, 116 foram resistentes, um moderadamente resistente e um altamente susceptível. Resultados semelhantes foram obtidos por GORADIA et al. (2009) avaliando 525 cultivares de soja inoculados com a estirpe UIUC-1 de *X. axonopodis* pv. *glycines*. Os autores verificaram que a maioria dos genótipos também não apresentaram sintomas de pústula bacteriana.

Diferentemente do que ocorreu com os genótipos inoculados com a estirpe XAG2447, a maioria dos genótipos apresentaram sintomas de pústula bacteriana quando inoculados com a estirpe XAG2440^P, o que, conforme relatado por MKANDAWIRE et al. (2004), pode ser devido à diversidade genética entre as estirpes além da sua interação com as plantas de soja. Esses resultados sugerem que a estirpe XAG2440^P contém diferentes genes, em relação à estirpe XAG2447, capazes de suplantarem os genes de resistência dos genótipos de soja avaliados neste estudo.

O genótipo TMG 7161RR foi o primeiro a apresentar sintomas de pústula bacteriana, mostrando-se altamente suscetível à ação de ambas as estirpes. Ao contrário, o genótipo BMX POTÊNCIA RR foi suscetível à estirpe XAG2440^P, mas foi resistente a XAG2447.

Os genótipos BRS 243 RR, BRS 246 RR, BRS 284 e CD 214 RR, classificados por SOARES (2010) como resistentes a pústula-bacteriana, foram resistentes quando inoculados com a estirpe XAG2447, porém suscetíveis quando inoculados com a estirpe XAG2440^P.

O genótipo CD244RR foi resistente a ambas as estirpes. Esse genótipo teve nota 1 em ambas as avaliações, o que o caracteriza como boa fonte de resistência à pústula-bacteriana.

Tabela 3. Reação de cultivares de soja à estirpe XAG2440^P de *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, médias agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, média fenotípica do grupo e intervalo de notas dentro do grupo.

Genótipos	Reação	Agrupamento	Média	Intervalo
CD244RR	R	a	1	1
CD243RR, CD236RR, CD5969, FUNDACEP55RR, FUNDACEP58RR	MR	b	2,09	1,86-2,43
5D660RR, 5D711RR, 5G770RR, 5G830RR, A6001, A8000, BMXFORÇARR, BMXTURBARR, BRS232, BRS256RR, BRS185, CAC-1, CD206, CD214RR, CD215, CD216, CD224, CD229RR, CD232, CD233RR, CD234RR, CD235RR, CD237RR, CD246, CD250RRSTS, CD2630RR, CD2792RR, CD2800, CD205, FUNDACEP56RR, FUNDACEP61RR, IGRARA516RR, IGRARA518RR, IGRARA626RR, IGRARA628RR, M6009RR, M6707RR, M7639RR, M7908RR, M9144RR, TMG1066RR, UFV16(CAPINOPOLIS)	MS	c	3,06	2,57-3,42
5D690RR, ANTA, BRS184, BRS230, BRS243RR, BRS257, BRS259, BRS268, BRS284, BRSMG68(VENCEDORA), CD208, CD217, CD219RR, CD226RR, CD228, CD230RR, CD239RR, CD240RR, CD242RR, CD245RR, CD249RRSTS, CD251RR, CD253, CD254RR, CD2737RR, CD2840, FUNDACEP39, FUNDACEP59RR, FUNDACEP63RR, M7211RR, MERCEDES70 A, MGBR48(GARIMPO), M-SOY7901, P98Y51, R7	S	d	3,77	3,57-4,00
BMXMAGNARR, BMXPOTENCIARR, Bragg, BRS133, BRS213, BRS246RR, BRS258, BRS262, BRS282, BRSMGRENASCENÇA, BRSMTPINTADO, CD201, CD204, CD206RR, CD213RR, CD218, CD221, CD225RR, CD238RR, CD248RR, CD252, CD2860, CDFAPA, EMBRAPA48, EMBRAPA59, EMGOPA304, FUNDACEP33, FUNDACEP53RR, FUNDACEP57RR, M-SOY6101, M-SOY8001, NK3358, P98Y70, TMG115RR, TMG7161RR	AS	e	4,43	4,14-5,00

Tabela 4. Reação de cultivares de soja à estirpe XAG2447 de *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, médias agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, média fenotípica do grupo e intervalo de notas dentro do grupo.

Genótipos	Reação	Agrupamento	Média
5D660RR, 5D690RR, 5D711RR, 5G770RR, 5G830RR, A6001, A8000, ANTA, BMXFORÇARR, BMXMAGNARR, BMXPOTENCIARR, BMXTURBORR, Bragg, BRS133, BRS184, BRS185, BRS213, BRS230, BRS232, BRS243RR, BRS246RR, BRS256RR, BRS257, BRS258, BRS259, BRS262, BRS268, BRS282, BRS284, BRSMGRENASCENCA, BRSMTPINTADO, CAC-1, UFV16(CAPINOPOLIS), CD201, CD204, CD205, CD206, CD206RR, CD208, CD213RR, CD214RR, CD215, CD216, CD217, CD218, CD219RR, CD221, CD224, CD225RR, CD226RR, CD228, CD229RR, CD230RR, CD232, CD233RR, CD234RR, CD235RR, CD236RR, CD237RR, CD238RR, CD239RR, CD240RR, CD242RR, CD243RR, CD244RR, CD245RR, CD246, CD248RR, CD249RRSTS, CD250RRSTS, CD251RR, CD252, CD253, CD254RR, CD2630RR, CD2737RR, CD2792RR, CD2800, CD2840, CD2860, CD5969, CDFAPA, EMBRAPA48, EMBRAPA59, EMGOPA304, FUNDACEP33, FUNDACEP39, FUNDACEP53RR, FUNDACEP55RR, FUNDACEP56RR, FUNDACEP57RR, FUNDACEP58RR, FUNDACEP59RR, FUNDACEP61RR, FUNDACEP63RR, IGRARA516RR, IGRARA518RR, IGRARA626RR, IGRARA628RR, M6009RR, M6707RR, M7908RR, M9144RR, MERCEDES70A, MGBR48(GARIMPO), M-SOY6101, M-SOY7901, M-SOY8001, NK3358, P98Y51, P98Y70, R7, TMG1066RR, TMG115RR, BRSMG68(VENCEDORA)	R	a	1,00
M7211 RR	MR	b	2,00
TMG7161 RR	AS	c	5,00

Após a confirmação da variabilidade dos genótipos quanto à resistência a pústula-bacteriana, foi realizada a GWAS. Uma vez feito o controle de qualidade dos SNPs impostos, foram utilizados 2233 e 3807 SNPs para as estirpes XAG2440^P e XAG2447, respectivamente.

