

PATRICIA DA SILVA VINHOLES

ASSOCIAÇÃO GENÔMICA PARA RESISTÊNCIA DA SOJA A
Meloidogyne javanica* E *Macrophomina phaseolina

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014

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

T

V784a
2014 Vinholes, Patrícia da Silva, 1986-
Associação genômica para resistência da soja a
Meloidogyne javanica e *Macrophomina phaseolina* / Patrícia da
Silva Vinholes. – Viçosa, MG, 2014.
xiv, 115f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Aluizio Borém de Oliveira.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

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

CDD 22. ed. 633.34

PATRICIA DA SILVA VINHOLES

**ASSOCIAÇÃO GENÔMICA PARA RESISTÊNCIA DA SOJA A
Meloidogyne javanica E *Macrophomina phaseolina***

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

APROVADA: 31 de janeiro, 2014.

Felipe Silva
(Coorientador)

Ivan Schuster

Tatiane Dalla Nora Montecelli

Tatiane Alves

Aluizio Borém
(Orientador)

À minha família, que tanto amo.

“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de
vencer.”

(Mahatma Gandhi)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela proteção e por sempre iluminar meus caminhos.

À minha família querida, por tudo, pelo amor incondicional, apoio em todos os momentos importantes da minha vida, pela família maravilhosa que construímos; em especial à minha mãe Neusa, por tudo que me proporcionou, por estar sempre presente em minha vida, mesmo que geograficamente estejamos distantes – Amo vocês!

Ao meu orientador Professor Dr. Aluizio Borém, pelos incentivos, conhecimentos transmitidos e por depositar em mim sua confiança.

Ao Professor Dr. Ivan Schuster, pela oportunidade, confiança, por todos os ensinamentos preciosos e por ter me recebido em Cascavel e contribuído, de forma tão especial, em tantas decisões importantes na minha vida profissional.

Ao Professor Dr. Phillip Roberts, da Universidade da Califórnia, Riverside, USA, por ter-me recebido em sua equipe de trabalho e ter proporcionado uma das mais importantes experiências na minha vida.

Às pesquisadoras Dras. Elisa Serra Negra Viera e Tatiane Dalla Nora Montecelli, por todo incentivo e exemplo de profissional de mulheres fortes, éticas e brilhantes.

Às minhas amigas mais que especiais Laura Calgaro, Mônica Gioda, Vanessa Silva, Débora Oliveira, Eliane Natale, Viviane Nader e Ana Cristina

Pellegrino, por sempre estarem na torcida, enviando muita energia positiva para mim – Nossa amizade é um dos meus bens mais preciosos!

Ao meu querido Norbert Karoly, por todo o carinho dedicado a mim.

Aos meus colegas e amigos da Coodetec, pelo excelente convívio em momentos de crescimento profissional durante o desenvolvimento desta tese – Todos serão sempre lembrados com muita alegria.

Aos meus colegas e amigos da Syngenta, pelo excelente convívio, pela confiança em meu trabalho e, principalmente, pelo suporte no término desta tese.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), pela excelente estrutura física.

Aos professores da UFV, pela qualidade técnica das aulas ministradas e pelos conhecimentos passados.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia Tatiane e Rafaela, por sempre me auxiliaram de forma tão prestativa.

À Capes e ao CNPq, pela concessão dos auxílios e das bolsas de Doutorado e de Doutorado-Sanduíche.

Por fim, a todos aqueles que, de alguma maneira, contribuíram para que eu pudesse concretizar mais esta conquista – Serei sempre grata a todos!

BIOGRAFIA

PATRICIA DA SILVA VINHOLES nasceu na cidade de Pelotas, RS, em 10 de janeiro de 1986.

Em 2003, ingressou no Curso de Agronomia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel/RS), graduando-se em agosto de 2008.

No segundo semestre de faculdade, iniciou no Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC-CNPq), orientada pelo Professor Paulo Dejalma Zimmer, em que foi bolsista por quatro anos.

Fez estágio de conclusão de curso no Laboratório de Biotecnologia da Coodetec, por seis meses, com o Professor Ivan Schuster.

Em 2008, ingressou no Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Fitotecnia – área de concentração em Melhoramento de Plantas e Biotecnologia – da Universidade Federal de Viçosa (UFV), sob a orientação do Professor Aluízio Borém. Após um ano nesse curso, foi selecionada para fazer Progressão de Nível, tornando-se aluna de Doutorado dessa mesma Instituição.

Em 2011, foi aprovada como bolsista do Programa de Estágio no Exterior (PDDE-CAPES), permanecendo 12 meses (2012) na University of California, Riverside (UCR), nos Estados Unidos, no Departamento de Nematologia, sob a orientação do Professor Phillip Roberts.

Em fevereiro de 2013, foi contratada como Pesquisadora de Desenvolvimento de Traits pela Syngenta Seeds, onde desenvolve atividades de pesquisa.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	ix
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1. Seleção Assistida por Marcadores Moleculares para características de interesse	3
1.2. Associação genótipo x fenótipo	6
1.3. Patógenos de solo que limitam a produção de soja.....	11
1.3.1. <i>Meloidogyne javanica</i>	11
1.3.2. <i>Macrophomina phaseolina</i>	12
2. OBJETIVOS.....	13
2.1. Objetivo geral.....	13
2.2. Objetivos específicos	13
CAPÍTULO 1.....	14
MAPEAMENTO GENÉTICO DE QTLs PARA RESISTÊNCIA A <i>Meloidogyne javanica</i> EM SOJA.....	14
RESUMO	14
ABSTRACT	16
1. INTRODUÇÃO.....	18
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	21

	Página
2.1. Obtenção das gerações parentais, F ₁ e F ₂	21
2.2. Desempenho fisiológico para resistência ao nematoide de galhas	21
2.3. Genotipagem da População com Marcadores Moleculares.....	24
2.4. Análise qualitativa dos dados fenotípicos	25
2.5. Análise da associação Marcador/QTL	25
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	26
3.1. Herança da resistência ao nematoide de galhas da espécie <i>Meloidogyne javanica</i> na cultivar MG/BR 46 Conquista	26
3.2. Marcadores moleculares e análise de QTLs.....	29
4. CONCLUSÕES.....	41
5. REFERÊNCIAS	42
CAPÍTULO 2.....	45
IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES SNPs ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA GENÉTICA AO <i>Meloidogyne javanica</i> EM SOJA ATRAVÉS DE POPULAÇÃO NÃO ESTRUTURADA	45
RESUMO	45
ABSTRACT	47
1. INTRODUÇÃO.....	49
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	55
2.1. Material genético e delineamento estatístico	55
2.2. Desempenho fisiológico para resistência ao nematoide de galhas	55
2.3. Extração de DNA	57
2.4. Genotipagem	58
2.5. Análises dos dados.....	62
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	65
3.1. Fenotipagem	65
4. CONCLUSÕES.....	75
5. REFERÊNCIAS	76

	Página
CAPÍTULO 3.....	81
ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO DE MARCADORES SNPS PARA RESISTÊNCIA A <i>Macrophomina phaseolina</i> EM SOJA.....	81
RESUMO	81
ABSTRACT	83
1. INTRODUÇÃO.....	85
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	90
2.1. Material genético e delineamento estatístico	90
2.2. Desempenho das cultivares quanto ao caráter resistência a <i>Macrophomina phaseolina</i>	92
2.3. Extração de DNA, Genotipagem e Análise de Dados.....	93
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	94
4. CONCLUSÕES.....	105
5. REFERÊNCIAS	106
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	110
4. REFERÊNCIAS	113

RESUMO

VINHOLLES, Patrícia da Silva Vinholes, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2014. **Associação genômica para resistência da soja a *Meloidogyne javanica* e *Macrophomina phaseolina***. Orientador: Aluizio Borém de Oliveira. Coorientadores: Ivan Schuster e Elisa Serra Negra Vieira.

No Brasil, a soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é um dos principais produtos agrícolas produzidos. Na década de 1990, foi o principal produto agrícola de exportação, aumentando a cada ano as áreas de soja. A cultura era cultivada no Sul, Sudeste e mais recentemente no Centro-Oeste. Atualmente, expandiu-se, além do Cerrado brasileiro, iniciando um novo ciclo em novas áreas, como Maranhão, Bahia, Tocantins, Piauí e Pará. Devido a essa importância do cultivo da soja, não somente no Brasil, muitos recursos para pesquisas foram disponibilizados, objetivando-se, cada vez mais, produzir cultivares mais adaptadas e produtivas. As doenças que ocorrem na cultura da soja causam, devido ao clima local, severos danos e perdas de produtividade. Entre esses prejuízos, as doenças de solo são extremamente importantes, pois se caracterizam por serem de difícil controle. Uma estratégia bastante efetiva para prevenir perdas de produtividade nesses casos é o uso de cultivares resistentes. Os fitonematoides *Meloidogyne javanica* são de ampla ocorrência no Brasil e responsáveis por perdas significativas em lavouras de soja. Outro patógeno

importante no Brasil, com crescimento de sua ocorrência a cada ano, é o *Macrophomina phaseolina*. Estudos de identificação de fontes de resistência e de marcadores moleculares associados às características de interesse têm sido utilizados por pesquisadores com o objetivo de desenvolver cultivares resistentes. Para estudos de associação do genótipo com o fenótipo desejado, populações de cruzamentos têm sido desenvolvidas. Outra abordagem também importante é o estudo da resistência genética em populações não estruturadas, recomendadas para identificação de novas fontes de resistência. Devido ao elevado desequilíbrio de ligação presente neste tipo de população, as associações marcador x gene/QTLs são mais fortes em razão do pequeno tamanho dos blocos de desequilíbrio de ligação. Dessa forma, os objetivos deste estudo foram identificar e validar marcadores moleculares associados à resistência a *Meloidogyne javanica* e *Macrophomina phaseolina* em soja, de forma a estabelecer uma rotina de SAM para o melhoramento genético da cultura. Para o estudo sobre *Meloidogyne javanica*, foram utilizadas duas abordagens de populações, uma baseada em grupos de ligação, em que uma população, a partir de um cruzamento biparental, foi criada e outra, a partir de uma população não estruturada, composta por variedades de soja comercialmente importantes no Brasil. As famílias F_{2:3} foram obtidas do cruzamento entre MG/BR46 Conquista (resistente) x CD 204 (suscetível). Para cada família ou cultivar testada, plantas foram semeadas em tubetes individuais e, após 10 dias da semeadura, cada planta foi inoculada com ovos do nematoide. Trinta dias após a inoculação, as raízes foram analisadas. Foi utilizado o escore variando de 1 a 5, sendo 1 = 10% do sistema radicular com pequenas galhas; 2 = 10 a 25% do sistema radicular com pequenas galhas; 3 = 26 a 50% do sistema radicular com galhas; 4 = 51 a 90% do sistema radicular com grandes galhas; e 5 = 91 a 100% do sistema radicular com grandes galhas e apodrecimento de raiz. Para as análises de *Macrophomina phaseolina*, 169 variedades de soja foram distribuídas em duas linhas, com quatro repetições por cultivar, no Citrus Research Center – Agricultural Experiment Station (CRCAES), na Universidade da Califórnia, em Riverside, USA, em área com histórico de infestação por *Macrophomina* spp. Os sintomas de mortalidade foram avaliados por 12 semanas consecutivas a

cada sete dias, após o surgimento da infecção. Os dados genotípicos da população estruturada ($F_{2:3}$) utilizada para mapeamento de *M. javanica* foram obtidos com marcadores microssatélites. Os dados genotípicos das cultivares da população não estruturada foram obtidos através da plataforma *Illumina iScan*, em que cada amostra foi genotipada com 6.000 SNPs. Após as análises de segregação da população $F_{2:3}$, observou-se que a resistência para *Meloidogyne javanica* presente na cultivar MG/BR46 Conquista é controlada por dois genes com efeitos combinados. Os marcadores Satt114, Satt335 e Satt374, localizados no grupo de ligação F, foram identificados como associados à resistência à nematoide de galhas para *Meloidogyne javanica*. Para o estudo de população não estruturada, foram encontrados 12 marcadores SNPs associados à resistência ao nematoide de galhas, localizados no cromossomo 13, também grupo de ligação F da soja. Para resistência a *Macrophomina*, foram identificados 12 marcadores SNPs associados à característica em estudo, sendo oito deles localizados no cromossomo 19 (grupo de ligação L), indicando essa região como forte candidata à presença de genes/QTLs com a presença de resistência a *Macrophomina phaseolina*. Os marcadores identificados como associados poderão ser aplicados diretamente nos Programas de Melhoramento de Soja, com o estabelecimento da Seleção Assistida por Marcadores Moleculares para resistência à nematoide de galhas e podridão de carvão.

ABSTRACT

VINHOLLES, Patricia da Silva Vinholes, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, January, 2014. **Genomic association for soybean resistance to *Meloidogyne javanica* and *Macrophomina phaseolina***. Adviser: Aluizio Borém de Oliveira. Co-Advisers: Ivan Schuster and Elisa Serra Negra Vieira.

Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] is one of the main agricultural products in Brazil. In the 1990's it was the main agricultural export product, with increasing areas every year, since then. Soybean was usually cultivated in southern, southeastern and most recently in the Midwest of Brazil. Currently it has grown beyond Cerrado, expanding into new areas such as Maranhão, Bahia, Tocantins, Piauí and Pará States. Because of soybean importance, large amount of resources were made available for research, aiming the development of more adapted and productive cultivars. Diseases in soybean due to weather may be responsible for severe damage and productivity losses. Among these, soil diseases are extremely important because of its difficulty to control. A very effective strategy to reduce yield loss in these cases is the use of resistant cultivars. The nematode *Meloidogyne javanica* is widely spread in Brazil and it is responsible for significant losses in this crop. Another important pathogen in Brazil, because of its growing occurrence, is *Macrophomina phaseolina*. Studies for the identification of new sources of resistance and molecular markers associated with traits of interest have been

used by scientists in order to develop resistant cultivars. To study the association of genotype with the desired phenotype, segregating populations have been developed. Another important approach is the study of genetic resistance in unstructured populations, recommended for identification of new sources of resistance. Marker x gene/QTLs associations are stronger in these populations, due to the small size of the linkage disequilibrium blocks. Thus, the objective of this study was to identify molecular markers associated with resistance to *Meloidogyne javanica* and *Macrophomina phaseolina* in soybean, in order to establish a SAM routine for the crop genetic improvement. For the *Meloidogyne javanica* study, it was used two populations approaches based on: (1) linkage groups, in which a population from a bi-parental cross was created, and (2) an unstructured population, constituted by commercially important past and current soybean cultivars. Families F_{2:3}, obtained from crosses between MG/BR46 Conquista (resistant) x CD204 (susceptible) and 124 soybean cultivars representing the Brazilian germplasm were phenotypically evaluated for resistance to nematode galls. For each family or cultivar, plants were transplanted in individual tubes and after 10 days of sowing, each plant was inoculated with eggs of nematodes. Thirty days after inoculation, the galls in the roots were analyzed. Score ranging from 1-5 was used, where 1 = 10% of root system with small galls, 2 = 10-25% of root system with small galls, 3 = 26-50% of root system galled, 4 = 51 -90% of root system with large galls and 5 = 91-100% of root system with large galls and root rot. For the analysis of *Macrophomina phaseolina*, 169 soybean varieties were distributed into two plots, with four replicates per cultivar, in Citrus Research Center-Agricultural Experiment Station (CRCAES) at the University of California, Riverside, USA. This area has a history of *Macrophomina* infestation. Symptoms of mortality were evaluated for 12 weeks after the first symptoms of infection. Genotypic data from structured population (F_{2:3}) were used for *Meloidogyne javanica* mapping with microsatellite markers. The genotype data from the unstructured population (cultivars) were obtained from Illumina platform iScan. Each sample was genotyped with 6,000 SNPs. After F₂ population analysis, it was observed that resistance to *Meloidogyne javanica* in the cultivar MG/BR46 is controlled by two genes combining effects. The markers Satt114, Satt335 and Satt374,

located linkage group F have been identified as associated with resistance to root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. For the unstructured population, 12 SNPs markers associated with root-knot nematode resistance located on chromosome 13, same linkage group F of soybean were found. For *Macrophomina* resistance, 12 SNPs markers associated with the studied trait were identified, eight of those being located on chromosome 19 (linkage group L), indicating that this region is a strong candidate for the presence of genes/QTL resistant to *Macrophomina phaseolina*. Markers identified may be directly applied in soybean breeding programs, with the establishment of Molecular Marker Assisted Selection for resistance to nematode galls and charcoal.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A soja é a principal *commodity* agrícola do Brasil e um dos principais produtos exportados para diversos países, tendo a maior participação do PIB agrícola nacional, o que leva o Brasil a ser considerado o país com o maior potencial de expansão de área e aumento da produtividade (FRANÇA NETO, 2000). Na safra 2012/2013, foram cultivados, no Brasil, cerca de 27 milhões de hectares de soja, com alto nível tecnológico utilizado na produção da cultura (CONAB, 2014).

De origem asiática, a soja é planta herbácea anual pertencente à família Fabaceae, ordem Leguminosinae, subclasse Archichlamydae e classe Dicotyledoneae (SEDIYAMA et al., 1993). É espécie autógama com cleistogamia, $2n = 40$ cromossomos (Van RAAMSDONK, 1995).

Cultivada em várias regiões do Brasil, o cultivo da soja iniciou nos anos da década de 1940, no Rio Grande do Sul, e nas décadas de 1960 e 1970 foi introduzida no Centro-Oeste brasileiro, onde se consolidou, na década de 1990 (BLACK, 2000). Desde então, assumiu grande valor socioeconômico, devido à importância de seus produtos, tanto para o mercado interno quanto externo, além da geração de empregos nos diversos setores da economia. No mundo, o Brasil é um dos poucos países com possibilidade de incremento nas áreas de plantio. Isso devido à disponibilidade de regiões aptas ao cultivo da soja, principalmente com expansão das Regiões Centro-Oeste e Norte.

Maiores tetos de produtividade têm sido alcançados devido aos altos investimentos em pesquisa realizados no Brasil, objetivando o desenvolvimento de cultivares a cada ano com maiores produtividades, alta estabilidade e resistência às principais doenças, além de características agronômicas desejadas, como altura e porte de planta.

Na década de 1990, a maioria dos Programas de Melhoramento de Soja do Brasil era mantida pelo setor público, como universidades, Embrapa, e Empresas de Pesquisas Estaduais. Atualmente, empresas do setor privado como Monsanto, Pioneer, Syngenta, Coodetec, TMG, Nidera, Dom Mario, entre outras, têm contribuído para a manutenção e desenvolvimento de novas cultivares.

De maneira geral, os Programas de Melhoramento de Soja objetivam à obtenção de cultivares com diferentes finalidades (TOLEDO et al., 1994), entre elas alta produtividade e estabilidade em ambientes variados. A estabilidade é conferida pela introdução de resistência às doenças, pragas e características especiais, como tolerância a diversos fatores que podem comprometer a produção (ALMEIDA; KIIHL, 1998).

Entre os fatores que mais contribuem para perdas de rendimento na cultura da soja estão as doenças, destacando-se aquelas causadas por nematoides fitoparasitos (FUGANTI et al., 2004). As perdas que lhes são atribuídas têm sido a causa de crescente preocupação entre os produtores (ASMUS, 2004; KUBO et al., 2003; MACHADO et al., 2006). A avaliação da resistência a doenças pode ser atividade complexa, onerosa e que demanda tempo, além de ser muito influenciada pelo ambiente.

A identificação e validação de marcadores moleculares associados aos genes ou QTLs (*Quantitative Trait Loci*) de resistência podem oferecer importante contribuição aos Programas de Melhoramento de Soja, para aumentar a frequência de linhagens resistentes em suas progênes.

1.1. Seleção Assistida por Marcadores Moleculares para características de interesse

Nos últimos anos, ocorreu aumento significativo, tanto nas técnicas de biologia molecular quanto nas análises estatísticas, o que tornou o melhoramento assistido por marcadores moleculares uma realidade.

A grande maioria dos caracteres de importância agronômica é controlada por muitos genes e sofre grande influência do ambiente, chamada de característica quantitativa, sendo de baixa herdabilidade. Essa natureza poligênica de características de importância agronômica e a interação do genótipo com o ambiente constituem alguns dos maiores desafios no melhoramento de plantas. Para as avaliações fenotípicas, é necessário um bom controle do ensaio de experimentação, a fim de reduzir ao máximo possível o efeito ambiental, tornando o fenótipo mais próximo do genótipo de interesse (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 2009).

Os marcadores moleculares surgiram na década de 1980 (BERED et al., 1997), passando a ser grande ferramenta para trabalhos com biologia molecular. Essa ferramenta também começou a ser utilizada pelos melhoristas, com o objetivo de selecionar os genótipos superiores ou de interesse agronômico. A utilização de marcadores moleculares possibilita a avaliação da variabilidade genética dentro e entre as espécies. A tecnologia de marcadores moleculares viabiliza a caracterização genética de grande número de genótipos através de procedimentos relativamente simples e rápidos (CAIXETA, 2009).

A seleção de genótipos superiores com o auxílio dos marcadores moleculares representa a associação entre o melhoramento convencional e as modernas técnicas de biologia molecular, disponíveis atualmente. O uso dos marcadores moleculares em programas de melhoramento de plantas tem algumas vantagens, como não sofrerem influência do ambiente e serem herdados conforme as Leis de Mendel. Essa seleção indireta com base nas informações moleculares de plantas superiores foi denominada Seleção Assistida por Marcadores Moleculares (SAM). A SAM envolve o uso de marcadores genéticos para mapear regiões do genoma que codificam características específicas de uma planta. Por exemplo, um marcador

geneticamente ligado a um loco de resistência à doença pode ser usado para prever a presença de alelos resistentes ou suscetíveis em dada população (BARR, 2009). É importante, principalmente, nos casos em que a característica de interesse é de avaliação difícil e cara, nos estudos de espécies perenes de ciclo longo e para características fenotípicas de herdabilidade baixa, o que pode significar redução no tempo e nos custos de programas de melhoramento. A SAM é uma forma de seleção indireta na qual o caráter indireto apresenta herdabilidade igual a 1 (100%), uma vez que marcadores moleculares não são influenciados pelo ambiente. A prática da seleção indireta para caracteres de baixa herdabilidade pode ser intensamente explorada desde que os genes de interesse estejam fortemente ligados a marcadores moleculares (CAIXETA, 2009).

Selecionar plantas a partir de dados genotípicos (DNA) resulta algumas vantagens importantes em relação a uma seleção com base nas informações fenotípicas, como para caracteres de difícil avaliação fenotípica, de elevado custo, quando exige caracteres específicos, como inoculação de patógenos no caso de resistência a nematoides, ou ambiente como déficit hídrico. Os marcadores também apresentam vantagens quando as avaliações fenotípicas são subjetivas, quando exigem destruição da planta e, ainda, piramidação de genes, em que o melhorista busca em um único genótipo ter o maior número de genes de interesse (SILVA, 2006). Isso ocorre, principalmente, para genes de resistência a diferentes raças de um mesmo patógeno ou para resistência a diferentes patógenos.

A SAM ainda apresenta grande vantagem quando a característica de interesse ocorre apenas nos estágios mais avançados da planta. Nesses casos, a seleção dos genótipos de interesse pode ser feita em estágios iniciais da planta, e assim o tempo necessário para obter linhagens através dos métodos de melhoramento de plantas se reduz enormemente (CAIXETA, 2009).

Outro benefício do uso da SAM é que o número total de linhas que precisam ser testadas pode ser reduzido. Isso porque muitas linhas podem ser descartadas no início de um método de melhoramento, permitindo utilização eficiente de estufas e casas de vegetação, porque somente o material de reprodução importante é mantido (BARR, 2009).

A SAM para resistência aos nematoides, como no caso dos formadores de galhas da espécie *Meloidogyne javanica*, ainda é bastante limitada. Um limitante é o poder de identificação dos QTLs. Muitos QTLs identificados em estudos de mapeamento em populações controladas podem não ser validados em outras populações. Isso pode ocorrer devido ao cruzamento específico ou, ainda, podem ter acontecido erros nos experimentos de fenotipagem. Os marcadores utilizados na SAM devem ser fortemente ligados ao gene/QTL de resistência, de preferência inferior a 5 cM de distância genética. O uso de marcadores flaqueadores ou marcadores intragênicos aumentará significativamente a confiabilidade dos marcadores para prever o fenótipo (COLLARD; MACKILL, 2008).

Especificamente, a SAM para resistência aos nematoides de galhas tem como principal limitação a falta de marcadores fortemente associados e, também, porque essa não é característica principal quando se está desenvolvendo uma cultivar de soja, como é o caso, por exemplo, da produtividade, ciclo vegetativo, grupo de maturação, número de vagens por planta, entre outros. Ao fim do programa, em testes de Valor de Cultivo e Uso (VCU), a incorporação da característica “resistência a doenças” é tratada como vantagem indireta, não sendo o principal interesse para o desenvolvimento de uma cultivar.

A resistência da soja ao nematoide de cisto (NCS) é uma das características mais bem estabelecidas para os programas de SAM. Os principais QTLs que controlam a característica estão mapeados (CONCIBIDO et al., 1996; SCHUSTER et al., 2001) e, nesse caso, a seleção assistida é extremamente eficiente. Concibido et al. (2004), comparando os custos nos dois tipos de seleção, verificaram que, dependendo do volume da operação, o custo da SAM para a resistência ao NCS varia de US\$ 0.25 a US\$ 1.00 dólar por planta, enquanto a fenotipagem, em casa de vegetação, custa de US\$ 1.50 a US\$ 5.00 dólares por planta, além de demorar cerca de 30 dias.

A distância entre a geração de informações e a sua utilização em escala comercial normalmente é grande em qualquer ramo da ciência. A eficácia de novos métodos que estão sendo estudados e validados e, ainda, o aumento da acessibilidade aos equipamentos necessários contribuem para

que a SAM se torne mais amplamente aplicável a programas de melhoramento.

1.2. Associação genótipo x fenótipo

Os mapas genéticos baseados em marcadores moleculares possibilitam a localização dos genes nos cromossomos, a contagem aproximada dos principais loci envolvidos no controle da característica e a estimativa da magnitude do efeito desses loci no fenótipo de interesse.

A maioria dos caracteres de importância agrônômica é resultante da ação de muitos genes, sendo chamada de característica quantitativa, em que a expressão é fortemente influenciada pelo ambiente. Com os marcadores moleculares, a construção de mapas genéticos e o mapeamento de QTLs tornaram-se possíveis (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 2009).

Esses estudos estão baseados em análises de ligação ou, mais recentemente, em análises de associação, com princípio na recombinação genética. Estudos de associação ou mapas genéticos baseados em análises de ligação são comumente realizados em populações experimentais F_2 originalmente derivadas de autofecundação do híbrido F_1 , obtido a partir do cruzamento de duas linhagens contrastantes para a característica de interesse. As análises de associação podem ainda ser realizadas em populações naturais, coleções de germoplasma e conjunto de materiais-elite, entre outros (FLINT-GARCIA, 2003).

Quando comparados estudos com análises de ligação com associação ou baseada em desequilíbrio de ligação, este último apresenta algumas vantagens. As limitações nas estratégias de mapeamento por ligação podem ser resolvidas através da associação ou mapeamento de desequilíbrio de ligação (DL). Esse mapeamento é baseado na busca de associações entre fenótipo e as frequências alélicas dos marcadores. O desequilíbrio de ligação é baseado na associação de loci marcadores com características em nível de população. Pode ser medido através de uma estimativa de mudanças nas frequências alélicas, como resultado da pressão de seleção. Há quatro potenciais vantagens dessa abordagem no

mapeamento genético em espécies cultivadas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 2009).

Uma das maiores utilizações do desequilíbrio de ligação em plantas está no estudo de associação marcador molecular e característica fenotípica, sendo também utilizados em estudos de diversidade genética, coleções de germoplasma e estudos de genética de populações.

Desequilíbrio de ligação (DL), ou também chamado de desequilíbrio de fase gamético, é uma associação não aleatória de alelos em uma população, ou seja, é a ocorrência de gametas com frequências diferentes daquelas esperadas sob segregação independente (GUPTA et al., 2005). Essa é uma medida de independência entre alelos de dois ou mais loci. Se dois alelos são encontrados juntos em um grupo de indivíduos analisados mais frequentemente do que seria esperado pelo simples produto de suas frequências, eles estão em desequilíbrio de ligação. A estrutura do desequilíbrio de ligação em plantas ainda é pouco conhecida, mas sabe-se que varia conforme a história da domesticação da espécie. O uso da genética de associação serve para identificação de genes que controlam características complexas em plantas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 2009).

