

BRUNO DE ALMEIDA SOARES

**ASSOCIAÇÃO GENÔMICA AMPLA PARA RESISTÊNCIA
DE CULTIVARES DE SOJA À *Sclerotinia Sclerotiorum***

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

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

T

S676a
2018 Soares, Bruno de Almeida, 1993-
Associação genômica ampla para resistência de
cultivares de soja à *Sclerotinia sclerotiorum* / Bruno de
Almeida Soares. - Viçosa, MG, 2018.
viii, 36f. : il. ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador : Felipe Lopes da Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Soja - Melhoramento genético. 2. Soja -
Resistência a doenças e pragas. 3. Polimorfismo de
nucleotídeo único. 4. *Sclerotinia sclerotiorum*.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Fitotecnia. Programa de Pós-Graduação em Genética e
Melhoramento. II. Título.


CDD 22. ed. 633.342

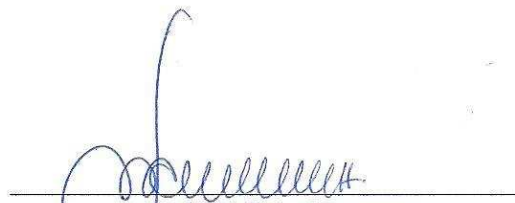
BRUNO DE ALMEIDA SOARES

**ASSOCIAÇÃO GENÔMICA AMPLA PARA RESISTÊNCIA
DE CULTIVARES DE SOJA À *Sclerotinia Sclerotiorum***

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

APROVADA: 21 de fevereiro de 2018.


Moysés Nascimento
(Coorientador)


Carlos Nick Gomes


Felipe Lopes da Silva
(Orientador)

A todos os professores e amigos que contribuíram para meu aprendizado.

DEDICO

“Tudo posso naquele que me fortalece.”
(Filipenses 4:13)

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e pelas graças concedidas até este momento, e as que ainda estão por vir.

Aos meus pais Cláudio e Suelene e ao meu irmão Gabriel pelo amor incondicional, apoio e torcida durante todos os anos da minha vida.

À minha noiva, companheira e amiga Andressa, pelo amor, carinho e paciência nestes anos de nossa união.

À toda minha família, que sempre torcerem pela minha vitória.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao professor, amigo e orientador Dr. Felipe Lopes da Silva pela paciência, ensinamentos, entusiasmo, vibração, amizade e confiança a mim concedido.

À EPAMIG SUDESTE pelo espaço concedido para realização dos trabalhos.

Aos amigos do Laboratório de Fitopatologia da EPAMIG SUDESTE, Ari, Lucas, Pablo, Paola e Tatiane pela amizade, apoio e ajuda na condução dos trabalhos realizados.

Ao meu padrinho e professor Dr. Renan Cardoso Lima, pela amizade e pelos conselhos que me ajudaram a chegar até aqui.

Aos amigos, estagiários e pós-graduandos do Programa Soja. TODOS foram importantes para a minha formação e para conclusão deste trabalho.

Ao amigo e companheiro do Programa Soja, Stênio Andrey Guedes Dantas pela ajuda e apoio com as análises de associação.

Aos Drs. e coorientadores Rogério Faria Vieira e Trazilbo José de Paula Júnior pela amizade, ensinamentos e paciência ao longo da minha trajetória acadêmica.

Ao professor e coorientador Dr. Moysés Nascimento, pelas sugestões e pela paciência.

Ao pesquisador e coorientador Dr. Ivan Schuster e à Coodetec pelo material concedido para realização deste trabalho.

A todos os amigos e colegas de trabalho do GenMelhor, pela ajuda em minha formação profissional e pessoal.

A todos os professores da graduação e da pós-graduação que fizeram parte da minha formação profissional e que ajudaram a me tornar uma pessoa melhor.

MUITO OBRIGADO!!!

BIOGRAFIA

BRUNO DE ALMEIDA SOARES, filho de Claudio Antônio Soares e de Suelene Alves de Almeida Soares, nasceu em 21 de fevereiro de 1993, em Belo Horizonte, Estado de Minas Gerais.

Cursou o primário no Escola Municipal Henfil, em Belo Horizonte, Estado de Minas Gerais.

Cursou o ensino fundamental e médio na Escola Estadual Anita Brina Brandão e no Colégio Dona Clara, em Belo Horizonte - MG.

Em março de 2011, iniciou o curso superior em Agronomia pela Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, colando grau em janeiro de 2016 como Engenheiro Agrônomo.

Em março de 2016, iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento pela Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de dissertação em fevereiro de 2018.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
INTRODUÇÃO	1
MATERIAL E MÉTODOS	2
Linhagens e local dos experimentos	2
Genotipagem com marcadores SNP	4
Fenotipagem	4
Análise de dados fenotípicos	5
Análise de Associação Genômica	5
RESULTADOS	6
Avaliação do painel de cultivares.....	6
Análise de Associação Genômica	8
Desequilíbrio de Ligação	12
Haplótipos controladores da característica	12
DISCUSSÃO	15
Fenotipagem do painel de cultivares.....	15
Densidade de Marcadores	15
Associação Genômica Ampla	16
Genes e Proteínas candidatos.....	17
CONCLUSÕES	19
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20
ANEXOS	27
Tabela suplementar 1	27
Tabela suplementar 2	29
Figura suplementar 1	33
Figura suplementar 2	34
Figura suplementar 3	35
Figura suplementar 4	36

RESUMO

SOARES, Bruno de Almeida, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2018. **Associação genômica ampla para resistência de cultivares de soja à *Sclerotinia sclerotiorum***. Orientador: Felipe Lopes da Silva. Coorientadores: Rogério Faria Vieira, Trazilbo José de Paula Júnior, Ivan Schuster e Moysés Nascimento.

Um dos fatores limitantes na produção da soja é o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, causador da podridão branca da haste (PBH). A produtividade é comprometida quando há condições de temperaturas entre 18 e 22 C° e humidade relativa acima de 80%. Ainda não é conhecido genótipo imune à *S. sclerotiorum*. Contudo, muitos estudos em casa de vegetação com o método de inoculação *straw test* tem sido feitos para seleção de genótipos com resistência fisiológica ao fungo. A associação genômica ampla (GWAS) vem facilitando a detecção de genes e QTLs (*Quantitative Trait Loci*) responsáveis por características agronômicas, por meio da utilização de marcadores SNPs (*single nucleotide polymorphism*). Nosso objetivo foi realizar GWAS em 146 cultivares brasileiras e identificar SNPs, QTLs e genes relacionados com a resistência fisiológica à PBH em soja. Foram obtidos notas e o comprimento de lesão aos 3, 7, 10 e 14 dias após inoculação (DAI). Com a progressão da doença obtida a partir da diferença entre os dias de avaliação de comprimento de lesão e com as notas, pôde-se observar 25 e 10 SNPs significativos em 2016 e 2017, respectivamente, distribuídos em 14 cromossomos diferentes. Houve 6 SNPs localizados em QTLs já descritos. Haplótipos baseados nos marcadores significativos confirmaram a baixa contribuição dos SNPs quando analisados separadamente para resistência fisiológica à PBH. Com base nos SNPs detectados neste estudo, foram confirmados 67 genes candidatos em 2016 e 23 genes candidatos em 2017 para resistência a doenças. Esses resultados reforçam o fato de que esta é uma característica complexa, relacionada com muitos genes. Os resultados ainda sugerem que sob diferentes condições ambientais o patógeno é capaz de suprimir genes da soja, aumentando a susceptibilidade da cultura ao fungo. No entanto, ainda são necessários estudos de validação dos SNPs encontrados para utilização em seleção assistida e programas de melhoramento no futuro.

ABSTRACT

SOARES, Bruno de Almeida, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February. 2018. **Genome wide association for resistance of soybean cultivars to *Sclerotinia sclerotiorum***. Advisor: Felipe Lopes da Silva. Co-advisors: Rogério Faria Vieira, Trazilbo José de Paula Júnior, Ivan Schuster and Moysés Nascimento.

One of the limiting factors on soybean production is the White Mold (WM), caused by fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. Yield is compromised when conditions are temperature between 18 and 22 C° and relative humidity above 80%. Moreover, immune genotype is unknown to *S. sclerotiorum*. However, many greenhouse studies using the straw test method have been done to select genotypes with physiological resistance to the fungus. Genome wide association studies (GWAS) has been making it easier to detect genes and QTLs (Quantitative Trait Loci) responsible for agronomic traits, by using SNPs (single nucleotide polymorphism) markers. Our objective was to do GWAS in 146 Brazilian cultivars and to identify SNPs, QTLs and genes associated with WM physiological resistance in soybean. Notes and lesion length were obtained at 3, 7, 10 and 14 days after inoculation (DAI). With the disease progression obtained from the difference between the days of evaluation of lesion length and with the notes, it can be observed 25 and 10 significant SNPs in 2016 and 2017, respectively, distributed in 14 different chromosomes. There were 6 SNPs located in QTLs already described. Haplotypes based on significant markers have confirmed the low contribution of SNPs when analyzed separately for physiological resistance to WM. Based on detected SNPs in this study, 67 candidate genes in 2016 and 23 candidate genes in 2017 were confirmed for resistance to diseases. These results reinforce the fact that physiological resistance to WM is a complex trait, associated with many genes. The results still suggest that in different conditions the pathogen is capable of suppressing soybean genes, increasing the susceptibility of the crop to the fungus. However, more studies are necessary for validation of SNPs found for use in assisted selection and breeding programs in the future.

INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor de soja, *Glycine max* (L.) Merrill, no mundo (CONAB, 2016). A podridão-branca-da-haste (PBH), causada pelo agente *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, é uma das doenças que causam maior decréscimo na produção deste grão no país. O prejuízo é ainda maior em regiões de elevada altitude, onde a temperatura é amena e a umidade é alta (Leite, 2005).

O controle químico da PBH é o mais utilizado para a doença. Entretanto, o uso indiscriminado e errôneo dessas substâncias pode resultar em isolados de *S. sclerotiorum* resistentes aos fungicidas (Lehner et al., 2015 a). Além disso, a utilização de fungicidas de forma equivocada para o controle do patógeno, culmina em alto custo de produção e desequilíbrio ambiental. Assim, o controle da PBH deve ser realizado de forma sustentável, ambientalmente e economicamente.

O manejo integrado da PBH é extremamente importante para o controle da doença. Práticas como controle biológico, rotação de culturas, manejo de irrigação, espaçamento entre linhas e utilização de cultivares resistentes podem diminuir a incidência da doença e o inóculo na lavoura (Zeng et al., 2012; Rousseau et al., 2007; Mila e Yang, 2008; De Bruin e Pedersen, 2008). Ainda não é conhecido nenhum genótipo de soja com resistência completa à PBH. Assim, o que se busca em programas de melhoramento para essa doença são genótipos com maior resistência parcial ao fungo, ou seja, que são infectadas, mas afetam o menos possível o tecido vivo.

A resistência parcial à PBH tem como um dos fatores principais a resistência fisiológica das plantas (Kolkman e Kelly, 2002). A resistência fisiológica compreende os mecanismos de defesa da planta que inibem a atividade enzimática do fungo, impedindo que a infecção se estenda para o restante do tecido vivo (Pascual et al., 2010). Estudos em casa de vegetação são importantes em programas de melhoramento pois podem auxiliar na seleção de genótipos com maior resistência fisiológica (Steadmann et al., 2004, 2006). O método de *straw test* tem sido muito utilizado para identificação de genótipos com resistência fisiológica em soja e feijão à *S. sclerotiorum* dentro de casa de vegetação (Auclair et al., 2004; Schwartz e Singh, 2013). Este método implica no corte do pecíolo e inoculação direta do micélio do fungo, quando a soja atinge o estágio fenológico V4.

A estrutura de população do agente *S. sclerotiorum* mostra que o fungo tem reprodução basicamente clonal (Hambleton et al., 2002; Lehner et al., 2015 b). Em estudo com seis genótipos de soja e seis isolados do patógeno, Kull et al., (2004) observaram que não houve interação entre genótipos x isolados, demonstrando que cultivares mais resistentes ou mais suscetíveis não alteram a resposta quando inoculadas com isolados que apresentam alta ou baixa agressividade.

Quantitative Loci Traits (QTLs) para resistência à PBH já foram identificados por meio de mapeamento genético utilizando dois parentais, resistente e suscetível (Kim and Diers, 2000; Arahana et al., 2001; Guo et al., 2008; Han et al., 2008; Vuong et al., 2008, Huynh et al., 2010, Li et al., 2010, and Sebastian et al., 2010). O mapeamento de QTLs é feito a partir do cruzamento entre dois parentais contrastantes a fim de detectar regiões no genoma da espécie estudada que estão relacionadas com a característica em estudo. A utilização de populações com grande número de marcadores SNPs (*single nucleotide polymorphism*) é tem sido uma nova abordagem para detecção de QTLs.