Por meio da GWAS foram identificados 11 potenciais marcadores associados com a resistência da soja à pústula-bacteriana causada pela estirpe XAG2440^P (Tabela 5 e Figura 1). Os marcadores identificados estão presentes em cinco cromossomos: cinco no cromossomo 3 (grupo de ligação N da soja); um em cada um dos cromossomos 5 (A1), 8 (G) e 10 (O); e três no cromossomo 13 (F) (Tabela 5 e Figura 1). O número de SNPs identificados para essa estirpe está de acordo com os resultados da análise dos parâmetros genéticos e ambientais (Tabela 2). Esses resultados evidenciaram que o controle da característica em questão é conferido por um maior número de genes do que para a estirpe XAG2447.

O marcador Gm03_46214163_C_T é o mais fortemente associado com a resistência à pústula-bacteriana causada pela estirpe XAG2440^P e está localizado no cromossomo 3. Entre os marcadores identificados como associados, outros quatro também estão posicionados neste mesmo cromossomo. O que indica essa região do genoma como candidata a ter um QTL associado com a característica em questão, com valor de P variando de 2,62E-04 a 8,96E-04.

Os valores de R^2 variaram de 0,13 a 0,16, ou seja, os marcadores identificados explicam de 13% a 16% da variação fenotípica observada nos genótipos avaliados. Este resultado evidencia a herança quantitativa da característica em questão, visto que mais de um marcador contribui de forma semelhante para a variação fenotípica dos genótipos.

Já para a resistência à ação da estirpe XAG2447, foram identificados cinco marcadores potenciais em três cromossomos. Sendo que três marcadores estão localizados no cromossomo 15 (grupo de ligação E) e um marcador localizado em cada um dos cromossomos 6 (C2) e 17 (D2) (Tabela 6 e Figura 2).

Em comparação ao número de SNPs identificados para a estirpe XAG2440^P, o resultado da associação genômica evidencia o menor número de genes envolvidos no controle da reação à doença e corrobora com os resultados encontrados por meio das análises de parâmetros genéticos e ambientais (Tabela 2).

Os marcadores localizados no cromossomo 15, Gm15_5097389_T_C, Gm15_5363077_C_T e Gm15_5438610_G_A, evidenciam a presença de uma região (QTL) fortemente associada à característica em estudo, visto que eles se encontram muito próximos no genoma (Tabela 6 e Figura 2).

Tabela 5. Marcadores SNPs identificados e possivelmente associados à resistência da soja à pústula-bacteriana causada pela estirpe XAG2440^P de *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*.

SNP	Cromossomo	Posição (pares de bases)	p [*]	-Log10(P)	R ² **
Gm03_36438792_G_T	3	36438792	8,96E-04	3,05	0,13
Gm03_36634361_G_A	3	36634361	6,94E-04	3,16	0,14
Gm03_38069022_A_G	3	38069022	4,62E-04	3,34	0,14
Gm03_46055685_C_T	3	46055685	3,36E-04	3,47	0,15
Gm03_46214163_C_T	3	46214163	2,62E-04	3,58	0,16
Gm05_682648_A_G	5	682648	4,57E-04	3,34	0,14
Gm08_42793022_A_G	8	42793022	2,77E-04	3,56	0,15
Gm10_2437001_A_G	10	2437001	4,64E-04	3,33	0,14
Gm13_27665585_A_G	13	27665585	7,06E-04	3,15	0,14
Gm13_29677928_G_T	13	29677928	5,19E-04	3,28	0,14
Gm13_32875289_C_A	13	32875289	6,33E-04	3,20	0,14