O desequilíbrio de ligação é uma medida estatística da associação entre alelos de diferentes loci em que fatores como epistasia, seleção natural ou artificial, deriva genética, estrutura populacional e, ainda, sistema reprodutivo podem interferir. Quando ocorrem mutações em uma população, em geral apresentam forte desequilíbrio de ligação com os alelos em loci adjacentes. A recombinação gênica é capaz de reduzir a extensão do desequilíbrio de ligação em uma região genômica. O genoma vegetal é heterogêneo, tendo regiões com altas taxas de recombinação, como nas extremidades dos cromossomos e baixas taxas de recombinação, próximo ao centrômero. O desequilíbrio de ligação é maior nas regiões pouco densas, com recombinação mais rara, e menor nas regiões ricas em genes, com maior taxa de recombinação (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 2009).

Desequilíbrio de ligação pode ser consequência da proximidade física dos genes, por estarem fisicamente presentes na mesma molécula, sendo herdados em bloci, enquanto os distantes são herdados independentemente.

De acordo com a lei de equilíbrio de Hardy-Weinberg, desequilíbrio de ligação é definido como qualquer desvio nas frequências alélicas esperadas sob cruzamentos ao acaso. A maioria das pesquisas realizadas sobre desequilíbrio de ligação foi desenvolvida com animais e, de forma mais restrita, em plantas. Em plantas, a maior parte dos estudos sobre DL foi realizada em milho e *Arabidopsis* (FLINT-GARCIA et al., 2003).

Alguns fatores influenciam o DL. As autofecundações, populações pequenas, isolamento genético entre linhagens, baixa taxa de recombinação, mistura populacional, seleção artificial ou natural acabam aumentando o DL. A quebra do DL ocorre em situações de acasalamento ao acaso, em altas taxas de recombinação e mutações, sendo a recombinação o principal fenômeno que diminui o DL. Quanto mais próximos estiverem fisicamente dois loci, o desequilíbrio de ligação persistirá por múltiplas gerações meióticas na população devido à baixa frequência de recombinação (GUPTA et al., 2005). O tamanho da população também é importante, pois em pequenas populações ocorre a deriva genética, levando a perdas de combinações raras entre alelos, aumentando, assim, o DL.

Outros fatores importantes, como acasalamentos e misturas, influenciam o DL. Espécies alógamas reduzem o DL mais rapidamente que plantas autógamas, visto que a recombinação em plantas de autofecundação é menor e os indivíduos tendem a apresentar alelos em homozigose, em comparação com indivíduos de espécies de fecundação cruzada. No caso da mistura, o fluxo de genes entre indivíduos geneticamente distintos, após intercruzamentos, resulta na introdução de genes, alterando as frequências alélicas; com isso, o DL cai rapidamente em cruzamentos aleatórios. A seleção de indivíduos leva à perda de alelos para loci específicos e, conseqüentemente, poucas combinações alélicas são passadas para as gerações futuras, podendo gerar maior DL (FLINT-GARCIA et al., 2003).

Uma das vantagens do mapeamento por DL está na detecção de associações genéticas válidas para toda a população e não somente para um cruzamento específico. O uso de populações construídas para o mapeamento pode levar à necessidade de maior número de indivíduos a serem analisados, em que o espaço é, muitas vezes, um limitante. Sem um

bom número de indivíduos, há redução da sensibilidade das análises. Muitas vezes também, as populações desenvolvidas são muito desatualizadas pelo tempo em que se precisa para obtê-la e, ainda, identificar marcadores associados com a característica. Em muitos projetos são utilizadas populações que foram estabelecidas cinco ou mais anos antes da identificação do marcador. Isso reduz o valor das informações recolhidas e as possibilidades da sua aplicação. O mapeamento por essa nova perspectiva usa uma população não estruturada, e com isso há associação da característica e um novo marcador, sem que seja preciso gastar tempo e recursos para obter a população segregante do mapeamento (GUPTA et al., 2005).

A melhor precisão na localização de um QTL em relação a um marcador molecular ocorre de forma diretamente proporcional ao número de meioses ocorridas na população de mapeamento. Isso significa que depende da recombinação entre o marcador e o loco que controla a característica de interesse. Dessa forma, as análises de ligação baseadas em populações experimentais, como retrocruzamento, F_2 e RILs (*Recombinant Inbred Lines*), apresentam menor resolução que análises de associação, em que muitas gerações de recombinação ocorreram entre marcador e QTL. Assim, somente marcadores fortemente ligados aos QTLs permanecem associados (FLINT-GARCIA et al., 2003).

Como esse método utiliza os cruzamentos reais nas populações, o material é diversificado e os genes relevantes (adaptação etc.) devem estar segregando em tais populações. As informações são mais detalhadas em grande número de linhagens e variedades, sendo essas informações valiosas para o melhoramento de plantas. O uso de populações naturais para mapear caracteres de interesse, através de mapeamento por associação, tem como grande vantagem o potencial de mapear QTLs com maior resolução, uma vez que se aproveita dos eventos de mutação e recombinação acumulados ao longo do tempo, na população para analisar um fenótipo; além disso, dezenas de alelos podem ser acessados simultaneamente.

Através da análise dos dados, podem-se detectar combinações complexas (mesmo interações epistáticas) entre alelos em vários loci. Isso

pode ser difícil de isolar e validar usando outra abordagem de mapeamento (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 2009).

Outra vantagem do mapeamento por DL é devida à validação dos marcadores. No mapeamento por ligação, a validação dos marcadores é realizada em outras populações, além da população de mapeamento original para garantir que os alelos selecionados tenham efeito similar em diferentes *backgrounds* genéticos. No mapeamento por DL, isso não é necessário, uma vez que tal fato ocorre devido à maior variação alélica presente na população utilizada nesse mapeamento.

Uma das desvantagens do DL é devida a estudos de genes candidatos, principalmente em humanos, em que muitos genes são identificados, mas não confirmados em estudos subsequentes em razão, provavelmente, do fato de o gene selecionado ser de pequeno efeito na variação fenotípica ou quando ocorrem mudanças nas condições experimentais. A população estudada pode possuir ou não composição genética que favoreça a detecção de genes de pequeno efeito, inclusive por possíveis variações na composição alélica nos loci de interesse, ou no padrão de desequilíbrio de ligação ao longo do genoma. Outro fator é a interação genótipo com o ambiente, que pode interferir na detecção da associação (FLINT-GARCIA et al., 2003).

Outra limitação é devida à identificação de alelos raros em uma população. Esses alelos dificilmente são detectados ou não podem ser detectados com boa confiabilidade por DL, a menos que seu efeito seja muito grande. O poder de detecção de um alelo depende enormemente não apenas da magnitude dos efeitos que podem ser atribuídos a um loco, em relação a outros loci presentes na população, mas também na distribuição da frequência do alelo. Nos casos de alelos raros, as populações segregantes biparentais seriam mais adequadas para o mapeamento, pois seriam feitos cruzamentos controlados, em que os germoplasmas teriam o alelo de interesse. Por essas razões, é possível afirmar que esses são métodos complementares que contribuem para melhor compreensão da estrutura genética dos caracteres quantitativos em plantas.

Para alguns autores, esses métodos devem ser utilizados em conjunto. O mapeamento por associação deve ser utilizado para refinar a

localização do QTL previamente identificado através da análise de ligação. Em algumas situações, dependendo de fatores como espécie, histórico de domesticação e seleção, o mapeamento por análise de ligação pode ser mais indicado que o mapeamento por associação, como no caso de alelos raros. Ainda existem poucos exemplos publicados sobre a aplicação de estudos baseados em populações em desequilíbrio de ligação para associação de genótipo com o fenótipo de interesse em plantas.

1.3. Patógenos de solo que limitam a produção de soja

1.3.1. *Meloidogyne javanica*

O ataque de fitonematoides, particularmente a espécie *Meloidogyne javanica* (Treub 1885), constitui grave limitante do potencial produtivo da soja. Esse nematoide é de ampla ocorrência e responsável por perdas significativas em lavouras de soja (YORINORI, 2000). Essa espécie tem sido constatada com maior frequência no Norte do Rio Grande do Sul, Sudoeste e Norte do Paraná, Sul e Norte de São Paulo e Sul do Triângulo Mineiro (FUGANTI et al., 2004). Na região Central do Brasil, o problema é crescente, com severos danos em lavouras do Mato Grosso do Sul e de Goiás. A baixa eficiência no uso da rotação de culturas e a evidente deficiência do uso das cultivares resistentes são as principais razões dessa situação (SILVA, 1998).

Nas áreas onde tais fatos ocorrem, observam-se manchas em reboleiras nas lavouras, onde as plantas de soja ficam pequenas e amareladas. As folhas das plantas afetadas normalmente apresentam manchas cloróticas ou necroses entre as nervuras. Às vezes, pode não ocorrer redução no tamanho das plantas, mas, por ocasião do florescimento, nota-se intenso abortamento de vagens e amadurecimento prematuro das plantas atacadas. Nas raízes das plantas atacadas, observam-se galhas em números e tamanhos variados, dependendo do nível de suscetibilidade da cultivar de soja e da densidade populacional do nematoide (YORINORI, 2000). Os nematoides de galha se reproduzem bem na maioria das plantas invasoras. Assim, indica-se também o controle sistemático dessas plantas nos focos de nematoide. A utilização de cultivares de soja resistentes aos

nematoides de galha é o meio de controle mais eficiente e mais adequado para o agricultor.

1.3.2. *Macrophomina phaseolina*

Outra doença que acomete a cultura da soja no Brasil é a podridão-negra da raiz, doença causada pelo fungo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. Esse patógeno causa significativas perdas na produção agrícola sob altas temperaturas, em condição de estresse hídrico (MUCHERO et al., 2011), e está amplamente distribuído em solos do mundo todo (SU et al., 2001). Em regiões tropicais de cultivo, a doença pode ocorrer ainda em fase de plântula, em que perdas maiores que 70% foram relatadas (SEDIYAMA, 2009). Recentemente, tem ocorrido aumento mundial na incidência de relatos desse patógeno em diversas culturas, indicando a importância da doença para a produção agrícola em regiões propensas à seca (GAETÁN et al., 2006).

O fungo *Macrophomina phaseolina* é considerado um dos fungos mais prevalentes em infecções radiculares de soja, no Brasil. Nenhuma fonte de resistência genética foi ainda encontrada. Além disso, nenhuma informação foi obtida quanto à variabilidade genética desse patógeno em regiões tropicais (ALMEIDA, 2003).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Identificar marcadores moleculares associados à resistência para *Meloidogyne javanica* e *Macrophomina phaseolina*.

2.2. Objetivos específicos

- a) Gerar e conduzir populações segregantes para resistência a nematoides de galhas da espécie *Meloidogyne javanica*.
- b) Identificar marcadores moleculares associados à resistência à nematoide de galhas da espécie *Meloidogyne javanica*.
- c) Estudar a herança da resistência aos nematoides de galhas em uma população de cruzamento biparental.
- d) Caracterizar fenotipicamente 124 cultivares de soja quanto à reação para o nematoide *Meloidogyne javanica* e 169 cultivares ao fungo *Macrophomina phaseolina*, para uso futuro como progenitoras em Programas de Melhoramento Genético de Soja.
- e) Genotipar 169 cultivares de soja com 6.000 marcadores SNPs.
- f) Identificar genes e QTLs responsáveis pelas características avaliadas, através de desequilíbrio de ligação com os marcadores SNPs.
- g) Identificar um conjunto de marcadores SNPs úteis para uso em Seleção Assistida por Marcadores Moleculares (SAM), no melhoramento genético.

CAPÍTULO 1

MAPEAMENTO GENÉTICO DE QTLs PARA RESISTÊNCIA A *Meloidogyne javanica* EM SOJA

RESUMO

No Brasil, o nematoide de galhas *Meloidogyne* sp. causa severos danos e perdas de produtividade à cultura da soja [*Glycine max* (L.) Merrill] em muitas áreas agrícolas. Uma estratégia efetiva para prevenir perdas de produtividade é o uso de cultivares resistentes. No entanto, cultivares brasileiras de soja apresentam base genética estreita para resistência ao nematoide de galhas, derivadas da cultivar Bragg. Dessa forma, os objetivos deste projeto foram gerar e conduzir populações segregantes para nematoides de galhas, identificar e validar marcadores moleculares associados à característica e estudar a herança da resistência aos nematoides de galhas. A população obtida do cruzamento entre a variedade MG/BR 46 Conquista (tolerante) x CD 204 (suscetível) foi eleita para ser utilizada neste projeto. As famílias obtidas desse cruzamento foram avançadas até famílias F_{2:3}. Cento e quarenta famílias foram fenotipadas para os nematoides *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita* em casa de vegetação. Para cada família, sete plantas foram semeadas em tubetes e, após 10 dias da semeadura, cada planta foi inoculada com 5.000 ovos do

nematoide. Depois de 30 dias da inoculação, a formação de galhas nas raízes foi analisada. Foi utilizado o escore variando de 1-5, sendo 1 = 10% do sistema radicular com pequenas galhas; 2 = 10-25% do sistema radicular com pequenas galhas; 3 = 26-50% do sistema radicular com galhas; 4 = 51-90% do sistema radicular com grandes galhas; e 5 = 91-100% do sistema radicular com grandes galhas e apodrecimento de raiz. Famílias com escore médio de formação de galhas 1.0-2.0 foram consideradas resistentes (R); 2.1-3.0 moderadamente resistentes (MR); 3.1-4.0 foram moderadamente suscetíveis (MS); e 4.1-5.0 suscetíveis (S). Entre as famílias $F_{2:3}$, sete foram R, 25 MR, 93 MS e 15 S. No teste do qui-quadrado, diferentes segregações foram testadas, e a 12S+MS:3MR:1R melhor explica a segregação dessa população em estudo ($\chi^2 = 0.49$; $P = 0.78$), suportando o modelo de resistência controlada por dois genes recessivos com efeito epistático. Os genótipos preditos foram 1R (aabb), 3MR (aaB_) e 12 MS + S (A_bb + A_B_). A completa resistência (R) ao *Meloidogyne javanica* é determinada por dois recessivos genes (aabb), sendo um com efeito epistático, o que resulta na presença de apenas um deles, o fenótipo MR. Plantas com o gene em epistasia apresentariam fenótipo MS ou S. Embora essa resistência seja expressa quantitativamente, é controlada por dois genes com efeitos combinados, permitindo o uso de um simples sistema de seleção assistida por marcadores. Para análise de associação dos marcadores com o fenótipo, foi utilizada a estratégia de análise de extremos, em que 15 plantas fenotipadas como resistentes e 15 como suscetíveis foram testadas com cada marcador polimórfico entre os parentais. Marcadores com associação nos extremos foram aplicados em toda a população. Os marcadores Satt114, Satt335 e Satt374, localizados em grupo de ligação F, foram identificados como associados à resistência ao nematoide de galhas para *Meloidogyne javanica*, podendo ser potencialmente utilizados na seleção assistida por marcadores na seleção ou monitoramento de QTLs de resistência, nos Programas de Melhoramento de Soja, que utilizam a fonte de resistência Bragg como fonte doadora de resistência aos nematoides de galhas.

Palavras-chave: *Meloidogyne javanica*; *Glycine max* (L.) Merrill; Herança da Resistência; SSR.

ABSTRACT

In Brazil, the root-knot nematode *Meloidogyne* sp., can be responsible for severe damages and yield loss in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] in many agricultural areas concerned. An effective strategy to reduce loss of productivity is to use resistant cultivars. However, Brazilian soybean cultivars have narrow genetic basis for resistance to nematode galls, most of them came from cultivar Bragg. Thus, the goal of this project was to generate segregating populations to root-knot nematode, identify and validate molecular markers associated with the trait and to study the inheritance of resistance to nematode galls. The population obtained from crossing the variety MG/BR46 MG/BR 46 MG/BR 46 Conquista (resistant) x CD 204 (susceptible) was chosen for being used in this project. Families obtained from this cross were advanced to F_{2:3} families. One hundred and forty families were phenotyped for *Meloidogyne javanica* nematodes in the greenhouse. For each family, seven plants were sown in plastic tubes and after 10 days of sowing, each plant was inoculated with 5000 eggs of the nematode. After 30 days, the galls on roots were analyzed. Score ranging from 1-5 was used, where 1 = 10 % of the root system with small galls, 2 = 10-25 % of root system with small galls, 3 = 26-50 % of root system galled, 4 = 51 -90 % of the root system with large galls and 5 = 91-100 % of the root system with large galls and root rot. Families with an average score of 1.0-2.0 galling were considered resistant (R), 2.1-3.0 moderately resistant (MR);

3.1-4.0 were moderately susceptible (MS), and susceptible 4.1-5.0. (S). Among the F₂:3 families 7 were R, 25 MR, 93 MS, and 15 S. The chi-square, different segregations were tested, with an 12S + MS:3MR: 1R which best explains the segregation of this study population ($\chi^2 = 0.49$, $P = 0.78$), supporting the model of resistance controlled by two recessive genes epistatic effect. The genotypes were predicted 1R (aabb), 3MR (aaB_), and 12 MS + S (A_bb A_B_). Two recessive genes (aabb) and one with epistatic effect, resulting in the presence of only one MR phenotype, determine the complete resistance (R) *Meloidogyne javanica*. Plants with the gene epistasis on phenotype would present MS or S. Although this resistance is expressed quantitatively, it is controlled by two genes combined with effects, allowing the use of a simple system of marker-assisted selection. To analyze the association of markers with the phenotype, the analysis strategy of extremes in which 15 plants phenotyped as resistant and 15 as susceptible were tested with each polymorphic marker between parents was used. Markers associated with the extremes were applied to the entire population. Satt114 markers, Satt335 and Satt374, located in linkage group F have been identified as associated with resistance to root-knot nematode to *Meloidogyne javanica* and may potentially be used in marker-assisted selection in the selection or monitoring of QTL for disease resistance in soybean breeding programs using the power of resistance Bragg as a donor source of resistance to nematode galls.

Keywords: *Meloidogyne javanica*; *Glycine max* (L.) Merrill; Inheritance of Resistance; SSR.

1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é originária da Ásia e tem como centro de origem primário a região Leste da China (XU et al., 1989). O Brasil é o segundo maior produtor mundial desse grão, com 27 milhões de hectares cultivados na safra 2012/13 (CONAB, 2014).

Um dos principais problemas da cultura da soja no Brasil é a presença de nematoides nas áreas de cultivo. Esses fitonematoides são de difícil controle e têm causado prejuízos em todo o mundo (BIRD; KALOSHIANET, 2003). Perdas de produção induzidas por esses patógenos podem chegar a 100% (SCHMITT; NOEL, 1984). Os altos níveis de produtividade no país ocorrem devido aos investimentos em tecnologias que combatem os fatores que limitam a produção, como o desenvolvimento de plantas resistentes aos mais diversos tipos de estresses bióticos, entre eles os nematoides de galhas (*Meloidogyne* spp.), que foram responsáveis por perdas econômicas acima de 52 milhões de dólares na safra 1999/2000 (SÁ et al., 2012). Assim, a seleção de plantas resistentes é importante alternativa de controle e de baixo custo para os produtores.

O *Meloidogyne* é um dos gêneros de fitonematoides mais importantes para a agricultura mundial, porque são extremamente adaptados ao parasitismo em muitas culturas produtoras de alimentos e fibras no mundo, sendo capazes de infectar mais de 2.000 hospedeiros (AGRIOS, 2005). O *M. javanica* tem ocorrência generalizada, enquanto *M. incognita* predomina

em áreas cultivadas anteriormente com café ou algodão. Os sintomas característicos da presença desses nematoides são a formação de galhas nas raízes das plantas, em números e tamanhos variados, dependendo da suscetibilidade da cultivar e da densidade populacional do nematoide (DIAS et al., 2010).

Estudos da herança da resistência e a validação de marcadores moleculares, que possam ser aplicados aos mais diversos programas de melhoramento genético, são ferramentas importantes para obtenção de resistência genética, sendo essencial no manejo da cultura para obtenção de alta produtividade e estabilidade de produção em ambientes variados (MÁTSUO et al., 2012).

Alguns estudos para diferentes fontes de resistência aos nematoides de galhas foram realizados (LI et al., 2001; TAMULONIS et al., 1997; LUZZI et al., 1995; HA et al., 2004), bem como identificada a localização de genes de resistência nos grupos de ligação da soja. Consequentemente, potenciais marcadores moleculares foram testados para verificar a associação com a resistência da soja a esses nematoides (LI et al., 2001; HA et al., 2007).

A seleção de cultivares resistentes através de marcadores moleculares em um programa de melhoramento aumenta a eficácia do processo seletivo. Dessa forma, a identificação de marcadores moleculares ligados a genes de resistência é importante alternativa para viabilizar a seleção de plantas resistentes. A seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) visando à seleção de genótipos com alelos de interesse necessita que estes sejam identificados, o que permitirá o monitoramento desses alelos por marcadores moleculares. Os marcadores *Single Sequence Repeats* (SSR), ou microssatélites, destacam-se entre marcadores que podem ser usados nessa seleção, por serem multialélicos e de caráter codominante (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; CAIXETA et al., 2009).

A SAM tem sido utilizada de forma eficiente em programas de melhoramento de plantas no Brasil para o nematoide de cisto da soja, principalmente para as raças 3 e 14 (SCHUSTER et al., 2001; SILVA et al., 2007). Contudo, para os nematoides de galhas ainda não foram identificados marcadores moleculares fortemente associados a genes de resistência, com potencial para utilização em programas de SAM na cultura da soja.

Marcadores moleculares precisam ser testados e validados para cada nova fonte de resistência utilizada, não podendo ser aplicados diretamente nos programas de melhoramento (SCHUSTER et al., 2001). Dessa forma, cada programa deve estudar e validar, nas fontes de resistência para o nematoide de galhas, quais genes e marcadores moleculares efetivamente estão associados e permitem seleção de plantas resistentes.

Em geral, a avaliação da resistência aos nematoides de galhas é realizada a partir de uma abordagem quantitativa, embora na prática dos Programas de Melhoramento de Soja as linhagens sejam classificadas em grupos de forma qualitativa, sendo utilizada a classificação de Resistente (R), Moderadamente Resistente (MR), Moderadamente Suscetível (MS), Suscetível (S) e Altamente Suscetível (AS). As duas primeiras classes representam o grupo selecionável e as três últimas, o grupo não selecionado, o que resume a classificação em dois grupos com alguma variação dentro de cada um deles.

Este trabalho teve como objetivos estudar a herança da segregação da resistência da soja aos nematoides de galhas com base em sua classificação qualitativa; identificar marcadores moleculares ligados a genes/QTLs de resistência; e estimar seu efeito na seleção indireta, tanto qualitativa quanto quantitativamente.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto de pesquisa foi desenvolvido no Centro de Pesquisas Elói Gomes, da Coodetec, em Cascavel, PR.

2.1. Obtenção das gerações parentais, F_1 e F_2

Foi obtida uma população segregante para resistência ao nematoide de galhas através do cruzamento entre as variedades MG/BR 46 Conquista (R) e CD 204 (S).

O desenvolvimento das gerações parentais foi em casa de vegetação. Obtiveram-se as sementes F_1 , e a população avançou até F_2 , em que foram abertas famílias para teste de avaliação de resistência ao *Meloidogyne javanica* em sementes $F_{2:3}$.

2.2. Desempenho fisiológico para resistência ao nematoide de galhas

Cento e quarenta famílias $F_{2:3}$ da população estudada foram submetidas à avaliação de resistência aos nematoides de galhas *Meloidogyne javanica* (Mj).

O *screening* das famílias quanto à resistência aos nematoides formadores de galhas foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, em ambiente controlado. Utilizaram-se tubetes de 4 cm de

diâmetro por 20 cm de comprimento, com substrato composto por 1/3 de solo e 2/3 de areia. Os tubetes foram colocados em baldes contendo areia (14 tubetes por balde). Os baldes foram colocados dentro de um tanque com água, cuja temperatura foi mantida de forma que a temperatura do solo dentro dos tubetes se mantivesse entre 26 e 28 °C. Foram semeadas sete plantas por família, sendo uma semente por tubete (Figura 1).



Figura 1 – Unidade experimental de duas famílias e distribuição em tanque, com temperatura da água controlada.

A inoculação foi realizada aos 10 dias após a semeadura, em que cada tubete contendo apenas uma planta foi inoculado com 5.000 ovos do nematoide *Meloidogyne javanica*. Para a inoculação, foram feitos dois furos

de aproximadamente 1,5 cm de profundidade com um bastão ao redor de cada planta, aplicando-se 1 mL da solução de ovos em cada furo (Figura 2).



Figura 2 – Inoculação de 5.000 ovos do *Meloidogyne javanica* em cada planta.

As avaliações foram realizadas aos 30 dias após a inoculação. As plantas foram retiradas dos tubetes, o excesso de substrato foi removido e o sistema radicular foi cuidadosamente lavado. Cada planta foi analisada quanto à formação de galhas no sistema radicular.

Para determinação da severidade de galhas no sistema radicular da população $F_{2:3}$, foi utilizado o sistema de notas proposto por Harris (2003), em que 1 < 10% do sistema radicular, com pequenas galhas; 2 = 10 – 25% do sistema radicular com galhas, sendo a maioria galhas pequenas; 3 = 26 – 50% do sistema radicular com galhas grandes; 4 = 51 – 90% do sistema radicular com galhas grandes; e 5 = 91 – 100% do sistema radicular com galhas grandes e raízes necrosadas.

As famílias foram agrupadas conforme a média das notas, para a reação aos nematoides formadores de galhas, sendo Resistente (R): nota de 1 a 1,9; Moderadamente Resistente (MR): nota de 2,0 a 2,9; Moderadamente Suscetível (MS): nota de 3,0 a 3,9; e Suscetível (S): nota de 4,0 a 5,0. Também, foi determinado o fator de reprodução para cada família,

através da extração dos ovos dos nematoides, empregando-se a técnica de Bonetti e Ferraz (1981). O número total de ovos foi avaliado em câmera de Peters, ao microscópio óptico. O fator de reprodução (FR) foi obtido pelo estimador: $FR = \text{número de ovos extraídos total} / \text{número de ovos inoculados}$. Também, foi obtido o índice de reprodução (IR): $IR = \text{número de ovos extraídos na família} / \text{número de ovos extraídos no genitor suscetível}$.

2.3. Genotipagem da População com Marcadores Moleculares

Para a extração de DNA, amostras de folhas de 140 famílias F_2 foram coletadas, congeladas em nitrogênio (N_2) líquido e armazenadas em ultrafreezer (-80 °C) até o momento da extração de DNA. A extração de DNA foi realizada conforme protocolo descrito por Doyle e Doyle (1991). A concentração de DNA de cada amostra foi estimada por absorbância a 260 nm em espectrofotômetro Nanodrop 1000, sendo cada unidade de absorbância correspondente à concentração de 50 µg/mL de DNA de fita dupla (SAMBROOK et al., 1989).

A reação de PCR foi realizada em termociclador Thermo Hybaid (Ashford, Middlesex, Reino Unido), e os fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese capilar em sistema de *multiplex*, em géis de agarose ou em gel de acrilamida, conforme o tamanho do fragmento.

Os dados dos géis foram codificados, atribuindo-se o escore 2 para os genótipos homozigotos iguais ao genitor resistente (MG/BR 46 Conquista), 1 para os heterozigotos e 0 para os homozigotos iguais aos do genitor suscetível (CD 204).

Inicialmente, um conjunto de 281 marcadores microssatélites foi utilizado para a comparação entre os genitores MG/BR 46 Conquista e CD 204. Os marcadores polimórficos entre os parentais foram, então, utilizados na avaliação de um subconjunto da população, através da estratégia de análise de extremos. Quinze plantas de cada grupo (resistente e suscetível) e mais as duas amostras dos genitores foram avaliadas com cada marcador. Marcadores que apresentaram associação significativa com a resistência foram utilizados na amplificação do restante da população.

2.4. Análise qualitativa dos dados fenotípicos

Para avaliação da segregação qualitativa da resistência da soja ao nematoide, foram agrupadas as famílias com classificação R e MR (nota menor do que 3) e as famílias MS e S (nota igual ou superior a 3), e as proporções obtidas foram comparadas com proporções esperadas pelo teste de qui-quadrado.

2.5. Análise da associação Marcador/QTL

A análise de associação marcador/QTL foi realizada através da análise de marcadores únicos. Foi realizada a análise de variância e a análise de regressão dos dados das avaliações de nematoides (FR, IR e nota) em relação aos escores dos marcadores moleculares com os dados dos marcadores moleculares. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GQMol (CRUZ; SCHUSTER, 2004).