Poucos trabalhos foram feitos para detecção de QTLs quanto à resistência parcial à *S. sclerotiorum* em diversas populações de soja. Bastien et al. (2014) encontraram 4 QTLs nos cromossomos 1, 15, 19 e 20, em um estudo de associação genômica (GWAS) realizado com 130 linhagens de soja. Este estudo foi realizado em campo, onde as plantas foram inoculadas com suspensão de micélio e algodão. O conhecimento sobre QTLs responsáveis pela resistência fisiológica da soja ao agente *S. sclerotiorum* ainda é escasso, e torna o processo de melhoramento da cultura limitado uma vez que ainda existem poucos estudos com essa finalidade.

Em nosso estudo, o objetivo foi avaliar 146 genótipos de soja quanto à resistência fisiológica à PBH e detectar, por meio de GWAS, novos QTLs e genes relacionados com essa doença. Por fim, identificar os haplótipos que se sobressaem quanto à resistência ao patógeno.

MATERIAL E MÉTODOS

Linhagens e local dos experimentos

Ao todo, foram utilizadas 146 cultivares (Tabela 1) que, conforme citado por Contreras-Soto et al. (2017), foram cultivares comercializadas entre os anos de 1990 e 2010 no Brasil. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, na cidade de Viçosa – Minas Gerais (20° 45' 14" S 42° 52' 55" W), nos anos de 2016 e 2017. Devido às condições ambientais, a temperatura média na casa de vegetação, durante a condução

Tabela 1 – Cultivares de clima tropical (n=146) e Grupo de Maturidade Relativa (GM) utilizadas para realização da associação genômica ampla para resistência fisiológica à PBH.

CULTIVARES							
	GM		GM		GM		GM
5D660RR	6.6	CD204	7.3	CD253	8.7	M7908RR	7.9
5D690RR	6.9	CD205	7.8	CD254RR	8.4	M8527RR	8.5
5D711RR	7.1	CD206	6.8	CD2585RR	5.8	M9144RR	9.1
5G770RR	7.7	CD206RR	6.8	CD2630RR	6.3	MERCEDES70A	6.6
5G830RR	8.3	CD208	6.9	CD2721RR	7.2	M-SOY6101	6.1
A6001	6.0	CD213RR	6.8	CD2737RR	7.3	M-SOY7901	7.9
A6001RR	6.0	CD214RR	6.4	CD2792RR	7.9	MSOY8001	8.0
A8000	8.0	CD215	5.9	CD2800	8.0	NA4990 RG	4.9
ANTA 82	7.4	CD216	5.5	CD2840	8.4	NA5909RR	5.9
BMXATIVARR	5.6	CD217	7.3	CD2860	8.6	NIDERAA4725RG	4.7
BMXENERGIARR	5.0	CD218	7.2	CD5807	6.0	NIDERAA6411RR	6.4
BMXForcaRR	6.2	CD219RR	8.2	CD5969	6.4	NIDERAA7321RG	7.3
BMXPOTENCIARR	6.7	CD221	6.4	CD/FAPA 220	7.3	SYN3358 RR	6.4
BMXTitanRR	5.3	CD224	6.9	BRS CELESTE	8.7	NK7059 RR	7.0
BMXTURBORR	5.8	CD225RR	5.8	MG/BR 46 (Conquista)	8.2	NS 4823RR	4.8
Bragg	6.6	CD226RR	6.6	EMBRAPA48	6.5	OCEPAR3- PRIMAVERA	6.5
BRS133	6.6	CD228	7.5	EMBRAPA59	6.5	P98Y11	8.1
BRS184	6.1	CD229RR	7.3	EMGOPA304	7.3	P98Y51	8.5
BRS185	6.6	CD230RR	7.6	FT-Abyara	7.7	P98Y70	8.7
BRS213	6.5	CD231RR	7.3	FT-ESTRELA	8.0	R7	7.0
BRS230	6.4	CD232	7.3	FT-GUAIRA	6.4	TMG103RR	8.3
BRS232	6.5	CD233RR	6.4	Fundacep33	8.0	TMG1066RR	6.6
BRS243RR	6.6	CD234RR	8.0	Fundacep38	7.0	TMG1067RR	6.7
BRS245RR	7.3	CD235RR	6.4	Fundacep39	7.1	TMG115RR	8.6
BRS246RR	7.2	CD236RR	6.2	Fundacep53RR	6.4	TMG123RR	6.7
BRS256RR	7.8	CD237RR	7.3	Fundacep55RR	6.0	TMG7161RR	6.5
BRS257	6.4	CD238RR	7.1	Fundacep57RR	6.2	TropicalRR	6.7
BRS258	7.3	CD239RR	6.7	Fundacep58RR	6.8	TUCUNARE	8.3
BRS259	7.1	CD240RR	6.9	Fundacep61RR	6.0	VENCEDORA	8.0
BRS262	7.9	CD242RR	7.9	Fundacep63RR	5.4	-	-
BRS268	7.2	CD243RR	8.0	MG/BR 48 (Garimpo)	7.8	-	-
BRS282	6.5	CD244RR	8.0	IAS5	6.4	-	-
BRS283	6.5	CD246	8.1	IGRARA516R R	6.4	-	-
BRS284	6.4	CD247RR	8.3	IGRARA626R R	7.7	-	-
BRSMG Renascenca	7.9	CD248RR	6.4	IGRARA628R R	6.4	-	-
CAC-1	8.3	CD249RRS TS	6.7	M6009RR	6.0	-	-
CAPINOPOLIS (UFV16)	7.7	CD250RR	5.5	M6707RR	6.7	-	-
CD201	6.7	CD251RR	8.8	M7211RR	7.2	-	-
CD202	6.4	CD252	6.4	M7639RR	7.6	-	-

dos experimentos, foi de 28 e 20 °C nos anos 2016 e 2017, respectivamente. Foi mantido a umidade relativa acima de 80% na casa de vegetação em ambos os experimentos.

Genotipagem com marcadores SNP

Todas as cultivares foram genotipadas com 6000 *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) utilizando a plataforma Illumina BARCSoySNP6K BeadChip, um subconjunto da plataforma SoySNP50K BeadChip (Song et al., 2013). A genotipagem foi conduzida pela Deoxi Biotechnology Ltda, na cidade de Araçatuba, São Paulo, Brasil.

Fenotipagem

A unidade experimental foi composta de duas plantas conduzidas em copo de poliestireno expandido de 200 ml contendo substrato comercial Tropstrato HT Hortaliças ®. Foi utilizado o delineamento em blocos ao acaso (DBC) com três repetições, totalizando 438 unidades experimentais.

As plantas foram conduzidas até o estágio fenológico V4 segundo Fher e Caviness, (1977) e inoculadas pelo método *straw test* (Petzoldt e Dickson, 1996). Foi adotado o procedimento padrão para isolamento dos escleródios: imersão em álcool 70%, imersão em hipoclorito de sódio, lavagem em água destilada estéril e inserção em placa de petri contendo meio de cultura batata dextrose ágar (BDA). Após o crescimento do micélio até a borda das placas, foram retirados discos de 5 mm de diâmetro, contendo meio de cultura e micélio do patógeno e inoculados nas plantas.

O isolado foi obtido na cidade de Formosa-GO e pertence ao grupo de compatibilidade micelial de maior predominância no Brasil segundo Lehner et al., (2015b). Portanto, este estudo se aplica a maioria das áreas infestadas pelo patógeno.

Foram avaliados notas e o comprimento de lesão (em centímetros) aos 3, 7, 10 e 14 dias após a inoculação. As notas variaram de 1 a 9, em que: 1 = sem lesão; 2 = lesão apenas no pecíolo lateral; 3 = lesão além do pecíolo lateral, mas não se estende até o primeiro nó; 4 = lesão se estende até o primeiro nó; 5 = lesão entre o primeiro e o segundo nó a partir do pecíolo; 6 = lesão até o segundo nó; 7 = lesão entre o segundo e terceiro nó; 8 = lesão se estende até o terceiro nó; e, 9 = lesão além do terceiro nó (Auclair et al., 2004).

Os dados fenotípicos de comprimento de lesão utilizados foram obtidos através da diferença de mensuração entre os dias em sequência, avaliando a progressão da doença. Já para as notas, foi utilizado o valor real atribuído a cada cultivar nos respectivos dias de avaliação.

Análise de dados fenotípicos

Os dados dos dois anos foram analisados em conjunto para verificar a correlação genotípica. Para isso foi utilizado o modelo:

$$y = Xr + Zg + Wi + e$$

em que y é o vetor de dados fenotípicos, r é o vetor dos efeitos de repetição (assumidos como fixos) somados à média geral, g é o vetor dos efeitos genotípicos (assumidos como aleatórios), i é o vetor dos efeitos da interação genótipo x ambiente (aleatórios) e e é o vetor de erros ou resíduos (aleatórios). As letras maiúsculas representam as matrizes de incidência para os referidos efeitos.

Após realizado a análise conjunta e verificado a baixa correlação, foi obtido a herdabilidade, o coeficiente de variação genético e o coeficiente de variação ambiental dos experimentos. Os dados fenotípicos de cada ambiente foram corrigidos a partir de modelos lineares mistos, via REML/BLUP, separadamente. Este modelo considera o delineamento em blocos ao acaso, com teste genótipos não aparentados e um único indivíduo por parcela. O nosso indivíduo foi considerado a média de duas plantas por vaso, uma vez que se trata de cultivares. O modelo que representa esta análise foi:

$$y = \mu + Xr + Zg + e$$

onde y é o vetor de dados fenotípicos, r é o vetor dos efeitos de repetição (assumidos como fixos) somados à média geral, g é o vetor dos efeitos genotípicos (assumidos como aleatórios), e é o vetor de erros ou resíduos (aleatórios) que segue $N(0, \sigma_e^2)$. As letras maiúsculas representam as matrizes de incidência para os referidos efeitos. Após a correção dos valores fenotípicos, foi realizado a média dos indivíduos para as três repetições. Esses dados foram utilizados para realizar a associação posteriormente.

Análise de Associação Genômica

Foi utilizado o modelo linear misto comprimido (CMLM) de associação levando em conta a matriz de parentesco e a estrutura de população do painel de cultivares. Assim, o modelo de associação adotado foi:

$$y = \mu + Wm + Zu + e$$

onde y é o vetor dos dados fenotípicos corrigidos; m é o efeito do marcador e estrutura de população (efeito fixo); u é o efeito poligênico considerando a variância aditiva e a matriz de parentesco (efeito aleatório); W e Z são os vetores de incidência para o efeito de marcador e efeito poligênico, respectivamente; e é o aleatório.

A matriz de parentesco foi obtida através do software Tassel, utilizando os próprios marcadores (Hayes et al., 2007). A estrutura de população utilizada neste estudo

foi a mesma utilizada por Contreras-Soto et al. (2017), devido ao mesmo painel de cultivares.

A medida de desequilíbrio de ligação utilizada foi o r^2 , calculada com o programa Haploview (Barret et al., 2005), por meio da fórmula $r^2 = (D')^2 / (pAqapBqb)$ em que D' é uma medida de desequilíbrio de ligação e pA , qa , pB e qb são as frequências dos alelos que são comparados. A raiz quadrada de r^2 pode ser definida como o coeficiente de correlação entre os alelos correspondentes (Hartl e Clark, 1997).

Ao final da análise, foi verificado os QTLs, a partir do genoma de referência Willians 82 versão 1.1, usando a plataforma Soybase (Grant et al., 2010), nos quais os marcadores significativos detectados estavam inseridos. Após esta etapa, utilizou-se o banco de dados PlantGDB (Duvick et al., 2008) para a identificação e filtragem dos genes, e suas respectivas proteínas sintetizadas, que podem estar relacionados com a reação de resistência da soja à PBH.

RESULTADOS

Avaliação do painel de cultivares

As cultivares apresentaram variabilidade quanto às notas e comprimento de lesão. Em 2016, as lesões variaram de 5 a 16 cm de comprimento (Figura 1a) e as notas variaram de 2.9 a 3.9 (Figura 1c), quando avaliadas aos 14 dias após inoculação (DAI). Já em 2017, provavelmente pelo fato de haver condições melhores para o patógeno desenvolver, as lesões variaram de 12 a 46 cm (Figura 1b) e as notas variaram de 5.5 a 8.02 (Figura 1d).

Os genótipos OCEPAR3-PRIMAVERA, M-SOY7901, NIDERAA6411RR, P98Y51 e CD243RR, apresentaram menores comprimentos de lesão nos dois anos. Os genótipos TMG1066RR, CD240RR, M9144RR, CD233RR, CD204 e CD202 apresentaram maiores comprimentos de lesão em ambos os anos, também aos 14 DAI. Em relação a nota avaliada aos 14 DAI, os genótipos CD 215, CD 218, CD 235RR, BRS 133, BRS 259, P98Y51, 5G770RR e CAPINÓPOLIS UFV 16 apresentaram menores valores tanto em 2016 quanto em 2017. As maiores notas foram observadas nos genótipos CD 204, CD 208, CD 246, CD 240RR, NIDERAA4725RG e 5D690RR.