* Significância de associação entre marcador e QTL

** Proporção da variação fenotípica explicada pelo marcador

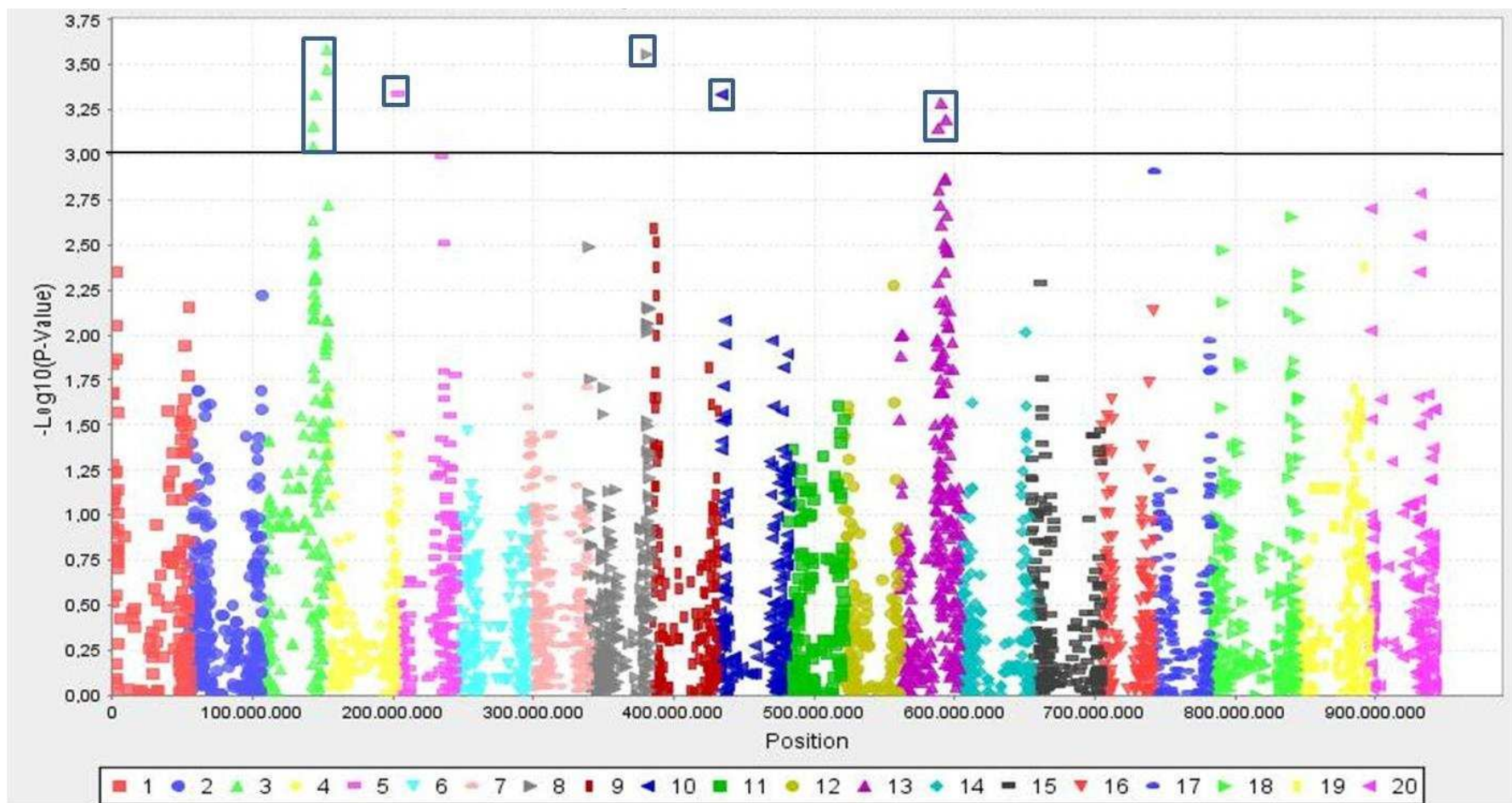


Figura 2. Distribuição gráfica dos valores de $-\text{Log}_{10}(\text{P})$ dos marcadores SNPs nos 20 cromossomos da soja associados com a resistência à estirpe XAG2440^p de *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*. Marcadores SNPs localizados acima da linha preta (posição $-\text{Log}_{10}(\text{P})$ igual a 3) foram considerados associados com a resistência à pústula-bacteriana.

Tabela 6. Marcadores SNPs identificados e possivelmente associados à resistência da soja à pústula-bacteriana causada pela estirpe XAG2447 de *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*.

SNP	Cromossomo	Posição (pares de bases)	p [*]	-Log10(P)	R ² **
Gm06_9442481_T_C	6	9442481	1,08E-23	22,97	0,94
Gm15_5097389_T_C	15	5097389	1,10E-23	22,96	0,94
Gm15_5363077_C_T	15	5363077	1,10E-23	22,96	0,94
Gm15_5438610_G_A	15	5438610	1,10E-23	22,96	0,94
Gm17_7280661_C_T	17	7280661	9,03E-25	24,04	0,94

* Significância de associação entre marcador e QTL

** Proporção da variação fenotípica explicada pelo marcador

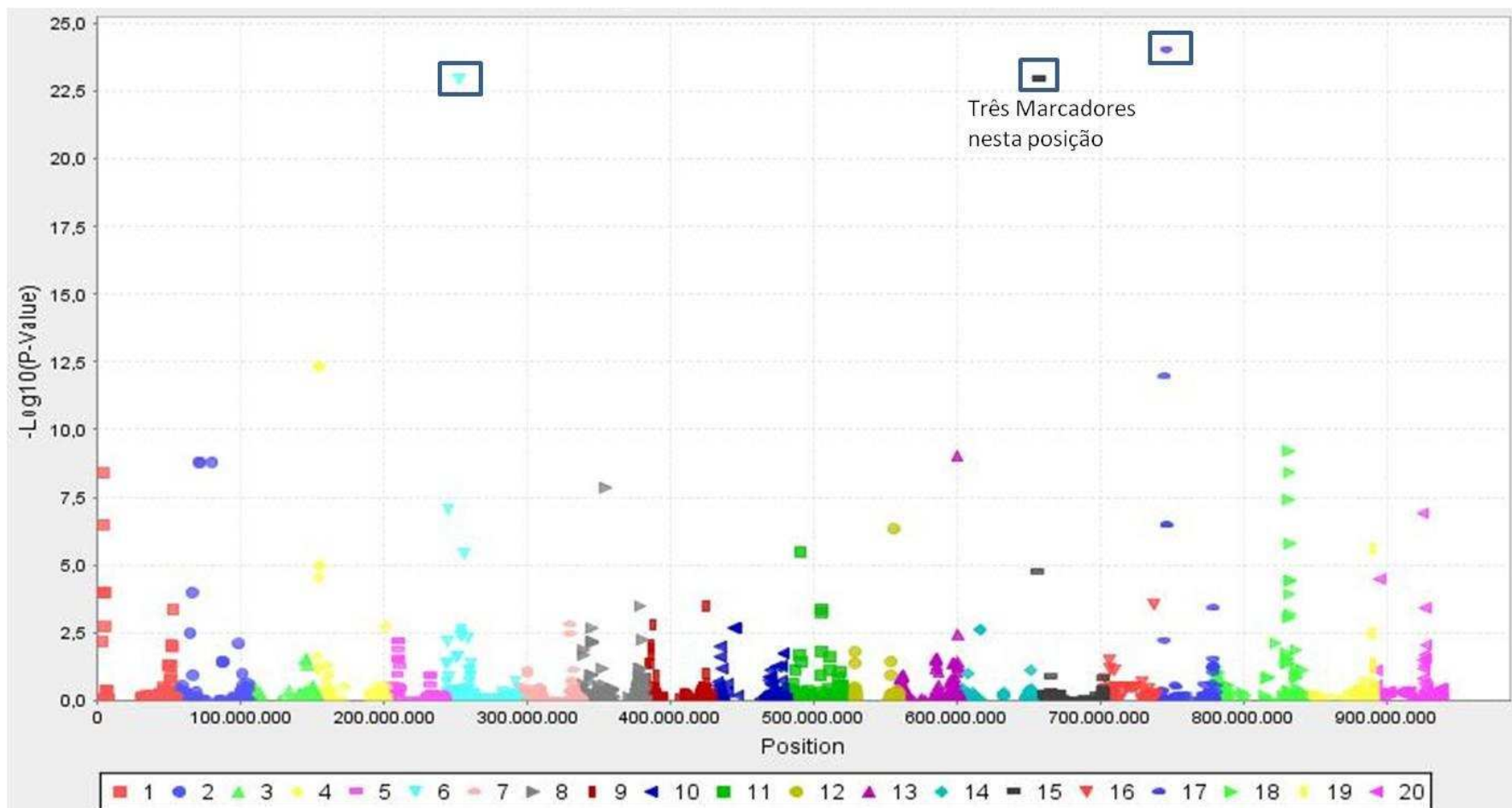


Figura 3. Distribuição gráfica dos valores de $-\text{Log}_{10}(\text{P})$ dos marcadores SNPs nos 20 cromossomos da soja associados com a resistência à estirpe XAG2447 de *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*.

O marcador Gm17_7280661_C_T localizado no cromossomo 17 é o marcador mais fortemente associado à resistência à pústula-bacteriana causada pela estirpe XAG2447. Os altos valores de R^2 revelaram ser essa característica oligogênica, visto que cada marcador é capaz de explicar 0,94% da variação fenotípica.

Até o momento não há informações sobre regiões do genoma da soja relacionadas com resistência genética à pústula-bacteriana. Com o uso da plataforma SoyBase (www.soybase.org) (GRANT et al., 2010), foi possível identificar regiões cromossômicas que englobam diferentes QTLs descritos na literatura e nas quais estão presentes os SNPs identificados no presente estudo (Figuras 3 e 4).