Para estudo de associação dos marcadores com o fenótipo, foi utilizada a estratégia de análise de extremos, para a seleção prévia dos marcadores candidatos. Os marcadores polimórficos entre os genitores foram amplificados em um conjunto de 30 amostras da população de estudo, divididas em dois grupos, sendo 15 R ou MR e 15 S. Esses dados da população reduzida foram avaliados pela análise de variância e de regressão em relação aos dados de resistência aos nematoides de galhas. Marcadores com associação significativa nessa população reduzida foram, então, amplificados na população total e as análises, refeitas com os dados completos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Herança da resistência ao nematoide de galhas da espécie *Meloidogyne javanica* na cultivar MG/BR 46 Conquista

Os resultados qualitativos da avaliação da resistência da soja ao *Meloidogyne javanica* estão apresentados na Tabela 1. A partir da média das notas visuais do sistema radicular, as famílias da população de estudo foram classificadas em classes de resistência. Foram obtidas sete famílias resistentes (R), 25 moderadamente tolerantes (MR), 93 moderadamente suscetíveis (MS) e 15 suscetíveis (S). Com base nos resultados, foi avaliada a hipótese de que a resistência seja conferida por dois genes recessivos, e a presença de apenas um desses genes resulta no fenótipo de moderadamente resistente (MR). Além disso, um dos genes é epistático sobre o outro, com epistasia do tipo complementar, de forma que o segundo gene apenas contribui para a resistência na presença do primeiro. E as classes moderadamente suscetível (MS) e suscetível (S) não possuem o gene epistático, de forma que não há expressão de genes de resistência nessa classe.

Para essa hipótese, as proporções esperadas são de 12(S+MS):3MT:1T. Os dados observados se ajustaram a essa hipótese ($\chi^2 = 0.49$; $P = 0.78$), suportando o modelo de dois genes recessivos, com efeitos epistáticos (Tabela 1). Os genótipos preditos são 1R (aabb), 3MR (aaB_) e 12 MS + S (A_bb + A_B_).

Tabela 1 – Resultados observados na avaliação da resistência da soja a *Meloydogyne javanica* em uma população de 140 famílias F_{2:3} derivada do cruzamento entre MG/BR 46 Conquista e CD 204, genótipos preditos e frequências esperadas para a hipótese de resistência conferida por dois genes recessivos, epistáticos, número de famílias esperadas em cada classe fenotípica e teste de qui-quadrado para a hipótese avaliada

Classe	Observados	Genótipos preditos	Frequência esperada	Nº esperado	χ^2	P
R	7	aabb	1	8,75		
MR	25	aaBb	2	26,25		
		aaBB	1			
MS/S	93+15 = 108	Aabb	2	105	0,49	78%
		AaBb	4			
		AaBB	2			
		AAbb	1			
		AABb	2			
		AABB	1			
Total	140		16	140		

Embora tenha sido utilizada uma abordagem qualitativa, a expressão fenotípica da resistência é quantitativa. No entanto, isso não significa necessariamente que o controle genético seja complexo ou que envolva muitos genes, mas simplesmente que as condições experimentais são suscetíveis a fontes de variação. Assim, plantas com o mesmo genótipo podem apresentar variações de fenótipo entre unidades experimentais, dentro de certos limites.

A experiência na avaliação fenotípica da resistência da soja aos nematoides, incluindo *Meloidogyne javanica*, em geral tem demonstrado que existe mais consistência nos resultados de resistência (R), ou de resistência moderada (MR), do que nos resultados de suscetibilidade (S) ou, mesmo, de suscetibilidade moderada (MS). A partir da hipótese de dois genes recessivos, epistáticos, é possível prever que, embora em todas as classes genotípicas possa haver variabilidade fenotípica, a variabilidade deve ser menor na classe tolerante (aabb), uma vez que a variação dentro dessa

classe ficará restrita à variação possível dentro do grupo resistente. Ou seja, essas plantas não poderão ser classificadas como suscetíveis ou, mesmo, moderadamente suscetíveis, sob as mesmas condições experimentais, pois possuem os genes de resistência. Na classe moderadamente tolerante, pode haver variabilidade maior, uma vez que, além da variabilidade fenotípica esperada dentro desse genótipo, é possível que algumas plantas não sejam suficientemente infectadas pelos nematoides, ou melhor, algumas delas com genótipo de classe moderadamente tolerante (aaBB ou aaBb) possam apresentar fenótipo de classe resistente. Mas é mais raro que apresentem fenótipo de classe suscetível ou de moderadamente suscetível.

Na classe de plantas com ausência de genes de resistência à variabilidade esperada, é, portanto, maior, uma vez que, quando forem muito parasitadas pelos nematoides, apresentarão notas elevadas, sendo classificadas como altamente suscetíveis ou suscetíveis; quando forem menos infectadas, apresentarão notas que as classificarão em moderadamente suscetíveis; e quando forem pouco ou muito pouco parasitadas, apresentarão fenótipo moderadamente resistente e, até mesmo, resistente.

Por esse motivo, na avaliação da hipótese de dois genes recessivos de resistência, as classes moderadamente suscetível e suscetível foram reunidas em uma única classe, uma vez que, do ponto de vista genético, essas classes não possuem genes de resistência.

As cultivares de soja do Brasil têm base genética bastante estreita. Para o caráter resistência ao nematoide de galhas, basicamente as cultivares têm a mesma fonte de resistência da cultivar americana Bragg (DIAS et al., 2010; SILVA et al., 2001). Uma vez que o nível de tolerância é transferido às variedades descendentes, mantendo o mesmo nível, é de se esperar que a tolerância seja controlada por pequeno número de genes de efeito maior, mesmo que a expressão fenotípica seja quantitativa.

A Cultivar MG/BR 46 Conquista é essencialmente derivada de Bragg (MIRANDA, 2005). Essa cultivar foi obtida do cruzamento entre Lo 75-4484 (Seleção de Bragg) com Numbaíra (MR para *Meloidogyne incognita* e S para *Meloidogyne javanica*).

Silva et al. (2001) realizaram estudos de herança da tolerância ao nematoide de galhas utilizando a cultivar resistente CD 201 e a PI 595099 cruzando com BRS 133, suscetível ao *Meloidogyne* spp. Concluíram que na CD 201 a tolerância teve herança quantitativa e foi controlada por efeitos aditivos, de dominância e epistáticos do tipo aditivo por aditivo. Na PI 595099, foram identificados dois genes complementares de tolerância e ausência de dominância, de acordo com os dados encontrados neste estudo.

Luzzi et al. (1994) identificaram que a moderada tolerância da cultivar Forest é determinada por um único gene (Rmi1/rmi1), localizado no grupo de ligação. Porém, nesse caso o alelo dominante foi o responsável pela moderada tolerância. Ausência de efeitos de dominância também foi detectada em outros trabalhos afins, como nos cruzamentos entre os genótipos de soja CNS e Jackson, inoculados com *M. arenaria* (LUZZI et al., 1995); e PI 96354 e PI 417444, inoculados com *M. incognita* (LUZZI et al., 1994). Diferentes genes condicionam a resistência nos diferentes genótipos que, quando cruzados, podem apresentar segregação transgressiva.

Compreender a herança da resistência de determinada característica que se deseja estudar é extremamente importante na condução dos programas de melhoramento. Para a herança da resistência identificada de dois genes epistáticos e recessivos, a eficiência de seleção em gerações precoces deve ser alta, uma vez que apenas plantas homozigotas são resistentes.

3.2. Marcadores moleculares e análise de QTLs

Na Figura 3 estão apresentadas as distribuições de frequência das características nota e fator de reprodução (FR). A distribuição de frequência do índice de reprodução (IR) é a mesma do FR, pois é resultado da divisão deste por uma constante.

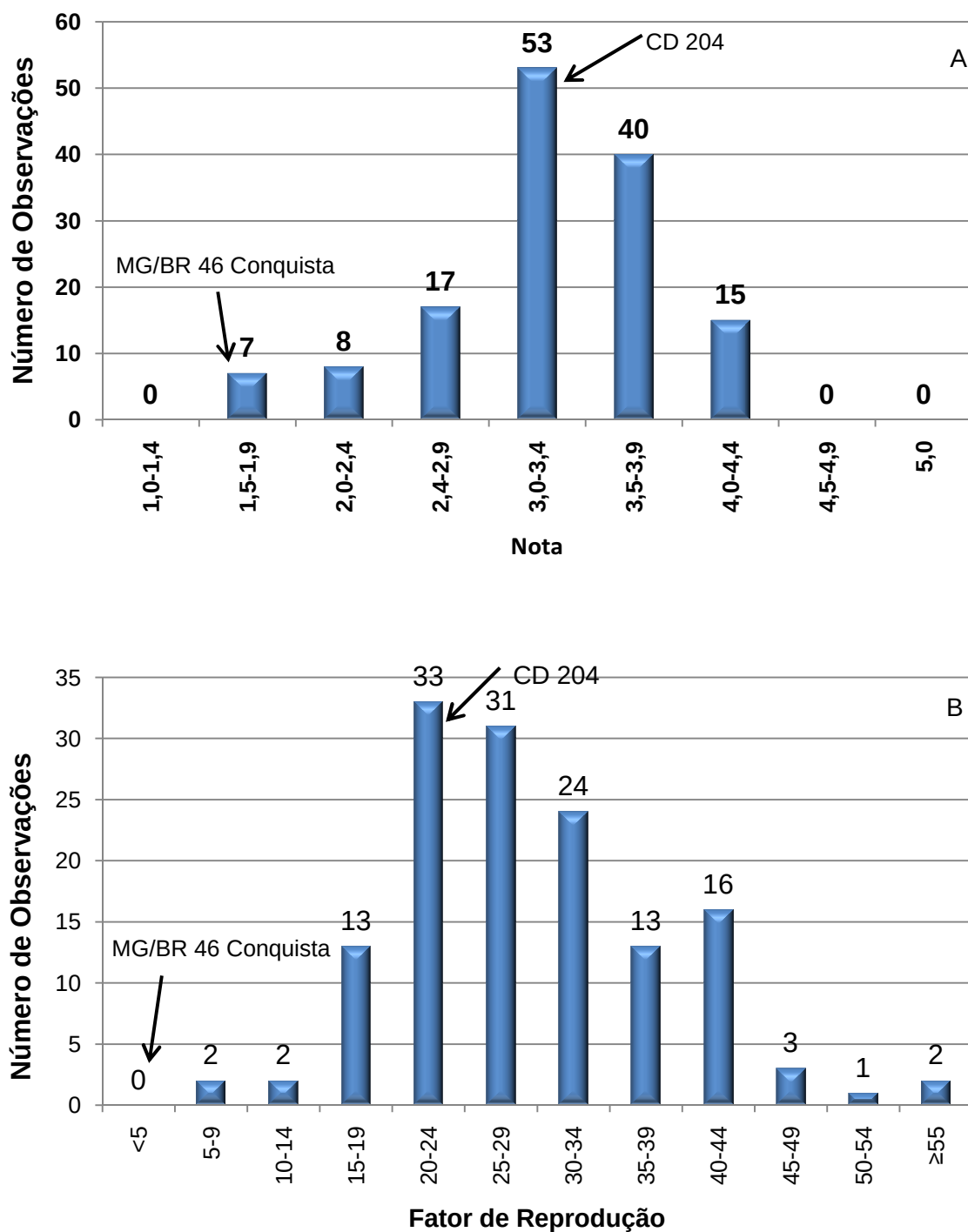


Figura 3 – Distribuição da frequência das notas para formação de galhas (A) e do fator de reprodução (B) provocados pelo nematoide *Meloidogyne javanica* nas raízes das famílias $F_{2:3}$, oriundas do cruzamento de MG/BR 46 Conquista x CD204. Os valores observados nos genitores estão indicados nos gráficos.

Observou-se que a frequência de notas iguais ou superiores a 3,0 é bastante elevada em comparação com notas menores do que 3,0. Esse resultado é coerente com o fato de que o controle genético é recessivo, e notas abaixo de 3,0 indicam resistência ou moderada resistência. Para o fator de reprodução, apenas quatro famílias apresentaram FR menor do que 15, e apenas 17 famílias exibiram FR menor do que 20, indicando também que o controle genético do FR é exercido por genes/QTLs recessivos. Também, verificou-se que, para o fator de reprodução igual ou superior a 20, a frequência de observações aumenta drasticamente, o que sugere que, nas condições experimentais, FR igual a 20 possa ser o ponto de corte que separa geneticamente famílias com maior ou menor suscetibilidade à reprodução do nematoide.

A correlação entre a nota e o fator de reprodução foi de 0,57 ($P < 0,01$ pelo teste F). Uma vez que existe correlação significativa entre as características e que a análise da nota visual do sistema radicular é mais simples nos programas de melhoramento que utilizam seleção fenotípica para resistência ao *Meloidogyne javanica*, então basta realizar a seleção a partir da nota visual. Plantas com notas mais baixas apresentarão fator de reprodução menor.

Entre os 281 marcadores analisados, 32 marcadores foram polimórficos (12%) entre os parentais MG/BR 46 Conquista e CD 204. Entre os 20 grupos de ligação da soja (CREGAN et al., 1999), foram identificados marcadores polimórficos em 16 grupos (Tabela 2). Desses, apenas três marcadores (Satt335, Satt114 e Satt374) foram significativos na análise dos indivíduos extremos da população, todos do grupo de ligação F. Esses marcadores foram utilizados na avaliação da população completa. A análise desses marcadores para a presença de QTLs iniciou-se pela análise de marcadores únicos, utilizando análise de variância e de correlação de cada marcador, em relação à nota de galhas.

Na análise de variância das características nota e fator de reprodução, considerando os genótipos dos marcadores como tratamentos, os três marcadores utilizados na avaliação da população completa foram significativos para nota, enquanto para FR os marcadores Satt335 e Satt114 foram significativos (Tabela 3). O marcador mais informativo foi Satt335, com R^2 de 26,1% para nota e 11,1% para FR. Ou seja, a variação no genótipo

desse marcador foi responsável por 26,1% da variação na nota de galhas do sistema radicular e por 11,1% da variação no fator de reprodução do nematoide.

Tabela 2 – Lista de marcadores polimórficos entre os parentais da população segregante MG/BR 46 CONQUISTA x CD204

Marcador	GL	Marcador	GL
Satt545	A1	Satt114	F
Satt233	A2	Satt335	F
Satt429	A2	Satt374	F
Sat_085	C1	Satt423	F
Satt476	C1	Sat_308	G
Sat_402	C2	Satt163	G
Sat_106	D1a	Satt191	G
Satt147	D1a	Satt199	G
Sat_279	D1b	Satt275	G
Satt274	D1b	Satt181	H
Satt216	D1b+W	Satt182	L
Sat_001	D2	Satt229	L
Satt186	D2	Satt220	M
Satt386	D2	Satt336	M
Satt574	D2	Satt257	N
Sat_107	E	Satt477	O

G. L. – Grupo de Ligação.

Tabela 3 – Resumo da análise de variância e da análise de regressão das características nota e fator de reprodução de *Meloidogyne javanica*, em função dos genótipos dos marcadores moleculares

	Marcador	F (Anova)	P(F) Anova	P(F) regressão	R²
Nota	Satt335	24,2449	<0,001	<0,001	26,1%
	Satt114	21,6635	<0,001	<0,001	24,4%
	Satt374	4,5743	0,0119	0,012	6,3%
Fator de reprodução	Satt335	8,5544	<0,001	<0,001	11,1%
	Satt114	4,9066	0,008	0,009	6,8%
	Satt374	0,7923	1,0	1,0	1,1%

Na análise de regressão múltipla para a nota de galhas, os marcadores Satt335 e Satt114 foram significativos ($P = 0,017$) e explicaram, em conjunto, 28,8% da variação na nota de galhas. Para o fator de reprodução, não foi possível incluir mais de um marcador na análise de regressão múltipla. Os valores de beta foram positivos, tanto na regressão simples quanto na regressão múltipla, para nota e FR. Uma vez que o genótipo de MG/BR 46 Conquista foi codificado como zero e o genótipo de CD 204 como 2, os resultados indicam que o alelo que diminui os valores de nota e de FR é proveniente de MG/BR 46 Conquista.

A análise de regressão múltipla pelo procedimento stepwise inclui no modelo apenas marcadores que complementam seus efeitos. No caso dos três marcadores avaliados, todos estão ligados no grupo de ligação F da soja. Para permanecerem significativos no mesmo modelo de regressão múltipla, é necessário que esses marcadores estejam ligados a QTLs diferentes no mesmo grupo de ligação ou, quando ligados ao mesmo QTL, que estejam flanqueando o QTL, sendo ambos os marcadores necessários para a seleção.

A análise de mapeamento de QTLs através da análise de intervalos confirmou que existe um QTL para a formação de galhas em soja (nota de galhas) devido à infecção por *Meloidogyne javanica*, localizado no intervalo entre os marcadores Satt335 e Satt114 (Figura 4A). Esse QTL explica 28,6% da variação nas notas de galhas (Tabela 4).

Para o fator de reprodução, há um QTL na posição do marcador Satt335 (Figura 4B). Esse QTL explica 10,5% da variação no fator de reprodução do nematoide. Para a nota, o sinal positivo do grau médio de dominância (d/a) indica que há dominância no sentido de aumento da nota, mas a dominância não é completa. Para a característica fator de reprodução, há ausência de dominância no QTL identificado (d/a = 0).

O gene/QTL identificado está localizado no meio do intervalo entre os marcadores Satt335 e Satt114, a 7 cM de cada marcador. Assim, não há preferência no uso de um ou outro marcador na seleção assistida por marcadores moleculares, e preferencialmente o uso de ambos os marcadores aumenta a segurança de que o gene/QTL estará sendo selecionado também. Na Figura 5A está apresentada a distribuição de frequência das classes fenotípicas de resistência ao nematoide *M. javanica*

nos grupos de plantas F₂, agrupadas pelo genótipo dos marcadores Satt335 e Satt114. Observa-se que, para ambos os marcadores, as plantas com genótipo do genitor tolerante (MG/BR 46 Conquista) contêm a maior quantidade de plantas tolerantes e moderadamente tolerantes, enquanto os fenótipos suscetíveis e moderadamente suscetíveis estão concentrados nos genótipos heterozigoto e homozigoto iguais ao genitor suscetível (CD 204). Nenhuma planta com fenótipo tolerante foi observada no grupo com genótipo homozigoto igual ao genitor suscetível para ambos os marcadores.

Considerando a utilização conjunta dos dois marcadores na seleção para a resistência ao *Meloidogyne javanica*, torna-se mais evidente a concentração de plantas resistentes e moderadamente resistentes no grupo com ambos os marcadores homozigotos iguais à cultivar MG/BR 46 Conquista e de plantas suscetíveis e moderadamente suscetíveis no grupo com ambos os marcadores homozigotos iguais à CD 204 (Figura 5B).

Na população de estudo, levando-se em conta que apenas os genótipos homozigotos iguais à MG/BR 46 Conquista devem ser selecionados e que se esperam nas plantas selecionadas para esse genótipo apenas plantas tolerantes e moderadamente tolerantes, a eficiência de seleção utilizando o marcador Satt335 foi de 81%, enquanto a eficiência de seleção usando o marcador Satt114, de 74% (Tabela 5). O emprego conjunto dos dois marcadores teve eficiência de seleção de 83%. Embora o valor da eficiência de seleção com a utilização de ambos os marcadores tenha sido próximo ao da eficiência de seleção utilizando apenas o marcador Satt335, é recomendável o uso de dois marcadores flanqueando o gene-alvo, a fim de evitar diminuir a probabilidade de perda do gene pela recombinação.

Uma vez que o estudo de herança revelou que o controle genético da infecção radicular por *Meloidogyne javanica* é dado por dois genes, ainda é necessário identificar, para essa fonte de resistência, marcadores moleculares ligados ao outro gene de resistência. A seleção para os dois genes deve aumentar a eficiência de seleção para níveis próximos de 100%, uma vez que os erros de seleção (em torno de 20% para esses marcadores) são devidos à recombinação entre os marcadores e o gene e também à falta do segundo gene, isso porque apenas um gene está sendo selecionado com esses marcadores.

Tabela 4 – Caracterização do QTL para nota de galhas e fator de reprodução de *Meloidogyne javanica* em soja

Característica	GL	Intervalo	Posição*	LR	LR crítico [#]	R ²	a	d	d/a
Nota	F	Satt335 – 14 cM - Satt114	7 cM	53,9	18,7	28,6%	0,45	0,13	0,29
FR	F	Satt335 – 14 cM - Satt114	1 cM	15,7	11,3	10,5%	0,09	0,0	0,0

*Posição mais provável do QTL, em relação ao primeiro marcador (Satt335).

[#]Valor crítico da razão de verossimilhança para o teste de significância a 5% de probabilidade, utilizando o teste de permutação com 1.000 permutações.

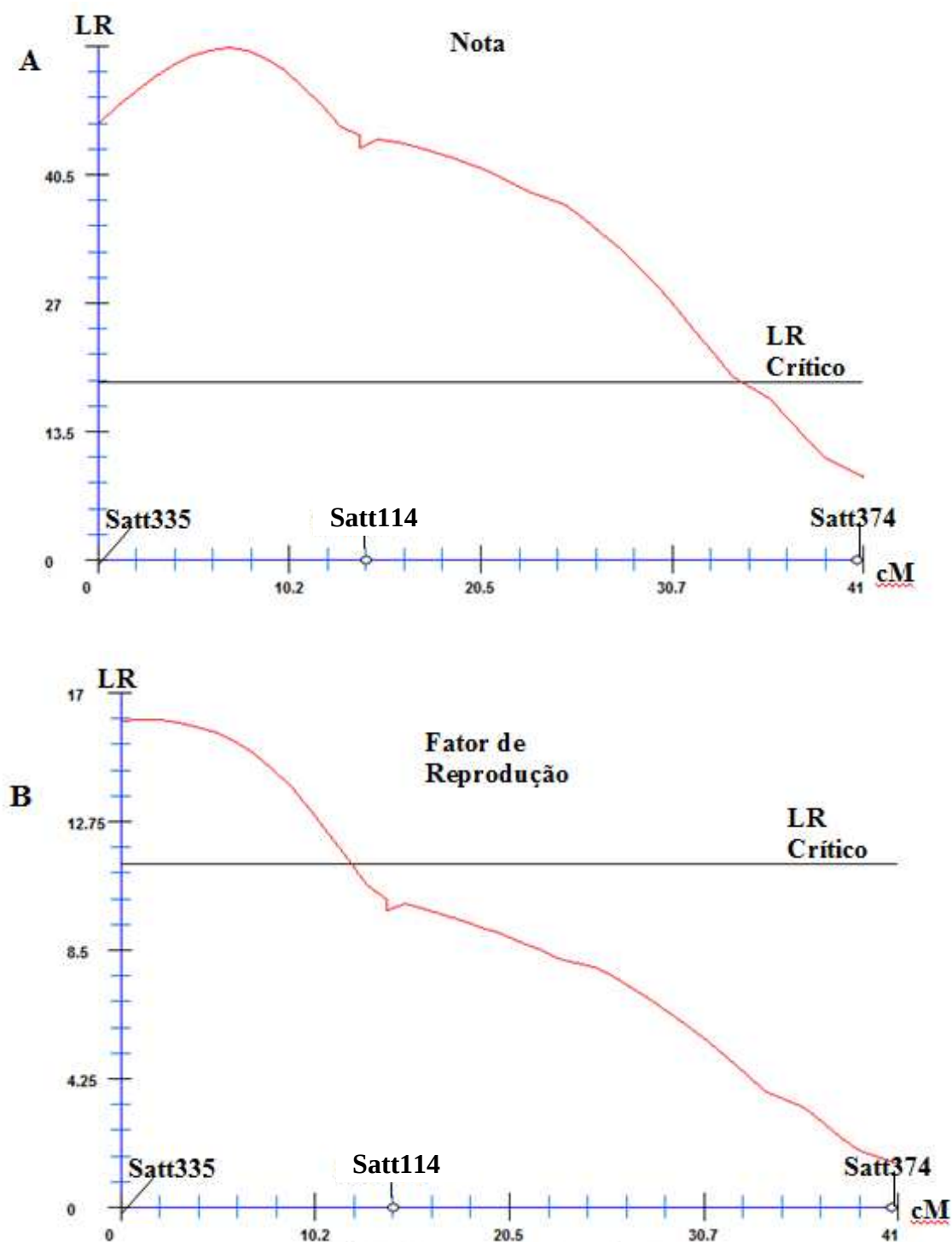


Figura 4 – Análise de intervalo simples das características nota (A) e fator de reprodução (B), resultantes da infecção de uma população segregante de soja inoculada com *Meloidogyne javanica*. LR Crítico = razão de verossimilhança crítica para o nível de significância a 5% de probabilidade, pelo teste de permutação, com 1.000 permutações.

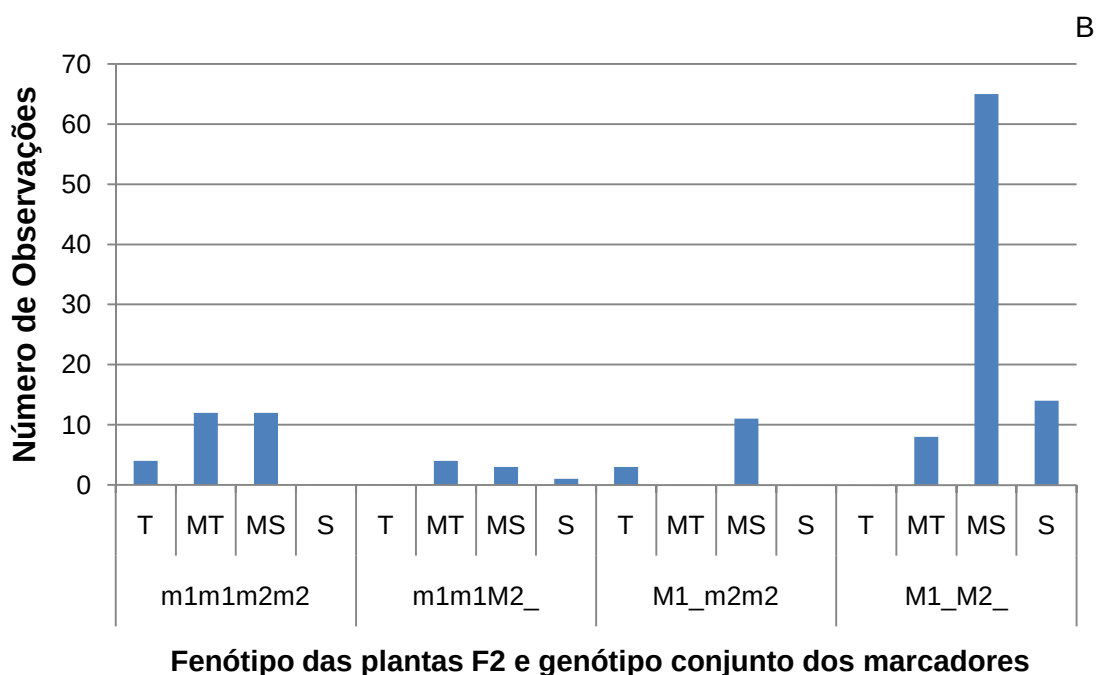
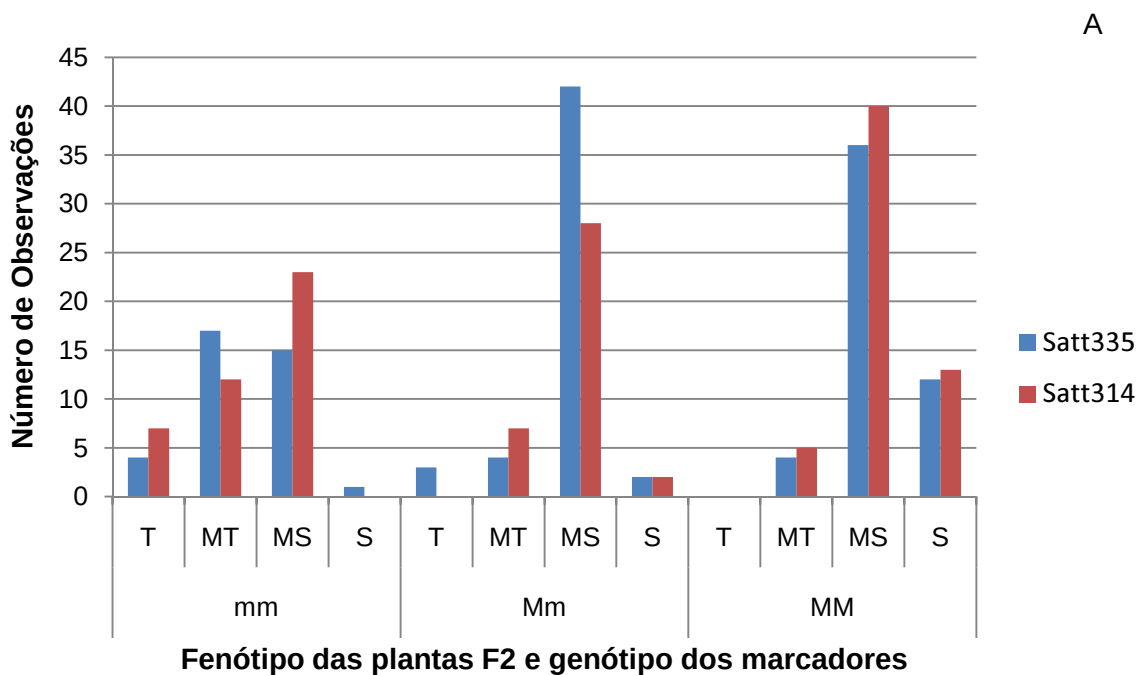


Figura 5 – Distribuição das classes fenotípicas para resistência ao nematoide *Meloidogyne javanica* e relação com o genótipo dos marcadores Satt355 e Satt114: (A) Distribuição em relação a cada marcador individual. (B) Distribuição considerando ambos os marcadores simultaneamente. O alelo m do marcador é proveniente de MG/BR 46 Conquista e o alelo M, de CD 204.