A herdabilidade variou de 1 a 25% em 2016 e de 1 a 10% em 2017 (Tabela 2). De maneira geral, a herdabilidade aumentou ao longo dos dias de avaliação em ambos os anos. Aos 3 DAI, a herdabilidade da característica variou entre 1 e 2% nos dois anos de experimento. O início de infecção do patógeno nos genótipos pode explicar esses valores muito baixos por não haver variação suficiente entre os genótipos. A partir do 7 DAI, tanto a herdabilidade quanto o coeficiente de variação genético aumentaram, principal-

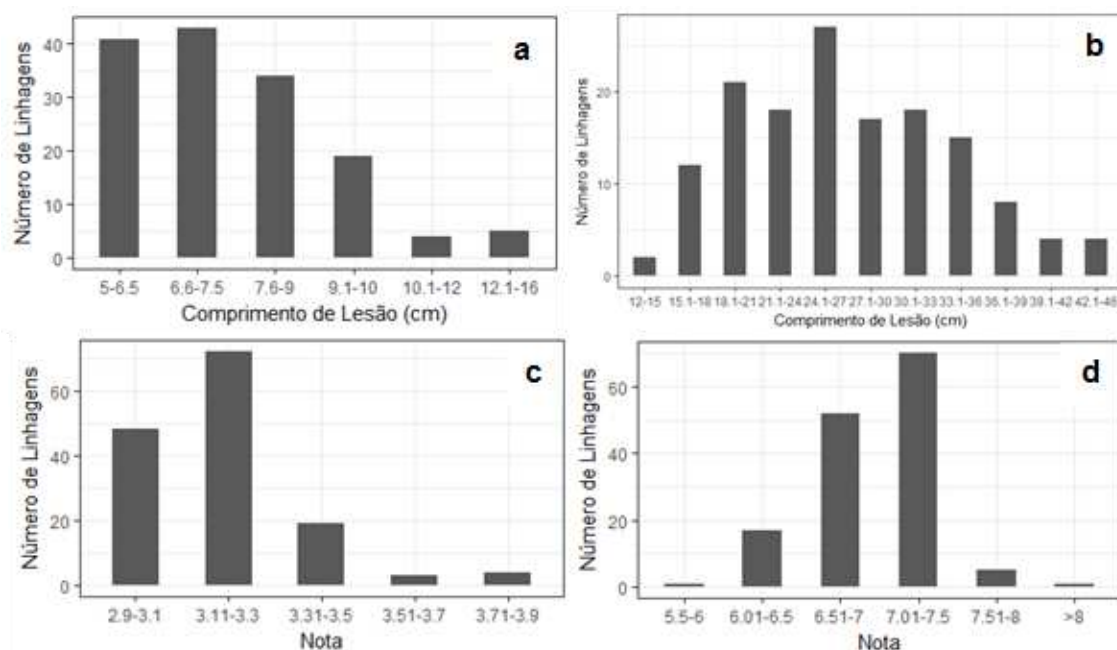


Figura 1 – Distribuição de cultivares brasileiras de soja de acordo com as classes de comprimento de lesão em 2016 (a) e 2017 (b) e classes de nota em 2016 (c) e 2017 (d), quando avaliadas aos 14 dias após inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum*.

mente para o ano de 2016. Valores maiores de coeficiente de variação genético em 2016 podem ser atribuídos devido à alta variação ambiental após a inoculação do fungo, o que ajudou a impedir o desenvolvimento do patógeno em alguns genótipos. Os experimentos foram analisados separadamente devido ao baixo valor de correlação genotípica entre os dois ambientes a partir do 7 DAI. Valores baixos de herdabilidade sugerem que a característica é um fator quantitativo, ou seja, comandado por vários genes.

Tabela 2 - Herdabilidade genética no sentido amplo (h^2_g), coeficientes de variação genético ($CV_{gi}\%$) e ambiental ($CV_e\%$) e correlação genotípica entre o desempenho de cultivares brasileiras de soja inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum* nos anos 2016 e 2017 (rgloc) avaliadas quanto a nota pelo *straw test* aos 3, 7, 10 e 14 dias após inoculação (N3, N7, N10 e N14, respectivamente) e progresso do comprimento de lesão entre 0, 3, 7, 10 e 14 dias após inoculação (CL0-3, CL3-7, CL7-10 e CL10-14, respectivamente).

	N3	N7	N10	N14	CL0-3	CL3-7	CL7-10	CL10-14
2016								
h^2_g	0.01	0.07	0.04	0.12	0.02	0.11	0.12	0.25
$CV_{gi}\%$	1.23	210.34	3.56	289.21	11.32	52.22	36.54	74.97
$CV_e\%$	14.89	769.59	17.50	767.14	79.20	150.48	97.41	129.05
2017								
h^2_g	0.01	0.10	0.10	0.05	0.01	0.08	0.09	0.08
$CV_{gi}\%$	1.46	16.10	19.57	19.54	2.83	12.83	26.10	29.84
$CV_e\%$	16.88	79.22	56.44	85.80	37.01	42.75	81.15	103.75
Correlação								
rgloc	0.84	0.36	0.15	0.63	0.34	0.10	0.10	0.08

Análise de Associação Genômica

Os SNPs utilizados para GWAS estavam distribuídos em todos os cromossomos no genoma da soja conforme cariograma feito no software R, apresentado na Figura 2. Foi possível notar que existem poucos *gaps* dentro do cromossomo que não contemplaram nenhum SNP e que, por consequência, poderiam não informar um possível QTL de resistência da soja à PBH.

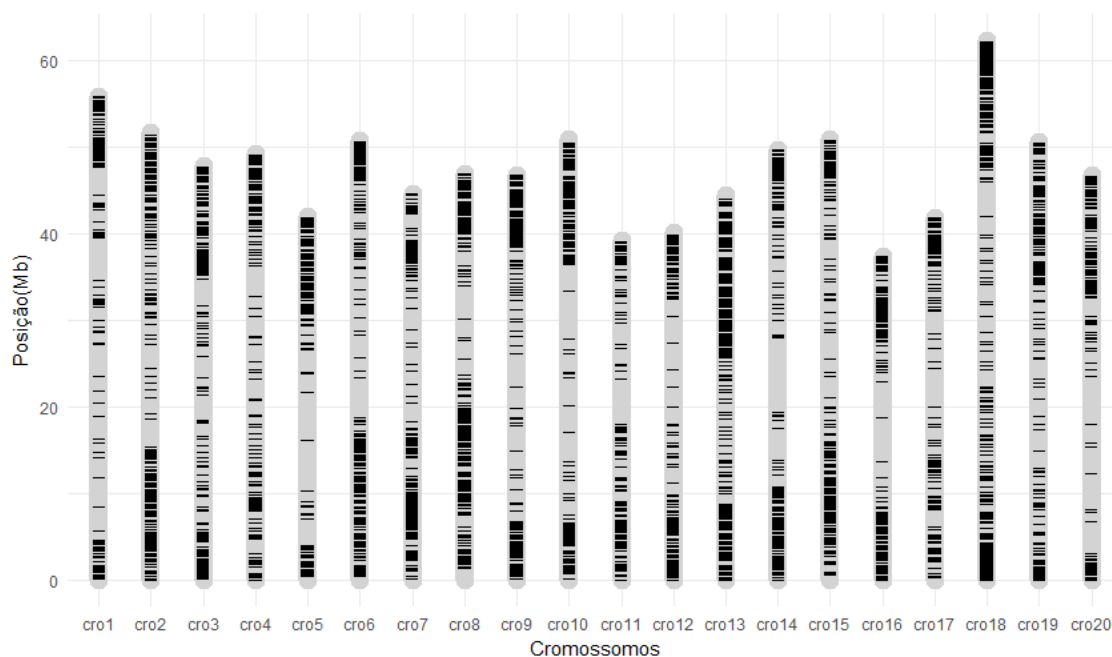


Figura 2 – Posição dos 3753 *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) nos cromossomos da soja. Representação em escala de Megabase (1Mb = 1.000.000 pares de base).

Ao todo foram detectados 25 e 10 SNPs significativos em 14 cromossomos diferentes nos ensaios de 2016 e 2017, respectivamente (Tabela 3 e Figuras suplementares). Foram considerados significativos SNPs com $-\log_{10}(\text{p.valor}) > 3$. Não houve coincidência de marcadores entre os experimentos. A heterogeneidade de marcadores entre os experimentos pode ser explicada devido ao caráter quantitativo da característica, facilmente influenciada pelo ambiente.

Em GWAS, geralmente se tem grande número de alelos raros com pequeno efeito para características de baixa herdabilidade (Wallace et al., 2016). A reação da soja à *S. sclerotiorum* é uma característica comandada por vários genes de pouco efeito cada. Por isso foram admitidos marcadores com baixa frequência ($\text{MAF} > 0,05$), a fim de detectar alelos raros, que também poderiam influenciar a característica (Tabela 3).

Por meio dos dados fenotípicos utilizados para a característica comprimento de lesão foi possível identificar os marcadores que estão associados com as menores taxas de progresso da PBH ao longo dos dias de avaliação.

Houve marcadores significativos localizados dentro de QTLs em ambos os anos. Em 2016, os SNPs Gm06_37823440 e o Gm09_5514307 foram significativos e estão dentro dos QTLs Sclero 7-1 e Sclero 1-3, respectivamente, controladores de resistência à *S. sclerotiorum* em soja (Huynh et al., 2010; Kim and Diers, 2000). Os marcadores Gm08_1923992, Gm08_2341591, Gm08_2671408, Gm08_2622664 e Gm11_30227104 foram significativos em mais de uma característica e não estão em nenhuma região confirmada para reação à PBH, segundo o banco de dados *SoyBase*. Os SNPs Gm16_37078478, Gm16_33457667 e Gm16_34685922 foram significativos apenas para uma característica e também não estão inseridos em nenhum QTL já descrito como controlador de resistência à *S. sclerotiorum*.

Os SNPs Gm09_7953606, Gm09_8831480 e Gm09_12801032, detectados em 2017, também estão localizados no QTL Sclero 1-3, descrito por Kim and Diers (2000), enquanto o marcador Gm08_41318101 está dentro do QTL Sclero 9-2 descrito por Guo et al., (2008). Os demais marcadores estão próximos à QTLs já descritos ou se encontram em regiões que ainda não foi relatado nenhuma reação à *S. sclerotiorum* (Tabela suplementar 1). Em ambos os anos houve uma quantidade maior de SNPs nas avaliações finais, devido ao fato de haver maior variabilidade quanto à reação das plantas à infecção do patógeno.

Tabela 3 - Significância de SNPs associados com a avaliação de nota pelo *straw test* aos 3, 7, 10 e 14 dias após inoculação (N3, N7, N10 e N14, respectivamente) e progresso do comprimento de lesão entre 0, 3, 7, 10 e 14 dias após inoculação (CL0-3, CL3-7, CL7-10 e CL10-14, respectivamente) em plantas de soja [*Glycine max* L. Merrill] (n=146) avaliadas em 2016 e 2017.

Ambientes									
Caract	2016				Caract	2017			
	SNP_id*	P.value	maf	r ²		SNP_id*	P.value	maf	r ²
N3	Gm18_7012291	5.22E-04	0.4	0.182	N3	Gm14_13510414	9.29E-04	0.38	0.134
N7	Gm09_5514307	9.95E-04	0.5	0.143	N7	Gm15_10467095	4.04E-04	0.14	0.144
N10	Gm05_1705841	5.22E-04	0.4	0.182		Gm08_41318101	6.90E-04	0.29	0.137
N10	Gm05_1744708	5.95E-04	0.38	0.180	N10	Gm08_9179927	3.40E-04	0.07	0.142
N14	Gm07_39225759	8.50E-04	0.2	0.184					
N14	Gm08_1923992	2.46E-05	0.09	0.233					
N14	Gm08_2341591	5.60E-05	0.1	0.221					
N14	Gm08_2622664	2.06E-05	0.1	0.235					
N14	Gm08_2671408	5.33E-05	0.09	0.222					
N14	Gm11_24911566	8.47E-04	0.1	0.184					
N14	Gm11_30227104	1.88E-04	0.12	0.204					
N14	Gm12_6295017	4.15E-04	0.25	0.194					
N14	Gm16_35257348	9.02E-04	0.34	0.183					
CL0-3	Gm04_5950275	4.02E-04	0.288	0.125	CL0-3	Gm20_34881595	5.46E-04	0.423	0.161
CL3-7	Gm05_9097414	4.81E-04	0.137	0.180	CL0-3	Gm20_34942502	5.46E-04	0.423	0.161
CL3-7	Gm05_9012813	4.81E-04	0.137	0.180					
CL3-7	Gm07_14979158	5.28E-04	0.099	0.179					
CL3-7	Gm08_1923992	1.40E-05	0.086	0.230					
CL3-7	Gm08_2341591	3.77E-05	0.099	0.216					
CL3-7	Gm08_2622664	4.05E-05	0.096	0.215					
CL3-7	Gm08_2671408	1.08E-04	0.092	0.201					
CL3-7	Gm08_2341591	7.05E-04	0.099	0.207					
CL3-7	Gm19_50545618	4.30E-04	0.116	0.181					
CL7-10	Gm15_46698746	5.95E-04	0.144	0.192					
CL10-14	Gm06_37823440	5.36E-04	0.175	0.211	CL10-14	Gm09_7953606	5.64E-04	0.125	0.165

Continua

Continuação

Ambientes									
2016					2017				
Caract	SNP_id*	P.value	maf	r ²	Caract	SNP_id*	P.value	maf	r ²
CL10-14	Gm08_1923992	1.40E-05	0.086	0.230	CL10-14	Gm09_8831480	5.78E-04	0.118	0.164
CL10-14	Gm08_2341591	3.77E-05	0.099	0.216	CL10-14	Gm09_12801032	1.38E-04	0.125	0.187
CL10-14	Gm08_2671408	1.08E-04	0.092	0.201	CL10-14	Gm09_28218304	2.55E-04	0.081	0.177
CL10-14	Gm11_30227104	1.83E-04	0.116	0.225					
CL10-14	Gm11_1874390	2.94E-04	0.171	0.219					
CL10-14	Gm11_30588492	7.36E-04	0.120	0.207					
CL10-14	Gm16_37078478	3.48E-04	0.168	0.217					
CL10-14	Gm16_33457667	6.42E-04	0.360	0.209					
CL10-14	Gm16_34685922	8.48E-04	0.329	0.205					

* SNP_id indica o cromossomo e a posição do SNP, MAF indica a frequência do menor alelo, r2 indica a variação fenotípica explicada pelo marcador.

