



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL GOIANO – CAMPUS URUTAÍ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROTEÇÃO DE PLANTAS

**MARCADORES MOLECULARES TIPO SNP's CANDIDATOS
LIGADOS A RESISTÊNCIA A NEMATOIDE DE CISTO DA SOJA RAÇA
14 EM CULTIVARES DE SOJA BRASILEIRAS**

PÂMELA MARTINS ALVARENGA

Bióloga

URUTAÍ – GOIÁS

2019

PÂMELA MARTINS ALVARENGA

**MARCADORES MOLECULARES TIPO SNP's CANDIDATOS
LIGADOS A RESISTÊNCIA A NEMATOIDE DE CISTO DA SOJA RAÇA
14 EM CULTIVARES DE SOJA BRASILEIRAS**

Orientador: Prof. Dr. Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes

Coorientador: Prof. Dr. Fernando Godinho de Araújo

Coorientador: Dr. Gustavo Malagi

Defesa apresentada ao Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas para obtenção do título de MESTRE.

URUTAÍ – GOIÁS

2019

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

AAL473 Martins Alvarenga, Pâmela
Marcadores moleculares tipo SNP's candidatos ligados à resistência a nematoide de cisto da soja raça 14 em cultivares de soja brasileiras / Pâmela Martins Alvarenga. -- Urutaí, GO: IF Goiano, 2019.
59 fls.

Orientador: Prof. Dr. Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes
Coorientador: Prof. Dr. Fernando Godinho de Araújo
Coorientador: Dr. Gustavo Malagi

Dissertação (Mestrado Profissional em Proteção de Plantas) -- Instituto Federal Goiano, Campus Urutaí, 2019.

1. *Glycines max.* 2. *Heterodera glycines.* 3. *RAPD.* 4. *SoyBase.* 5. *SSR.*
I. Pessoa Pinto de Menezes, Dr. Ivandilson , orient. II. Godinho de Araújo, Coorientador , Dr. Fernando , co-orient. III. Título.

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO
IF GOIANO**

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610/98, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, a disponibilizar gratuitamente o documento no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, em formato digital para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

Identificação da Produção Técnico-Científica

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Tese | <input type="checkbox"/> Artigo Científico |
| <input checked="" type="checkbox"/> Dissertação | <input type="checkbox"/> Capítulo de Livro |
| <input type="checkbox"/> Monografia – Especialização | <input type="checkbox"/> Livro |
| <input type="checkbox"/> TCC - Graduação | <input type="checkbox"/> Trabalho Apresentado em Evento |
| <input type="checkbox"/> Produto Técnico e Educacional - Tipo: _____ | |

Nome Completo do Autor: **Pâmela Martins Alvarenga**

Matrícula: **2017101330540150**

Título do Trabalho: **Marcadores moleculares tipo SNP's candidatos ligados à resistência a nematoide de cisto da soja raça 14 em cultivares de soja brasileiras.**

Restrições de Acesso ao Documento

Documento confidencial: Não Sim, justifique: _____

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: 16/07/2019

O documento está sujeito a registro de patente? Sim Não

O documento pode vir a ser publicado como livro? Sim Não

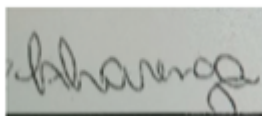
DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O/A referido/a autor/a declara que:

- o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- obteve autorização de quaisquer materiais inclusos no documento do qual não detém os direitos de autor/a, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia

3. Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
4. cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Urutaí, 16/07/2019.



Assinatura do Autor e/ou Detentor dos Direitos Autorais

Ciente e de acordo:



Assinatura do(a) orientador(a)



INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA GOIANO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROTEÇÃO
DE PLANTAS

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Marcadores moleculares tipo SNPs candidatos ligados a resistência à nematoide de cisto da soja raça 14 em cultivares de soja brasileiras.

AUTORA: Pâmela Martins Alvarenga

Dissertação defendida e aprovada como parte das exigências para obtenção do título de Mestra em Proteção de Plantas.