Tabela 5 – Eficiência de seleção para a resistência ao *Meloidogyne javanica* com a utilização dos marcadores Satt335 e Satt114. O alelo m é proveniente de MG/BR 46 Conquista e o alelo M, de CD 204

Marcador	Genótipo	T+MT	MS+S	Eficiência de seleção
Satt335	m1m1	21	16	81%
	M1_	11	92	
Satt114	m2m2	19	23	74%
	M2_	12	83	
Satt335+Satt114	m1m1m2m2	16	12	83%
	M1_M2_	8	79	

Considerando que o germoplasma brasileiro de soja resistente aos nematoides de galhas possui base genética estreita, esses marcadores podem potencialmente ser utilizados em todo o germoplasma brasileiro para seleção para *Meloidogyne javanica* em soja. A busca por outros marcadores ainda será necessária para selecionar os outros loci de resistência. O uso dos marcadores Satt335 e Satt114 permitirá o aumento da frequência e, ou, monitoramento de linhagens resistentes com a seleção por meio dos marcadores.

Com base nos resultados apresentados, pode-se recomendar o uso dos marcadores Satt335 e Satt114 para seleção de plantas resistentes ao nematoide de galhas da espécie *Meloidogyne javanica*.

Estudos com o objetivo de identificar marcadores microssatélites relacionados à resistência ao *Meloidogyne javanica* foram realizados. Essa região no mapa da soja foi mapeado anteriormente por Tamulonis et al. (1997), que identificaram, estudando uma população derivada do parental resistente PI230977, o marcador B212-1, no grupo de ligação F, como associado à resistência ao *Meloidogyne javanica*. Silva et al. (2001), estudando a resistência da cultivar CD 201, identificaram possíveis genes de resistência próximos aos alelos Satt133 (GL A2) e Satt266 (GL D1b). Para a PI595099, foi identificado o marcador SOYHSP 176 (GL F), também como associado à resistência ao nematoide *Meloidogyne javanica*. Fuganti et al.

(2004) identificaram marcadores em uma população de cruzamento utilizando também a PI595099 como parental resistente. Os loci Satt144, SOYHSP 176 e Satt423, todos do grupo de ligação F, foram associados.

A identificação de marcadores associados às características de interesse auxilia a seleção de plantas nos Programas de Melhoramento de Soja e, posteriormente, a obtenção de plantas com as características desejadas de forma mais rápida e eficiente, permitindo a obtenção de cultivares mais competitivas no mercado brasileiro.

Estudo de populações segregantes, como a analisada, permite a compreensão do mecanismo genético para resistência aos nematoides de galhas, além de auxiliar na identificação de novas fontes de resistência para futura piramidação de genes.

A utilização de marcadores moleculares na seleção assistida em programas de melhoramento é possível após a validação dos marcadores para o germoplasma local. Com os resultados deste trabalho, pode-se validar a utilização do marcador Satt335 na seleção de plantas resistentes ao nematoide *Meloidogyne javanica*. Esse marcador não havia sido relatado na literatura como ligado à resistência a esse nematoide. A região do grupo de ligação (GL) de F na soja já havia sido identificada como potencial presença de genes de resistência, e neste trabalho essa informação foi confirmada.

A seleção assistida por marcadores moleculares para resistência a nematoides pode acelerar o trabalho do melhoramento e ser realizada nas fases iniciais dos programas, além de não requerer a manutenção da população dos nematoides, multiplicação e inoculação das plantas a serem avaliadas (FERRAZ, 2001). Com isso, maior número de plantas pode ser avaliado, principalmente em fases iniciais, aumentando a eficiência dos Programas de Melhoramento de Soja. Uma vez que a seleção assistida por marcadores moleculares não apresenta eficiência absoluta, as linhagens selecionadas pelos marcadores moleculares precisam ser confirmadas pela avaliação fenotípica. Mas pode-se reduzir bastante a quantidade de linhagens a serem avaliadas fenotipicamente, selecionando apenas as que possuem alelo de resistência para o marcador molecular. Essas linhagens possuem a maior probabilidade de serem resistentes.

A seleção assistida por marcadores geralmente envolve a análise de muitos marcadores e indivíduos, porém, depois de identificado e validado um marcador para determinado programa de melhoramento de plantas, a seleção irá auxiliar na seleção precoce e rápida de potenciais materiais com a frequência dos alelos de interesse. No caso deste estudo, para resistência ao nematoide de galhas *Meloidogyne javanica*, podem-se usar o Satt335 e o Satt114 para confirmar e, ou, monitorar a presença do QTL de resistência nas linhagens em desenvolvimento.

4. CONCLUSÕES

- Foi observada correlação positiva entre a variável nota para formação de galhas nas raízes e fator de reprodução.
- A resistência ao nematoide *Meloidogyne javanica* da variedade MG/BR 46 Conquista é conferida por dois genes recessivos com efeitos epistáticos.
- A resistência completa é obtida por dois genes recessivos, sendo um dos genes epistático. Para ser resistente, a planta precisa ser duplo homozigoto (aabb). Na ausência do bb, o genótipo aa resulta em moderadamente resistente. O genótipo bb sem a presença do aa não confere nenhuma resistência.
- Os marcadores Satt335 e Satt114 estão ligados a um gene/QTL recessivo que confere resistência ao nematoide *Meloidogyne javanica*. Esse marcador está associado a 28,6% da resistência da soja ao nematoide.
- O uso dos marcadores Satt335 e Satt114 combinados permite o aumento e, ou, manutenção da frequência dos genes de resistência na seleção de linhagens nos Programas de Melhoramento de Soja.

5. REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. Burlington, MA: Elsevier Academic, 2005. 922 p.

BIRD, D. M.; KALOSHIAN, I. Are roots special? Nematodes have their say. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 62, n. 2, p. 115-123, 2003.

CAIXETA, E. T. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. 2. ed. Viçosa, MG: Folha de Viçosa, 2009. p.11-94.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos – Quinto levantamento**. Brasília, DF: Companhia Nacional de Abastecimento, 2004. Acesso em: 6 Jan. 2014.

CRUZ, C. D.; SCHUSTER, I. **GQMOL**: aplicativo computacional para análise de dados moleculares e de suas associações com caracteres quantitativos. Versão 2.1. Viçosa, MG: DBG/UFV, 2004.

DIAS, W. P.; GARCIA, A.; SILVA, J. F. V.; CARNEIRO, G. E. S. **Nematoides em soja**: identificação e controle. Londrina, PR: Embrapa, 2010. p. 1-8. (Circular técnica, 76).

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 1, p. 13-15, 1991.

FERRAZ, L. C. C. B. As meloidoginoses da soja: passado, presente e futuro. In: SILVA, J. F. V.; MAZAFFERA, P.; CARNEIRO, R. G.; ASMUS, G. L.; FERRAZ, L. C. C. B. **Relações parasito-hospedeiro nas meloidoginoses da soja**. Londrina, PR: Embrapa Soja/Sociedade de Nematologia, 2001. 127 p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília, DF: MA/EMBRAPA/CENARGEN, 1998. 204 p.

FUGANTI, R.; BENEVENTI, M. A.; SILVA, J. F. V.; ARIAS, C. A.; MARIN, S. R. R.; BINNECK, E.; NEPOMUCENO, A. L. Identificação de marcadores moleculares de microssatélites para a seleção de genótipos de soja resistentes a *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, v. 28, n. 2, p. 125-130, 2004.

GREGAN, P. B.; JARVIK, T.; BUSH, A. L.; SHOEMAKER, R. C.; LARK, K. G.; KAHLER, A. L.; KAYA, N.; VANTOAI, T. T.; LOHNES, D. G.; CHUNG, J.; SPECHT, J. E. An integrated genetic linkage map of the soybean. **Crop Science**, v. 39, p.1464-1490, 1999.

HA, B. K.; BENNETT, B. J.; HUSSEY, R. S.; FINNERTY, S. L.; BOERMA, B. R. Pedigree analysis of a major QTL conditioning soybean resistance to southern root-knot nematode. **Crop Science**, v. 44, 2004.

HA, B. K.; HUSSEY, R. S.; BOERMA, H. R. Development of SNP assays for marker. Assisted selection of two southern root-knot nematode Resistance QTL in soybean. **Crop Science**, p. 73-82, 2007.

HARRIS, D. K.; BOERMA, H. R.; HUSSEY, R. S.; FINNERTY, S. L. Additional sources of soybean germplasm resistant to two species of root-knot nematode. **Crop Science**, v. 43, p. 1848-1851, 2003.

LI, Z.; JAKKULA, L.; HUSSEY, R. S.; TAMULONIS, J. P.; BOERMA, H. R. SSR mapping and confirmation of the QTL from PI96354 conditioning soybean resistance to southern root-knot nematode. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 103, p. 1167-1173, 2001.

LUZZI, B. M.; BOERMA, H. R.; HUSSEY, R. S. A gene for resistance to the southern root-knot nematode in soybean. **Journal Hered**, v. 85, p. 484-486, 1994.

LUZZI, B. M.; TAMULONIS, J.; HUSSEY, R. S.; BOERMA, H. R. Inheritance of resistance to the javanese root-knot nematode in soybean. **Crop Science**, v. 35, p. 1372-1375, 1995.

MÁTSUO, E.; FERREIRA, P. A. F.; SEDIYAMA, T.; FERRAZ, S.; BOREM, A.; FRITSCHÉ-NETO, R. Breeding for nematode resistance. In: FRITSCHÉ-NETO, R.; BORÉM, A. (Ed.). **Plant breeding for biotic stress resistance**. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2012.

SÁ, M. E. L.; LOPEZ, M. J. C.; CAMPOS, M. A. C.; PAIVA, L. V. P.; SANTOS, R. M. A.; BENEVENTIS, M. A.; FIRMINO, A. A. P.; SÁ, M. F. G. Transcriptome analysis of resistant soybean roots infected by *Meloidogyne javanica*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, p. 272-282, 2012.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: laboratory manual**. 2. ed. New York: CSHL, Cold Spring Harbore, 1989.

SILVA, J. F. V.; MAZZAFERA, P.; CARNEIRO, R. G.; ASMUS, G. L.; FERRAZ, L. C. C. B. **Relações parasito-hospedeiro nas meloidoginoses da soja**. Londrina, PR: Embrapa Soja/Sociedade Brasileira de Nematologia, 2001. p. 15-115.

SILVA, M. F.; SCHUSTER, I.; CERVIGNI, G. D. L.; SILVA, J. F. V.; DIAS, W. P.; FERREIRA, A.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Inheritance of resistance to soybean cyst nematode races 3 and 14 in soybean RIL and F2 populations. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 12, p. 1735-1740, 2007.

SCHMITT, D. P.; NOEL, G. R. Nematodes parasites of soybean. In: NICKLE, W. R. (Ed.). **Plant and insect nematodes**. New York: Marcel Dekker, 1984. p. 13-59.

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

TAMULONIS, J. P.; LUZZI, B. M.; HUSSEY, R. S.; PARROT, W. A.; BOERMA, H. R. DNA markers associated with resistance to javanese root-knot nematode in soybean. **Crop Science**, v. 37, p. 783-788, 1997.

CAPÍTULO 2

IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES SNPs ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA GENÉTICA AO *Meloidogyne javanica* EM SOJA ATRAVÉS DE POPULAÇÃO NÃO ESTRUTURADA

RESUMO

Os fitonematoides *Meloidogyne javanica* são de ampla ocorrência e responsáveis por perdas significativas em lavouras de soja. O uso de materiais resistentes tem sido apontado como a principal forma de controle da doença causada por esse patógeno. Estudos de populações não estruturadas são recomendados para identificação de novas fontes de resistência, pois as associações marcador x gene/QTLs estão mais fortemente associadas devido ao desequilíbrio de ligação presente na população. Além disso, novas fontes de resistência podem ser identificadas. O objetivo deste estudo foi identificar marcadores moleculares do tipo SNPs associados à resistência ao *Meloidogyne javanica* em soja e promissores para uso em Seleção Assistida por Marcadores (SAM). Primeiramente, foram escolhidas 124 cultivares de soja como população deste estudo. Foi realizada análise fenotípica em casa de vegetação, em condições controladas na Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola – COODETEC, em Cascavel, PR. As plantas foram inoculadas e, após 30 dias, foi atribuída uma

nota para cada planta, em função da formação de galhas nas raízes: nota 1: < 10% do sistema radicular com pequenas galhas; nota 2: 10-25% do sistema radicular com galhas, sendo a maioria galhas pequenas; nota 3: 26-50% do sistema radicular com galhas, muitas delas grandes; nota 4: 51-90% do sistema radicular com galhas, sendo a maioria galhas grandes; e nota 5: 91-100% do sistema radicular com galhas grandes e algumas raízes apodrecidas. O DNA desses materiais foi extraído e enviado para genotipagem na empresa Deóxi Biotecnologia, em Araçatuba, SP. Foi utilizada a plataforma Illumina *iScan*, em que 6.000 SNPs foram testados em cada amostra. Os dados estatísticos de associação foram obtidos através do software SVS Golden Hélix. Após a análise de qualidade dos dados com base no *call rate* das amostras e SNPs, foi realizado um teste de associação marcador x fenótipo de interesse. Entre os marcadores testados, 12 localizados no cromossomo 13 (grupo de ligação F) foram identificados como associados à resistência genética ao *Meloidogyne javanica* ($P < 0,0001$) em soja. Essa região do genoma soja também foi identificada no estudo baseado em população estruturada apresentado nesta tese, confirmando essa região do genoma da soja como fortemente associada à resistência ao *Meloidogyne javanica*.

Palavras-chave: Nematóide de galhas; *Glycine max* (L.) Merrill; SNPs, desequilíbrio de ligação.

ABSTRACT

The root-knot nematode *Meloidogyne javanica* is widely spread and responsible for significant losses in soybean. Resistant materials have been appointed as the main control method of the disease. Studies with unstructured populations are recommended to identify sources of resistance, because the associations between markers and QTLs are strongly associated and also new sources of resistance can be identified. The objective of this study was to identify SNPs markers associated to resistance to *Meloidogyne javanica* in soybean to be used in Marker Assisted Selection (MAS). First of all, 124 soybean cultivars were chosen. Phenotypic analysis was conducted in a greenhouse under controlled conditions in Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola – COODETEC, Cascavel/PR. Plants were inoculated and after thirty days it was assigned a score for each plant according to galls formation on roots: Score 1: < 10% of root system with small galls; Score 2 : 10-25% of root system with galls and with majority of small galls; Score 3: 26-50% of root system with many large galls; Score 4: 51-90% of root system with galls and most being large galls; note 5: 91-100% of root system with large galls and some rotted roots. DNA was extracted and sent to Deóxi in Araçatuba/SP for genotyping data analysis with Illumina *iScan* platform. For material genotyping, 6.000 SNPs were tested for each sample. Statistical association data were obtained from Golden Helix SVS software. After data quality analysis based on the *call rate* of SNPs and

samples, an association test was performed. Among the tested markers, 12 of them located on chromosome 13 (linkage group F) have been identified as associated with genetic resistance to *Meloidogyne javanica* ($P < 0.0001$) in soybean. This region in the soybean genome was also identified in the study based on structured population presented in this Project, confirming this region of the soybean genome as strongly associated with resistance to *Meloidogyne javanica*.

Keywords: Root-knot nematode; *Glycine max* (L.) Merrill; SNPs, linkage disequilibrium.

1. INTRODUÇÃO

O primeiro registro de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) no Brasil é de 1882, na Bahia. De lá para os dias atuais ocorreu notável expansão no cultivo dessa cultura (SILVA et al., 2001). A soja é uma das principais *commodities* mundiais. O preço de venda do grão é baseado em negociações nas principais bolsas de valores do mundo. Até o momento, o Brasil segue como o segundo maior produtor mundial de soja, apesar de essa cultura ser destaque de produtividade na safra 2012/2013, com crescimento de 10,7% (2,68 milhões de hectares), passando de 25,04 para 27,72 milhões de hectares (CONAB, 2013).

Muitos fatores podem interferir no aumento crescente de produtividade da soja. Os principais fatores que interferem nos ganhos de produtividade são as doenças, principalmente as de difícil controle, como no caso das causadas por nematoides. Entre aqueles que causam danos à soja, destacam-se o nematoide de cisto, *Heterodera glycines*, o nematoide de galhas (*Meloidogyne* spp.), o nematoide reniforme (*Rotylenchulus reniformis*) (SCHMITT; NOEL 1984) e, mais recentemente, o nematoide das lesões radiculares *Pratylenchulus brachyurus*.

Entre os fitonematoides, o *Meloidogyne javanica* se caracteriza por formar galhas nas raízes das plantas, interferindo no seu desenvolvimento, de forma que a produtividade é afetada. Assim, o manejo para evitar perdas de produtividades é essencial (MÁTSUO et al., 2012). Normalmente, os

sintomas desse patógeno são mais frequentes em solos arenosos e leves, sendo mais severos em ocasião de déficit hídrico, porém anos chuvosos favorecem sua disseminação (COSTAMILAN, 2000).

Esses patógenos não causam perdas somente devido ao dano nas raízes, mas também porque permitem que outros organismos de solo como fungos e bactérias penetrem as raízes mais facilmente.

O controle dos nematoides não é fácil porque os ovos ficam viáveis no solo por longos períodos de tempo. Dessa forma, além da rotação de culturas, a utilização de cultivares tolerantes ou resistentes é extremamente recomendada como medida de controle (FERRAZ, 2001). Além disso, o uso de cultivares resistentes resulta na redução da população no solo, diminuindo, assim, o inóculo para os próximos cultivos (SILVA et al., 2001). As plantas podem ser resistentes ou tolerantes aos patógenos. A resistência é uma reação de defesa da planta, resultante da soma de fatores hereditários, definida como a capacidade de uma espécie ou cultivar de reduzir o desenvolvimento do patógeno e da doença. Para os nematoides, a resistência de plantas está relacionada à redução no desenvolvimento e reprodução do nematoide nas raízes, reduzindo, assim, a fonte de inóculo no solo. A tolerância é utilizada para definir a capacidade de uma espécie ou cultivar de se desenvolver bem e produzir mais que outra exposta à mesma intensidade da doença; dessa forma, nas plantas tolerantes não há injúria, mesmo sob alta infecção (SILVA et al., 2001).

Estudos de identificação de genes associados à resistência aos nematoides são de fundamental importância na busca por variedades comerciais resistentes (WENDLAND, 2004). Ferramentas de biologia molecular disponíveis atualmente permitiram grande avanço no uso dessas técnicas nos programas de melhoramento para seleção assistida por marcadores moleculares (SAM). Os marcadores SNPs são os que apresentam maior potencial de uso no momento, pois permitem variados estudos com quantidade muito grande de marcadores, essencial para a construção e identificação de marcadores associados a características de interesse.

Identificar SNPs informativos e associados a características agronômicas de interesse contribuirá para aumentar a eficiência e eficácia

da seleção de plantas (HA et al., 2007), sendo extremamente importante para os Programas de Melhoramento Genético de Soja, pois, dessa forma, é possível aumentar a frequência de alelos de interesse, alelos esses responsáveis pelo fenótipo desejado, reduzindo-se, assim, tempo e recursos necessários para o desenvolvimento de uma nova cultivar ou híbrido.

A seleção assistida por marcadores tem muitas vantagens quando comparada com a análise fenotípica. Através de marcadores associados, é possível fazer a seleção de linhagens desejadas nas primeiras gerações das populações de cruzamento, em estágios iniciais de desenvolvimento da planta, reduzindo recursos necessários para as análises fenotípicas. Também, é possível realizar múltiplos ciclos de seleção em um ano (HA et al., 2007) e diminuir o custo de trabalho associado à manutenção do inóculo, além de eliminar a dependência sobre a ocorrência natural de praga ou do agente patogênico (MOHAN et al., 1997). O uso efetivo dessa ferramenta nos programas de melhoramento tem aumentado. No entanto, muitos fatores podem interferir no sucesso da aplicação, a exemplo da correta determinação de marcadores que estão intimamente ligados com QTL para a característica desejada.

Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) são os marcadores baseados na identificação de polimorfismos de um único nucleotídeo em regiões do DNA expressas ou não. Utilizando esses marcadores, é possível detectar a substituição de uma única base nucleotídica por outra, o que representa o tipo de polimorfismo mais minucioso entre quaisquer alelos (CAIXETA, 2009). Outra vantagem é que os SNPs são considerados estáveis na evolução das espécies, permitindo, assim, a sua utilização em estudos de genética de populações (JIN et al., 2003). Os SNPs foram considerados por Schork et al. (2000) os melhores marcadores para uso em estudos de genética de associações, devido à alta frequência, ampla distribuição em todo o genoma e adequação para genotipagem automatizada (*high-throughput*). Grimm et al. (1999) estimaram a frequência de SNPs em soja de 3,4 por kilobase em aproximadamente 18.000 bases da sequência de DNA obtidos a partir de 18 genótipos, que eram os ancestrais das modernas cultivares de soja da América do Norte.

Para a associação fenótipo/marcador, o desequilíbrio de ligação presente nos genomas é fundamental. O Desequilíbrio de Ligação (DL) é a ocorrência de gametas com frequências diferentes daquelas esperadas em populações de segregação independente, e, dessa forma, dois ou mais alelos estão ligados em uma frequência maior do que a esperada, não ocorrendo recombinação conforme probabilidades esperadas. A associação de um marcador com um alelo que confere resistência a determinada característica fenotípica de interesse será fortemente mantida se a população em estudo estiver em desequilíbrio de ligação. Isso ocorre porque a recombinação genética entre o marcador/gene ou alelo de interesse ocorre em frequência menor do que a esperada, e, assim, a associação é mantida, não gerando falsos positivos ou negativos. Essa recombinação gênica é capaz de reduzir a extensão do desequilíbrio de ligação em uma região genômica. Segundo Ferreira e Grattapaglia (2009), o desequilíbrio de ligação é maior nas regiões pouco densas do genoma, com recombinações mais raras, e menor nas regiões ricas em genes, com maior taxa de recombinação.

A localização de um QTL em relação a um marcador molecular é diretamente proporcional ao número de meioses ocorridas na população de mapeamento. Isso significa que depende da recombinação entre o marcador e o loco que controla a característica de interesse. Dessa forma, as análises de ligação baseadas em populações experimentais, como retrocruzamento, F_2 e RILs, apresentam menor resolução que análises de associação em populações não estruturadas, em que muitas gerações de recombinação ocorreram entre marcador e QTLs. Assim, somente marcas fortemente ligadas aos QTLs permanecem associadas após sucessivas gerações (FLINT-GARCIA et al., 2003).

Como a análise de associação utiliza a informação dos cruzamentos reais realizados na obtenção das populações, os genótipos são diversificados e os genes relevantes (adaptação etc.) devem estar segregados em tais populações. As informações são mais detalhadas em um grande número de linhagens e variedades, sendo essas informações valiosas para o melhoramento de plantas (HIRSCHHORN; DALY, 2005).

O uso de populações naturais para mapear caracteres de interesse, através de mapeamento por associação, tem como grande vantagem o potencial de mapear QTLs com maior resolução, uma vez que se aproveita dos eventos de mutação e recombinação acumulados ao longo do tempo na população para analisar um fenótipo. Além disso, dezenas de alelos podem ser acessadas simultaneamente; assim, para uma mesma genotipagem, diversas características de interesse podem ser estudadas (GUPTA et al., 2005).

Para os melhoristas, o mapeamento por desequilíbrio de ligação (DL) é interessante, pois permite o desenvolvimento de variedades comerciais simultaneamente. Grande número de avaliações fenotípicas é requerido para a construção de mapas, que também são feitas rotineiramente nos programas de melhoramento de plantas ao longo dos vários anos, como os próprios ensaios de Valor de Cultivo e Uso (VCU). Assim, esses dados podem ser utilizados na busca para identificar genes ou marcadores associados aos fenótipos de interesse (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 2009).

Através da análise dos dados, podem-se detectar combinações complexas (mesmo interações epistáticas) entre alelos em vários loci. Isso pode ser difícil de isolar e validar usando outra abordagem de mapeamento. Outra vantagem do uso do DL é devida à validação dos marcadores. No mapeamento por ligação, a validação dos marcadores é realizada em outras populações além da população de mapeamento original, para garantir que os alelos selecionados tenham efeito similar em diferentes *backgrounds* genéticos. No mapeamento por DL, essa validação não é necessária. Isso ocorre devido à maior variação alélica presente na população utilizada no mapeamento por DL (MACKAY; POWELL, 2007).

Esses estudos de associação baseados em desequilíbrio de ligação devem ser realizados em populações naturais, coleções de germoplasma e conjunto de materiais-elite, entre outros, e não através de populações estruturadas. No caso de mapeamento de populações estruturadas, foi observado que os QTLs identificados em uma população de mapeamento em particular podem não ser eficazes em diferentes origens (LIAO et al., 2001), devido a efeitos do *background* genético. Para experimentos de mapeamento de QTLs, são utilizados parentais que são contrastantes para

determinado fenótipo. Nessa abordagem, ao utilizar outra população, um ou ambos os progenitores podem possuir alelos que são semelhantes ou, mesmo, idênticos. Nesse caso, o efeito de um QTL pode ser insignificante quando utilizado para introgressão em variedades-elite. Em outros casos, o efeito de um QTL pode ser diferente, dependendo da origem genética, devido às interações com outros loci ou epistasia (HOLAND, 2001; LI, 2000).

Estudos de associação podem ser utilizados para refinar a localização do QTL previamente identificado através da análise de ligação. Em algumas situações, dependendo de fatores como espécie, histórico de domesticação e seleção, o mapeamento por análise de ligação pode ser mais indicado que o mapeamento por associação, como no caso de alelos raros. Estudos de associação para fenótipos de interesse em plantas podem ser realizados em duas estratégias. A primeira está baseada em todo o genoma com uma população não estruturada e desequilíbrio de ligação. A outra estratégia está baseada em genes candidatos, em que são desenvolvidas populações de cruzamento para estudo de genes raros ou já conhecidos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 2009).

Considerando as duas abordagens de associação genótipo x fenótipo, o objetivo deste estudo foi identificar SNPs associados a genes/QTLs de resistência ao *Meloidogyne javanica* em um grupo de cultivares de soja, para uso em Seleção Assistida por Marcadores Moleculares (SAM), no melhoramento genético da soja.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi desenvolvida no Centro de Pesquisas Elói Gomes, da Coodetec, em Cascavel, PR.

2.1. Material genético e delineamento estatístico

Foi utilizado neste estudo um grupo de 124 cultivares de soja, entre cultivares que foram importantes no mercado brasileiro nas décadas de 1980 e 1990, e cultivares comerciais mais recentemente utilizadas, visando obter maior variabilidade possível para a característica em estudo. O germoplasma mais antigo foi obtido do Banco Ativo de Germoplasma da Coodetec.