Desequilíbrio de Ligação

A análise de desequilíbrio de ligação foi realizada com os marcadores significativos (Tabela 4). Dos 35 SNPs detectados para os experimentos, nove formaram blocos de ligação gênica. Entretanto, os loci N14_2 e CL10-14_2 se sobrepuseram, assim como os loci N14_4 e CL10-14_4 em 2016. Desta forma 27 loci diferentes foram identificados neste trabalho como controladores da reação de cultivares brasileiras de soja à infecção de *S. sclerotiorum*, sendo que dez desses loci possuíam pelo menos dois SNPs. Assim, é possível evidenciar que algumas regiões responsáveis por controlar a resistência à PBH estão em alto desequilíbrio de ligação e, portanto, podem auxiliar em seleções assistidas ao selecionar os haplótipos desejáveis além de apontar maiores quantidades de genes que podem estar relacionados com a resistência ao patógeno.

De todos os loci observados, 4 estão inseridos dentro de QTLs já descritos, 7 estão em regiões que flanqueiam outros QTLs e 16 estão em regiões que ainda não foram descritas nenhuma reação à *S. sclerotiorum* (Tabela Suplementar 1).

Haplótipos controladores da característica

Com posse dos loci responsáveis pela resistência à PBH na soja, foi possível verificar os haplótipos que controlam as características avaliadas. Em 2016, houve 33 haplótipos em 14 cromossomos diferentes (Tabela 5). De todos os haplótipos formados, apenas o referente a N14 (nota aos 14 DAI) não foi informativo. Todos os outros haplótipos apresentaram variação sobre a média fenotípica devido ao efeito de substituição alélica.

Em 2017, foi possível observar 15 haplótipos formados em 5 cromossomos diferentes (Tabela 6). Todos os haplótipos formados apresentaram alguma variação. Diferenças mínimas entre os haplótipos já eram esperadas devido à baixa influência de cada marcador sobre o fenótipo. Provavelmente, em blocos de marcadores sob desequilíbrio de ligação a variação fenotípica tende a ser maior devido a participação de mais alelos influenciando a característica.

Tabela 4 - Locus controladores das características nota pelo *straw test* aos 3, 7, 10 e 14 dias após inoculação (N3, N7, N10 e N14, respectivamente) e progresso do comprimento de lesão entre 0, 3, 7, 10 e 14 dias após inoculação (CL0-3, CL3-7, CL7-10 e CL10-14, respectivamente), em plantas de soja [*Glycine max* L. Merrill] (n=146) avaliadas em 2016 e 2017 para resistência fisiológica à PBH.

Carac	2016				Carac	2017							
	Locus	Crom	Intervalo	r ^{2a}		Locus	Crom	Intervalo	r ^{2a}				
N3	N3_1	18	7012291-7012291	1	N3	N3_1	14	13510414-13510414	1				
N7	N7_1	9	5514307-5514307	1	N7	N7_1	8	41318101-41318101	1				
N10	N10_1	5	1705841-1744708	0.965		N7_2	15	10467095-10467095	1				
N14	N14_1	7	39225759-39225759	1	N10	N10_1	8	9179927-9179927	1				
	N14_2	8	1923992-2622664	0.806									
	N14_3	8	2622664-2671408	0.902									
	N14_4	11	24911566-30227104	0.944									
	N14_5	12	6295017-6295017	1									
	N14_6	16	35257348-35257348	1									
CL0-3	CL0-3_1	4	5950275-5950275	1	CL0-3	CL0-3_1	20	34881595-34942502	0.916				
CL3-7	CL3-7_1	5	9012813-9097414	1									
	CL3-7_2	7	14979158-14979158	1									
	CL3-7_3	19	50545618-50545618	1									
CL7-10	CL7-10_1	15	46698746-46698746	1									
CL10-14	CL10-14_1	6	37823440-37823440	1	CL10-14	CL10-14_1	9	7953606-12801032	0.810				
	CL10-14_2	8	1923992-2671408	0.893						CL10-14_2	9	28218304-28218304	1
	CL10-14_3	11	1874390-1874390	1									
	CL10-14_4	11	24911566-30588492	0.921									
	CL10-14_5	16	33457667-34685922	0.8									
	CL10-14_6	16	37078478-37078478	1									

Tabela 5 - Haplótipos formados a partir dos blocos de desequilíbrio de ligação para nota pelo straw test aos 3, 7, 10 e 14 dias após inoculação (N3, N7, N10 e N14, respectivamente) e progresso do comprimento de lesão entre 0, 3, 7, 10 e 14 dias após inoculação (CL0-3, CL3-7, CL7-10 e CL10-14, respectivamente) em plantas de soja [*Glycine max* L. Merrill] (n=146) avaliadas em 2016 para resistência fisiológica à PBH.

Crom	Posição(pb)		SNPs	Alelos	Haplótipos	Média	Locus
	Começo	Fim					
4	5950275	5950275	Gm04_5950275	G/A	G	3.27	CL0-3_1
					A	3.29	
5	9012813	9097414	Gm05_9012813	A/G	GA	2.33	CL3-7_1
			Gm05_9097414	G/A	AG	2.74	
5	1705841	1744708	Gm05_1705841	A/G	AG	2.86	N2_1
			Gm05_1744708	G/A	GA	2.79	
6	37823440	37823440	Gm06_37823440	T/C	T	2.50	CL10-14_1
					C	1.69	
7	14979158	14979158	Gm07_14979158	T/C	T	2.83	CL3-7_2
					C	2.33	
7	39225759	39225759	Gm07_39225759	C/T	C	3.12	N14_1
					T	3.2	
8	1923992	2671408	Gm08_1923992	T/C	CACC TGTT	1.72 3.16	CL10-14_2
			Gm08_2341591	G/A			
			Gm08_2622664	T/C			
			Gm08_2671408	T/C			
8	1923992	2671408	Gm08_1923992	T/C	CACC TGTT	3.16 3.47	N14_2
			Gm08_2341591	G/A			
			Gm08_2622664	T/C			
			Gm08_2671408	T/C			
9	5514307	5514307	Gm09_5514307	C/T	C	2.80	N7_1
					T	2.76	
11	30227104	30588492	Gm11_24911566	T/C	TAT CGG	3.16 3.37	N14_4
			Gm11_30227104	A/G			
			Gm11_30588492	T/G			
12	6295017	6295017	Gm12_6295017	A/C	A	3.15	N14_5
					C	3.30	
15	46698746	46698746	Gm15_46698746	T/C	T	0.66	CL7-10_1
					C	0.25	
16	33457667	34685922	Gm16_33457667	T/G	TG	1.67	CL10-14_5
			Gm16_34685922	G/A	GA	2.36	
					GG	1.83	
16	35257348	35257348	Gm16_35257348	T/C	T	3.15	N14_6
					C	3.3	
18	7012291	7012291	Gm18_7012291	T/C	T	2.19	N3_1
					C	2.19	
19	50545618	50545618	Gm19_50545618	G/A	G	2.79	CL3-7_3
					A	2.33	

Crom = Cromossomo; Média = media fenotípica para cada haplótipo considerando todos os indivíduos portadores de cada alelo.

Tabela 6 - Haplótipos formados a partir dos blocos de desequilíbrio de ligação para nota pelo straw test aos 3, 7, 10 e 14 dias após inoculação (N3, N7, N10 e N14, respectivamente) e progresso do comprimento de lesão entre 0, 3, 7, 10 e 14 dias após inoculação (CL0-3, CL3-7, CL7-10 e CL10-14, respectivamente) em plantas de soja [*Glycine max* L. Merrill] (n=146) avaliadas em 2017 para resistência fisiológica à PBH.

		Posição(pb)		SNPs	Alelos	Haplótipos	Média	Locus
Crom	Começo	Fim						
8	41318101	41318101	Gm08_41318101	A/G	A G	3.21	N7_1	
						3.24		
8	9179927	9179927	Gm08_9179927	C/T	C T	5.15	N10_1	
						5.22		
9	7953606	12801032	Gm09_7953606	G/T	TGC TGT GAT	6.63	CL10-14_1	
						6.18		
						5.6		
9	28218304	28218304	Gm09_28218304	A/G	A G	5.57	CL10-14_2	
						6.62		
14	13510414	13510414	Gm14_13510414	A/G	A G	2.47	N3_1	
						2.48		
15	10467095	10467095	Gm15_10467095	G/A	G A	3.22	N7_2	
						3.23		
20	34881595	34942502	Gm20_34881595	C/T	CG TA	3.52	CL0-3_1	
						3.53		

Crom = Cromossomo; Média = media fenotípica para cada haplótipo considerando todos os indivíduos portadores de cada alelo.

DISCUSSÃO

Fenotipagem do painel de cultivares

A reação da PBH em soja pode ser mensurada por algumas metodologias como os métodos de algodão com micélio, disco de inoculo no folíolo, disco de inoculo na ponteira e spray de micélio (Bastien et al., 2012; Garcia et al., 2015; Chen and Wang, 2005). Quando se trata de avaliação de genótipos em casa de vegetação, o método *straw test* é muito utilizado (Kull et al., 2003; Auclair et al., 2004; Pascual et al., 2010; Bastien et al., 2012). Nós utilizamos a avaliação de notas e de comprimento de lesão como comumente é feito. Entretanto, avaliamos a diferença de comprimento de lesão ao longo dos quatro dias de mensuração, a fim de comparar a progressão da doença nos diferentes genótipos. Essa alteração na interpretação dos resultados foi importante para detectar SNPs significativos em nosso trabalho.

Densidade de Marcadores

Foram utilizados 3753 marcadores SNPs em nosso trabalho após limpeza via MAF e call rate preestabelecidos. Huynh et al., (2010) utilizaram 50 a 90 marcadores SSR para detecção de QTLs responsáveis por resistência parcial à PBH em soja. Li et al.,

(2010) também utilizaram 109 marcadores SSR para mapeamento de QTLs no estudo de resistência parcial a PBH em 149 RILs (Recombinant Inbreed Lines) providas do cruzamento entre duas cultivares. Comparado a estes autores, o número de marcadores que utilizamos é consideravelmente maior e pode facilitar a detecção de QTLs.

Contreras-Soto et al., (2017) utilizaram 3780 SNPs, também advindos da plataforma Illumina BARCSoySNP6K BeadChip, visando a detecção de marcadores significativos para produtividade, altura de plantas e peso de 100 sementes em diferentes ambientes de avaliação. Os autores mostraram que esta quantidade de SNPs foi satisfatória para a realização do estudo de associação genômica ampla em características de baixa herdabilidade.

Em trabalho de GWAS para resistência parcial da soja à *S. sclerotiorum*, Bastien et al., 2014 utilizaram 7864 SNPs. Essa quantidade de marcadores pode ser necessária para evitar grandes faixas dentro de cromossomos que não possuem SNPs, os chamados gaps. Entretanto, mesmo possuindo gaps em nosso estudo, foi possível identificar QTLs descritos na literatura como controladores de resistência à PBH. Além disso, outras regiões foram identificadas como possíveis controladoras da resistência.

Associação Genômica Ampla

A resistência parcial da soja ao agente *Sclerotinia sclerotiorum* é um caráter quantitativo, principalmente quando se trata de resistência fisiológica avaliada em ambiente controlado (Miklas et al., 2001). Isso indica que vários genes são responsáveis por este caráter. A GWAS é uma ferramenta de grande utilidade, pois permite identificar marcadores relacionados com a característica ao longo de todo o genoma da espécie, facilitando a descoberta de novos QTLs, genes, e ainda pode auxiliar a seleção assistida no futuro (Unêda-Trevisoli, 2017).