Banca Examinadora:


Prof. Dr. Irandilson Pessoa Pinta de Menezes (orientador)
Instituto Federal Goiano - Campus Urutaí


Dr. Gustavo Malagi
Nidera Seeds Brasil


Dra. Lizandra Lucy Catelli
Nidera Seeds Brasil

Urutaí, 30 de abril de 2019

 ppgpp.urt@ifgoiano.edu.br

 (64) 3465-1912

RODOVIA GERALDO S. NASCIMENTO,
KM 2,5
CEP 75790-000, URUTAÍ - GO
www.ifgoiano.edu.br/urutaí


INSTITUTO
FEDERAL
Goiano

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho primeiramente a Deus e aos meus agraciados vizinhos, que nunca duvidaram da minha capacidade e sempre me estimularam a seguir em frente, me mostrando minha força interior e veracidade da minha fé.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por tornar possível as realizações dos meus sonhos.

Ao programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas do Instituto Federal Goiano Campus Urutaí.

A Nidera Seeds Brasil, principalmente ao Mariano Bulos, Edgardo Gabriel Bresso, Fabricio Jose Biasotto Francischini, Lizandra Lucy Catelli e Maira Sertorio Maia pela disponibilidade dos laboratórios, casa de vegetação e banco germoplasma para execução do experimento, além dos ensinamentos e dedicação.

Aos colaboradores Nidera Seeds Brasil que me ajudaram no decorrer do experimento com as avaliações em casa-de-vegetação e laboratório.

Ao meu orientador Dr. Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes do Instituto Federal Goiano, *campus* Urutaí-GO, pela orientação, ensinamentos, compreensão, paciência e atenção, motivação, esforço e dedicação.

Ao meu co-orientador Dr. Fernando Godinho de Araújo do Instituto Federal Goiano, *campus* Urutaí-GO, pela orientação, paciência, ensinamentos e dedicação.

Ao meu co-orientador Dr. Gustavo Malagi pela orientação, conhecimento, serenidade, apoio e empenho.

Ao meu esposo Cristiano Martins Silva, pelo carinho, paciência, dedicação e compreensão, por se sacrificar várias vezes por mim.

Aos meus pais Higino Martins Filho e Célia Euzébio Alvarenga por me apoiarem em minha jornada.

A toda a minha família em especial Poliane Alvarenga Martins de Lima, Dener Vinicius Pereira de Lima, Ana Vitoria Alves Alvarenga, Maria Eduarda Alves Alvarenga que de alguma forma colaboraram comigo para a conclusão das disciplinas e conseqüentemente para minha formação profissional.

A minha prima Letticia Alvarenga que sempre me incentivou com a frase: “Paminha estou tão orgulhosa de você”.

Aos meus amigos Débora Zacarias da Silva, Fernanda de Souza Ferreira, Lauro Joaquim Thiago Neto, Luana Martins Pires, Adriano Mendonça, Cide Moreira e Érika Chahine, por estarmos sempre unidos nas risadas e nos apoiarmos nas dificuldades.

A minha professora de Inglês Marlene Bernardo que me auxiliou na tradução do resumo da minha dissertação.

As minhas amigas Débora Zacarias da Silva e a Fernanda de Souza Ferreira por toda confiança a mim depositada e por me acolherem em sua residência, sou eternamente grata a vocês.

A Thais Rezende de Moraes por ser minha companheira de estrada, muito obrigada pela paciência e companheirismo.

Ao professor Dr. Anderson Rodrigo da Silva, ao professor Ms. Felipe Bachion e Wilhan Velasco por auxiliarem com dados estatístico do meu experimento.

A todos os professores que contribuíram para minha formação, pela paciência, e por sempre ensinar o lado teórico e prático das disciplinas.

E aos membros da banca, pela dedicação e disponibilidade de contribuir com meus ensinamentos e conhecimento.

Por fim, agradeço a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha pós-graduação.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo Geral.....	4
2.2 Objetivos Específicos	4
3. CULTIVARES E MÉTODOS	5
3.1 Material vegetal	5
3.1.1 Instalação do ensaio de fenotipagem e delineamento experimental	9
3.1.2 Obtenção e preparo do inóculo de NCS	9
3.1.3 Inoculação de NCS e determinação da reação fenotípica das cultivares 10	
3.2 Análise genotípica.....	11
3.2.1 Análise de Seleção de marcadores <i>SNPs</i> ligados a fontes de resistência a NCS 12	
3.2.2 Genotipagem das cultivares de Soja no marcador <i>SNP</i>	12
3.3 Genotipagem dos <i>SNPs</i>	13
3.3.1 Análise de diversidade e estruturação genética	13
3.4 Análises Estatísticas.....	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	15
4.1 Análise Fenotípica	15
4.2 Seleção de marcadores <i>SNPs</i> prospectados da literatura	20
4.3 Genotipagem.....	25
4.4 Análise de correlação fenotípica e genotípica	32
5. CONCLUSÃO	37
6. REFERÊNCIAS	38
7. ANEXO	44