Ao analisar os QTLs descritos na literatura científica posicionados no cromossomo 3 (Figura 3A), verificou-se que os marcadores identificados no presente estudo estão localizados em regiões que conferem resistência de genótipos de soja à *Heterodera glycines* (JIAO et al., 2015), à eficiência na absorção de ferro em solos calcários (LIN et al., 2000), à resistência ao mosaico da soja (YAN et al., 2015), à tolerância ao estresse salino (HA et al., 2013) e a resistência à *Bemisia tabaci* (ZHANG et al., 2013).

O marcador Gm08_42793022_A_G presente no cromossomo 8 encontra-se na região em que GUO et al. (2008) identificaram QTL associado com a resistência de genótipos de soja à *Sclerotinia sclerotiorum* (Figura 3B).

Na região do cromossomo 13 onde se identificou neste estudo três possíveis marcadores, encontram-se QTLs para resistência de cultivares de soja a *Fusarium solani* f.sp. *glycines* (SWAMINATHAN et al., 2016a), para tolerância ao estresse por alumínio (BIANCHI-HALL et al., 2000) e para resistência à *Phytophthora sojae* (WANG et al., 2012) (Figura 3C).

No cromossomo 5, próximo a região cromossômica onde se encontra o marcador Gm05_682648_A_G, não há relatos de QTLs descritos na plataforma SoyBase. O mesmo foi observado para o cromossomo 10 com o marcador Gm10_2437001_A_G.

O marcador Gm06_9442481_T_C presente no cromossomo 6 está localizado em uma região onde foram identificados QTLs para resistência de cultivares de soja à *Phytophthora sojae* (WU et al., 2010) e para *Fusarium solani* f.sp. *glycines* (ABDELMAJID et al., 2012) (Figura 4A).

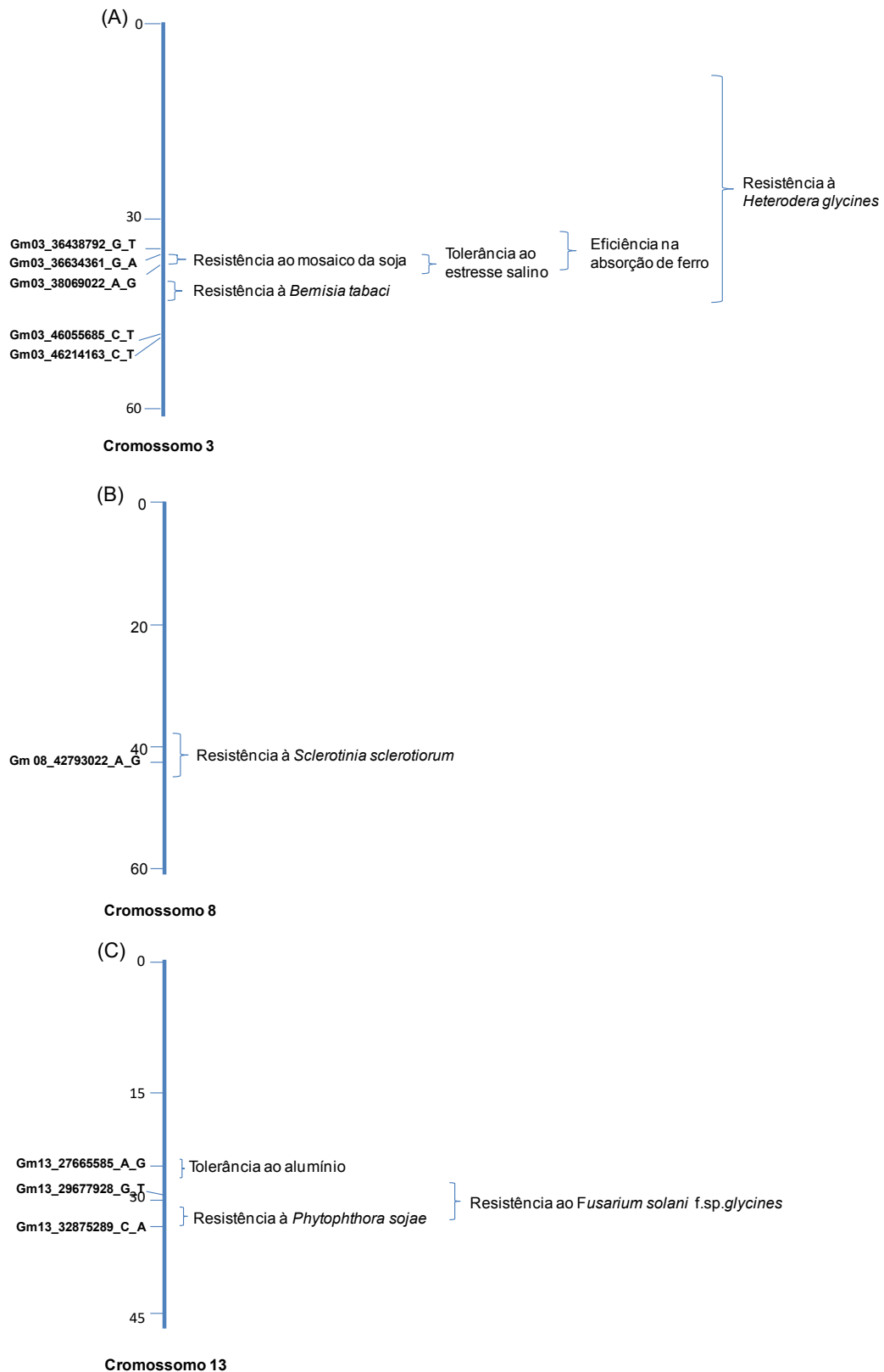


Figura 4. QTLs identificados e descritos nos cromossomos 3 (A), 8 (B) e 13 (C) pela plataforma SoyBase e que estão associados a resistência à doenças e tolerância a estresses abióticos (à direita), localizados em regiões cromossômicas próximas aos marcadores associados à severidade de pústula-bacteriana (à esquerda) causada pela estirpe XAG2440^P de *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*. Números à esquerda, na barra indicam o número de milhões de pares de bases em cada cromossomo.