2.2. Desempenho fisiológico para resistência ao nematoide de galhas

Para avaliação fenotípica, foi utilizado o inóculo de *Meloidogyne javanica* obtido de raízes de plantas da cultivar CD 206, segundo metodologia de Bonetti e Ferraz (1981), sendo essa cultivar bastante suscetível e utilizada para manutenção e multiplicação do mesmo inóculo em casa de vegetação. Após a lavagem das raízes, estas foram trituradas em liquidificador por 30 seg com solução de 0,5% de hipoclorito de sódio. A solução foi peneirada utilizando-se peneiras de 500, 260 e 60 mesh,

dispostas uma sobre a outra. Os ovos foram coletados na peneira de 500 mesh e quantificados para preparo do inóculo (BONETTI; FERRAZ, 1981).

Para cada uma das cultivares, sete sementes foram semeadas individualmente em tubetes plásticos, de 4 cm de diâmetro por 20 cm de comprimento. Nos tubetes, foi utilizado o substrato composto por 1/3 de solo e 2/3 de areia. Os tubetes foram colocados em baldes contendo areia (12 tubetes por balde), de forma a obter uma planta por tubete, com sete repetições. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. A inoculação dos ovos do nematoide foi realizada a partir de perfurações no solo ao redor da haste da planta, e em seguida foram injetados nesses orifícios 5.000 ovos por planta. Após a inoculação, os orifícios foram cobertos com solo esterilizado.

As avaliações foram realizadas 30 dias após a inoculação. Para avaliação, as plantas foram retiradas dos tubetes e as raízes, cuidadosamente lavadas. A avaliação foi realizada de acordo com a observação do sistema radicular da planta, conforme Harris et al. (2003), seguindo as escalas (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1 – Escala de notas para avaliação de nematoides formadores de galhas

Nota	Descrição
1	< 10% do sistema radicular com pequenas galhas
2	10-25% do sistema radicular com galhas e a maioria sendo galhas pequenas
3	26-50% do sistema radicular com galhas tendo muitas galhas grandes
4	51-90% do sistema radicular com galhas e a maioria sendo galhas grandes
5	91-100% do sistema radicular com galhas grandes e algumas raízes apodrecidas

Tabela 2 – Escala de caracterização de genótipos aos nematoides formadores de galhas

Média de notas	Reação
1,0 – 1,9	Resistente
2,0 - 2,9	Moderadamente Resistente
3,0 - 3,9	Moderadamente Suscetível
4,0 - 4,9	Suscetível
5,0	Altamente Suscetível

2.3. Extração de DNA

A extração de DNA das sementes foi realizada conforme o protocolo descrito por McDonald et al. (1994), com algumas modificações. Foram moídos cerca de 50 mg de cada semente e colocados em microtubos com capacidade para 1,5 mL. Em seguida, foram adicionados 500 µL de tampão de extração contendo 0,1 M Tris HCl (pH 7,5), 5 M EDTA, 5 M NaCl e SDS 10%. Para maceração mais precisa, uma esfera de vidro de 3 mm de diâmetro foi adicionada em cada tubo. Os microtubos fechados foram colocados em um grinder para macerar o tecido vegetal. Após 3 min no grinder, adicionaram-se 500 µL do tampão de extração, seguido de centrifugação a 18.000 x *g*, por 10 min. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo previamente identificado, e 10 µL de proteinase K (10 mg.mL⁻¹) foi adicionado para remoção das proteínas. As amostras foram colocadas em banho-maria a 37 °C por 30 min. Para precipitar o DNA, adicionaram-se 500 µL de isopropanol gelado e, após 2 min de repouso, as amostras foram centrifugadas por 15 min a 18.000 x *g*. Descartou-se o sobrenadante, e o precipitado ficou na temperatura ambiente por 15 min para secar. Para eliminação do 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 A (10 mg.mL⁻¹). As amostras foram colocadas em banho-maria a 37 °C por 30 min e o DNA, novamente precipitado pela adição de 500 µL de isopropanol gelado, sendo as amostras, após 2 min,

centrifugadas por 15 min a 18.000 x g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado, deixado por 15 min na temperatura ambiente, para secar. Após esse período, 300 µL de TE foram adicionados para ressuspender o precipitado.

A concentração de DNA de cada amostra foi estimada em espectrofotômetro Nanodrop1000 por absorbância a 260 nm, sendo cada unidade de absorbância correspondente à concentração de 50 µg.mL⁻¹ de DNA de fita dupla (SAMBROOK et al., 1989).

As amostras foram armazenadas em freezer para posterior diluição e genotipagem com marcadores SNPs.

2.4. Genotipagem

A genotipagem com marcadores SNPs foi realizada 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, contendo 24 amostras cada *Beadchip*. Foram adquiridos oito *BeadChips* com 6.000 SNPs por amostra. A genotipagem foi realizada conforme instruções do fabricante e está disponível em detalhes no endereço eletrônico www.illumina.com (ILLUMINA, 2014). Em suma, o protocolo em questão consistiu de seis etapas principais distintas. Uma visão geral dos processos está representado no fluxo de trabalho da Figura 1 e descrito a seguir.

Amplificação – As amostras de DNA foram diluídas a 75 ng/mL, desnaturadas e neutralizadas com NaOH para posterior amplificação, bem como submetidas a um processo de amplificação isotérmico a 36 °C e incubadas no equipamento por aproximadamente 16 h. Essa etapa resultou em aumento na concentração de DNA centenas de vezes, em comparação com a reação de PCR (do inglês *Polymerase Chain Reaction*), melhorando, assim, a qualidade dos resultados.

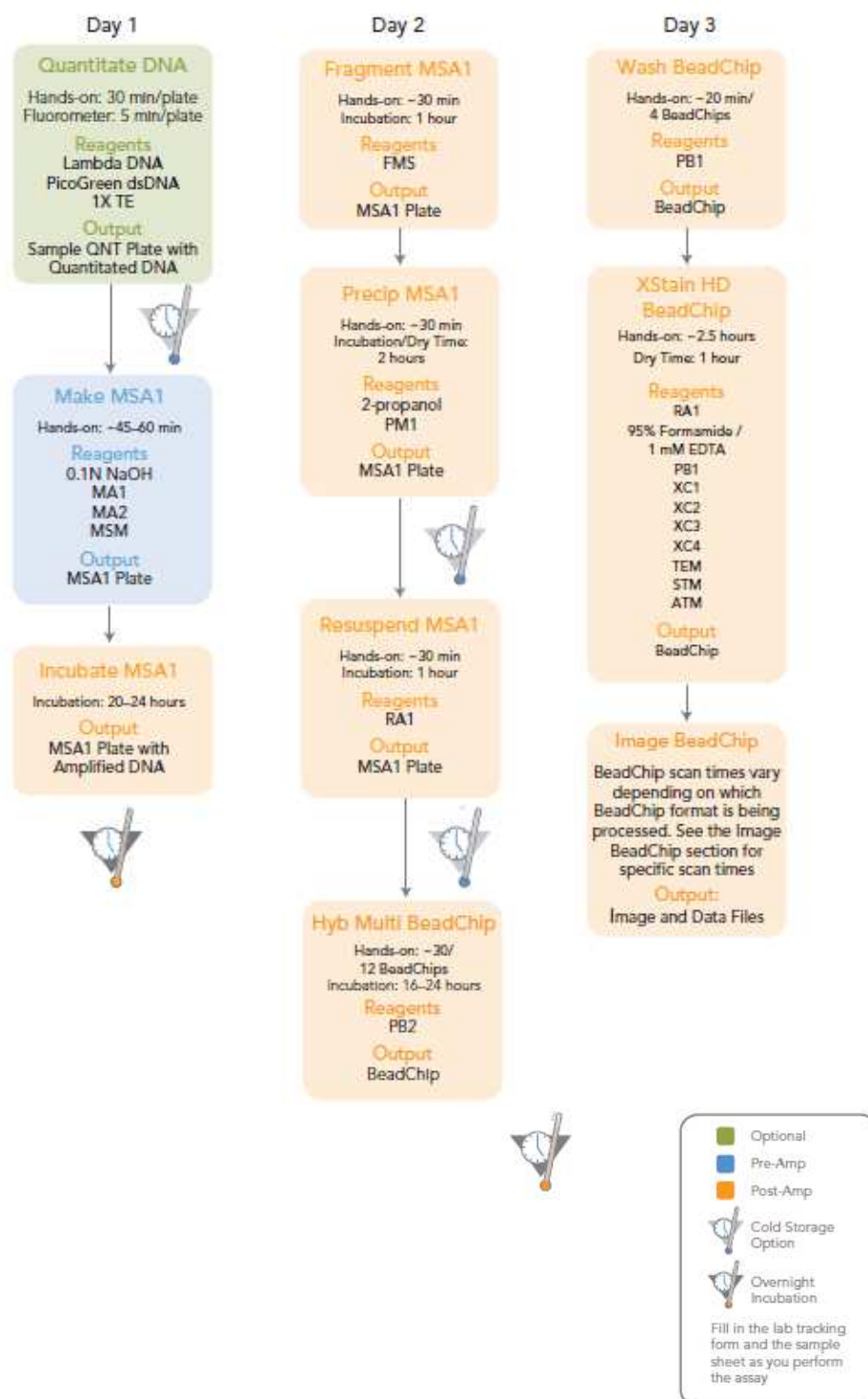


Figura 1 – Fluxo de trabalho do *Illumina Infinium HD Assay* para 24 *BeadChips*.

Fragmentação – Após 16 h de incubação, prosseguiu-se com a fragmentação enzimática. Foi adicionado isopropanol no DNA e centrifugado a 4 °C; em seguida, descartou-se o isopropanol. O DNA foi ressuspensionado em tampão de hibridização. O produto de amplificação foi fragmentado por um processo enzimático do tipo *end-point*, isto é, os sítios de fragmentação são determinados por atributos específicos da sequência de DNA, o que evita a ocorrência de fragmentação excessiva.

Hibridização – o DNA amplificado e fragmentado se anela (hibridiza) na sequência de 50 bases que está covalentemente ligada à nanopartícula *bead*, em que cada *bead* corresponde a um locus específico do DNA (Figura 2). O chip contendo as amostras foi incubado por 16 a 24 h em forno com temperatura controlada de 47 °C.



Figura 2 – *Beads* contendo SNPs onde as amostras de DNA são aplicadas e o local onde são acomodadas para hibridização.

Extensão de base-única – Após a hibridização, foi realizada a extensão de uma única base nucleotídica da sequência, para incorporar os corantes que permitiram a determinação dos genótipos.

Coloração – Para a coloração, primeiramente o chip foi lavado. O DNA hibridizado não foi removido. Uma sequência de reagentes e corantes foi aplicada aos chips, sendo responsáveis pela emissão de fluorescência, para a determinação dos diferentes genótipos. Todo o procedimento ocorreu em equipamento com umidade e temperatura controladas. Depois da coloração, os chips foram acondicionados a vácuo até a completa secagem.

Visualização das Imagens – Após a secagem, os chips foram levados para o equipamento Illumina iScan®. Um conjunto de laser foi utilizado para excitar os fluoróforos que estavam ligados aos *beads* na lâmina, permitindo que o sinal de fluorescência fosse captado e analisado. De acordo com os alelos encontrados, houve diferentes intensidades de coloração no chip, obtendo-se, assim, os resultados da hibridização entre o DNA e o chip.

A informação obtida do SNP para cada genótipo testado é determinada pela intensidade de fluorescência emitida pela reação físico-química que ocorre no sítio de hibridização específico para cada SNP, que é captada por diferentes tipos de plataformas de detecção. As intensidades determinaram a formação de três possíveis grupos que representam os genótipos hipotéticos AA, AB e BB (Figura 3).

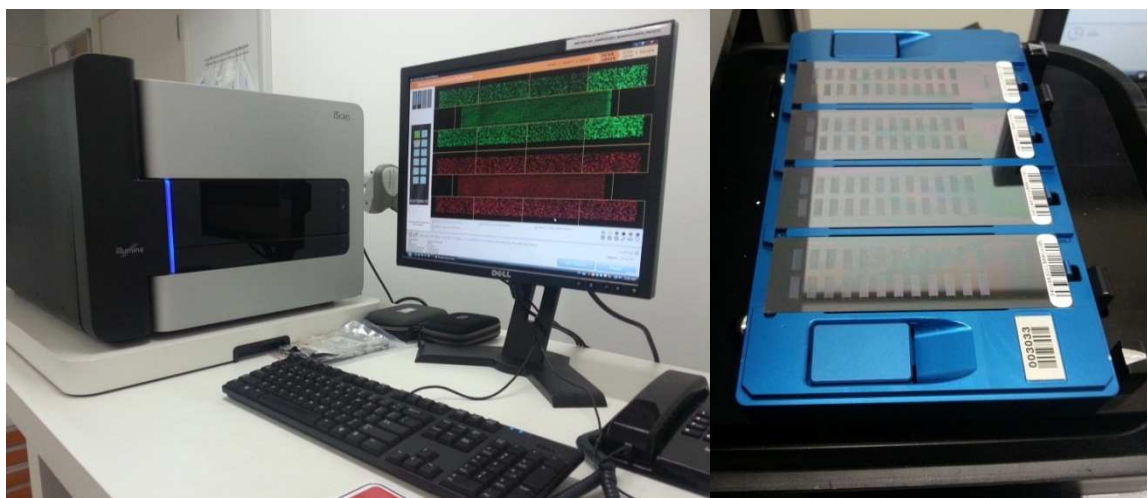


Figura 3 – A: Equipamento Illumina iScan®, utilizado para leitura dos genótipos. B: BeadChips com 6.000 SNPs cada.

2.5. Análises dos dados

A análise dos dados fenotípicos foi realizada com o auxílio do Programa Sasm-Agri (CANTERI et al., 2001). Foram realizados ANOVA e teste de médias Scott-Knott (SCOTT-KNOTT, 1974), para agrupamento das médias.

A análise de associação dos dados genotípicos com o fenótipo foi realizada utilizando o Software SNP and Variation Suite – Golden Helix (http://www.goldenhelix.com/SNP_Variation).

A associação marcador/fenótipo foi avaliada pela correlação entre os marcadores e os resultados de nota para a formação de galhas nas raízes da soja, utilizando-se a expressão:

$$r = \frac{cov(x, y)}{\sqrt{var(x)var(y)}} = \frac{\sum x_i y_i - \frac{1}{n} \sum x_i \sum y_i}{\sqrt{\left(\sum x_i^2 - \frac{1}{n} (\sum x_i)^2\right) \left(\sum y_i^2 - \frac{1}{n} (\sum y_i)^2\right)}}$$

O valor da correlação ao quadrado (r^2) ponderado por $n-1$ tem distribuição de qui-quadrado:

$$\chi^2 = (n - 1)r^2$$

Com um grau de liberdade, o valor de probabilidade (P) da correlação é obtido a partir dessa distribuição de qui-quadrado. Uma vez que os valores de probabilidade são muito baixos, eles são expressos através de $-\log_{10}(P)$.

Antes de submeter os dados à análise estatística, foi necessária a avaliação da qualidade dos dados obtidos pela genotipagem. SNPs com baixo *call rate* ($<0,90$) foram eliminados da análise, ou seja, marcadores que não apresentaram resultado em pelo menos 90% das amostras da população de variedades de soja foram removidos da análise. A qualidade por amostras também foi verificada, e aquelas que tinham menos de 90% de genótipos determinados pelo painel de genotipagem foram desconsideradas nas análises.

Um processo eficiente de controle de qualidade dos SNPs e limites de significância elevados são alternativas normalmente utilizadas para diminuir as associações espúrias (EASTON et al., 2007; SLADEK et al., 2007; CHAN

et al., 2009; THE WELLCOME TRUST CASE CONTROL CONSORTIUM, 2007; BOLORMAA et al., 2010).

Através do controle de qualidade, determinaram-se quais indivíduos e quais marcadores devem permanecer ou não no conjunto de dados a serem analisados, removendo-se, assim, todos os dados considerados não informativos (TURNER et al., 2011).

Para testes com muitos marcadores, o uso de correções no valor de P é necessário. Nesse tipo de análise, correções de Bonferroni (ASTON; CARREL, 2009) ou FDR (False Discovery Rate) (BENJAMIN; HOCHBERG, 1995) são as mais comumente utilizadas.

Foi utilizada a correção de Bonferroni nas análises deste estudo. Essa correção diminui os falsos positivos (erro do tipo I), que são muito comuns nesse tipo de estudo, devido ao número de marcadores analisados. Um dos principais problemas dessa correção é o aumento do erro do tipo II, tornando esse teste excessivamente conservativo. A correção de Bonferroni controla a probabilidade global de qualquer falso positivo (i.e., um ou mais falsos positivos) no experimento. Para aplicar a correção de Bonferroni, simplesmente especifica-se o nível de significância geral desejado, o qual é, então, dividido pelo número de testes a serem realizados. Esse nível de significância corrigido ($\alpha^* = \alpha/m$) é, então, utilizado como limite de significância para cada um dos testes efetuados (ROSA et al., 2007).

Marcadores com valores de $P < 0,0001$ corrigidos para Bonferroni foram considerados associados ao fenótipo neste estudo. Devido ao grande número de marcadores testados, optou-se por ser bastante restritivo quanto à associação marcador/QTL.

A combinação de utilização de um valor de significância rigoroso com outros critérios pode auxiliar na reprodutibilidade dos dados. Manly (2005) propôs o sistema *Better Associations for Disease and Genes* (BADGE) de classificação (Tabela 3), de acordo com a confiabilidade da associação representada no *Manhattan Plot*. Na primeira classe apresentada na Tabela 3 está descrito o valor de significância considerado mais rigoroso, enquanto a última classe apresenta o valor de significância menos exigente.

Tabela 3 – Sistema *Better Associations for Disease and Genes* de classificação da reprodutibilidade em estudos de associação genômica

1ª Classe	$p < 2 \times 10^{-7}$	Sugere reprodutibilidade sob pressuposição conservadora para associação sem evidências prévias.
2ª Classe	$p < 5 \times 10^{-6}$	Sugere reprodutibilidade sob pressuposição conservadora para características previamente mapeadas (~100 cM) ou outras fracas evidências de associação. Sugere reprodutibilidade sob pressuposição não conservadora para associação sem evidências prévias.
3ª Classe	$p < 1 \times 10^{-4}$	Sugere reprodutibilidade sob pressuposição conservadora para características previamente mapeadas em pequenas regiões (~5 cM). Sugere reprodutibilidade sob pressuposição não conservadora para associação com evidências prévias fracas.
4ª Classe	$p < 2 \times 10^{-3}$	Sugere reprodutibilidade sob pressuposição conservadora para características previamente mapeadas em pequenas regiões.
5ª Classe	$p < 5 \times 10^{-2}$	Confirma associação de primeira e de segunda classe em amostras de população independente.

Fonte: MANLY, 2005.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Fenotipagem

Os resultados para o *screening* das linhagens utilizadas neste estudo apresentaram variabilidade genética quanto à resistência ao *Meloidogyne javanica*. A característica apresentou efeito significativo ($P < 0,01$) para a fonte de variação tratamentos (Tabela 4).

Tabela 4 – Análises de variância em delineamento inteiramente casualizado da resistência a *Meloidogyne javanica*, Cascavel, PR, Brasil

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	123	107,8956	0,8772	11,092**
Resíduo	776	610,4016	0,7866	
TOTAL	899	718,2972		
C.V. (%)	8,68%			

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

A variabilidade genética da característica em estudo, demonstrada pela análise de variância, é necessária para análise de associação entre

marcadores e o fenótipo. As médias das cultivares avaliadas foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, cujos dados são apresentados na Figura 4.

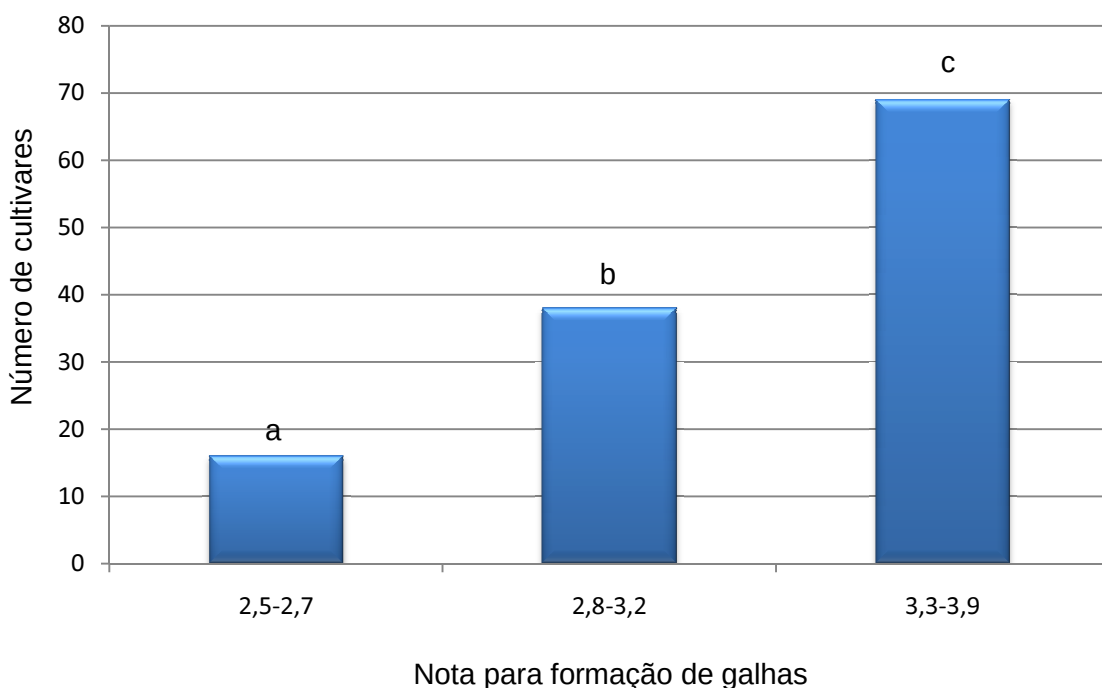


Figura 4 – Número de cultivares testadas agrupadas pelas médias de nota para formação de galhas. Cultivares agrupadas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott a 1% de probabilidade.

Para os valores de média, foram formados três grupos distintos, segundo o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Após a confirmação da variabilidade entre os materiais testados, a associação marcador com fenótipo foi realizada. Primeiramente, foi realizado o controle de qualidade dos SNPs, em que marcadores com mais de 10% de dados perdidos foram eliminados. Entre os 6.000 testados, 4.232 SNPs foram utilizados para as análises, reduzindo em 30% o volume de testes para análise.

Foi realizado o controle de qualidade também das amostras, sendo mantidas apenas aquelas com menos de 10% de dados perdidos. Devido ao reduzido número de cultivares fenotipadas, optou-se pela não exclusão de amostras baseadas na heterozigosidade observada neste estudo. Essa tomada de decisão não influenciou os resultados. Ziegler (2008) afirmou que materiais com valores acima de 90% de dados válidos já seriam suficientes para garantir a qualidade do estudo.

Através da análise de correlação, foram identificados 13 potenciais marcadores associados com a característica resistência ao *Meloidogyne javanica* (Tabela 5). Devido ao fato de este estudo estar baseado em muitos marcadores, o valor de P pode ser mais restritivo, como $P < 0,0001$ (0,01%), para que o valor de falsos positivos possa ser dentro do aceitável.

Tabela 5 – Marcadores associados à resistência ao *Meloidogyne javanica* analisados pelo Software SVS Golden Hélix, pela correção de Bonferroni

Marker	Cr**	Call Rate	Correlação	
			-log10 P	Bonf. P
Gm13_29739984	13	96,3	16,74419	9,02E-14*
Gm13_30078140	13	97,2	14,63054	1,17E-11*
Gm13_29418256	13	99,1	14,46314	1,72E-11*
Gm13_29265240	13	96,3	14,35186	2,23E-11*
Gm13_29858691	13	97,2	13,5332	1,47E-10*
Gm13_31013252	13	92,7	13,30029	2,51E-10*
Gm13_29524129	13	96,3	12,98574	5,17E-10*
Gm13_29565413	13	93,6	12,68604	1,03E-09*
Gm13_30744043	13	93,6	9,957422	5,52E-07*
Gm13_31262161	13	91,7	9,700692	9,97E-07*
Gm13_28141969	13	98,2	8,19866	3,17E-05*
Gm05_31767626	5	98,2	8,179056	3,32E-05*
Gm13_32210915	13	97,2	8,023998	4,74E-05*

* Marcadores significativamente associados ($P < 0,0001$) pela correção de Bonferroni.

**Cromossomo.

Entre os marcadores avaliados, considerando a correção de Bonferroni, 13 marcadores foram identificados como associados à resistência ao *Meloidogyne javanica* em soja. Entre esses, 12 estão localizados no cromossomo 13 (grupo de ligação F) (SONG et al., 2004). Foi ainda identificado um marcador associado presente no cromossomo 5 (A1).

O marcador mais fortemente associado à característica em estudo está localizado no cromossomo 13. O valor de P obtido nesta análise foi de $P = 16,744E-12$. Os dados deste trabalho indicam que na região do cromossomo há um QTL com genes responsáveis pela resistência ao nematoide de galha *Meloidogyne javanica*. Esse QTL está posicionado aproximadamente entre 28 e 33 cM dentro do grupo de ligação (Figura 5).

Conforme o sistema proposto por Manly (2005) (Tabela 3), o uso de $P < 4,74E-05$ como ponto de corte para indicar marcadores associados é bastante restritivo, e os dados apresentam reprodutibilidade sob pressuposição conservadora para associação sem evidências prévias. Na análise gráfica $\log_{10}(P)$ está indicada a distribuição dos marcadores nos cromossomos da soja (Figura 4).

Não há publicações recentes sobre o descobrimento de novas regiões do genoma na soja envolvidas com resistência genética ao *Meloidogyne javanica*. As informações disponíveis estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6 – Resumo das informações disponíveis sobre resistência ao *Meloidogyne javanica* em soja

Referência	Grupo de ligação	Fonte de resistência
Tamulonis et al. (1997)	F	PI230977
Silva et al. (2001)	F	PI595099
Fuganti et al. (2004)	F	PI595099
Silva et al. (2001)	A2 e D1b	CD201

Esses estudos foram baseados em mapas de ligação por recombinação, em que uma população segregante para a resistência ao nematoide foi criada e estudada. Nesta pesquisa, envolvendo um grupo de cultivares de soja, a associação marcador/QTL confirmou a presença de genes de resistência no genoma da soja localizado no grupo de ligação F.

Entre os dados obtidos, foi observado um único marcador fortemente associado ($P = 3,32E-05$) no cromossomo 5 para a resistência ao nematoide de galhas, indicando essa região do genoma como candidata a ter genes/QTLs de resistência. Esta não foi citada em trabalhos de mapeamento de QTLs para nematoide de galhas anteriormente publicados.

Os dados gerados são de grande importância para estudos de resistência ao nematoide de galhas, pois, utilizando a estratégia de estudos de associação por desequilíbrio de ligação e com diferentes fontes de resistência, novas regiões do genoma associadas à característica de interesse foram observadas. Além disso, após a validação desses marcadores, poderá ser realizada seleção indireta para a característica em estudo e predição de fenótipos esperados.

Segundo Ferreira e Grattapaglia (1995), a existência de desequilíbrio de ligação entre alelos no loco marcador e alelos do QTL é fundamental. O desequilíbrio de ligação gera efeitos quantitativos associados ao marcador, os quais podem ser detectados e estimados por meio de análises estatísticas apropriadas. O desequilíbrio de ligação é decorrente de efeitos de ligação ou epistáticos entre os loci, resultando em desvios das frequências gaméticas em relação às frequências de equilíbrio de ligação.

Entre os marcadores associados à resistência identificados no cromossomo 13, a maior parte está localizada próxima à região 30 cM. Na Figura 5, estão plotados os marcadores identificados no cromossomo, com os respectivos valores de P.