A utilização de haplótipos relacionados com os as informações marcadores-fenótipo podem favorecer as análises de GWAS, uma vez que é possível dissecar de modo mais refinado os loci responsáveis por uma característica complexa (Lorenz et al., 2010). Em nosso trabalho, vários haplótipos baseados nos SNPs significativos foram formados. Os maiores blocos em desequilíbrio de ligação foram observados nos locus N14_2 em 2016 e CL10-14_1 em 2017. O loci N14_2, por exemplo, não se encontra em nenhuma região descrita, está em alto desequilíbrio de ligação (Figura 2a) e auxiliou a redução de notas da doença em até 45% (Tabela 5). Já o loci CL10-14_1, observado em 2017, está inserido em um QTL já descrito por Kim and Diers (2000), se encontra em alto desequilíbrio de ligação no cromossomo 9 (Figura 2b) e formou haplótipos que

influenciaram diretamente o fenótipo variando a progressão da doença em até 16% (Tabela 6). Os demais locus observados nos dois anos apresentaram blocos de desequilíbrio de ligação menores. Contudo, a maioria dos haplótipos formados em cada loci apresentou alguma variação no fenótipo, com exceção do loci N3_1 observado no ano de 2016 (Tabela 5).

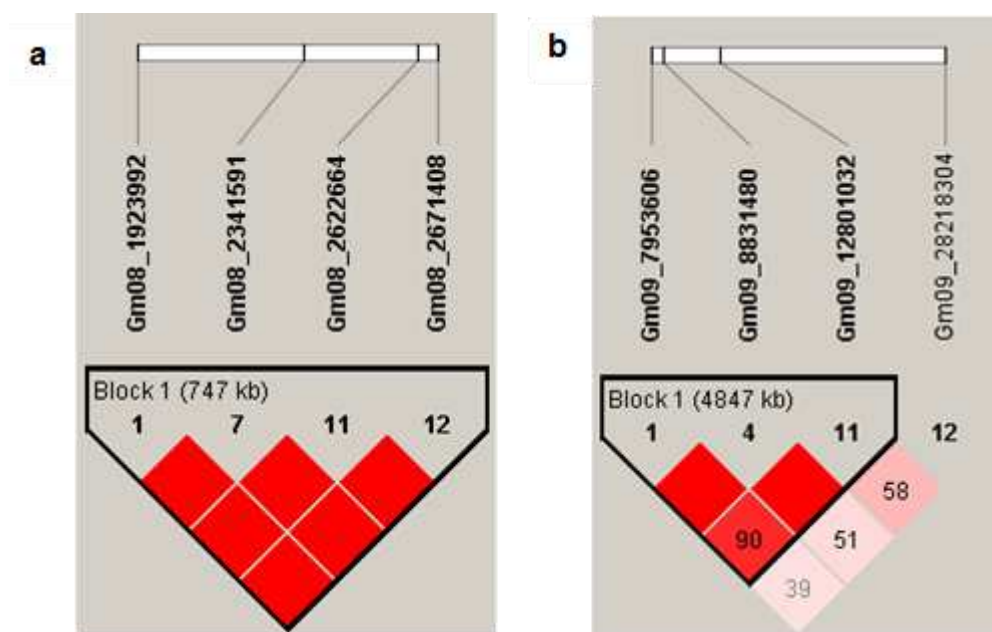


Figura 2 – a) bloco de desequilíbrio de ligação formado por SNPs significativos localizados no cromossomo 8, no ano de 2016. b) bloco de desequilíbrio de ligação formado por SNPs significativos localizados no cromossomo 9, em 2017.

Genes e Proteínas candidatos

A identificação de genes e proteínas responsáveis por desencadear respostas de defesas da planta ao patógeno através da maquinaria celular é importante para o programa de melhoramento (AFZAL et al., 2008). Os genes e proteínas identificados neste trabalho foram verificados para cada bloco de desequilíbrio de ligação contendo mais de um marcador ou para cada SNP significativo isolado com uma faixa de 2000 pares de base para mais e para menos. Após a filtragem das regiões que envolvem os locus encontrados neste estudo, foram reconhecidos 67 genes candidatos em 5 cromossomos diferentes em 2016 e 23 genes em 3 cromossomos diferentes em 2017 (Tabela Suplementar 2).

Já é conhecido que genes da família TIR-NBS-LRR são responsáveis por resistência de plantas a doenças (Meyers et al., 2002). A defesa basal das plantas compreende o reconhecimento da infecção em que as plantas são capazes de perceber sinais moleculares produzidos pelo patógeno, tais como quinases e leucine-rich (Dangl et al., 2013, Zipfel 2008). Hok et al., (2011) demonstraram que as famílias das proteínas

kinases e leucine-rich repeats (LRR) estão envolvidos com a resposta inicial das plantas com o patógeno *Hyaloperonospora arabidopsidis*, causador de oídeo em Arabidopsis. Em tomate, Dixon et al., (1996) sugeriram que além destas proteínas estarem envolvidas com a resistência à *Cladosporium fulvum*, causador de mofo da folha de tomate, interagem com outro complexo de proteínas que auxiliam na defesa da planta. Estas proteínas e enzimas foram encontradas em vários genes do nosso estudo, em ambos os anos.

As carboxylesterases também apresentam papel importante na defesa das plantas à patógenos, apesar de não ser bem descrito a ação dessas enzimas. Já foi relatado que esterases são capazes de prevenir o ataque de patógenos, principalmente bactérias, tendo importante papel nas reações de hidrólise (Gershater e Edwards, 2007). Esta enzima foi verificada atuando no gene Glyma09g08640.1 localizado no cromossomo 9. Outro gene localizado neste mesmo cromossomo foi o Glyma09g08780.1, responsável pela síntese de *chalcone synthase*. Esta enzima também é importante na defesa das plantas à bactérias e fungos, provocando o acúmulo de flavonoides e isoflavonóides e interferindo na via de defesa do ácido salicílico (Dao et al., 2011).

Outro gene que tem relação com a resposta de defesa das plantas é o complexo do ATP-binding. Em 2016 foram verificados o gene Glyma05g02370.1 no cromossomo 5, os genes Glyma08g02960.1, Glyma08g03100.1, Glyma08g03110.1, Glyma08g03690.1 e Glyma08g03730.1 no cromossomo 8 e os genes Glyma16g29890.1, Glyma16g30030.1 e Glyma16g30120.1 no cromossomo 16 responsáveis pela síntese dessas proteínas/enzimas. Todos esses genes estão inseridos em regiões ainda não descritas para reação à *S. sclerotiorum* segundo o banco de dados Soybase (Grant et al., 2010). Campbell et al. (2003) demonstraram em seu estudo um gene pertencente a este complexo ATP-Binding (AtPDR12), responsável pela defesa da planta quando houve acúmulo de ácido salicílico e sensibilidade a jasmonatos e etileno em Arabidopsis.

Genes responsáveis pelo complexo ABC Transporter também são responsáveis por resistência de plantas a patógenos. Krattinger et al. (2009) revelaram em seu estudo que um gene desta família tem papel fundamental na resistência de trigo à ferrugem das folhas, ferrugem e oídio. Em 2017, pôde-se observar o gene Glyma09g08730.1 que confere transcrição dessas proteínas, localizado no cromossomo 9. Este gene está inserido dentro de um QTL para reação à *S. sclerotiorum* (Kim and Diers, 2000), o que indica que provavelmente é expresso para tal característica.

As proteases são proteínas de uma família que podem estar envolvidas no processo de infecção de patógenos à plantas. No entanto, para plantas, os inibidores de proteases são verdadeiramente importantes pois ajudam a regular as infecções por agentes patogênicos (Habib and Fazili, 2007). No ano de 2017 um gene dessa família foi verificado do cromossomo 9, nomeado Glyma09g09390.1.

Uma família de proteínas considerada muito importante na defesa das plantas contra patógenos são as chamadas dedo de zinco (*zinc finger*). Guo et al., (2009) mostraram que proteínas do complexo dedo de zinco podem aumentar a tolerância de plantas a estresse salino e resistência a *Rhizoctonia solani* para plantas de tabaco. Genes dessa família foram detectados nos dois experimentos, o que nos leva a acreditar que também têm papel importante na reação a *S. sclerotiorum* em soja.

CONCLUSÕES

Este estudo revelou novas possíveis regiões no genoma da soja relacionadas com a resistência ou suscetibilidade à PBH. Programas de melhoramento genético poderão se beneficiar desse estudo a partir de métodos de seleção assistida ou de direcionamento de cruzamentos a fim de obter futuros genótipos com maior resistência parcial à *S. sclerotiorum* em soja.

A diferença entre ambientes para características quantitativas leva a diferentes expressões gênicas. Isso foi claramente evidenciado nos dois ensaios realizados neste estudo. Em duas condições claramente diferentes, o mecanismo de resistência das plantas se mostrou mais ativo no experimento de 2016, com um total de 67 genes. Já para 2017, houve um total de 23 genes detectados. Assim, sob diferentes condições, pode-se concluir que o fungo é capaz de suprimir alguns mecanismos de defesa das plantas de soja, tornando-as mais suscetíveis.

Vários marcadores em regiões não descritas foram identificados. A diversidade de cultivares foi de suma importância para detectar essas novas regiões que podem estar relacionadas com a reação a PBH. Novos estudos devem ser realizados para validação dos SNPs significativos para as características aqui avaliadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFZAL, A. J.; WOOD, A. J.; LIGHTFOOT, D. A., 2008. Plant receptor-like serine threonine kinases: roles in signaling and plant defense. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 21, n. 5, p. 507-517.

ARAHANA, V.S., GRAEF, G.L., SPECHT, J.E., STEADMAN, J.R., ESKRIDGE, K.M., 2001. Identification of QTLs for Resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in Soybean. **Crop Sci.** 41(1):180-188. SoyBase, the USDA-ARS soybean genetics and genomics database.

AUCLAIR J., BOLAND G.J., KOHN L.M., RAJCAN I., 2004 Genetic Interactions Between Glycine max and *Sclerotinia sclerotiorum* Using a Straw Inoculation Method. **Plant Disease.** 88:891-895.

BARRETT J.C., FRY B., MALLER J., DALY M.J., 2005. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics.**

BASTIEN M., HUYNH T.T., GIROUX G., IQUIRA E., RIOUX S., AND BELZILE F., 2012. A reproducible assay for measuring partial resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Can. J. Plant Sci.** 92: 279288 doi:10.4141/CJPS2011-101

Bastien M.; Sonah H.; Belzile F., 2014. Genome Wide Association Mapping of *Sclerotinia sclerotiorum* Resistance in Soybean with a Genotyping-by-Sequencing Approach. **The Plant Genome**, Vol. 7, no. 1

CAMPBELL E. J., SCHENK P. M., KAZAN K., PENNINCKX I. A. M. A., ANDERSON J. P., MACLEAN D. J., CAMMUE B. P. A., EBERT P. R., AND MANNERS J. M., 2003. Pathogen-Responsive Expression of a Putative ATP-Binding Cassette Transporter Gene Conferring Resistance to the Diterpenoid Sclareol Is Regulated by Multiple Defense Signaling Pathways in Arabidopsis. **Plant Physiol.** Vol. 133, 1272-1284

CHEN, Y., AND WANG, D. 2005. Two convenient methods to evaluate soybean for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Dis.** 89:1268-1272.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento**. V. 3 - SAFRA 2015/16- N. 12- Décimo Segundo levantamento. SETEMBRO 2016

CONTRERAS-SOTO R. I., MORA F., OLIVEIRA M. A. R., HIGASHI W., SCAPIM C. A., SCHUSTER I., 2017. A Genome-Wide Association Study for Agronomic Traits in Soybean Using SNP Markers and SNP-Based Haplotype Analysis. **PLOS ONE** | DOI:10.1371/journal.pone.0171105

DANGL, J. L., HORVATH, D. M., AND STASKAWICZ, B. J. 2013. Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. **Science** 341:746-751.

DAO T. T. H., LINTHORST H. J. M., VERPOORTE R., 2011. Chalcone synthase and its functions in plant resistance. **Phytochem** 10:397–412 DOI 10.1007/s11101- 11- 211-7

DE BRUIN J. L. AND PEDERSEN P., 2008. Effect of Row Spacing and Seeding Rate on Soybean Yield. **Agronomy Journal** 100:704–710 doi:10.2134/agronj2007.0106

DIXON M. S., JONES D. A., KEDDIE J. S., THOMAS C. M., HARRISON K. AND JONES J. D. G., 1996. The Tomato *Cf-2* Disease Resistance Locus Comprises Two Functional Genes Encoding Leucine-Rich Repeat Proteins. **Cell**, Vol. 84, 451–459

DUVICK, J., FU, A., MUPPIRALA, U., SABHARWAL, M., WILKERSON, M. D., LAWRENCE, C. J., ... BRENDEL, V. (2008). PlantGDB: a resource for comparative plant genomics. **Nucleic Acids Research**, 36(Database issue), D959–D965. <http://doi.org/10.1093/nar/gkm1041>

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E., 1977. Stages of soybean development. Ames, Yowa: Yowa State University of Science and Technology, **Cooperative Extension Service**. 11 p. n. 80.