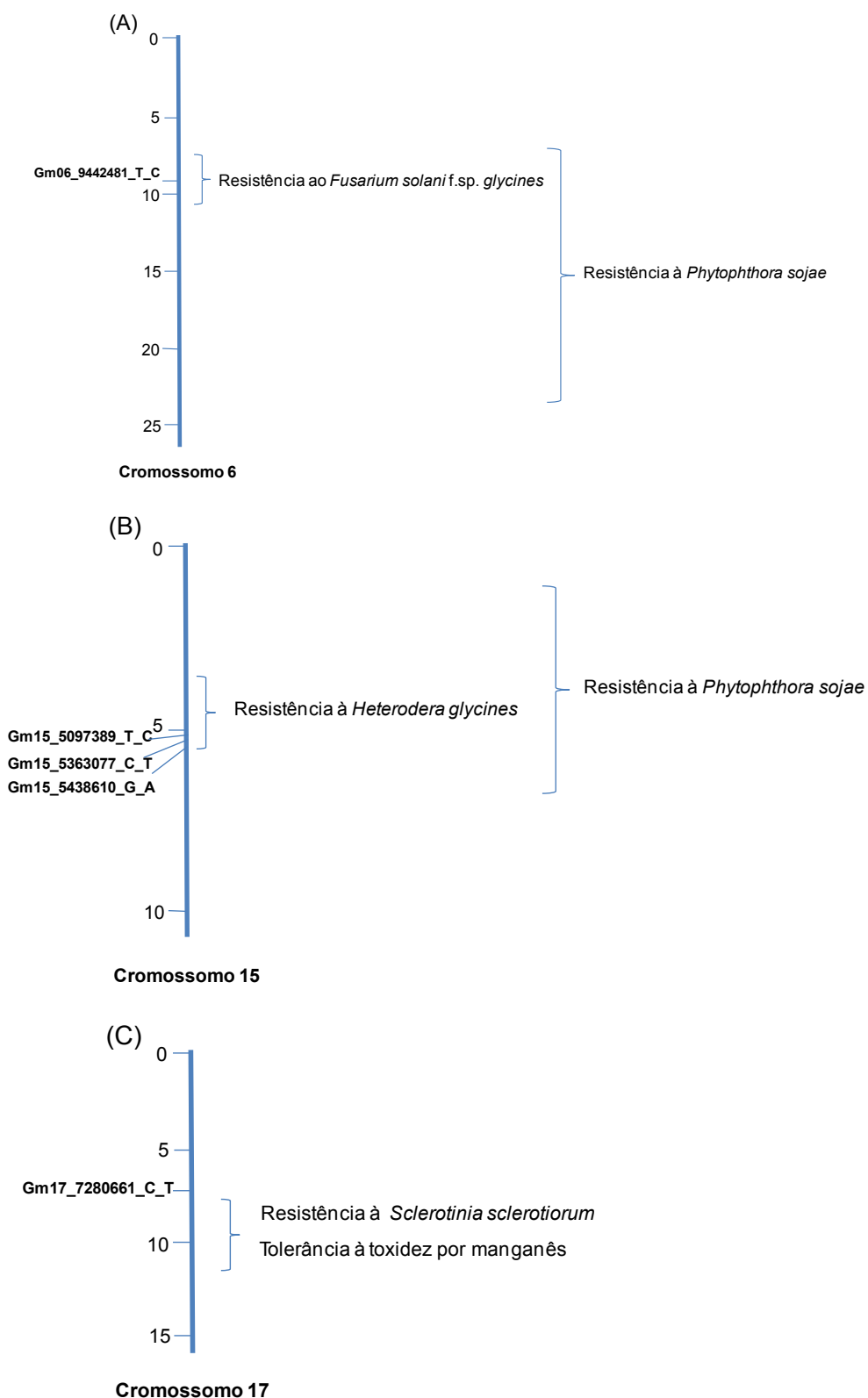


Figura 5. QTLs identificados e descritos nos cromossomos 6 (A), 15 (B) e 17 (C) pela plataforma SoyBase e que estão associados a resistência à doenças e tolerância a estresses abióticos (à direita), localizados em regiões cromossômicas próximas aos marcadores associados à severidade de pústula-bacteriana (à esquerda) causada pela estirpe XAG2447 de *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*. Números à esquerda, na barra indicam o número de milhões de pares de bases em cada cromossomo.

No cromossomo 15 em regiões que englobam os três marcadores identificados no presente estudo tem-se descrito QTLs para resistência a *Phytophthora sojae* (LEE et al., 2013) e à *Heterodera glycines* (QIU et al., 1999) (Figura 4B). Já para o cromossomo 17, próximo ao marcador Gm17_7280661_C_T tem-se descrito QTLs para a resistência de genótipos de soja à *Sclerotinia sclerotiorum* (ARAHANA et al., 2001) e com tolerância ao manganês (KASSEM et al., 2001) (Figura 4C).

Portanto, para a maioria das regiões identificadas no presente estudo, já foram relatados QTLs associados à resistência a diferentes patógenos. Após a validação desses marcadores SNPs relacionados à resistência à pústula-bacteriana, pode-se utiliza-los para a seleção assistida de genótipos resistentes. Essas regiões do genoma da soja com diferentes associações são um recurso a mais nos programas de melhoramento, por possibilitarem a seleção de genótipos de soja com uma maior frequência de alelos favoráveis para diferentes características simultaneamente, devido à pleiotropia.

Um exemplo de pleiotropia foi descrito por HWANG et al. (2014) ao trabalharem com 298 genótipos do banco de germoplasma do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (*United States Department of Agriculture, USDA*) para identificar marcadores associados com teor de óleo e proteína em sementes de soja. Os autores identificaram sete marcadores SNPs que estão associados com ambas às características, contudo os alelos associados com alto teor de proteína estão associados com baixo teor de óleo e vice-versa.

Na tabela 7 estão indicados os marcadores identificados e os respectivos genótipos predominantes em cada loco nas cultivares de soja pertencente aos haplótipos quanto à reação à estirpe XAG2440^P. No haplótipo resistente, cinco marcadores obtiveram loci não informativos e, analisando os demais loci informativos, apenas o referente ao marcador Gm03_46055685_C_T possui genótipo semelhante ao grupo de genótipos moderadamente resistente e diferente aos demais. Esse marcador é importante para a seleção assistida de genótipos resistentes à estirpe XAG2440^P.

Assim, ao analisar o haplótipo moderadamente resistente, verificou-se que os genótipos GG, CC, CC e TT associados aos loci referentes aos marcadores Gm03_38069022_A_G, Gm03_46055685_C_T, Gm03_46214163_C_T e Gm13_29677928_G_T, respectivamente, conferem resistência à estirpe XAG2440^P.

Por meio da tabela 7 foi possível identificar a não contribuição de loci para a resistência à estirpe 2440^P, sendo eles referentes aos marcadores Gm03_36438792_G_T, Gm03_36634361_G_A, Gm05_682648_A_G, Gm08_42793022_A_G, Gm10_2437001_A_G

e Gm13_27665585_A_G. Já o marcador Gm13_32875289_C_A contribui em uma menor escala para a resistência de genótipos, uma vez que o alelo C somente esteve presente em genótipos altamente susceptíveis.