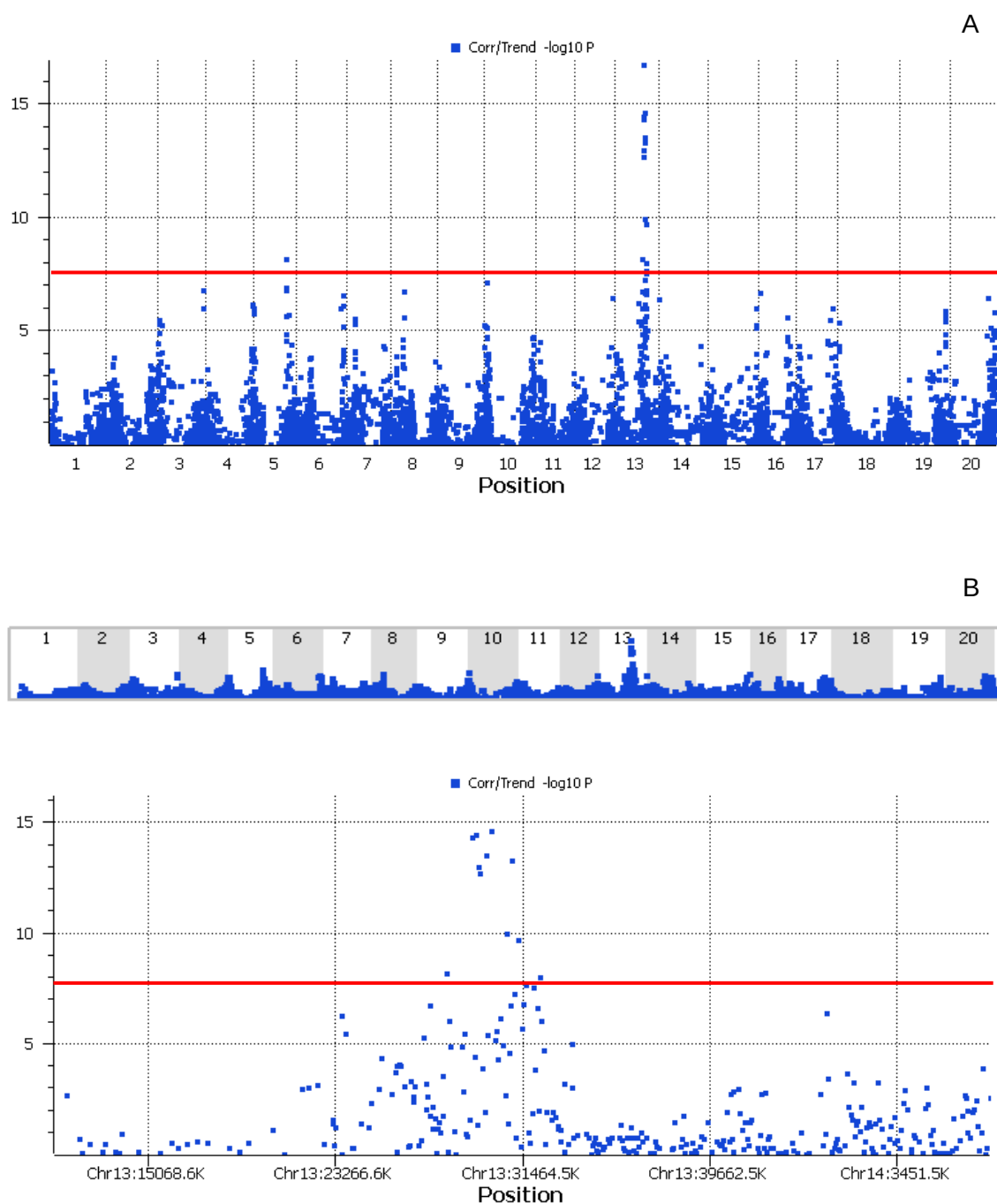


Figura 5 – Distribuição gráfica dos valores de $-\log(10)P$ com distribuição dos marcadores nos cromossomos da soja: (A) Visualização geral com ponto de corte para marcadores associados, com destaque em vermelho, baseado no $-\log P$. (B) Zoom da região mais fortemente associada para resistência ao *Meloidogyne javanica* em soja.

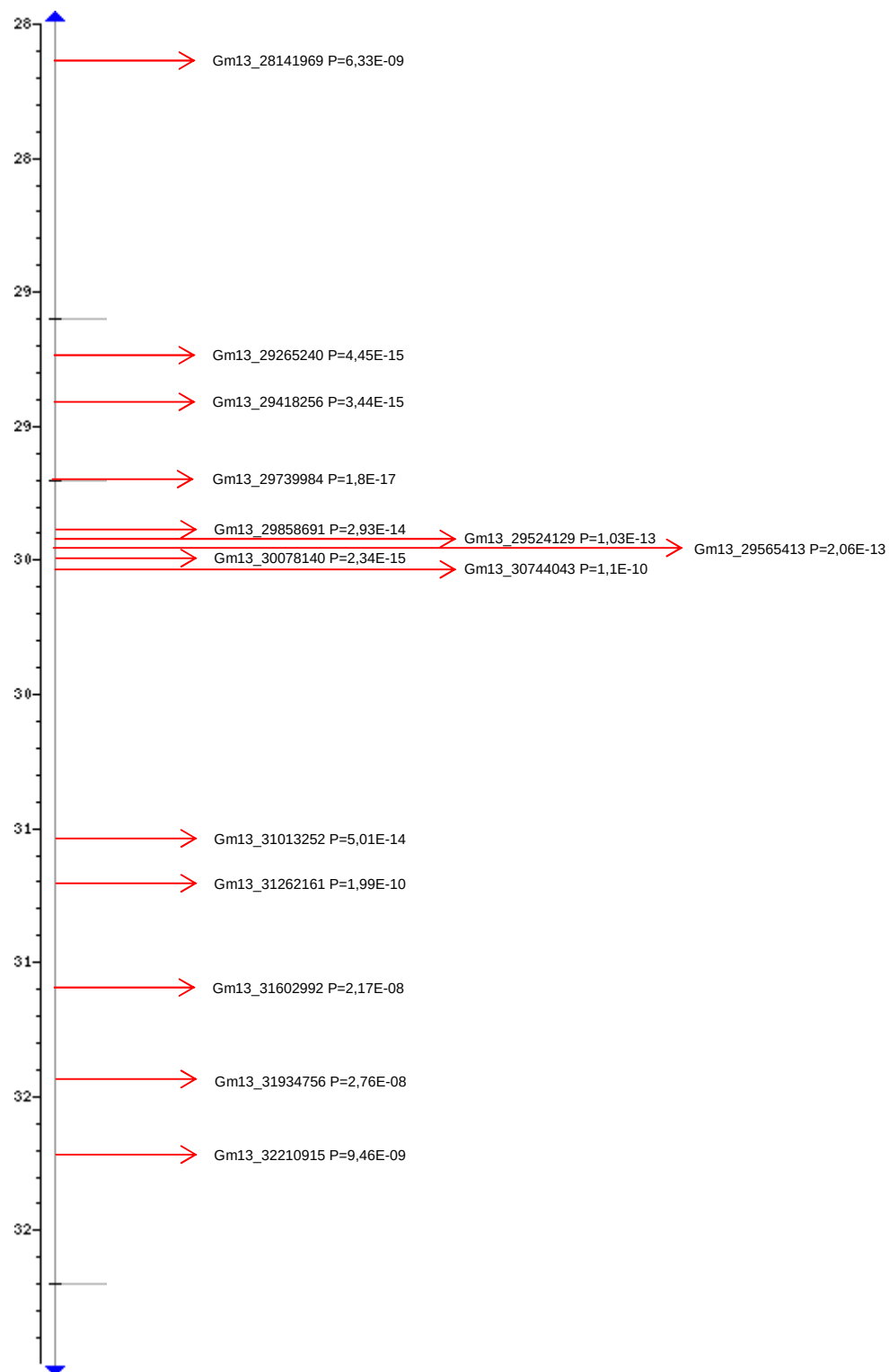


Figura 6 – Posição dos SNPs distribuídos no cromossomo 13, com os valores de P indicados.

As informações obtidas indicam que no cromossomo 13 há uma região saturada de SNPs associados com gene(s)/QTL(s) para resistência ao *Meloidogyne javanica*. Entre os marcadores associados, o marcador Gm13_29418256 está associado a um gene que codifica para a proteína DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA2. Essa proteína é uma polimerase que catalisa a transcrição de DNA em RNA, usando os quatro trifosfatos de ribonucleósido como substrato, responsável pela síntese de precursores de RNA ribossômico (OTA et al., 2004). O marcador Gm13_29524129 está posicionado no gene que codifica para a Ribosome Recycling Factor, que é uma proteína que recicla os ribossomos após a síntese das proteínas (JANOSI et al., 1994). Já o marcador Gm13_29565413 está posicionado no gene que codifica para a proteína RGA3. Essa proteína é de resistência a doenças, que protege a planta contra patógenos que contêm uma proteína de avirulência apropriada através de uma interação direta ou indireta. Isso desencadeia um sistema de defesa que restringe o crescimento do patógeno (SONG et al., 2003). Também, foi observado que o marcador associado Gm13_31262161 está posicionado no gene que codifica a proteína ABCI12, proteína responsável por transporte de moléculas no cloroplasto (SATO et al., 2000). A sequência dos marcadores SNPs identificados como associados estão apresentados na Tabela 7.

O uso dos marcadores SNPs indicados como associados à resistência ao nematoide de galhas permitirá que a frequência alélica dos alelos favoráveis seja aumentada durante a seleção de novos genótipos em Programas de Melhoramento de Soja no país. A utilização dessa nova abordagem permitiu a identificação de novas regiões candidatas com a presença de genes/QTLs para resistência ao nematoide de galhas.

Os marcadores moleculares têm despontado como potente ferramenta no melhoramento de plantas, através da identificação direta dos genótipos, superando, muitas vezes, as limitações na obtenção de dados fenotípicos. Além disso, o tempo de desenvolvimento de variedades nos programas de melhoramento pode ser reduzido, resultando, assim, na obtenção de materiais com características de interesse mais rapidamente e retorno mais rápido do investimento aplicado (FERREIRA, 2003).

Tabela 7 – Dados sobre sequência de base dos marcadores associados e alelo associado à característica de interesse (NCBI, 2014)

Marcador	Sequência de bases	Alelo/Trait
Gm13_29739984	CTTGAGTTGACTCCTCCCTGATCAT[A/C]CAGGCATTAGCATCTCCTTGCCGG	A
Gm13_30078140	TTTATACCCGTTGGATGAACCGTGT[A/G]TAAGCACATTAACCAGATTAATTTT	G
Gm13_29418256	CCCCTGGAAGAGCTCCGAAAAAGGT[C/T]ACTTGTCATGCTTGCCAAACGAGTA	C
Gm13_29265240	Não disponível	-
Gm13_29858691	GTGTTTTTTTTTTTATAAAAAAAA[A/C]CCTGAGAAGTTAAAAATCTCGTTT	A
Gm13_31013252	Não disponível	-
Gm13_29524129	GCTGCCGTGCATTGTGGTTGATCAA[A/C]ATCTTGTGCTTAATGTAACCTCGTT	C
Gm13_29565413	TTTTATGCCAACAAGTGGGAGAGTG[A/G]TTTTCTTAGTGATTGGCATTGTAA	G
Gm13_30744043	TCTATTATTGTTCTGCTGAGACATG[A/G]TCTGCGGCATTATAATTATATCCC	G
Gm13_31262161	TAATTCAGTTTCAACTAATGTTAT[A/G]TTTTGTATATTTTCAGCCACAAGG	A
Gm13_28141969	GTTTCACCTAACTCTGATTGTCTAC[G/T]GAGTCATGACACTGACCTGCCCTGC	G
Gm05_31767626	CTTTAACATAAAATAATATAAAAA[A/G]CGGTTAATTGTTTTATGACTATATA	G
Gm13_32210915	Não disponível	-
Gm13_31602992	TACCTTTCAAATCTCTTTTACAAGA[A/G]TCCACCAATATGAGTTCATAATTT	G
Gm13_31934756	ATTGTTCTAACTTCTGACATAGTCA[A/G]ATGTCATATATTCTCTCAACAATAA	G

Estudos sobre técnicas de marcadores moleculares na associação de genótipos com fenótipos de interesse vêm sendo realizados intensivamente, sendo alguns resultados consistentes. Mais de uma década de pesquisas sobre a possibilidade de associação de marcadores e caracteres quantitativos (QTLs) já foi realizada, porém a aplicação dessas informações não tem sido efetivamente utilizada pelos pesquisadores, principalmente pela dificuldade de validação das informações publicadas e de plataformas de genotipagem robustas. Muito já se avançou em relação a esses estudos. Atualmente, novas plataformas já foram desenvolvidas, tornando os estudos de associação mais reprodutíveis, além de novas técnicas e softwares para análises estatísticas. É importante ainda observar que características com baixas herdabilidades são altamente influenciadas pelo ambiente. Dessa forma, a generalização dos resultados é mais difícil ou, ainda, o uso de marcadores moleculares em ambientes muito distintos daqueles onde foram realizados os experimentos possivelmente não será detectado como associado.

Outro ponto importante a ser avaliado em estudos de associação fenótipo/genótipo é a consistência da associação entre marcadores moleculares e QTLs. Valores de recombinação muito altos permitem que a associação ou ligação seja desfeita/quebrada após algumas gerações. Nesse caso, um marcador não será mais associado à característica de interesse, podendo gerar falsos positivos ou negativos e comprometer a eficiência da seleção assistida por marcadores.

A validação de marcadores associados na população que está sendo utilizada pelos melhoristas como fonte de germoplasma é fundamental para que a seleção por marcadores seja eficiente para o desenvolvimento de materiais comerciais resistentes ao nematoide de galhas *Meloidogyne javanica*.

4. CONCLUSÕES

- Foram identificados 12 marcadores presentes no cromossomo 13 (grupo de ligação F) e associados à resistência genética ao *Meloidogyne javanica*.
- Nova região no cromossomo 5 (grupo de ligação A1) também foi identificada como potencial candidata no genoma da soja com QTL para resistência ao nematoide de galhas.

5. REFERÊNCIAS

ASTON, K. I.; CARREL, D. T. Genome-wide study of single-nucleotide polymorphisms associated with azoospermia and severe oligozoospermia. **Journal of Andrology**, v. 30, n. 6, 2009.

BENJAMIN, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. **Journal of the Royal Statistical Society** (Series B – Methodological), v. 57, n. 1, p. 289-300, 1995.

BOLORMAA, S.; PRYCE, J. E.; HAYES, B. J.; GODDARD, M. E. Multivariate analysis of a genome-wide association study in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 3818-3833, 2010.

BONETTI, J. I. S.; FERRAZ, S. Modificações do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 6, p. 553, 1981.

CAIXETA, E. T. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. 2. ed. Viçosa, MG: Folha de Viçosa, 2009. p. 11-94.

CANTERI, M. G.; ALTHAUS, R. A.; VIRGENS FILHO, J. S.; GIGLIOTI, E. A.; GODOY, C. V. SASM-Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott-Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v. 1, p. 18-24, 2001.

CHAN, E. K. F.; HAWKEN, R.; REVERTER, A. The combined effect of SNP-marker and phenotype attributes in genome-wide association studies. **Animal Genetics**, v. 40, p. 149-156, 2009.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos 2011/12** – Décimo primeiro levantamento – Ago. 2013.

COSTAMILAN, L. M. Doenças de plantas e alternativas de controle em plantio direto. In: ENCONTRO NACIONAL DE PLANTIO DIRETO NA PALHA, 7., 2000. **Resumos...** [S.l.]: FEBRAPDP, 2000. p. 103-104,

CREGAN, P. B.; JARVIK, T.; BUSH, A. L.; SHOEMAKER, R. C.; LARK, K. G.; KAHLER, A. L.; KAYA, N.; VANTOAI, T. T.; LOHNES, D. G.; CHUNG, J.; SPECHT, J. E. An integrated genetic linkage map of the soybean. **Crop Sci.**, v. 39, p.1464-1490, 1999.

EASTON, D. F.; POOLEY, K. A.; DUNNING, A. M. Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. **Nature**, v. 447, p. 1087-93, 2007.

FERRAZ, L. C. C. B. As meloidoginoses da soja: passado, presente e futuro. In: SILVA, J. F. V.; MAZAFFERA, P.; CARNEIRO, R. G.; ASMUS, G. L.; FERRAZ, L. C. C. B. **Relações parasito-hospedeiro nas meloidoginoses da soja**. Londrina, PR: Embrapa Soja/Sociedade de Nematologia, 2001. 127 p.

FERREIRA, M. A. J. F. **Utilização das técnicas de marcadores moleculares na genética de populações, na genética quantitativa e no melhoramento de plantas**. Boa Vista, RR: Embrapa Roraima, 2003. 63 p. (Embrapa Roraima – Documentos, 1).

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Genética de associação em plantas. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. **Marcadores moleculares**. Viçosa, MG: DFT/UFV, 2009. 532 p.

FLINT-GARCIA, S. A.; THORNSBERRY, J. M.; BUCKLER, E. S. I. Structure of linkage disequilibrium in plants. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 54, p. 357-374, 2003.

GRIMM, D. R. D.; DENESH, J.; MUDGE, N. D.; CREGAN, P. C. Assessment of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in soybean. **Plant Animal Genome**, v. 2, p. 140, 1999.

GUPTA, P. K.; RUSTGI, S.; KULWAL, P. L. Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: Present status and future prospects. **Plant Molecular Biology**, v. 57, p. 461-485, 2005.

HA, B. K.; HUSSEY, R. S.; BOERMA, H. R. Development of SNP assays for marker. Assisted selection of two southern root-knot nematode Resistance QTL in soybean. **Crop Sci.**, p. 73-82, 2007.

HARRIS, D. K.; BOERMA, H. R.; HUSSEY, R. S.; FINNERTY, S. I. Additional sources of soybean germplasm resistant to two species of root-knot nematode. **Crop Science**, v. 43, p.1848-1851, 2003.

HIRSCHHORN, J. N.; DALY, M. J. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. **Nature Reviews**, v. 6, 2005.

HOLLAND, J. Epistasis and plant breeding. **Plant Breed. Rev.**, v. 21, p. 27-92, 2001.

ILLUMINA. **Product literature.** Disponível em: <<http://www.illumina.com/support/literature.ilmn>>. Acesso em: Jan. 2014.

JANOSI, L.; SHIMIZU, I.; KAJIT, A. Ribosome recycling factor (ribosome releasing factor) is essential for bacterial growth. **Biochemistry**, v. 91, p. 4249-4253, 1994.

JIN, Q.; WATERS, D.; CORDEIRO, G. M.; ROBERT, H.; RUSSELL, R. A single nucleotide polymorphism (SNP) marker linked to the fragrance gene in rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Science**, v. 165, Issue 2, p. 359-364, 2003.

LI, Z. K. QTL mapping in rice: a few critical considerations. In: KHUSH, G. S.; BRAR, D. S.; HARDY, B. (Ed.). INT. RICE GENETICS SYMP, 4., 2000, Los Baños. **Proceedings...** Los Baños, The Philippines: International Rice Research Institute, 2000. p. 153-171.

LIAO, C.; WU, Y.; HU, P.; YI, B. Effects of genetic background and environment on QTLs and epistasis for rice (*Oryza sativa* L.) panicle number. **Theor. Appl. Genet.**, v. 103, p. 104-111, 2001.

MACKAY, I.; POWELL, W. Methods for linkage disequilibrium mapping in crops. **Trends in Plant Science**, v. 12, n. 2, 2007.

MANLY, K. F. **Reliability of statistical associations between genes and disease Immunogenetics.** [S.l. : s.n.t.], 2005. 558 p.

MÁTSUO, E.; FERREIRA, P. A. F.; SEDIYAMA, T.; FERRAZ, S.; BOREM, A.; FRITSCHÉ-NETO, R. Breeding for nematode resistance. In: FRITSCHÉ-NETO, R.; BORÉM, A. (Ed.). **Plant breeding for biotic stress resistance.** Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 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.

MOHAN, M.; NAIR, S.; BHAGWAT, A.; KRISHNA, T. G.; YANO, M. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. **Molecular Breeding**, v. 3, p. 87-103, 1997.

NCBI – National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: Jan. 2014.

OTA, A.; TAGAWA, H.; KARNAN, S.; TSUZUKI, S.; KARPAS, S.; KIRA, Y.; YOSHIDA, M. **Cancer Res.**, v. 64, p. 3087-3095, 2004.

ROSA, G. J. M.; ROCHA, L. B.; FURLAN, L. R. Estudos de expressão gênica utilizando-se *microarrays*: delineamento, análise, e aplicações na pesquisa zootécnica. **R. Bras. Zootec.**, v. 36, p. 185-209, 2007.

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

SATO, S.; NAKAMURA, Y.; KANEKO, T.; KATOH, T.; ASAMIZU, E.; TABATA, S. Structural analysis of *Arabidopsis thaliana* chromosome 3. I. Sequence features of the regions of 4,504,864 bp covered by sixty P1 and TAC clones. **DNA Res.**, v. 7, p. 131-135, 2000.

SLADEK, R.; ROCHELEAU, G.; RUNG, J.; DINA, C.; SHEN, L.; SERRE, D.; BOUTIN, P.; VINCENT, D.; BELISLE, A.; HADJADJ, S.; BALKAU, B.; HEUDE, B.; CHARPENTIER, G.; HUDSON, T. J.; MONTPETIT, A.; PSHEZHETSKY, A. V.; PRENTKI, M.; POSNER, B. L.; BALDING, D. J.; MEYRE, D.; POLYCHRONAKOS, C.; FROGUEL, P. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. **Nature**, v. 22, n. 445(7130), p. 881-5, 2007.

SCHMITT, D.; NOEL, G. R. Nematodes parasites of soybean. In: NICKLE, W. R. (Ed.). **Plant and insect nematodes**. New York NY: Marcel Dekker, 1984. p. 13-59.

SCHORK, N.; FALLIN, D.; LANCHBURY, J. Single nucleotide polymorphisms and the future of genetic epidemiology. **Clin. Genet.**, v. 58, p. 250-264, 2000.

SILVA, J. F. V.; MAZZAFERA, P.; CARNEIRO, R. G.; ASMUS, G. L.; FERRAZ, L. C. C. B. **Relações parasito-hospedeiro nas meloidoginoses da soja**. Londrina, PR: Embrapa Soja/Sociedade Brasileira de Nematologia, 2001. p. 15-115.

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

SONG, Q. J.; MAREK, L. F.; SHOEMAKER, R. C.; LARK, K. G.; CONCIBIDO, V. C.; DELANNAY, X.; SPECHT, J. E.; CREGAN, P. B. A new integrated genetic linkage map of the soybean. **Theor. Appl. Genet.**, v. 109, p.122-128, 2004.

SONG, J.; BRADEEN, J. M.; NAEISS, S. K.; RAASCH, J. A.; WIELGUS, S. M.; HABERLACH, G. T.; LIU, J.; KUANG, H.; AUSTIN-PHILLIPS, S.; BUELL, C. R.; HELGESON, J. P.; JIANG, J. Gene RB cloned from *Solanum bulbocastanum* confers broad spectrum resistance to potato late blight. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA, v. 100, p. 9128-9133, 2003.

TURNER, S.; ARMSTRONG, L. L.; BRADFORD, Y. Quality control procedures for Genome Wide Association Studies. **Curr. Protoc. Hum. Genetics**, 2011.

ZIEGLER, A.; KÖNING, I. R.; THOMPSON, J. R. Biostatistical Aspects of Genome-Wide Association Studies. **Biometrical Journal**, v. 50, p. 8-28, 2008.

WENDLAND, A.; NEPOMUCENO, A. L.; SILVA, J. F. V.; MENTEN, J. O. M.; BINNECK, E.; MARIN, S. R. R.; SILVEIRA, C. A.; MORALES, A. M. R.; TRAVENSOLO, R. F.; ALVES, L. C.; LOPES, T.; LEMOS, E. G. M. Genetic expression of soybean- *Meloidogyne javanica*-interaction revealed by analyses of microarrays. In: CONFERÊNCIA MUNDIAL DE PESQUISA DE SOJA, 7.; CONFERÊNCIA INTERNACIONAL DE PROCESSAMENTO E UTILIZAÇÃO DE SOJA, 4.; CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 3., 2004. **Anais...** [S.l. : s.n.t.], 2004.

CAPÍTULO 3

ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO DE MARCADORES SNPS PARA RESISTÊNCIA A *Macrophomina phaseolina* EM SOJA

RESUMO

A soja é uma das *commodities* mais importantes do mundo, sendo, no Brasil, um dos principais produtos de exportação. Devido à importância dessa cultura, há grande incentivo para as pesquisas, com o objetivo de obter materiais com características agronômicas desejadas, entre elas a resistência à podridão de carvão, causada pelo fungo *Macrophomina phaseolina*. Recentemente, tem ocorrido aumento mundial na incidência de relatos desse patógeno em diversas culturas, indicando a importância dessa doença para a produção agrícola em regiões propensas à seca. O fungo *Macrophomina phaseolina* é considerado um dos mais prevalentes em infecções radiculares de soja no Brasil, e nenhuma fonte de resistência genética foi ainda encontrada. Além disso, nenhuma informação foi obtida quanto à variabilidade genética desse patógeno em regiões tropicais. O objetivo deste estudo foi identificar marcadores moleculares do tipo SNPs para resistência a *Macrophomina phaseolina* em soja, para uso em SAM em Programas de Melhoramento de Soja no Brasil. Este experimento foi realizado no Citrus Research Center – Agricultural Experiment Station

(CRCAES), na Universidade da Califórnia, em Riverside, USA, em um campo com histórico de infestação por *M. phaseolina*. Para os experimentos de campo, 320 sementes de 169 variedades de soja foram distribuídas em duas parcelas e quatro repetições. A infecção foi avaliada após três semanas do plantio, quando os sintomas surgiram. A cada sete dias, o número de plantas mortas foi avaliado e o percentual de mortalidade por genótipo, determinado. Para a genotipagem, foi utilizada a plataforma *iScan*, na empresa Deoxi, em Araçatuba, SP, onde os genótipos foram testados para 6.000 SNPs, distribuídos no genoma da soja. As análises associativas foram realizadas utilizando o software SVS – Golden Hélix. Entre os dados estudados, foi possível identificar 12 marcadores SNPs associados à característica em estudo, sendo oito deles localizados no cromossomo 19, o que indica essa região como forte candidata à presença de genes/QTLs e de resistência a *Macrophomina phaseolina*. Os dados são relevantes, pois não há informações disponíveis na literatura sobre o assunto. Esses marcadores, depois de validados, poderão ser utilizados para seleção assistida por marcadores, de forma a aumentar a frequência de alelos favoráveis à resistência a essa doença, que, a cada ano, tem aumentado sua importância no Brasil.

Palavras-chave: Podridão-negra da raiz; *Glicine max*; Fungo de solo.

ABSTRACT

Soybeans are one of the most important commodities in the world. In Brazil it is one of the main export products. Due to its importance, there are investments in research to develop materials with desired agronomic traits, such as resistance to charcoal rot caused by the fungus *Macrophomina phaseolina*. Recently, there has been a worldwide increase of this pathogen's incidence reports in many cultures, indicating the importance of this disease for agricultural production in drought regions. The fungus *Macrophomina phaseolina* is considered one of the most prevalent infections in soybean roots in Brazil. No genetic resistance has been found yet, so there is no information concerning the genetic variability of this pathogen in tropical regions. The goal of this study was to identify molecular markers (SNP's) for resistance to *Macrophomina phaseolina* in soybean to be used in Marker Assisted Selection (MAS) for soybean breeding programs in Brazil. This experiment was conducted at the Citrus Research Center - Agricultural Experiment Station (CRCAES) at the University of California, Riverside, USA, in a field with a history of *Macrophomina* infestation. To the field experiment, 320 seeds of 169 soybean varieties were distributed in two plots and 4 replicates. The infection was assessed after three weeks after planting, when the first symptoms of infection appeared. Every seven days, the number of dead plants was evaluated to get the percentage of mortality by genotype. The *iScan* platform was used for material genotyping. Each material was

tested for 6,000 SNPs distributed in the soybean genome at Deoxy Biotechnology, in Araçatuba, SP. The association analysis were performed by the SVS software – Golden Helix. Among the data, it was possible to identify 12 SNPs markers associated with the trait under study. Eight of those are located on chromosome 19, that this region is a strong candidate for the presence of genes/QTL resistant to *Macrophomina phaseolina*. The data is relevant because there is no information in the literature on the subject. These markers, when validated, could be used for marker assisted selection, to increase the frequency of favorable resistance alleles to this disease and that each year has increased it is importance in Brazil.

Keywords: Charcoal rot; *Glycine max*; Soil fungus.

1. INTRODUÇÃO

A soja é o principal produto do agronegócio do Brasil, e um de seus principais produtos de exportação. Atualmente, o país é o segundo maior produtor mundial dessa leguminosa. Anualmente, são cultivados no Brasil cerca de 22 milhões de hectares de soja. Na safra 2011/12, a produção foi estimada em 66,4 milhões de toneladas (CONAB, 2012; USDA, 2012).

Devido à grande importância da cultura, há grande incentivo para a pesquisa e desenvolvimento de materiais de soja com maiores tetos produtivos e com características agronômicas desejadas. Uma das mais importantes contribuições das pesquisas científicas, foi a obtenção de cultivares melhoradas, que expressam alta produtividade, adaptação e boa resistência ou tolerância a fatores bióticos ou abióticos adversos.