GAO H, WILLIAMSON S, BUSTAMANTE C.D., A Markov Chain Monte Carlo approach for joint inference of population structure and inbreeding rates from multilocus genotype data. **Genetics**. 2007; 176: 1635±1651. doi: 10.1534/genetics.107.072371 PMID: 17483417

GARCIA R. A., MEYER M. C., ÁVILA K. A. G. B. E CUNHA M. G., 2015. Inoculation methods of *Sclerotinia sclerotiorum* for screening of soybean cultivars resistant to white mold. **Pesq. agropec. bras., Brasília**, v.50, n.8, p.726-729, DOI: 10.1590/S0100-204X2015000800011

GERSHATER M. C., EDWARDS R., 2007. Regulating biological activity in plants with carboxylesterases. **Plant Science** 173 (2007) 579–588

GRANT, D., NELSON, R.T., CANNON, S.B. AND SHOEMAKER, R.C., 2010 SoyBase, the USDA-ARS soybean genetics and genomics database. *Nucl. Acids Res.* (2010) 38 (suppl 1): D843-D846. doi: 10.1093/nar/gkp798

GUO, X., WANG, D., GORDON, S., HELLIWELL, E., SMITH, T., BERRY, S., ST. MARTIN, S., DORRANCE, A., 2008. Genetic mapping of QTLs underlying partial resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in Soybean PI 391589A and PI 391589B. **Crop Sci.**, 48(3):1129-1139

GUO Y., YU Y., WANG D., WU C., YANG G., HUANG J. AND ZHENG C., 2009. GhZFP1, a novel CCCH-type zinc finger protein from cotton, enhances salt stress tolerance and fungal disease resistance in transgenic tobacco by interacting with GZIRD21A and GZIPR5. **New Phytologist** 183: 62–75.

HABIB H. AND FAZILI K. M., 2007. Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. **Biotechnology and Molecular Biology Review** Vol. 2 (3), pp. 068-085

HAMBLETON S, WALKER C, KOHN LM, 2002. Clonal lineages of *Sclerotinia sclerotiorum* previously known from other crops predominate in 1999–2000 samples from Ontario and Quebec soybean. **Canadian Journal of Plant Pathology** 24, 309–15.

HARTL DL, CLARK AG (1997) Principles of population genetics. Sinauer Associates Inc., Sunderland.

HAYES B., 2007. QTL Mapping, MAS, and Genomic Selection. **BMC Genetics**

HOFFMAN, D. D., DIERS, B. W., HARTMAN, G. L., NICKELL, C. D., NELSON, R. L., PEDERSEN, W. L., COBER, E. R., GRAEF, G. L., STEADMAN, J. R., GRAU, C. R., NELSON, B. D., DEL RIO, L. E., HELMS, T., ANDERSON, T., POYSA, V., RAJCAN, I., AND STIENSTRA, W. C. 2002. Selected soybean plant introductions with partial resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**. 86:971-980.

HOK S., DANCHIN E. G. J., ALLASIA V., PANABIÈRES F., ATTARD A., KELLER H., 2011. An Arabidopsis (malectin-like) leucine-rich repeat receptor-like kinase contributes to downy mildew disease. **Plant, Cell and Environment** 34, 1944–1957

HUYNH, T.T., BASTIEN, M., IQUIRA, E., TURCOTTE, P., BELZILE, F., 2010. Identification of QTLs Associated with Partial Resistance to White Mold in Soybean Using Field-Based Inoculation. **Crop Sci**. 2010, 50(3):969-979. SoyBase, the USDA-ARS soybean genetics and genomics database.

HWANG EY, SONG Q, JIA G, SPECHT JE, HYTEN DL, et al., 2014 A genome-wide association study of seed protein and oil content in soybean. **BMC Genomics**.; 15: 1. doi: 10.1186/1471-2164-15-1 PMID: 24382143

KIM, H.S., DIERS, B.W., 2000. Inheritance of partial resistance to *Sclerotinia* stem rot in soybean. **Crop Sci**. 40(1):55-61. SoyBase, the USDA-ARS soybean genetics and genomics database.

KOLKMAN, J. M., AND KELLY, J. D. 2002. Agronomic traits affecting resistance to white mold in common bean. **Crop Sci**. 42:693-699.

KRATTINGER S. G., LAGUDAH E. S., SPIELMEYER W., SINGH R. P., HUERTA-ESPINO J., HELEN MCFADDEN, BOSSOLINI E., SELTER L. L., KELLER B., 2009.

A Putative ABC Transporter Confers Durable Resistance to Multiple Fungal Pathogens in Wheat. **Science** 323, 1360-1363

KULL, L. S., VUONG, T. D., POWERS, K. S., ESKRIDGE, K. M., STEADMAN, J. R., AND HARTMAN, G. L. 2003. Evaluation of resistance screening methods for *Sclerotinia* stem rot of soybean and dry bean. **Plant Dis.** 87:1471-1476.

KULL, L. S., PEDERSEN, W. L., PALMQUIST, D., AND HARTMAN, G. L. 2004. Mycelial compatibility grouping and aggressiveness of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Dis.** 88:325-332.

KURLE, J.E., C.R. GRAU, E.S. OPLINGER, AND A. MENGISTU. 2001. Tillage, crop sequence, and cultivar effects on *Sclerotinia* stem rot incidence and yield in soybean. **Agron. J.** 93:973–982. doi:10.2134/agronj2001.935973x

LEHNER, M. S.; PAULA JÚNIOR, T. J. ; SILVA, R. A.; VIEIRA, R. F. ; CARNEIRO, J. E. S.; SCHNABEL, G. ; MIZUBUTI, E. S. G. . Fungicide sensitivity of : A thorough assessment using discriminatory dose, EC , high resolution melt analysis and description of new point mutation associated with thiophanate-methyl resistance. **Plant Disease**, v. n/a, p. 150330082253001-1543, 2015.

LEHNER M. S., PAULA JÚNIOR T. J., HORA JUNIOR B. T., TEIXEIRA H., VIEIRA R. F., CARNEIRO J. E. S. AND MIZUBUTI E. S. G. 2015. Low genetic variability in *Sclerotinia sclerotiorum* populations from common bean fields in Minas Gerais State, Brazil, at regional, local and micro-scales. **Plant Pathology** 64, 921–931

LEITE, R. M. V. B, 2005. Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja.

LI, D., M. SUN, Y. HAN, W. TENG, AND W. LI. 2010. Identification of QTL underlying soluble pigment content in soybean stems related to resistance to soybean white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*). **Euphytica** 172(1):49–57. doi:10.1007/s10681-009-0036-z

LORENZ AJ, HAMBLIN MT, JANNINK J-L., 2010 Performance of Single Nucleotide Polymorphisms versus Haplotypes for Genome-Wide Association Analysis in Barley. **PLoS ONE**. 5: e14079. doi: 10.1371/journal.pone.0014079 PMID: 21124933

MEYERS B. C., MORGANTE M. AND MICHELMORE R. W., 2002. TIR-X and TIR-NBS proteins: two new families related to disease resistance TIR-NBS-LRR proteins encoded in Arabidopsis and other plant genomes. **The Plant Journal** 32, 77–92

MIKLAS, P. N.; JOHNSON, W. C.; DELORME, R.; GEPTS, P., 2001. QTL conditioning physiological resistance and avoidance to white mold in dry bean. **Crop Science**, v. 41, n. 2, p. 309-315.

MILA, A.L., AND X.B. YANG. 2008. Effects of fluctuating soil temperature and water potential on sclerotia germination and apothecial production of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Dis**. 92:78–82. doi:10.1094/PDIS-92-1-0078

PASCUAL, A., CAMPA, A., PÉREZ-VEGA, E., GIRALDEZ, R., MIKLAS, P. N., AND FERREIRA, J. J. 2010. Screening common bean for resistance to four *Sclerotinia sclerotiorum* isolates collected in northern Spain. **Plant Dis**. 94:885-890.

PETZOLDT, R., AND DICKSON, M. H. 1996. Straw test for resistance to white mold in beans. **Annu. Rep. Bean Imp. Coop**. 39:142-143

ROUSSEAU, G.X., D. DOSTALER, AND S. RIOUX. 2007. Effect of crop rotation and soil amendments on *Sclerotinia* stem rot on soybean in two soils. **Can. J. Plant Sci**. 87:605–614. doi:10.4141/P05-137

SCHWARTZ, H. F., AND SINGH, S. P. 2013. Breeding Common Bean for Resistance to White Mold: A Review. **Crop Sci**. 53: 1832-1844.

SONG Q, HYTEN DL, JIA G, QUIGLEY CV, FICKUS EW, et al., 2013. Development and evaluation of SoySNP50K, a high-density genotyping array for soybean. **PLoS One**. 8: e54985. doi: 10.1371/journal.pone.0054985 PMID: 23372807

STEADMAN, J. R., OTTO-HANSEN, L. K., POWERS, K. 2004. Identification of partial resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in common bean at multiple locations. **Annu. Rep. Bean Improv. Coop.** 47:281-282.

STEADMAN, J. R., OTTO-HANSEN, L. K., BREATHNACH, J. 2006. Identification of partial resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in common bean at multiple locations in 2005. **Annu. Rep. Bean Improv. Coop.** 49:223-224.

UNÊDA-TREVISOLI S.H., SILVA F.M., DI MAURO A.O., 2017. In: **Melhoramento da Soja**. Cap.14, p.348-371

WALLACE, J. G., ZHANG, X., BEYENE, Y., SEMAGN, K., OLSEN, M., PRASANNA, B. M., & BUCKLER, E. S., 2016. Genome-wide Association for Plant Height and Flowering Time across 15 Tropical Maize Populations under Managed Drought Stress and Well-Watered Conditions in Sub-Saharan Africa. **Crop Science**, 56(5), 2365-2378.

ZENG, W., W. KIRK, AND J. HAO. 2012. Field management of *Sclerotinia* stem rot of soybean using biological control agents. **Biol. Control** 60:141–147. doi:10.1016/j.biocontrol.2011.09.012

ZIPFEL, C. 2008. Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. **Curr. Opin. Immunol.** 20:10-16.

ANEXOS

Tabela suplementar 1 - Descrição quanto a localização de marcadores SNPs significativos e a posição de QTLs de reação à *S. sclerotiorum* no genoma da soja.

Ambiente	Crom	SNP	Descrição
2016	4	Gm04_5950275	Não descrito
	5	Gm05_9097414	Não descrito
	5	Gm05_9012813	
	5	Gm05_1705841	
	5	Gm05_1744708	
	6	Gm06_37823440	
	7	Gm07_14979158	Não descrito
	7	Gm07_39225759	
	8	Gm08_1923992	Não descrito
	8	Gm08_2341591	
	8	Gm08_2622664	
	8	Gm08_2671408	
	8	Gm08_2341591	
	8	Gm08_1923992	
	8	Gm08_2341591	
	8	Gm08_2622664	
	8	Gm08_2671408	
	9	Gm09_5514307	
	11	Gm11_30227104	Não descrito
	11	Gm11_1874390	
11	Gm11_30588492		

Continua

Continuação

Ambiente	Crom	SNP	Descrição
2016	11	Gm11_24911566	Não descrito
	11	Gm11_30227104	
	12	Gm12_6295017	Não descrito
	15	Gm15_46698746	Não descrito
	16	Gm16_37078478	Não descrito
	16	Gm16_33457667	
	16	Gm16_34685922	
	16	Gm16_35257348	
	18	Gm18_7012291	Próximo de Sclero 2-13 e Sclero 4-5
	19	Gm19_50545618	Não descrito
2017	8	Gm08_41318101	Sclero 9-2
	8	Gm08_9179927	Próximo de Sclero 2-2, Sclero 6-2, Sclero 5-1 e Sclero 3-2
	9	Gm09_7953606	Sclero 1-3
	9	Gm09_8831480	
	9	Gm09_12801032	
	9	Gm09_28218304	Não descrito
	14	Gm14_13510414	Não descrito
	15	Gm15_10467095	Não descrito
	20	Gm20_34881595	Próximo de Sclero 7-3
	20	Gm20_34942502	

Fonte: Banco de dados Soybase

Tabela suplementar 2 - Genes e proteínas candidatos dentro dos blocos de desequilíbrio de ligação ou região genômica vinculada aos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) associados com a resistência parcial à *S. sclerotiorum* em soja.