Tabela 7. Marcadores SNPs identificados e os respectivos genótipos predominantes em cada loco nas cultivares de soja pertencente aos diferentes haplótipos quanto à reação à estirpe XAG2440^P de *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*.

Marcadores	Grupos de haplótipos*				
	R	MR	MS	S	AS
Gm03_36438792_G_T	___**	GG	GG	TT	GG
Gm03_36634361_G_A	___	GG	GG	GG	GG
Gm03_38069022_A_G	___	GG	AA	AA	AA
Gm03_46055685_C_T	CC	CC	TT	TT	TT
Gm03_46214163_C_T	___	CC	TT	TT	TT
Gm05_682648_A_G	AA	AA	AA	AA	AA
Gm08_42793022_A_G	GG	GG	GG	GG	GG
Gm10_2437001_A_G	AA	___	AA	AA	AA
Gm13_27665585_A_G	GG	GG	GG	GG	GG
Gm13_29677928_G_T	___	TT	GG	GG	GG
Gm13_32875289_C_A	AA	AA	AA	AA	CC

* Grupos de reação: resistente (R), moderadamente resistente (MR), moderadamente suscetível (MS), suscetível (S) e altamente suscetível (AS); **_loco não informativo.

Quanto ao haplótipo de resistência à estirpe XAG2447, verificou-se que os genótipos resistentes possuíam os alelos T, T, C, G e C referentes aos marcadores Gm06_9442481_T_C, Gm15_5097389_T_C, Gm15_5363077_C_T, Gm15_5438610_G_A e Gm17_7280661_C_T, respectivamente. Logo, esses marcadores são úteis à seleção assistida para genótipos resistentes a esta estirpe. O genótipo TMG 7161RR foi o único suscetível a ação da estirpe XAG2447 com os alelos C, C, T, A e T para os respectivos marcadores citados.

A identificação de alelos associados com características fenotípicas é um grande avanço por que essa associação se mantém ao longo de várias gerações de melhoramento, facilitando a identificação de genes relacionados com tais características. (CONTRERAS-SOTO et al., 2017).

Além disso, o conhecimento dos alelos de resistência favorece o desenvolvimento de estratégias de cruzamentos para a piramidação gênica. Assim, baseando-se nos haplótipos de resistência, grupos de genótipos resistentes e moderadamente resistentes, sugeriram-se cruzamentos visando a piramidação de genes de resistência. Partiu-se do princípio de que o ideótipo é aquele que possui os genótipos GG, CC, CC e TT associados aos loci referentes aos marcadores Gm03_38069022_A_G, Gm03_46055685_C_T, Gm03_46214163_C_T e Gm13_29677928_G_T, respectivamente (Tabela 8).

Cruzamentos entre a cultivar CD 244RR com as cultivares CD 243 RR e FUNDACEP 55 RR e posteriormente as populações F₁s originadas desses cruzamentos deveriam ser cruzadas com as cultivares CD 5969 e FUNDACEP 58 RR. O que possibilita obter populações passíveis de identificação de genótipos portadores de todos os alelos de resistência à estirpe XAG2440^P identificados no presente estudo.

Tabela 8. Genótipos de soja, grupos de reação à pústula-bacteriana causada pela estirpe XAG2440^P de *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (entre parênteses) e alelos favoráveis referentes aos marcadores SNPs associados com a resistência à pústula-bacteriana.

Marcadores	Genótipos (Grupo de reação)					
	CD244RR (R)	CD243RR (MR)	CD236RR (MR)	CD5969 (MR)	FUNDACEP55RR (MR)	FUNDACEP58RR (MR)
Gm03_38069022_A_G	-*	x	x		x	-
Gm03_46055685_C_T	x**	-		x	-	x
Gm03_46214163_C_T	-	-		x	-	x
Gm13_29677928_G_T	-	x		-	x	

* loco não informativo; ** alelos favoráveis.

5. CONCLUSÕES

O genótipo CD244RR é uma importante fonte de resistência à pústula-bacteriana causada pelas estirpes XAG2440^P e XAG2447.

Os marcadores Gm03_36438792_G_T, Gm03_36634361_G_A, Gm03_38069022_A_G, Gm03_46055685_C_T, Gm03_46214163_C_T, Gm05_682648_A_G, Gm08_42793022_A_G, Gm10_2437001_A_G, Gm13_27665585_A_G, Gm13_29677928_G_T, Gm13_32875289_C_A SNPs identificados para resistência à estirpe XAG2440^P e os marcadores Gm06_9442481_T_C, Gm15_5097389_T_C, Gm15_5363077_C_T, Gm15_5438610_G_A, Gm17_7280661_C_T identificados para resistência a estirpe XAG2447 são úteis para uso em seleção assistida por marcadores moleculares no melhoramento genético da soja para resistência à pústula-bacteriana causada por essas estirpes.

Cruzamentos envolvendo as cultivares CD244RR, CD243RR, CD5969, FUNDACEP55RR e FUNDACEP58RR permitem a obtenção de genótipos portadores de todos os possíveis alelos de resistência à estirpe XAG2440^P de *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*.

REFERÊNCIAS

ABDELMAJID, K.; RAMOS, L.; LEANDRO, L.; MBOFUNG, G.; HYTEN, D.; KANTARTZI, S.; GRIER, R.; NJITI, V.; CIANZIO, S.; MEKSEM, K. The 'PI 438489B' by 'Hamilton' SNP-based genetic linkage map of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] identified quantitative trait loci that underlie seedling SDS resistance. **Journal of Plant Genome Sciences**, v.1, p.18-30, 2012.

ALMEIDA, A.M.R.; FERREIRA, L.P.; YORINORI, J.T.; SILVA, J.F.V.; HENNING, A.A.; GODOY, C.V.; COSTAMILAN, L.M.; MEYER, M.C. Doenças da soja. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia- doenças de plantas cultivadas**. São Paulo: Cares, p. 569-588, 2005.

ANDRUS, C.F.; MOORE, W.D. *Colletotrichum truncatum* (Schw.), n. comb., on garden and lima beans. **Phytopathology**, v.25, p.121-125, 1935.

ARAHANA, V.S., GRAEF, G.L., SPECHT, J.E., STEADMAN, J.R., ESKRIDGE, K.M. Identification of QTLs for Resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in Soybean. **Crop Science**, vol.41, p.180-188, 2001.

ÁVILA, M. R.; BRACCINI, A.L.; SCAPIM, C.A.; MANDARINO, J.M.G.; ALBRECHT, L.P.; FILHO, P. S. V. Componentes do rendimento, teores de isoflavonas, proteínas, óleo e qualidade de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 29, p. 111-127, 2007.

BARY, A. DE. Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze Mycetozen und Bacterien. **Engelmann, Leipzig**, 558p, 1884.