Entre os fatores bióticos que interferem na obtenção de altas produtividades, *Macrophomina phaseolina* é considerado um dos fungos mais prevalentes em infecções radiculares de soja no Brasil. Até o momento, nenhuma fonte de resistência genética foi ainda encontrada (GUPTA et al., 2012). Almeida et al. (2003) observaram a existência de variabilidade genética entre os isolados brasileiros de *M. phaseolina*. Em uma única raiz de soja foi observado mais de um haplotipo desse fungo. E os dados comprovam a alta variabilidade desse patógeno, que pode estar contribuindo para a baixa presença de resistência à infecção radicular das cultivares comerciais de soja no Brasil. O fungo de solo *Macrophomina*

phaseolina é o agente causal de doenças em mais de 500 espécies de plantas, sendo a soja um dos seus principais hospedeiros. O fungo causa a doença conhecida no Brasil como podridão de carvão, podendo causar perdas de 30-50% (GUPTA et al., 2012).

As estruturas de reprodução desse fungo, chamadas de microescleródios, sobrevivem no solo em condições adversas por dois a 15 anos como fonte de inóculo (MEYER et al., 1974) e, em condições adequadas, podem rapidamente germinar e infectar as raízes das plantas no período de desenvolvimento da cultura. A germinação da microesclerodina é favorecida por solos secos, com altas temperaturas, altos índices de nitrogênio e concentrações de oxigênio superiores a 16% (TODD et al., 1987). Altos níveis de infecção dessa doença ocorrem anteriormente ao desenvolvimento reprodutivo das plantas, se houver predominância de altas temperaturas e baixas umidades relativas do ar (OLAYA; ABAWI, 1993). Esse organismo pode infectar a soja em qualquer estágio, principalmente após o florescimento.

O fungo *M. phaseolina* é polífago, sem evidências de um hospedeiro específico (MAIA et al., 2004). Outras culturas importantes são suas hospedeiras, como feijão, sorgo, milho, algodão, feijão-caupi, Pinus, Citrus, café, plantas medicinais e, ainda, plantas daninhas (GUPTA et al., 2012), ocorrendo de forma generalizada no mundo (GUPTA; CHAUHAN, 2005). Em média, são encontrados de 0 a 1.000 microescleródios por grama de solos infestados naturalmente.

Os microescleródios geminam a partir de algumas células no solo, próximo às raízes. Os exsudatos radiculares induzem a germinação, em que numerosos tubos germinativos são formados e se aderem até as células epidérmicas das raízes por pressão mecânica e digestão enzimática, ou através de feridas e aberturas naturais (HARTMAN et al., 1999).

Os sintomas da doença começam a ocorrer em condições de solos secos e solos com altas temperaturas. Em plântulas, os sintomas são mais evidentes em cotilédones com marcas marrons ou no hipocótilo com marcas circulares/oblongas marrons avermelhadas, que se tornam mais escuras e pretas ao passar dos dias. Sintomas foliares progridem do topo das plantas para baixo (WYLLIE, 1988). As folhas de plantas infectadas permanecem

menores do que o normal e, posteriormente, transformam-se em amarelo antes de murchar. Plantas com esses sintomas poderão morrer se as condições de seca persistirem, pois o sistema de absorção de água e nutrientes estará danificado, não havendo trocas com o solo (GUPTA et al., 2005).

A doença resulta em plântulas sem vigor e faz que a vagem reduza o tamanho da semente, levando a perdas de rendimento. Após a morte da planta, a colonização por micélio e a formação de microescleródios em tecido hospedeiro continuam até que os tecidos fiquem secos; assim, os microescleródios são liberados no solo e o ciclo da doença continua.

Essa enfermidade pode ser manejada através de controles cultural, químico ou métodos biológicos. O controle da doença pode ser através da redução do número de microescleródios em solos, que pode ocorrer se a umidade do solo for mantida acima de 60% por três a quatro semanas (DHINGRA; SINCLAIR, 1974). A irrigação combinada com tratamento de sementes pode reduzir a intensidade da doença em até 50% (ANSARI, 2010). O uso de rotação de culturas não hospedeiras por 2-3 anos também ajuda na redução da capacidade de infecção em solos altamente infectados (NDIAYE, 2007).

Até o momento não há variedades de soja resistentes disponíveis no mercado (GUPTA et al., 2012). No entanto, diferentes variações na infecção por *M. phaseolina* em diferentes genótipos de soja foram reportados (BRISTOW; WYLLIE, 1984; PEARSON et al., 1984; SMITH; CARVIL, 1997; KENDIG et al., 2000; PARIS et al., 2006; MENGISTU et al., 2007; WRATHER et al., 2008; TALUKDAR et al., 2009). O insucesso das pesquisas para resistência a essa doença tem sido atribuído, principalmente, à variabilidade do patógeno. As cultivares Bay, Essex, Forrest e Sprite apresentaram menores infecções pelo fungo (PEARSON et al., 1984). Delta, Pineland 3478, Hamilton, Jackson II, Davis e Asgrow 3715 também foram identificadas como moderadamente tolerantes sob condições de campo em outras pesquisas (SMITH; CARVIL, 1997; SMITH; WYLLIE, 1999).

A identificação de marcadores associados com características fenotípicas de interesse poderá tornar viável a utilização da SAM pelos Programas de Melhoramento Genético de Soja do Brasil, acelerando a

seleção e desenvolvimento de materiais com genes de resistência genética a diferentes doenças, inclusive para *Macrophomina phaseolina* (HAYWARD et al., 1994).

Apesar dos grandes avanços em tecnologias, o uso de ferramentas como os marcadores moleculares nos programas de melhoramento para a seleção assistida por marcadores moleculares (SAM), em larga escala, é baixa nos Programas de Melhoramento de Soja no país. Muitos são os motivos para a baixa adesão das empresas na utilização dessa importante ferramenta, entre eles a principal seria a ausência de infraestrutura adequada para genotipagem de plantas em larga escala, além de pouca informação consistente obtida nos mapeamentos genéticos já realizados.

Para identificar marcadores associados a genes/QTLs, o desequilíbrio de ligação entre os alelos no loco marcador e alelos do QTL é fundamental. Na construção de mapas genéticos com base em desequilíbrio de ligação, utilizam-se coleções de germoplasma de base genética ampla e não apenas populações biparentais. O grande potencial de uso desse tipo de mapeamento é que todos os genes identificados e associados a determinados marcadores poderão ser utilizados para qualquer população de soja e não apenas para populações específicas, em que o gene de resistência identificado deve estar presente na população estudada para que o marcador seja eficiente na seleção (FLINT-GARCIA et al., 2003).

Um dos maiores desafios da associação por desequilíbrio de ligação é o grande número de marcadores necessários a ser testado, isso porque, para plantas autógamas, os blocos de desequilíbrio de ligação são pequenos e o genoma precisa estar bastante saturado para que seja possível identificar esses blocos de desequilíbrio de ligação contendo genes ou QTLs de interesse (GUPTA et al., 2005).

Os SNPs recentemente têm sido estudados por meio dos painéis de genotipagem de alta densidade, consistindo em importante ferramenta de identificação de variações genéticas ligadas a características fenotípicas de interesse comercial (CORNELIS et al., 2010). Considerando o grande potencial dos marcadores SNPs para variados estudos de análises genéticas, múltiplos esforços vêm sendo aplicados para o desenvolvimento de protocolos e procedimentos que facilitem a identificação de tais

marcadores. Por exemplo, a identificação de SNPs utilizando a técnica Illumina® *iScan* através de *BeadChips* tem-se mostrado promissora para genotipagem em larga escala, pois esse ensaio é capaz de analisar muitas amostras de SNPs em uma única reação. Análise de associação é um poderoso método para mapear a localização de loci causadores de doenças, identificando marcadores genéticos que são co-herdados com um fenótipo de interesse. Estudos de validação prévios demonstraram que a plataforma em questão apresenta *call rate* médio de 99,6% e reprodutibilidade de 100% (ILLUMINA, 2013). Contudo, para identificação eficiente de QTLs associados a características quantitativas é fundamental uma avaliação fenotípica com boa precisão experimental.

Este projeto foi desenvolvido com o objetivo de identificar materiais resistentes a *Macrophomina phaseolina* e marcadores moleculares do tipo SNPs ligados a genes/QTLs responsáveis por essa característica, para uso futuro em Programas de Melhoramento Genético de Soja, além de estabelecer uma rotina de SAM.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material genético e delineamento estatístico

A primeira etapa deste trabalho consistiu na escolha das cultivares a serem avaliadas. Para realização do mapeamento por desequilíbrio de ligação, foi escolhido um grupo de cultivares antigas e um grupo de cultivares em uso pelos agricultores no Brasil, totalizando 169 cultivares – procurou-se representar a Região Sul e o Cerrado brasileiro (Tabela 1).

As cultivares antigas foram provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Coodetec. Como não havia número de sementes suficiente para o plantio do experimento no campo, essas cultivares foram multiplicadas em casa de vegetação, no período de maio a outubro de 2011.

Após a colheita das sementes multiplicadas em casa de vegetação, foram preparados os experimentos para as avaliações fenotípicas, em condições de campo.

Tabela 1 – Linhagens utilizadas no experimento para resistência a *Macrophomina phaseolina*

Linhagens	Linhagens	Linhagens	Linhagens
1. ANTA	45. BRS 184	89. BRS 283	133. BMX FORÇA RR
2. A6001 RR	46. IGRA RA 518 RR	90. FUNDACEP 57 RR	134. CD 250 RR STS
3. 8000	47. M9144 RR	91. BRS 257	135. BMX ENERGIA RR
4. CD 202	48. CONQUISTA	92. EMBRAPA 48	136. BMX TURBO RR
5. CD 244 RR	49. BMX APOLO RR	93. BRS 185	137. DOM MARIO 5.8 I RR
6. PINTADO	50. TMG 115 RR	94. BRS 232	138. FUNDACEP 39
7. TABARANA	51. IGRA RA 628 RR	95. CD 226 RR	139. MSOY 6101
8. CD 247 RR	52. BRS 268	96. CD 235 RR	140. EMBRAPA 48
9. CD 231 RR	53. BRS 262	97. CD 252	141. MERCEDES 70 A
10. MSOY 7201	54. BRS 245 RR	98. 5G 830 RR	142. EMGOPA 304
11. LIDERANÇA	55. BRS 258	99. CD 239 RR	143. OCEPAR 3 – PRIMAVERA
12. MATRINHÃ	56. M7908 RR	100. CD 236 RR	144. CELESTE
13. CRIXÁS	57. BRS 213	101. USP 1	145. MSOY 8001
14. LAMBARI	58. IGRA RA 516 RR	102. CD 237 RR	146. TMG 1066 RR
15. MSOY 2001	59. BRS 246 RR	103. RENASCENÇA	147. NA 5909
16. OCEPAR 14	60. M8849 RR	104. CD 242 RR	148. 5G 770 RR
17. FT-GUAÍRA	61. FUNDACEP 58 RR	105. FUNDACEP 33	149. NK 7059
18. R7	62. NIDERA NA 5909 RG	106. TMG 1161 RR	150. CD 245 RR
19. 6001	63. P98Y51	107. CD 232	151. CD 251 RR
20. VENCEDORA	64. M7211 RR	108. TMG 4001 RR	152. CD 254 RR
21. EMBRAPA 59	65. BRS 282	109. TMG 7161 RR	153. CD 237 RR
22. CD 243 RR	66. CD 206 RR	110. TMG 1067 RR	154. 5D 688 RR
23. CD 213 RR	67. CD 248 RR	111. SPRING 5.3	155. CD 250 RR STS
24. CD 214 RR	68. BMX TITAN RR	112. TUCANO	156. 5D 660 RR
25. CD 216	69. P98Y70	113. CAC-1	157. CD 238 RR
26. CD 230 RR	70. BMX MAGNA RR	114. ABYARA	158. TROPICAL
27. CD 205	71. BMX ATIVA RR	115. TUCUNARÉ	159. NIDERA A 4725 RG
28. CD 224	72. NIDERA A 6411 RR	116. CAPINÓPOLIS	160. IGRA RA 626 RR
29. CD 225 RR	73. BRS 256 RR	117. BRAGG	161. BRS 259
30. CD 204	74. BRS 243 RR	118. CD 201	162. M7578 RR
31. CD 233 RR	75. P98Y11	119. CD 208	163. BRS 284
32. CD 217	76. NK3358	120. CD 206	164. FUNDACEP 61 RR
33. CD 246	77. CD 253	121. CD 218	165. FUNDACEP 63 RR
34. FUNDACEP 56 RR	78. CD 240 RR	122. CD 214 RR	166. P99R01
35. M8527 RR	79. NIDERA A 6411 RG	123. CD FAPA	167. FUNDACEP 59 RR
36. FUNDACEP 55 RR	80. CD 215	124. MSOY 7901	168. M6009
37. CD 229 RR	81. NA 4990	125. FUNDACEP 38	169. M6707
38. CD 228	82. CD 234 RR	126. IAS 5	
39. CD 221	83. 5D 711 RR	127. ENGOPA 302	
40. NIDERA A 7321 RG	84. CD 249 RR STS	128. GARIMPO	
41. TMG 123 RR	85. CD 219 RR	129. FT-ESTRELA	
42. BRS 133	86. 5D 690RR	130. DOM MARIO 7.0 I RR	
43. BRS 230	87. TMG 103 RR	131. NS 4823	
44. M7639 RR	88. FUNDACEP 53 RR	132. BMX POTÊNCIA RR	

2.2. Desempenho das cultivares quanto ao caráter resistência a *Macrophomina phaseolina*

Este experimento foi realizado no Citrus Research Center – Agricultural Experiment Station (CRCAES), na Universidade da Califórnia, em Riverside (33°57'54"N; 117°20'08"W), USA (Figura 1). O experimento foi feito de julho a outubro de 2012 em duas áreas, em campos adjacentes com um histórico de infestação por *Macrophomina* e em longo prazo com cultivo de feijão-caupi. O solo é classificado como arenoso, podendo simular um estresse hídrico moderado e gradual, ideal à infecção por *M. phaseolina*. Nos experimentos de campo, 320 sementes de cada genótipo foram distribuídas em quatro repetições, em 5 m de comprimento e parcelas espaçadas em 0,75 m de distância. Foram utilizados como controles os genótipos de feijão-caupi da coleção de Germoplasma da Universidade da Califórnia, Riverside, IT98K-499-39, Suvita 2, Mouride, Bambey 21, UCR24, IT98K-556-6, UCR232 (IT82E-18), CB27, CB46, IT93K- 503-1, UCR779, 24-125B-1, 524B e IT84S-2049. Esses germoplasmas foram anteriormente estudados por Muchero et al. (2011).

Para garantir a infecção por *M. phaseolina*, a área foi irrigada sete dias antes da semeadura e sete dias depois. Não foram realizadas irrigações adicionais e nem observadas chuvas durante todo o período do experimento. Quatorze dias após a semeadura, foi feita a contagem de germinação para o estande final. Quatro semanas depois da semeadura, quando os sintomas de infecção começaram a ocorrer, contou-se o número de plantas mortas dentro de cada parcela. Essa avaliação ocorreu a cada sete dias, durante 12 semanas. Após a avaliação, obteve-se o percentual de mortalidade, determinado pela equação: $\% \text{ mortalidade} = (\text{mortalidade total} / \text{emergência total}) \times 100$. O desenho experimental foi em bloci casualizados com quatro repetições.



Figura 1 – Vista geral da área experimental com o ensaio para resistência a *Macrophomina phaseolina*.

2.3. Extração de DNA, Genotipagem e Análise de Dados

A extração de DNA e a genotipagem foram realizadas conforme os subitens 4.2.3. e 4.2.4, respectivamente. A análise de dados fenotípicos foi feita com o auxílio do Programa Sasm-Agri (CANTERI et al., 2001). Realizaram-se a ANOVA e o teste de médias de Scott-Knott (SCOTT-KNOTT, 1974), para agrupamento das médias. Os dados de mortalidade de plantas foram transformados, utilizando-se a fórmula:

$$\sqrt{x + k} \text{ com } k = 0,5.$$

Os dados genotípicos foram analisados conforme o subitem 4.2.5.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

As 169 linhagens selecionadas para uso neste estudo apresentaram variabilidade genética quanto à resistência a *Macrophomina phaseolina* (Figura 2), o que é importante para viabilizar os estudos de mapeamento associativo de QTLs. A mortalidade de plantas apresentou efeito significativo ($P < 0,01$) sobre a fonte de variação tratamentos pelo teste F (Tabela 2), indicando que o grupo de cultivares escolhido tem variabilidade necessária para estudos de mapeamento.

Para a adequada associação de um fenótipo com o genótipo e a potencial construção de mapas, é importante selecionar adequadamente os genótipos, de forma que o máximo da variabilidade genética seja explorado.

As médias das cultivares avaliadas foram agrupadas pelo teste de Scott- Knott (1974) a 5% de probabilidade (Figura 3), formando quatro grupos distintos.

A cultivar TMG 103 RR apresentou um percentual de mortalidade de plantas acima de 50%, formando um grupo único no teste de médias. Nove materiais formaram o segundo grupo, em que o percentual de mortalidade variou de 18,04 a 26,02%; 52 materiais formaram o terceiro grupo, com médias variando entre 8,05 e 17,89%; e o último grupo, com média entre 1,25 e 7,79% de mortalidade, teve 107 variedades.



Figura 2 – Plantas de soja mortas, com típico sintoma de *Macrophomina phaseolina*.

Tabela 2 – Resultado da análise de variância em bloci casualizados para resistência a *Macrophomina phaseolina* em Riverside, CA/USA

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Bloci	3	5,7286	1,9095	3,8174**
Tratamentos	179	645,6906	3,6072	1,3172**
Resíduo	537	426,3001	0,7938	
C.V. (%)	33,95%	1.071,9910		

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

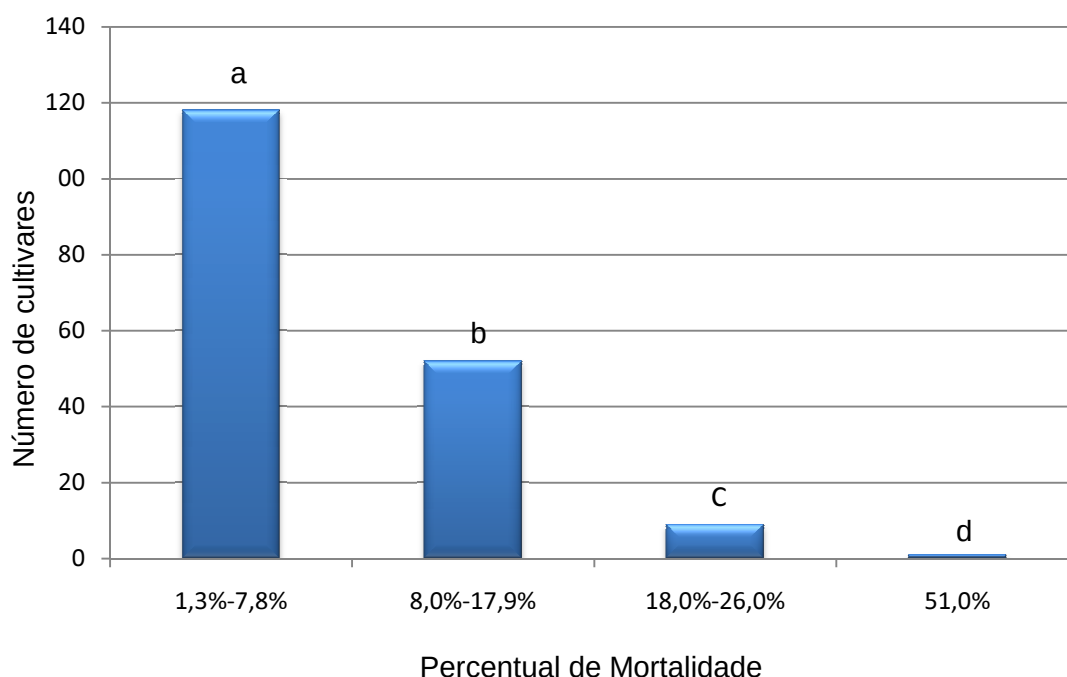


Figura 3 – Número de cultivares testadas agrupadas pela porcentagem de mortalidade de plantas. Cultivares agrupadas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott a 1% de probabilidade.

Foram utilizados 11 materiais de feijão-caupi como controles. Esses materiais foram utilizados como referência de suscetibilidade e resistência, devido à falta de informação sobre os materiais de soja testados. Os dados obtidos nos controles estão de acordo com os obtidos por Muchero et al. (2011), indicando reprodutibilidade do teste. Em feijão-caupi, materiais com menos de 5% de mortalidade podem ser considerados resistentes. Para soja, esse parâmetro não está definido.

Com a confirmação da variabilidade entre os materiais através dos dados fenotípicos, foram realizados estudos de associação genômica que permitem a identificação de associações estatísticas entre centenas de loci genômicos e características complexas, aumentando o entendimento sobre importantes vias moleculares e biológicas (SCOTT et al., 2007).

Após o controle de qualidade dos SNPs, em que marcadores com *call rate* menor que 90% foram eliminados, 4.232 SNPs foram utilizados nas análises. Com relação às amostras, de 169 materiais, 154 foram usados, por apresentarem *call rate* acima de 90%. Não foram empregados critérios para exclusão de SNPs baseados na heterozigosidade observada neste estudo. Anderson et al. (2010) indicaram que limites de *call rate* acima de 97% são normalmente utilizados para exclusão de amostras, entretanto Ziegler (2008) afirmou que valores acima de 90% já seriam suficientes para garantir a qualidade do estudo. Devido ao tamanho reduzido de amostras, foi adotado o critério menos rigoroso para a remoção delas.

Diferentes critérios de qualidade das análises genotípicas visam à remoção de SNPs e, ou, amostras que introduziriam erros nos resultados. Um exemplo das possibilidades de erros de falsos positivos (erros do tipo I), se for considerada uma análise com 1% de erro, em um universo de 6.000 marcadores, seis destes estariam erradamente associados ao fenótipo.

Entre os dados analisados, foram identificados 12 potenciais marcadores associados com a característica resistência a *Macrophomina phaseolina* em soja (Tabela 3).

Para estratégias de associações, realiza-se a comparação entre centenas de milhares de SNPs, um a um, o que aumenta as taxas de falsos positivos ou erro do tipo I (CHAN et al., 2009). Nesse caso, o uso da Correção por Bonferroni impõe níveis de significância excessivamente altos, o que dificulta a identificação de associação em estudos nos quais os SNPs têm efeito moderado sobre a característica.

Entre os marcadores associados, foram identificados marcadores potenciais em cinco cromossomos distintos, sendo oito desses no cromossomo 19 e pelo menos um marcador associado presente nos cromossomos 18, 2, 12 e 6 (Tabela 3). O marcador mais fortemente associado está localizado no cromossomo 18, com o valor de P associado à correlação de 9,61E-12.

Tabela 3 – Marcadores SNPs associados à resistência da soja a *Macrophomina phaseolina*

Marcador	Chr.	Call Rate	Correlação	
			-log(10) P	Bonf. P
Gm18_60278667	18	95,5	11,01731311	4,07E-08
Gm19_6476616	19	96,2	10,3204824	2,02E-07
Gm19_3162877	19	94,2	9,043622606	3,83E-06
Gm02_6418567	2	96,2	8,488733772	1,37E-05
Gm12_34380492	12	98,7	8,313684258	2,06E-05
Gm19_34156474	19	90,4	8,114415571	3,25E-05
Gm19_34687566	19	94,9	7,96868076	4,55E-05
Gm19_30103637	19	96,2	7,923778799	5,04E-05
Gm06_6488212	6	98,1	7,868576724	5,73E-05
Gm19_3458700	19	94,9	7,803870849	6,65E-05
Gm19_34243974	19	97,4	7,742240109	7,66E-05
Gm19_34320762	19	96,2	7,650491696	9,46E-05

O marcador mais fortemente associado Gm18_60278667, com a sequência TGTGTTTAGCTTTCTATTCTTTT[AG]TTGTTAATTTGTCATCTTCC TCCTT, tem o alelo A como associado à característica de interesse neste estudo, estando o SNP na posição 60.278.667 cM, no cromossomo 18. Não foi descrito até o momento nenhuma associação fenotípica com esse SNP ou identificação na presença de algum gene, no banco de dados do Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI) (NCBI, 2014).

Na Tabela 4 são apresentados a sequência de bases dos marcadores associados e o alelo de resistência a *M. phaseolina*, identificados neste estudo.

Para análises de associação, a reprodutibilidade de um estudo é extremamente importante. Dessa forma, o marcador pode ser efetivamente utilizado na seleção de materiais com o fenótipo de interesse. Conforme o sistema BADGE, o uso de $P < 2,24E-08$ como ponto de corte para indicar marcadores associados indica que a tomada de decisão foi bastante restritiva, sugerindo que os dados apresentam reprodutibilidade sob a pressuposição conservadora para associação sem evidências prévias.

Tabela 4 – Dados sobre sequência de base dos marcadores associados e alelos dos SNPs associados à resistência a *Macrophomina phaseolina*

Marcador	Sequência	Alelo/Trait
Gm18_60278667	CTGTGTTTAGCTTTCTATTCTTTT[A/G]TTGTTAATTTGTCATCTTCCTCCTT	A
Gm19_6476616	Não disponível	-
Gm19_3162877	CGATTGATCTGCCAAACCCCGAAGA[A/G]GATGGGTAGGATGAAGGGTGGCTA	G
Gm02_6418567	GGTATGGGGAGCCGTAGGAGAATCG[A/G]GACACGATGACCTACTCTACCGCGT	A
Gm12_34380492	CCTGACCTAGCCTATTGTCTGACCT[A/G]GCCTATTCCCACCCCTAGTTGGAGC	A
Gm19_34156474	AATTCATGTATTTTATTCAACCATC[A/C]GAATTATTGTGGCTGCTGTTCTCTA	A
Gm19_34687566	Não disponível	-
Gm19_30103637	Não disponível	-
Gm06_6488212	TTTTGCAAATGTCATGTACATATGT[A/C]ACTCCACCAGAGGAACATTACACTG	C
Gm19_3458700	ATGGGTGCTGTTAGCTTTTGCTAAA[A/G]ACACCTACAGTAGATATTAGTACA	G
Gm19_34243974	CGGGGACGGGGATAAATATTTACCC[A/G]TAGGCATAACAAGGACGAAGATCAT	A
Gm19_34320762	AGTAATTTTATTTGCAGAACTCGAA[A/C]TCAGATATCTGATTAAATTAACA	A

Entre os dados obtidos, o segundo marcador mais fortemente associado com resistência a *Macrophomina phaseolina* está posicionado no cromossomo 19. Entre os marcadores identificados como associados, outros sete também estão posicionados no cromossomo 19, indicando essa região do genoma da soja como candidata a ter um QTL associado à resistência a essa doença, com $-\log(10)P$ variando de 2,24E-08 a 4,78E-11 (Tabela 3).

Esses dados são de grande importância para o estudo dessa doença, pois não foi observado até o momento materiais de soja extremamente resistentes (GUPTA et al., 2012). Esses potenciais marcadores associados ao fenótipo de interesse poderão ser utilizados nos Programas de Melhoramento Genético de Soja, de forma a aumentar a frequência desses alelos de resistência nas populações e materiais comerciais. A identificação de marcadores associados será extremamente importante para a seleção de materiais resistentes, considerando que a fenotipagem para essa característica é difícil e auxilia ainda na redução de tempo para o desenvolvimento de cultivares resistentes.

Outras regiões do genoma da soja são candidatas a apresentar genes que contribuem para a resistência a *Macrophomina phaseolina*. Foram observados marcadores associados aos cromossomos 2, 12 e 6. A distribuição dos marcadores ao longo dos cromossomos da soja baseada no valor de $-\log(10)P$ está representada na Figura 4. A linha em vermelho destaca os marcadores considerados associados neste estudo.