Ambiente	Crom	Intervalo (pb)				Descrição	
		Gene	Começo	Fim	Locus		
2016	5	Glyma05g09310.1	9044590	9046832	CL3-7_1	pyruvate kinase, putative	
		Glyma05g09260.1	9018339	9019670	CL3-7_1	eukaryotic translation initiation factor 5, putative / eIF-5, putative	
		Glyma05g09390.1	9097547	9097110	CL3-7_1	ferredoxin/thioredoxin reductase subunit A (variable subunit) 1	
		Glyma05g09400.1	9107051	9099525	CL3-7_1	D-erythro-sphingosine kinase/ diacylglycerol kinase	
		Glyma05g02370.1	1745573	1742929	N10_1	ATP binding / protein kinase/ protein serine/threonine kinase/ protein tyrosine kinase	
		Glyma05g02320.1	1708224	1712021	N10_1	(SKP1/ASK-interacting protein 16); protein binding	
	8	Glyma08g02860.1	1960570	1959019	CL10-14_2	zinc finger (RING-H2 type) protein-related	
		Glyma08g02960.1	2043681	2047062	CL10-14_2	ATP binding	
		Glyma08g02980.1	2064064	2066115	CL10-14_2	short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein	
		Glyma08g03010.1	2094820	2090667	CL10-14_2	serine/threonine/tyrosine kinase, putative	
		Glyma08g03070.1	2165068	2169245	CL10-14_2	protein kinase, putative	
		Glyma08g03100.1	2188010	2189892	CL10-14_2	ATP binding / protein kinase/ protein serine/threonine kinase/ protein tyrosine kinase	
		Glyma08g03110.1	2192182	2195502	CL10-14_2	ATP binding / kinase/ protein kinase/ protein serine/threonine kinase	
		Glyma08g03120.1	2203747	2196661	CL10-14_2	acetyl-CoA carboxylase/ biotin carboxylase	
		Glyma08g03240.1	2289489	2300162	CL10-14_2	GHMP kinase family protein	
		Glyma08g03340.1	2361540	2358046	CL10-14_2	protein kinase family protein	
		Glyma08g03400.1	2407757	2409301	CL10-14_2	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase	
		Glyma08g03540.1	2479021	2477829	CL10-14_2	zinc finger (CCCH-type) family protein	
		Glyma08g03690.1	2617206	2619638	CL10-14_2	ATP binding	
		Glyma08g03730.1	2664086	2668363	CL10-14_2	ATP binding / fructokinase/ glucokinase/ hexokinase	
		15	Glyma15g39830.1	4669952	46691303	CL7-10_1	protein binding / zinc ion binding

Continua

Continuação

Ambiente	Crom	Intervalo (pb)				Descrição
		Gene	Começo	Fim	Locus	
2016	16	Glyma16g29870.1	33516384	33513885	CL10-14_5	protein kinase family protein
		Glyma16g29890.1	33529927	33525704	CL10-14_5	ATP binding / aminoacyl-tRNA ligase/ nucleotide binding / proline-tRNA ligase
		Glyma16g30060.1	33735930	33728171	CL10-14_5	short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein
		Glyma16g30100.1	33766281	33761392	CL10-14_5	zinc finger (C2H2 type) family protein
		Glyma16g30030.1	33693739	33699432	CL10-14_5	ATP binding / kinase/ protein kinase/ protein serine/threonine kinase
		Glyma16g30040.1	33711897	33703061	CL10-14_5	short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein
		Glyma16g30050.1	33724146	33719220	CL10-14_5	short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein
		Glyma16g30070.1	33743047	33738810	CL10-14_5	short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein
		Glyma16g30120.1	33781569	33776428	CL10-14_5	ATP binding / microtubule motor
		Glyma16g30210.1	33899355	33896387	CL10-14_5	AT2G34930.1 disease resistance family protein
		Glyma16g30230.1	33908506	33907174	CL10-14_5	AT2G34930.1 disease resistance family protein
		Glyma16g30300.1	33965723	33963695	CL10-14_5	AT2G34930.1 disease resistance family protein
		Glyma16g30320.1	33975009	33971751	CL10-14_5	AT2G34930.1 disease resistance family protein
		Glyma16g30340.1	33984327	33981999	CL10-14_5	AT2G34930.1 disease resistance family protein
		Glyma16g30350.1	34013488	34010137	CL10-14_5	AT2G34930.1 disease resistance family protein
		Glyma16g30360.1	34030917	34027807	CL10-14_5	AT2G34930.1 disease resistance family protein
		Glyma16g30390.1	34049700	34047579	CL10-14_5	AT2G34930.1 disease resistance family protein
		Glyma16g30440.1	34076953	34074703	CL10-14_5	AT2G34930.1 disease resistance family protein
		Glyma16g30470.1	34093338	34090786	CL10-14_5	AT2G34930.1 disease resistance family protein
		Glyma16g30480.1	34101191	34098486	CL10-14_5	AT2G34930.1 disease resistance family protein
Glyma16g30520.1	34122796	34119628	CL10-14_5	AT2G34930.1 disease resistance family protein		
Glyma16g30510.1	34112899	34109171	CL10-14_5	kinase/ protein binding		
Glyma16g30570.1	34157104	34153734	CL10-14_5	AT2G34930.1 disease resistance family protein		

Continua

Continuação

Ambiente	Crom	Intervalo (pb)				Descrição
		Gene	Começo	Fim	Locus	
2016	16	Glyma16g30540.1	34134473	34131233	CL10-14_5	AT2G34930.1 disease resistance family protein
		Glyma16g30600.1	34177116	34174100	CL10-14_5	AT2G34930.1 disease resistance family protein
		Glyma16g30630.1	34191264	34187958	CL10-14_5	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative
		Glyma16g30650.1	34206165	34204137	CL10-14_5	AT2G34930.1 disease resistance family protein
		Glyma16g30680.1	34219419	34215892	CL10-14_5	AT2G34930.1 disease resistance family protein
		Glyma16g30700.1	34246007	34238171	CL10-14_5	AT2G34930.1 disease resistance family protein
		Glyma16g30750.1	34273095	34270999	CL10-14_5	AT2G34930.1 disease resistance family protein
		Glyma16g30780.1	34303522	34300448	CL10-14_5	AT2G34930.1 disease resistance family protein
		Glyma16g30830.1	34330194	34327899	CL10-14_5	AT2G34930.1 disease resistance family protein
		Glyma16g30910.1	34388242	34382901	CL10-14_5	kinase/ protein binding
		Glyma16g30950.1	34446049	34443862	CL10-14_5	AT2G34930.1 disease resistance family protein
		Glyma16g30950.1	34446049	34443862	CL10-14_5	AT2G34930.1 disease resistance family protein
		Glyma16g31030.1	34496886	34493607	CL10-14_5	AT2G34930.1 disease resistance family protein
		Glyma16g30990.1	34468855	34465888	CL10-14_5	AT2G34930.1 disease resistance family protein
		Glyma16g31020.1	34488511	34484620	CL10-14_5	AT2G34930.1 disease resistance family protein
		Glyma16g31060.1	34515706	34512095	CL10-14_5	AT2G34930.1 disease resistance family protein
		Glyma16g31070.1	34529520	34526313	CL10-14_5	AT2G34930.1 disease resistance family protein
		Glyma16g31120.1	34553763	34550423	CL10-14_5	AT2G34930.1 disease resistance family protein
		Glyma16g31140.1	34589907	34586468	CL10-14_5	AT2G34930.1 disease resistance family protein
		Glyma16g31180.1	34621814	34619581	CL10-14_5	AT2G34930.1 disease resistance family protein
Glyma16g31210.1	34648739	34646102	CL10-14_5	AT2G34930.1 disease resistance family protein		
	18	Glyma18g08230.1	7013410	7010340	N3_1	calcium ion binding

Continua

Continuação

Ambiente	Crom	Intervalo (pb)				Descrição
		Gene	Começo	Fim	Locus	
2017	9	Glyma09g08640.1	7962611	7960120	CL10-14_1	carboxylesterase/ lipase
		Glyma09g08670.1	8010875	8013164	CL10-14_1	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein
		Glyma09g08690.1	8032623	8025506	CL10-14_1	BRIGHT DNA-binding domain-containing protein
		Glyma09g08730.1	8141249	8145730	CL10-14_1	ABC transporter family protein
		Glyma09g08780.1	8195572	8193759	CL10-14_1	naringenin-chalcone synthase
		Glyma09g08850.1	8283756	8287541	CL10-14_1	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class)
		Glyma09g08940.1	8401136	8400066	CL10-14_1	AT1G24420.1 transferase family protein
		Glyma09g09270.1	8905591	8908826	CL10-14_1	PYRUVATE DEHYDROGENASE KINASE/ ATP binding / histidine phosphotransfer kinase
		Glyma09g09350.1	9154687	9158112	CL10-14_1	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein
		Glyma09g09370.1	9168859	9168119	CL10-14_1	leucine-rich repeat family protein / protein kinase family protein
		Glyma09g09390.1	9210834	9214204	CL10-14_1	aspartyl protease family protein
		Glyma09g09440.1	9295075	9292829	CL10-14_1	cytidine/deoxycytidylate deaminase family protein
		Glyma09g09480.1	9346288	9345723	CL10-14_1	thioesterase family protein
		Glyma09g09740.1	9581606	9578559	CL10-14_1	zinc finger family protein / programmed cell death 2 C-terminal domain-containing protein
		Glyma09g09750.1	9614132	9617847	CL10-14_1	protein kinase family protein
		Glyma09g10010.1	10037709	10042556	CL10-14_1	zinc finger protein (LSD1)
		Glyma09g10350.1	10418567	10414445	CL10-14_1	proline-rich family protein
		Glyma09g11770.1	12024560	12017341	CL10-14_1	(CBL-INTERACTING PROTEIN KINASE 23); kinase / protein serine/threonine kinase
		Glyma09g11900.1	12223215	12220586	CL10-14_1	disease resistance protein (NBS-LRR class), putative
		Glyma09g12070.1	12504809	12503986	CL10-14_1	(C3HC4-type RING finger) family protein
Glyma09g12100.1	12547691	12547116	CL10-14_1	serine-rich protein-related		
	15	Glyma15g13860.1	10469750	10463693	N7_2	hydroxyisobutyrate dehydrogenase, putative
	20	Glyma20g25170.1	34913796	34913050	CL0-3_1	zinc finger protein-related

Fonte: Banco de dados PlantGDB

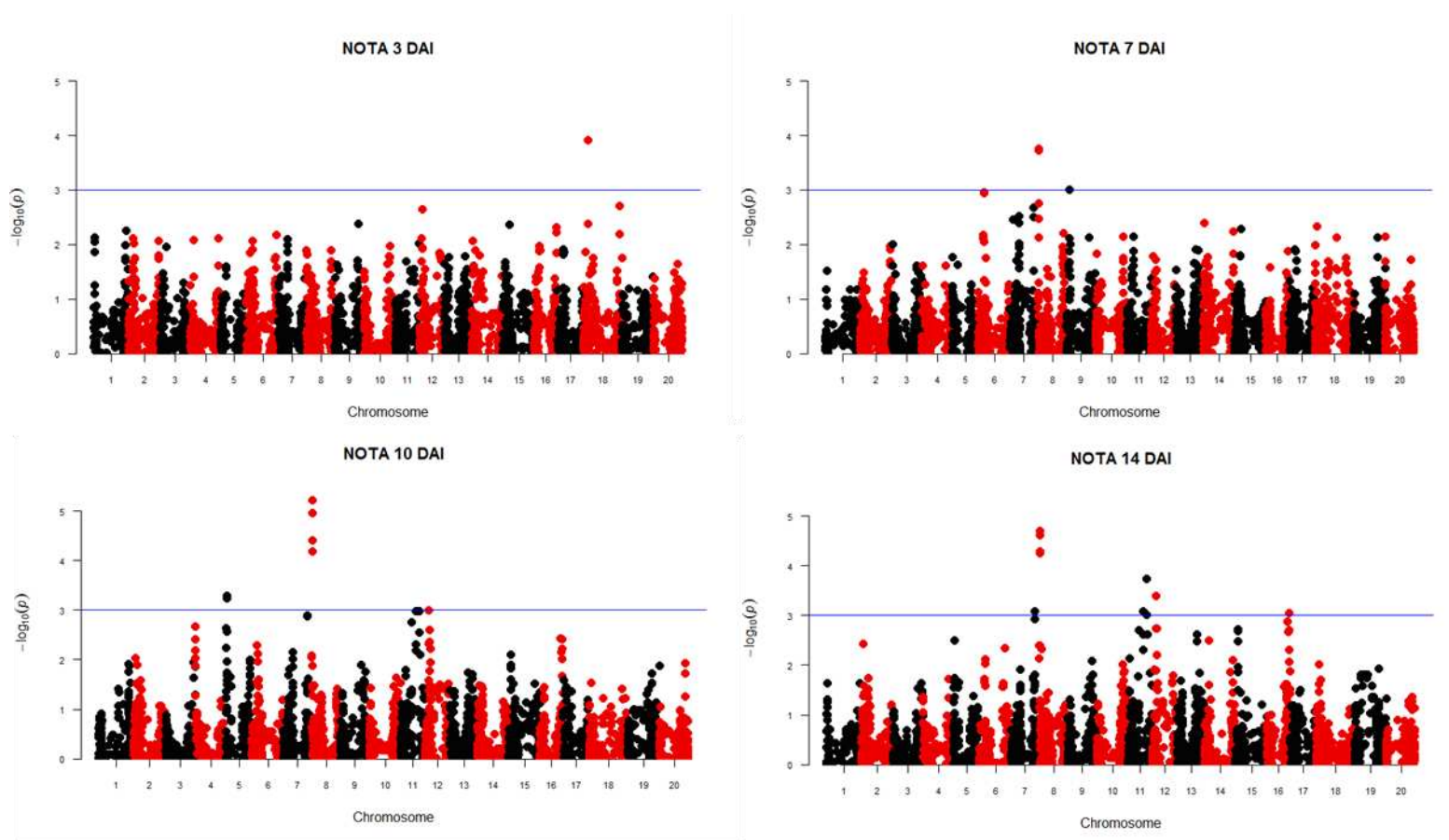


Figura suplementar 1- Gráficos Manhattan plots mostrando SNPs (single nucleotide polymorphisms) candidatos e seus respectivos P-valores para nota aos 3, 7,10 e 14 Dias Após Inoculação (DAI) utilizando modelos lineares mistos (MLM), em 2016.