BIANCHI-HALL, C.M.; CARTER, T.E.; JR., BAILEY, M.A.; MIAN, M.A.R.; RUFTY, T.W.; ASHLEY, D.A.; BOERMA, H.R.; ARELLANO, C.; HUSSEY, R.S.; PARROTT, W.A. Aluminum tolerance associated with quantitative trait loci derived from soybean PI 416937 in hydroponics. **Crop Science**, v.40, p. 538-545, 2000.

BORÉM, A.; CAIXETA, E.T.; (ed.) Marcadores Moleculares. **Editores Folha de Viçosa**, MG, 532p, 2009.

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, p. 2633-2635, 2007.

BUSH, W. S.; MOORE, J. H. Chapter 11: Genome-Wide Association Studies. **PLoS Computational Biology**, v. 8, p. e1002822, 2012.

CASTRO, L.H.S.; VIANNA, V.F.; DIMAURO, A.O.; UNÊDA-TREVISOLI, S.H. Melhoramento genético da soja visando resistência a fitopatógenos. In: LEMES, E.; CASTRO, L.; ASSIS, R. (ED.). **Doenças da soja: melhoramento genético e técnicas de manejo**. Campinas, SP: Millennium, p.179-203, 2015.

CHATNAPARAT, T.; PRATHUANGWONG, S.; LINDOW, S. E. Global pattern of gene expression of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* within soybean leaves. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 29, p. 508-522, 2016.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em:<<http://www.conab.gov.br>>, Acesso em: 09 de julho, 2017.

CONTRERAS-SOTO, R.I.; MORA, F.; DE OLIVEIRA, MAR.; HIGASHI, W.; SCAPIM, CA.; SCHUSTER, I. A Genome-Wide Association Study for agronomic traits in soybean using SNP markers and SNP-Based haplotype analysis. **Journal PLOS ONE** 12(2): e0171105, 2017.

COOKE, M.C.; PECK, C.H. The Erysiphei of the United States. **Journal of Botany, British and Foreign**, v.10, p.11-14, 1872.

CRUZ, C.D. **Programa Genes: Biometria**. Editora UFV. Viçosa (MG). 382p. 2013.
CRUZ, C.D.; SALGADO, C.C.; BHERING, L.L. (ed.) **Genômica aplicada**. Suprema Gráfica e editora Ltda.424p, 2013.

EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Tecnologia de Produção de Soja – Região Central do Brasil 2012 e 2013. Londrina. PR: **Embrapa Soja**. 264p, 2011.

EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Tecnologia de Produção de Soja – Região Central do Brasil 2014. Londrina. PR: **Embrapa Soja**, 266p, 2013.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. Stages of soybean. **Iowa State University Cooperative Extension Service Special Report**, v. 80, 1977.

GAO, H.; WILLIAMSON, S.; BUSTAMANTE, CD. A Markov Chain Monte Carlo approach for joint inference of population structure and inbreeding rates from multilocus genotype data. **Genetics**, v.176, p. 1635–1651, 2007.

GODOY, C.V.; ALMEIDA, A.M.R.; SOARES, R.M.; SEIXAS, C.D.S.; DIAS, W.P.; MEYER, M.C.; COSTAMILAN,L.M.; HENNING,A.A. **Doenças da soja**. Sociedade Brasileira de Fitopatologia (SBF), 2014.

GOIDÀNICH, G. Revisione del genere *Macrophomina* Petrak. Specie tipica: *Macrophomina phaseolina* (Tassi) G. Goid. n. comb. nec *M. phaseoli* (Maubl.) Ashby. **Annali della Sperimentazione Agraria**. v.1, p.449-461, 1947.

GORADIA, L.; HARTMAN, G.L.; DANIEL, S.L. Evaluation of glyphosate-tolerant soybean cultivars for resistance to bacterial pustule. **European Journal of plant Pathology**, v.124, p. 331-335, 2009.

GRANT, D.; NELSON, RT.; CANNON, SB.; SHOEMAKER, RC. Soybase, the USDA-ARS soybean genetics and genomics database. **Nucleic Acids Research**, V.38, P. 843-846, 2010.

GUO, X.; WANG, D.; GORDON, S.; HELLIWELL, E.; SMITH, T.; BERRY, S.; ST. MARTIN, S.; DORRANCE, A. Genetic mapping of QTLs underlying partial resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in Soybean PI 391589A and PI 391589B. **Crop Science**, v.48, p.1129-1139, 2008.

HA, B; VUONG, T; VELUSAMY, V; NGUYEN, H; SHANNON, J; LEE, J. Genetic mapping of quantitative trait loci conditioning salt tolerance in wild soybean. **Euphytica**, v.193, p. 79-88, 2013

HARTWIG, E.E.; LEHMAN, S.G. Inheritance of resistance to bacterial pustule disease in Soybeans. **Agronomy Journal**, v.43, p. 226-229, 1951.

HENNING, A.A. Manejo de doenças da soja (*Glycine max* L. Merrill). **Informativo Abrates**, v.19, p. 9-12, 2009.

HWANG, E.; SONG, Q.; JIA, G.; SPECHT, J.E.; HYTEN, D.L.; COSTAA, J.; CREGAN, P.B. A genome wide association study of seed protein and oil content in soybean. **BioMed Central Genomics**, v.15,p.1-12, 2014.

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

JIAO, Y., VUONG, T., LIU, Y., MEINHARDT, C., LIU, Y., JOSHI, T., CREGAN, P., XU, D., SHANNON, J., NGUYEN, H. Identification and evaluation of quantitative trait loci underlying resistance to multiple HG types of soybean cyst nematode. **Theoretical and Applied Genetics**, vol.128, p.15-23, 2015.

KADO, C.I.; HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v. 60, p.969-976, 1970.

KASSEM, M.Y.A.; MEKSEM, K.; KANG, C.H.; NJITI, V.N.; KILO, V.; WOOD, A.J.; LIGHTFOOT, DAVID. A. Loci underlying resistance to manganese toxicity mapped in a soybean recombinant inbred line population of 'Essex' x 'Forrest'. **Plant Soil**, v. 260, p.197-204, 2004.

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

KORTE, A.; FARLOW, A. The advantages and limitations of trait analysis with GWAS: a review. **Plant Methods**, v.9,p.29-38, 2013.

LAURIEL, C.C; DOHENY, K.F; MIREL, D.B; PUGH, E.W; BIERUT,L.J; BHANGALE,T; BOEHM,F; CAPORASO,N.E; CORNELIS,M.C; EDENBERG,H.J; GABRIEL, S.B; HARRIS,E.L; HU,F.B; JACOBS,K.B; KRAFT,P; LANDI,M.T; LUMLEY,T; MANOLIO,T.A; MCHUGH,C; PAINTER,I; PASCHALL,J; RICE,J.P; RICE,K.M; ZHENG,X; WEIR,B.S. Quality control and quality assurance in genotypic data for Genome-Wide Association Studies. **Genetic Epidemiology**, v. 34, p. 591-602, 2010.