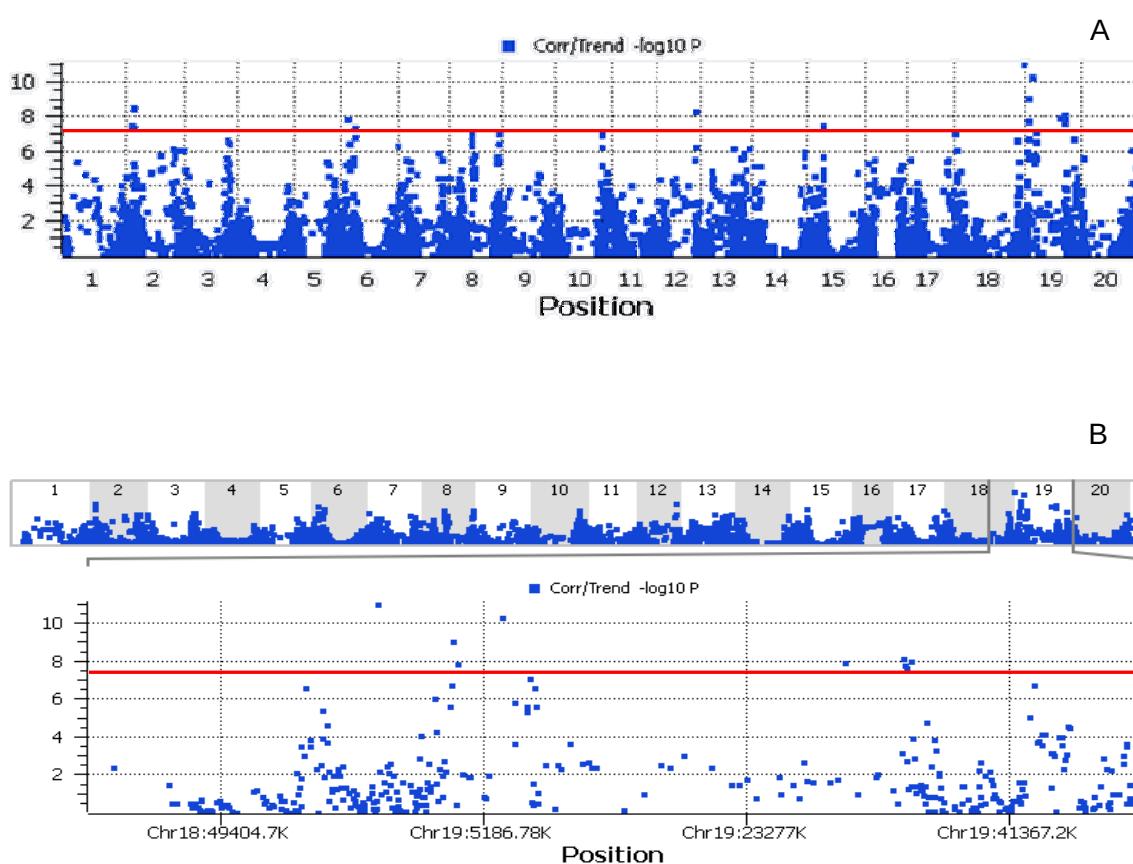


Figura 4 - $-\log(10)P$ com distribuição dos marcadores nos cromossomos da soja: (A) Visualização geral com ponto de corte (linha em vermelho) para marcadores associados com base no valor de $-\log(10)P$. (B) Zoom da região mais fortemente associada para resistência a *Macrophomina phaseolina* em soja.

Entre os marcadores associados distribuídos no grupo de ligação L (cromossomo 19), foram observadas associações em duas regiões, próximas a 30 cM e 60 cM, nesse grupo de ligação. Conforme informações do banco de dados do NCBI (2014), não há marcadores indicados próximos à região de 60 cM, nesse grupo de ligação. Próximo à região 30 cM, foi encontrado o maior número de marcadores associados, distribuídos no cromossomo. Na Figura 5 estão plotados os marcadores do loco no cromossomo 19, com os respectivos valores de $-\log(10)P$. Pode-se observar que a maioria dos marcadores associados está próxima da região de 34 cM. Pelas informações de associação, essa é uma região no genoma da soja candidata a ter QTLs/genes que possam influenciar na resistência genética a *Macrophomina phaseolina*. O marcador Gm19_3458700 está associado a um gene que codifica para a proteína ClpB3 (Casein lytic Preoteinase B3) (NCBI, 2014), proteína essa importante para a regulação do direcionamento de organelas como mitocôndrias e cloroplastos (SPOLADORE, 2011). Não foram identificados outras proteínas ou genes associados aos demais marcadores determinados como associados à podridão da raiz.

Essa característica não é de fácil *screening* e identificação de marcadores/QTLs associados. A natureza quantitativa da resistência a *M. phaseolina* (MIHAIL; ALCORN, 1992), como o número de QTLs identificados no estudo realizado com feijão-caupi por Muchero et al. (2011) e também a baixa contribuição dos loci identificados, faz o melhoramento genético para a característica difícil. Não foram encontrados na literatura estudos citando genes resistentes à podridão de carvão em soja. Um conjunto de 100 diferentes genótipos de soja foi submetido à avaliação de resistência à podridão-de- carvão por Talukdar et al. (2009), na Índia. Neste estudo, nenhum dos genótipos foi imune ao fungo, e sete dos materiais avaliados (DS 9712, DS 9814, JS 335, PK 564, CE 439618, 439619 CE e DS61) apresentaram certa resistência. Foi observada expressão contínua da doença entre os materiais testados, sugerindo que a característica possa ser controlada por mais de um loco. Uma população de mapeamento foi gerada pelo grupo para estudos de mapeamento, porém os dados não foram publicados até o momento.

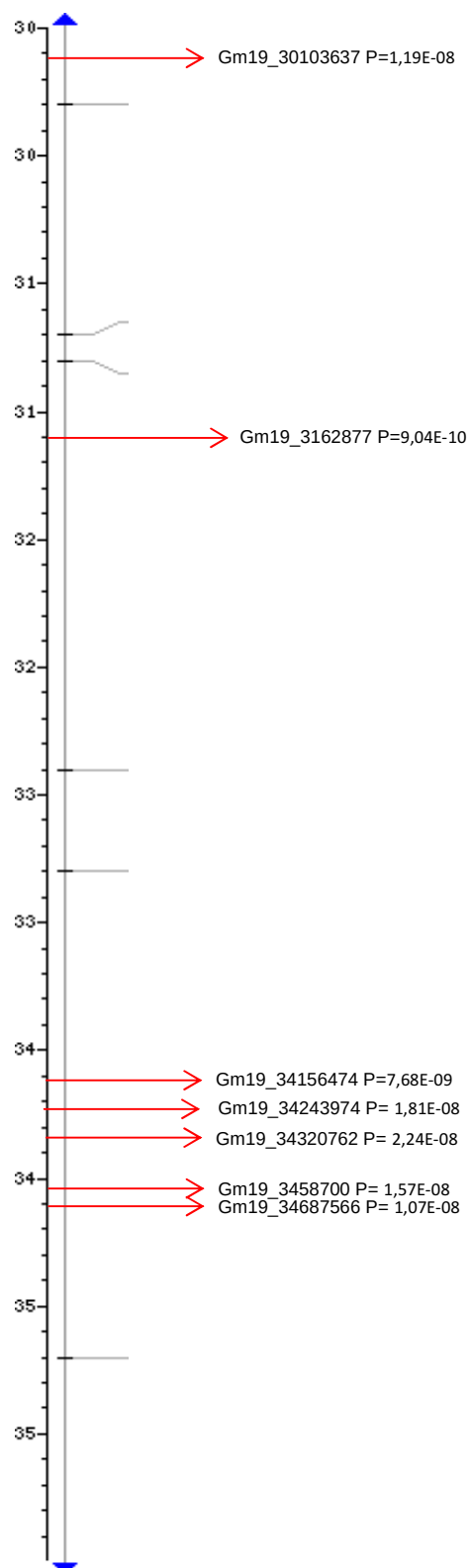


Figura 5 – Posição dos marcadores SNPs associados à resistência à mortalidade por *Macrophomina phaseolina*, distribuídos no cromossomo 19, com os valores de $-\log P$ indicados. Números à esquerda identificam a posição, em cM.

Mayek-Pérez et al. (2009), estudando a herança da resistência de *Macrophomina phaseolina* em feijão, através de uma população de cruzamento utilizando duas fontes de resistência diferentes à podridão da raiz presentes no México (BAT 477 e TLP 19), sugeriram com os dados de segregação observada que a resistência a essa doença é determinada por dois genes epistáticos, de efeitos variáveis, a qual pode ser quantitativamente controlada por dois genes de efeitos maiores. Foi determinado que o material BAT 477 tem em seu genótipo dois genes complementares dominantes com duplo efeito epistático. Em testes com feijão, foi observado por Mayek-Pérez et al. (2009) que a severidade dessa doença pode levar a perdas de até 50%.

Outro fator que limita os estudos de associação para essa característica é a presença de diferentes isolados. Almeida et al. (2001) utilizaram 22 marcadores RAPD em 55 isolados distribuídos no Brasil de *Macrophomina phaseolina*. O cluster formado revelou três grupos distintos. Neste estudo, também foram observados diferentes haplotipos do fungo em uma mesma planta.

Um estudo sobre podridão foi realizado por Muchero et al. (2011) com feijão-caupi, no qual fontes de resistência foram identificadas e o mapeamento de QTLs foi realizado por sintenia com soja e alfafa (*Medicago truncatula*). Nove QTLs foram identificados como responsáveis por 6,1 a 40,0% da variância fenotípica. Entre os QTLs, três previamente identificados associados à seca também foram associados a *M. phaseolina*, sugerindo que, em grande parte, diferentes mecanismos genéticos podem mediar resposta ao estresse hídrico e infecção por *Macrophomina*. Um dos SNPs identificados está presente em um gene responsável pela codificação de um inibidor de pectina esterase. Através da análise de sintenia, genes homólogos de floração ELF4 e FLK em soja apresentaram SNPs associados à característica de interesse em feijão-caupi.

Neste estudo, fontes importantes de resistência a *Macrophomina phaseolina* em germoplasma brasileiro de soja foram identificadas e regiões candidatas com a presença de genes/QTLs associados, observadas. No entanto, a avaliação com isolados brasileiros para validação desses marcadores e análise funcional é necessária, para que esses marcadores

possam efetivamente ser utilizados, visando à incorporação da resistência em cultivares economicamente importantes.

Um mapa genético por desequilíbrio de ligação poderá ser criado com os dados de genótipo e fenótipo obtidos neste estudo.

4. CONCLUSÕES

- Foram caracterizadas fenotipicamente 169 cultivares de soja para resistência a *Macrophomina phaseolina*, sendo observada variação genética entre os materiais testados.
- Foi identificado um conjunto de marcadores SNPs úteis para uso em Seleção Assistida por Marcadores Moleculares (SAM), no melhoramento genético da soja para resistência a *Macrophomina phaseolina*.
- A região próximo a 34 cM do cromossomo 19 (grupo de ligação L) é candidata a ter genes/QTL de resistência a *Macrophomina phaseolina*.

5. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A. M. R. Genotypic diversity among brazilian isolates of *Macrophomina phaseolina* revealed by RAPD. **Fitopatol. bras.**, Brasília, v. 28, n. 3, 2003.

ANDERSON, C. A.; PETTERSON, F. M.; CLARKE, G. M. Data quality control in genetic case-control association studies. **Nature Protocols**, v. 5, n. 9, p. 1564-1573, 2010.

ANSARI, M. M. Integrated management of charcoal rot of soybean caused by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. **Soybean Res.**, v. 8, p. 39-47, 2010.

BRISTOW, P. R.; WYLLIE, T. D. Reaction of soybean cultivars to *Macrophomina phaseolina* as seedlings in the growth chamber and field. **Trans Mo Acad. Sci.**, v. 18, p. 5-10, 1984.

CANTERI, M. G.; ALTHAUS, R. A.; VIRGENS FILHO, J. S.; GIGLIOTI, E. A.; GODOY, C. V. SASM-Agri: sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott-Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v. 1, p. 18-24, 2001.

CHAN, E. K. F.; HAWKEN, R.; REVERTER, A. The combined effect of SNP-marker and phenotype attributes in genome-wide association studies. **Animal Genetics**, v. 40, p. 149-156, 2009.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos 2011/12** – Décimo Primeiro Levantamento. Ago. 2013.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. Isolation and partial purification of a phytotoxin produced by *Macrophomina phaseolina*. **Phytopathol Z**, v. 80, p. 35-40, 1974.

FLINT-GARCIA, S. A.; THORNSBERRY, J. M.; BUCKLER, E. S. L. Structure of linkage disequilibrium in plants. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 54, p. 357-374, 2003.

GUPTA, G. K.; CHAUHAN, G. S. **Symptoms, identification and management of soybean diseases**. Indore, India: National Research Centre for Soybean, 2005. (Technical Bulletin, 10).

GUPTA, P. K.; RUSTGI, S.; KULWAL, P. L. Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: Present status and future prospects. **Plant Molecular Biology**, v. 57, p. 461-485, 2005.

GUPTA, G. K.; SHARMA, S. L. K.; RAMTEKE, R. Biology, epidemiology and management of the pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid with special reference to charcoal rot of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). **J. Phytopathol.**, v. 160, p. 167-180, 2012.

HARTMAN, G. L.; SINCLAIR, J. B.; RUPE, J. C. **Compendium of soybean diseases**. 4. ed. St. Paul, MN, USA: The American Phytopathological Society, APS Press, 1999.

HAYWARD, M. D.; MCADAM, N. J.; JONES, J. G.; EVANS, C.; EVANS, G. M.; FORSTER, J. W.; USTIN, A.; HOSSIN, K. G.; QUADER, B.; STAMMERS, M.; WILL, J. K. Genetic markers and the selection of quantitative traits in forage grasses. **Euphytica**, v. 77, p. 269-275, 1994.

KENDIG, S. R.; RUPE, J. C.; SCOTT, H. D. Effect of irrigation and soil water stress on densities of *Macrophomina phaseolina* in soil and roots of two soybean cultivars. **Plant Dis.**, v. 84, p. 895-900, 2000.

MAIA, G. L.; SILVA, J. C.; MEYER, M. C. Pathogenicity of *Macrophomina phaseolina* isolates from soybean. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 7., 2004. **Resumos...** Brasília, DF: EMBRAPA, Brazil, 2004. p. 83. (Documentos, 228).

MAYEK-PÉREZ, N.; LOPEZ-CASTANEDA, C.; LÓPEZ-SALINAS, E.; CUMPIÁN-GUTIÉRREZ, J.; GALLEGOS, J. A. A. Herencia de la resistencia genética a *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid in common bean. **Journal of Plant Pathology**, v. 91, n. 1, p. 163-170, 2009.

MENGISTU, A.; RAY, J. D.; SMITH, J. R.; PARIS, R. L. Charcoal rot disease assessment of soybean genotypes using a colony-forming unit index. **Crop Sci.**, v. 47, p. 2453-2461, 2007.

MEYER, W. A.; SINCLAIR, J. B.; KHARE, M. N. Factors affecting charcoal rot of soybean seedlings. **Phytopathology**, v. 64, p. 845-849. 1974.

MIHAIL, J. D.; ALCORN, S. M. Quantitative recovery of *Macrophomina phaseolina* sclerotia from soil. **Plant Disease**, v. 66, p. 662-663, 1992.

MUCHERO, W.; EHLERS, J.; CLOSE, T. J.; ROBERTS, P. A. Genic SNP markers and legume synteny reveal candidate genes underlying QTL for *Macrophomina phaseolina* resistance and maturity in cowpea [*Vigna unguiculata* (L) Walp.]. **BMC Genomics**, v. 12, p. 8, 2011.

NCBI – National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: Jan. 2014.

NDIAYE, M. **Ecology and management of charcoal rot (*Macrophomina phaseolina*) on cowpea in the Sahel**. 2007. Ph. D. (Thesis) – Wageningen University, Wageningen, The Netherlands, 2007.

OLAYA, G.; ABAWI, G. S. Effect of water potential on germination, growth, and microsclerotial production of *Macrophomina phaseolina*. **Phytopathology**, v. 83, p. 1394, 1993. (Abstr.).

PARIS, R. L.; MENGISTU, A.; TYLER, J. M.; SMITH, J. R. Registration of soybean Germplasm Line DT97-4290 with moderate resistance to charcoal rot. **Crop Sci.**, v. 46, p. 2324-2325, 2006.

PEARSON, C. A. S.; SCHWENK, F. W.; CROWE, F. J.; KELLEY, K. Colonization of soybean roots by *Macrophomina phaseolina*. **Plant Dis.**, v. 68, p. 1086-1088, 1984.

SPOLADORE, L. **Identificação de interatores putativos envolvidos na localização de proteínas de duplo direcionamento em *Arabidopsis thaliana***. 2011. (Dissertação) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, Piracicaba, SP, 2011.

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

SCOTT, L. J.; MOHLKE, K. L.; BONNYCASTLE, L. L.; WILLER, C. J.; LI, Y.; DUREN, W. L. A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. **Science**, v. 316, p. 1341-1345, 2007.

SMITH, G. S.; CARVIL, O. N. Field screening of commercial and experimental soybean cultivars for their reaction to *M. phaseolina*. **Plant Dis.**, v. 81, p. 363-368, 1997.

SMITH, G. S.; WYLLIE, T. D. Charcoal rot. In: HARTMAN, G. L.; SINCLAIR, J. B.; RUPE, J. C. (Ed.). **Compendium of soybean disease**. 4th edn. St. Paul, MN, USA: American Phytopathological Society, 1999. p. 29-31.

TALUKDAR, A.; VERMA, K.; GOWDA, D. S. S.; LAL, S. K.; SAPRA, R. L.; SINGH, K. P.; SINGH, R.; SINHA, P. Molecular breeding for charcoal rot resistance in soybean I. Screening and mapping population development. **Indian J. Genet.**, v. 69, p. 367-370, 2009.

THE WELCOME 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. 661-83, 2007.

TODD, T. C.; PEARSON, C. A. S.; SCHWENK, F. W. Effect of *Heterodera glycines* on charcoal rot severity in soybean cultivars resistant and susceptible to soybean cyst nematode. **Ann. Appl. Nematol.**, v.1, p. 35-40, 1987.

USDA – Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/psdonline/circulars/oilseeds.pdf>>. Acesso em: Set. 2013.

WRATHER, J. A.; SHANNON, J. G.; CARTER, T. E.; BOND, J. P.; RUPE, J. C.; ALMEIDA, A. M. R. Reaction of drought-tolerant soybean genotypes to *Macrophomina phaseolina*. Online. **Plant Health Prog.** Doi: 10.1094/PHP-2008-0618-01-RS, 2008.

WYLLIE, T. D. Charcoal rot of soybean current status. In: WYLLIE, T. D.; SCOTT, D. H. (Ed.). **Soybean diseases of the North Central Region**. St. Paul: American Phytopathological Society, 1988. p. 106-103.

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

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados observados neste trabalho envolveram o estudo da herança, validação e identificação de marcadores moleculares para o nematoide de galhas *Meloidogyne javanica* e identificação de marcadores SNPs para resistência ao *Macrophomina phaseolina* em soja.

Foram caracterizadas fenotipicamente 124 cultivares de soja quanto à resistência ao nematoide *Meloidogyne javanica* e 169 cultivares para resistência ao fungo *Macrophomina phaseolina*, para uso futuro como progenitoras em Programas de Melhoramento Genético de Soja. A genômica e seus avanços estão permitindo a melhor compreensão das doenças causadas pelos patógenos de solo como fungos e nematoides.

No primeiro artigo foi estudada a resistência genética ao *Meloidogyne javanica* da cultivar MG/BRS Conquista, importante cultivar no mercado brasileiro, em que muitas outras variedades foram desenvolvidas baseadas nesse germoplasma. No segundo artigo, foi utilizada uma abordagem diferente com uma população não estruturada. Observou-se que a abordagem foi eficiente na identificação de novas fontes de resistência para o *Meloidogyne javanica*. Por entender a fundamental importância dessa nova abordagem, na Introdução Geral foram apresentadas as principais vantagens e desvantagens dessa abordagem para estudos associativos. Neste estudo, foi possível identificar marcadores no grupo de ligação F e no A1 como associados para a resistência a esse patógeno e com potencial uso

em seleção assistida por marcadores nos Programas de Melhoramento de Soja.

No terceiro artigo apresentado nesta tese, foi discutida a resistência para o *Macrophomina phaseolina* em soja. Os problemas gerados por esse patógeno estão crescendo a cada ano agrícola. O desenvolvimento dessa doença está intimamente ligado com déficit hídrico no período de desenvolvimento da cultura. Os dados obtidos sobre esse patógeno são de grande importância, pois não há na literatura disponível informações sobre regiões do genoma da soja com QTLs/genes de resistência para esse patógeno.

É importante observar ainda que os marcadores associados poderão ser efetivamente utilizados pelos Programas de Melhoramento de Soja para identificar linhagens/cultivares com genes de resistência de interesse para as características estudadas nesta tese, e, de forma bem prática, as informações geradas neste estudo poderão ser aplicadas.

A escolha do uso da seleção assistida ou convencional em um programa de melhoramento de plantas não é tarefa trivial. Entre os critérios a serem considerados estão a relação custo-benefício de cada estratégia adotada e a disponibilidade de recursos técnico-financeiros para a execução de cada uma delas, bem como a qualificação da equipe para utilização das novas ferramentas. A seleção assistida por marcadores e a seleção fenotípica tradicional não são estratégias excludentes. E maior eficiência é obtida mediante a combinação das duas estratégias.

À medida que os métodos de genotipagem e estatísticos vão sendo desenvolvidos, a tecnologia vai-se tornando mais rápida e demandando menos recursos financeiros e pessoal, aumentando o acesso para os mais variados programas de melhoramento de plantas de diferentes culturas.

Os resultados apresentados nesta tese serão utilizados no mapeamento de genes e QTLs por meio de desequilíbrio de ligação com os marcadores SNPs analisados. Com os mesmos dados de genotipagem, será identificado um conjunto de marcadores SNPs úteis para uso em Seleção Assistida por Marcadores Moleculares (SAM), no melhoramento genético da soja para outras características agrônômicas de interesse, como ciclo vegetativo, ciclo total, altura da planta, acamamento, peso de 100 sementes

e produtividade de grãos, além de estudos para resistência genética a outras doenças, como para *Meloidogyne incognita*, Necrose da Haste (NHS), Cancro da Haste (CHS) e Fitóftora. No final deste grande projeto, será possível selecionar ou aumentar a frequência de alelos de interesse dentro de populações utilizadas no desenvolvimento de novos materiais comerciais dos Programas de Melhoramento de Soja.

4. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A. M. R. Genotypic diversity among brazilian isolates of *Macrophomina phaseolina* revealed by RAPD. **Fitopatol. bras.**, Brasília, v. 28, n. 3, 2003.

ALMEIDA, L. A.; KIIHL, R. A. S. Melhoramento de soja no Brasil – Desafios e perspectivas. In: CÂMARA, G. M. S. (Ed.). **Soja, tecnologia da produção**. Piracicaba, SP: Publique, 1998. p. 40-54.

ASMUS, G. L. **Avaliação de genótipos de soja ao nematoide reniforme *Rotylenchulus reniformis***. Dourados, MS: Embrapa Agropecuária Oeste, 2004. 24 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 19).

BARR, A. R. **Marker-assisted selection in theory and practice**. In plant breeding and farmer participation. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2009.

BERED, F.; BARBOSA NETO, J. F.; CARVALHO, F. I. F. Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Ciência Rural**, v. 27, n. 3, p. 513-520, 1987.

BLACK, R. J. Complexo soja: fundamentos, situação atual e perspectiva. In: CÂMARA, G. M. S. (Ed.). **Soja: tecnologia de produção II**. Piracicaba, SP: ESALQ, 2000. p. 1- 18.

CAIXETA, E. T. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. 2. ed. Viçosa, MG: Folha de Viçosa, 2009. p. 11-94.

COLLARD, B. C. Y.; MACKILL, D. J. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. **Phil. Trans. R. Soc. B.**, v. 363, p. 557-572, 2008.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira:** grãos – Quinto levantamento. Brasília, DF: Companhia Nacional de Abastecimento, 2014. Acesso em: 6 Jan. 2014.

CONCIBIDO, V. C.; DENNY, R. L.; LANGE, D. A.; ORF, J. H.; YOUNG, N. D. RFLP mapping and marker-assisted selection of soybean cyst nematode resistance in: PI 209332. **Crop Science**, v. 36, n. 6, p. 1643-1650, 1996.

CONCIBIDO, V. C.; DIERS, B. W.; ARELLI, P. R. A decade of QTL mapping for cyst nematode resistance in soybean. **Crop Science**, v. 44, p. 1121-1131, 2004.

DIAS, W. P.; GARCIA, A.; SILVA, J. F. V.; CARNEIRO, G. E. S. **Nematoides em soja:** identificação e controle. Londrina, PR, 2010. p. 1-8. (Circular técnica Embrapa, 76).

FRANÇA-NETO, J. B. A importância das associações de produtores no desenvolvimento da soja: o caso brasileiro. In: ORNELLAS, A. P.; YUYAMA, M. M.; CAMARGO, T. V. (Ed.). CONGRESSO DE TECNOLOGIA E COMPETITIVIDADE DA SOJA NO MERCADO GLOBAL, 2000, Cuiabá. **Anais...** Cuiabá, MT: Fundação MT, 2000. p. 89-94.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Genética de associação em plantas. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. **Marcadores moleculares**. Viçosa, MG, 2009. 532 p.

FLINT-GARCIA, S. A.; THORNSBERRY, J. M.; BUCKLER, E. S. I. Structure of linkage disequilibrium in plants. **Annu. Ver. Plant Biol.**, v. 54, p. 357-374, 2003.

FUGANTI, R.; BENEVENTI, M. A.; SILVA, J. V.; ARIAS, C. A.; MARIN, S. R. R.; BINNECK, E.; NEPOMUCENO, A. L. Identificação de marcadores moleculares de microssatélites para a seleção de genótipos de soja resistentes a *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, v. 28, n. 2, p. 125-130, 2004.

GAETÁN, S. A.; FERNANDEZ, L.; MADIA, M. Occurrence of charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina* on canola in Argentina. **Plant Dis.**, v. 90, p. 524, 2006.

GUPTA, P. K.; RUSTGI, S.; KULWAL, P. L. Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: Present status and future prospects. **Plant Molecular Biology**, v. 57, p. 61-485, 2005.

KUBO, R. K.; SILVA, R. A.; TOMAZINI, M. D.; OLIVEIRA, C. M. G.; MAZZAFERA, P.; INOMOTO, M. M. Patogenicidade de *Pratylenchus coffeae* em plântulas de cafeeiro cv. Mundo Novo. **Fitopatol. Bras.**, v. 28, p. 41-48, 2003.

MACHADO, A. C. Z.; BELUTI, D. B.; SILVA, R. A.; SERRANO, M. A. S.; INOMOTO, M. M. Avaliação de danos causados por *Pratylenus brachyurus* em algodoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 31, n. 1, p. 11-16, 2006.

MUCHERO, W.; EHLERS, J.; CLOSE, T.; ROBERTS, P. A. Genic SNP markers and legume syntenry reveal candidate genes underlying QTL for *Macrophomina phaseolina* resistance and maturity in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. **BMC Genomics**, v. 12, p. 8, 2011.

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

SILVA, M. F. **Mapeamento e validação de QTLs de resistência ao nematoide de cisto da soja**. 2006. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.

SILVA, L. F. Y. Problemas fitossanitários da soja no Brasil, com ênfase em nematoides. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 21., 1998, Maringá. **Anais...** Maringá, PR: UEM, 1998. p. 16-20.

SEDIYAMA, T. (Org.). **Tecnologias de produção e usos da soja**. Londrina, PR: Mecenias, 2009. v. 1, 314 p.

SEDIYAMA, T.; PEREIRA, M. G.; SEDIYAMA, C. S.; GOMES, J. L. L. **Cultura da soja**: I parte. Viçosa, MG: UFV, 1993. 96 p.

SU, G.; SUH, S. O.; SCHNEIDER, R. W.; RUSSIN, J. S. Host specialization in the charcoal rot fungus *Macrophomina phaseolina*. **Phytopath**, v. 91, p. 120-126, 2001.

TOLEDO, J. F. F.; ALMEIDA, L. A.; KIIHL, R. A. S.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; KASTER, M.; MIRANDA, L. C.; MENOSSO, O. G. Genetic and breeding. In: EMBRAPA – Centro Nacional de Pesquisa de Soja, Londrina. **Tropical soybean**: improvement and production. Rome: FAO, 1994. p. 19-36.

Van-RAAMSDONK, L. W. D. The cytological and genetical mechanisms of plant domestication exemplified by four crop models. **The Botanical Review**, New York, v. 61, n. 4, p. 367-399, 1995.

XU, B.; ZHEN, H.; LU, Q.; ZHAO, S. Three new evidences of the original area of soybean. 1989. In: CONFERENCIA MUNDIAL DE INVESTIGACION EN SOJA, 4., 1989, Buenos Aires. **Actas...** Buenos Aires, 1989. p. 124-128.

YORINORI, J. T. Ameaças para a soja. **Cultivar**, v. 22, p. 26-30, 2000.