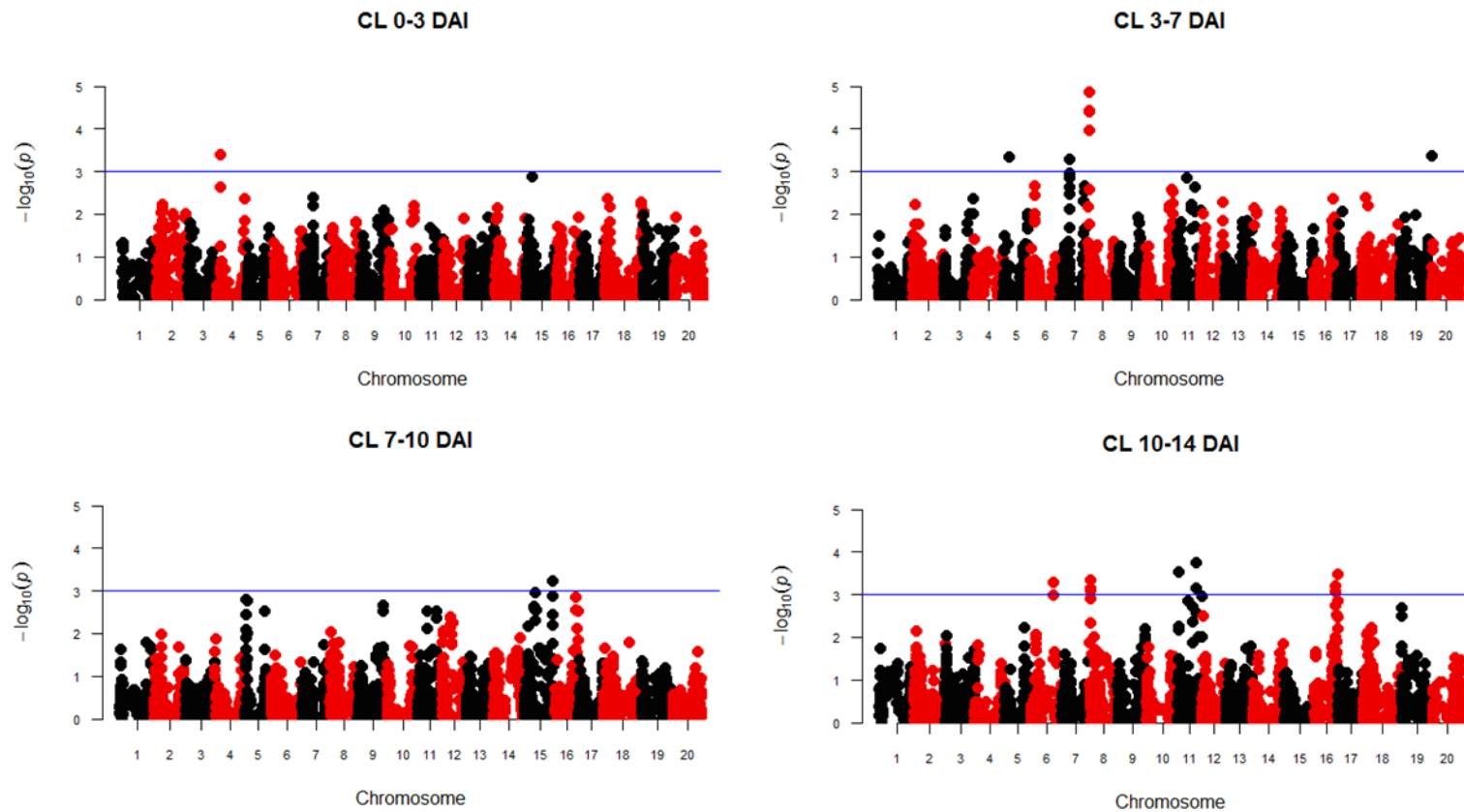


Figura suplementar 2 - Gráficos Manhattan plots mostrando SNPs (single nucleotide polymorphisms) candidatos e seus respectivos P-valores para diferença em dias sequenciais de comprimento de lesão em centímetros 0-3, 3-7, 7-10 e 10-14 Dias Após Inoculação (DAI) utilizando modelos lineares mistos (MLM), em 2016.

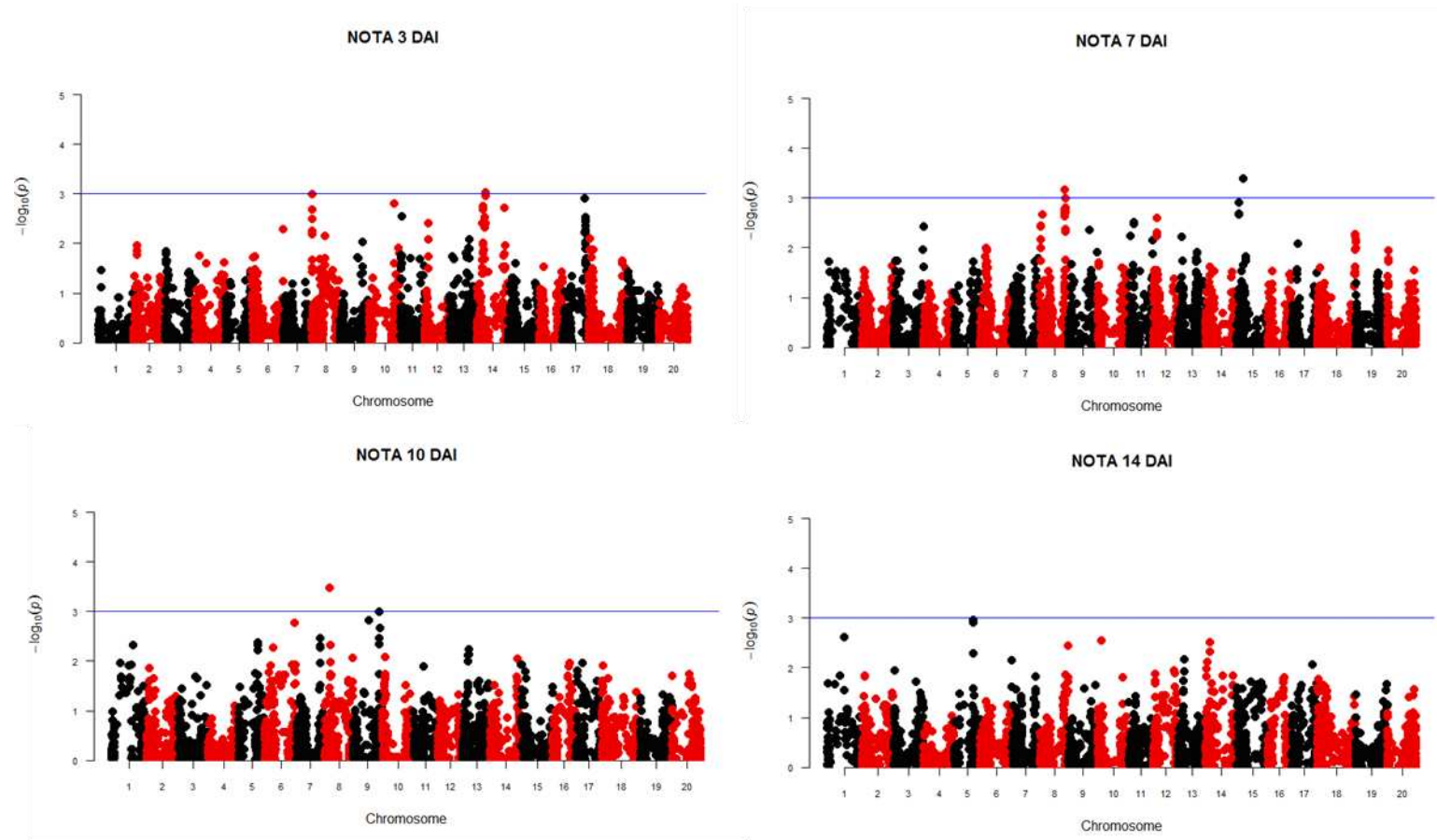


Figura suplementar 3 - Gráficos Manhattan plots mostrando SNPs (single nucleotide polymorphisms) candidatos e seus respectivos P-valores para nota aos 3, 7, 10 e 14 Dias Após Inoculação (DAI) utilizando modelos lineares mistos (MLM), em 2017.

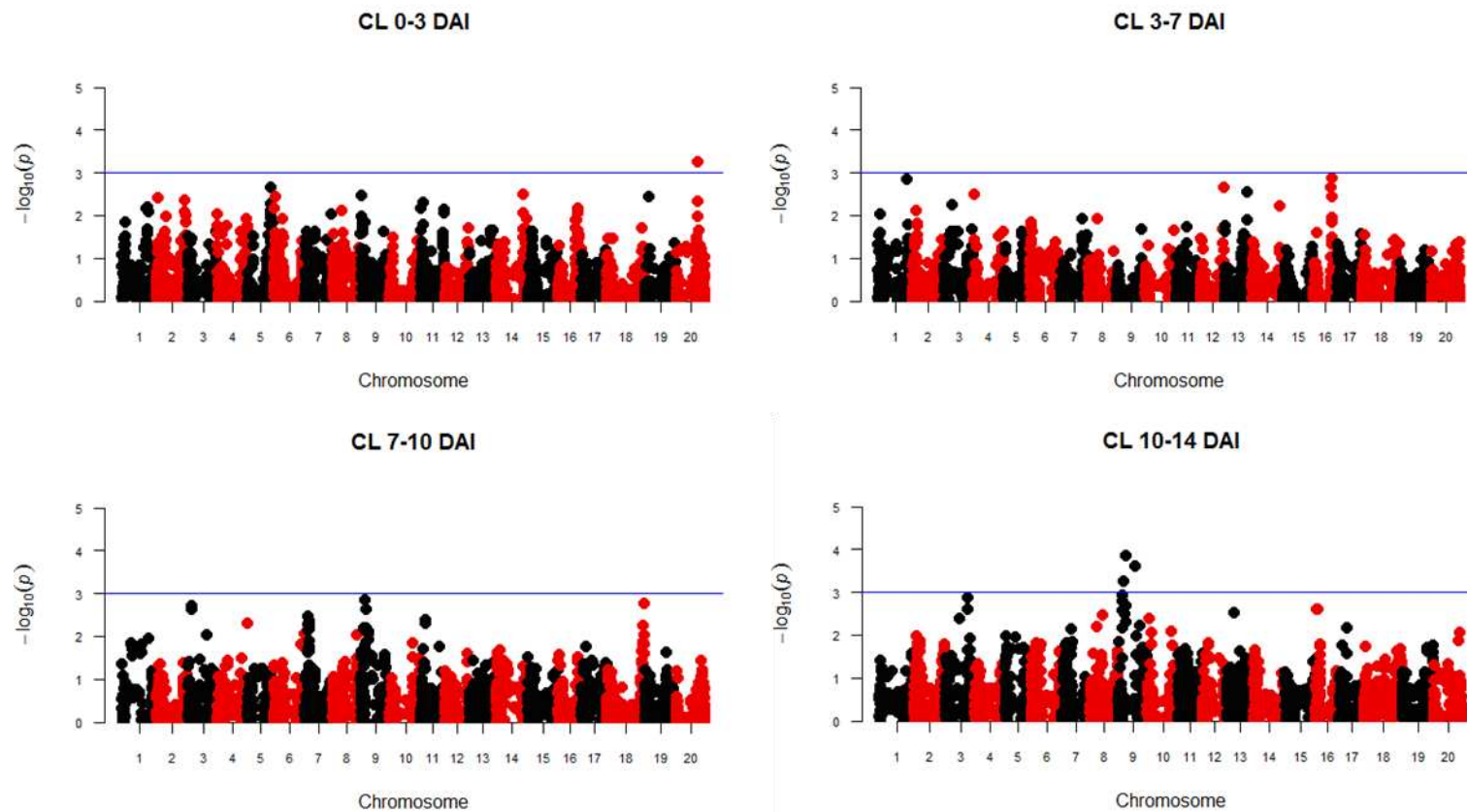


Figura suplementar 4 - Gráficos Manhattan plots mostrando SNPs (single nucleotide polymorphisms) candidatos e seus respectivos P-valores para diferença em dias sequenciais de comprimento de lesão em centímetros 0-3, 3-7, 7-10 e 10-14 Dias Após Inoculação (DAI) utilizando modelos lineares mistos (MLM), em 2017.