LEE, S; ROUF MIAN, M; MCHALE, L; WANG, H; WIJERATNE, A; SNELLER, C; DORRANCE, A. Novel quantitative trait loci for partial resistance to *Phytophthora sojae* in soybean PI 398841. **Theoretical and Applied Genetics**, v.126, p.1121-1132, 2013.

LIN, S.F., GRANT, D., CIANZIO, S.R., SHOEMAKER, R.C. Molecular characterization of iron deficiency chlorosis in soybean. **Journal of Plant Nutrition**, v.23, p.1929-1939, 2000.

LÜDKE, W.H. **Associação genômica para resistência parcial de soja à *Phytophthora sojae***. Viçosa, 2015. 23f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2015.

MARQUEZ ML.;TERÁN, H.; SINGH, SP. Selecting common bean with genes of different evolutionary origins for resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. **Crop Science** v.47, p. 1367-1374, 2007.

MATSUMOTO, T.; TOMOYASU. *Cercospora kikuchii*. **M.W. Gardner, Proc. Indiana Acad. Sci.**12p, 1927.

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.

MEYER, M. J.; DAS, J.; WANG, X.; YU, H. INstruct: a database of high-quality 3D structurally resolved protein interactome networks. **Bioinformatics**, v.29, p. 1577–1579, 2013.

MKANDAWIRE, A.B.C.; MABAGALA, R.B.; GUZMAN, P.; GEPTS, P.; GILBERTSON, R.L. Genetic and pathogenic variation of common blight bacteria (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*). **Phytopathology**, v.94, p. 593-603, 2004.

NARVEL, J.M.; JAKKULA, L.R.; PHILLIPS, D.V; WANG, T; LEE, S.H; BOERMA, H.R. Molecular mapping of *rxp* conditioning reaction to bacterial pustule in Soybean. **The Journal of Heredity**, v.92, p. 267-270, 2001.

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

QIU, B.X; ARELLI, P.R; SLEPER, D.A. RFLP markers associated with soybean cyst nematode resistance and seed composition in a 'Peking' x 'Essex' population. **Theoretical and Applied Genetics**. V. 98, p. 356-364, 1999.

RAFALSKI, J. A. Association genetics in crop improvement. **Current Opinion in Plant Biology**. v. 13, p. 174–180, 2010.

RESENDE, M.D.V.; SILVA, F.F.; AZEVEDO, C. F. **Seleção genômica ampla (GWS) via modelos mistos (REML/BLUP), inferência Bayesiana (MCMC), Regressão aleatória multivariada (RRM) e Estatística Espacial**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa/departamento de estatística. 291 p. http://www.det.ufv.br/ppestbio/corpo_docente.php, 2012.

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.

RIBEIRO, T; AZEVEDO, C.V.G; ESTEVES,J.A.F; CARBONELL,S.A.M; ITO,M.F; CHIORATO,A.F. Reaction of common bean lines to *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *Flaccumfaciens*. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** v.17, p. 40-46, 2017.

SEDIYAMA, T. **Tecnologias de produção e usos da soja**. Londrina: Ed. Mecenaz, 314.p, 2009.

SEDIYAMA, T.; SILVA, F.; BOREM, A. (ed.) **Soja: do plantio a colheita**. Editora UFV MG, 333p, 2015.

SHIN, H.D.; BRAUN, U. Notes on Korean Cercosporae and allied genera (II). **Mycotaxon**, v. 58 p.157-166, 1996.

SOARES, R.M. **Development of method for inoculation and evaluation of soybean genotypes reaction to bacterial pustule**. EMBRAPA Soja, 2010.

SWAMINATHAN, S.; ABEYSEKARA, N.; LIU, M.; CIANZIO, S.; BHATTACHARYYA, M. Quantitative trait loci underlying host responses of soybean to *Fusarium virguliforme* toxins that cause foliar sudden death syndrome. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 129 p. 495-506, 2016.

SYDOW, H.; SYDOW, P. Beitrag zur Kenntnis der parasitischen Pilze der Insel Formosa. **Annales Mycologici**. v.12, p.105-112, 1914.

USDA. United States Department of Agriculture. **Foreign Agriculture Service**. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/psdonline>>. Acesso em: 13 de julho, 2017.

VALTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Reclassification of Xanthomonas. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.45, p. 472-489, 1995.

VINHOLE, P.S. **Associação genômica para resistência da soja a *Meloidogyne Javanica* e *Macrophomina phaseolina***. 2014. 115f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

WANG, H.; ST. MARTIN, S.; DORRANCE, A. Comparison of phenotypic methods and yield contributions of quantitative trait loci for partial resistance to *Phytophthora sojae* in soybean. **Crop Science**, v. 52, p. 609-622, 2012.

WEI, C.T. Notes on Corynespora. **Mycological Papers**. v.34 p.1-10,1950.

WRATHER, J. A.; KOENNING, S.R. Estimates of disease effects on soybean yields in the United States, 2003-2005. **Journal of Nematology**, v. 38, p. 173-180, 2006.

WU, X.; ZHOU, B.; ZHAO, J.; GUO, N.; ZHANG, B.; YANG, F.; CHEN, S.; GAI, J.; XING, H. Identification of quantitative trait loci for partial resistance to *Phytophthora sojae* in soybean. **Plant Breeding**, v.130, p. 144-149, 2010.

YAN, H.; WANG, H.; CHENG, H.; HU, Z.; CHU, S.; ZHANG, G.; YU, D. Detection and fine-mapping of Soybean mosaic virus resistance genes via linkage and association analysis in soybean. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 57, p.722-729, 2015.

ZHANG, J.; LI, W.; ZHANG, L.; DAI, H.; CI, D.; XU, R. QTL Mapping of soybean resistance to whitefly (*Bemisia tabaci* Gennadius) under multi-environment conditions. **Australian Journal of Crop Science**, v.7, p. 1212-1218, 2013.

ZHANG, J.; SONG, Q.; CREGAN, PB.; NELSON, RL.; WANG, X.; WU, J.; JIANG, GL.; ZHANG. Genome-wide association study for flowering time, maturity dates and plant height in early maturing soybean (*Glycine max*) germplasm. **BioMed Central Genomics**, v.16, p.217-228, 2015.

ZINSOU, V.A.; AFOUDA, L.A.C.; ZOUMAROU-WALLIS, N.; PATE-BATA, T.; DOSSOU, L.; GOTZ, M.; WINTER,S. Occurrence and characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, causing bacterial pustules on soybean in Guinea Savanna of Benin. **African Crop Science Journal**, v.23, p.203-210, 2015.