LISTA DE TABELAS

	Páginas
Tabela 1: Cultivares comerciais de soja com resistência (R), moderadamente resistente (MR) e suscetível (S) à <i>Heterodera glycines</i> , raça 14, que foram analisadas fenotipicamente e genotipicamente	6
Tabela 2: Reação das linhas de soja da série diferenciadora de NCS, como proposto por RIGGS e SCHMITT (1988). Reação: R – Resistente; S – Suscetível	11
Tabela 3: Reações esperadas do teste fenotípico validadas pela reação da série diferenciadora do NCS, raça14.	15
Tabela 4: Análise de variância (ANOVA) para o índice de fêmeas das cultivares, avaliadas para resistência à NCS (raça, 14).	16
Tabela 5: Caracterização das 46 cultivares de soja quanto ao ataque do NCS, raça 14.	17
Tabela 6: Probabilidades de classificação em percentual quanto a resistência (R), moderada resistência (MR) e susceptibilidade (S), dos cinquenta e três genótipos testados fenotipicamente e resumo do teste de médias para índice de fêmeas.....	17
Tabela 7: Marcadores microssatélites e <i>RAPD</i> associados a genes de resistência a NCS identificados em publicações de 2001 a 2011.	20
Tabela 08: <i>SNPs</i> rastreados no mapa de sequenciamento da plataforma <i>SoyBase</i>	22
Tabela 09: Cronograma de execução das análises moleculares.....	25
Tabela 10: Descrição dos <i>locus</i> com alelos privativos (Ap) por cultivar de soja.....	26
Tabela 11: Análise de trilha: efeitos diretos (diagonal principal) e indiretos (fora da diagonal) de marcadores <i>SNP</i> sobre o índice de fêmeas.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS

- AJ** – Ácido jasmônico
ANOVA – Análise de Variância
CV - Cultivar
Db – Data Base
DIC - Delineamento Inteiramente Casualizado
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
EBDI – Eurofins Biodiagnostics Inc.
G – Grama
HR – Resposta Hipersensitiva
IF – Índice de Fêmeas
J1 a J4 – Juvenil de primeiro a quarto estágio
Kg - Quilograma
LG - Grupo de Ligação
MI – Mililitros
NCBI – National Center for Biotechnology Information
NCS - Nematóide de Cisto da Soja
NF – Número de Fêmeas
NIL – Número de linhas isogênicas
PCR – Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia de Polimerase)
QTL – Quantitative Trait Loci (Locus de característica quantitativa)
RAPD - Random Amplified Polymorphism DNA (Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso)
RH – Reação de Hipersensibilidade
RHG – Resistance to *Heterodera glycines*
RNA – Ácido Ribonucleico
RPSD – Reação Publicada Série Diferenciadora
RSA – Resistência Sistêmica Adquirida
RSI – Resistência Sistêmica Induzida
RTF – Reação Teste Fenotípico
SAM – Seleção Assistida por Marcadores Moleculares
SBN – Sociedade Brasileira Nematologia
SCN – Soybean Cyst Nematode
SNP – Single Nucleotide Polymorphism (Polimorfismo de base única)
SSR – Simple Sequence Repeats (Sequências simples repetidas)
USDA – Departamento de Agricultura dos Estados Unidos
V2 – Primeira folha trifolioladas completamente desenvolvida

RESUMO

O nematoide de cisto (NCS) é um dos patógenos que mais causa prejuízos em áreas produtoras de soja. Com sua alta variabilidade genética o uso dos marcadores de DNA tornou-se uma ferramenta útil para romper essa barreira por apresentar alto grau de identificação de fonte de variação de resistência genética. O objetivo do trabalho foi determinar marcadores moleculares tipo *SNPs* candidatos ligados à resistência à NCS, raça 14, em cultivares de soja brasileiras. O experimento foi conduzido em casa de vegetação em delineamento inteiramente casualizado, com cada unidade experimental caracterizada por um grupo de 6 tubetes com 6 repetições. A distribuição das 46 cultivares foi de forma aleatória, igualmente para série diferenciadora, que foram semeadas em bandejas plásticas com capacidade de 54 tubetes de 180cm³, preenchidos com solo e areia média na proporção de 1:3, com 2 sementes por tubete. Foram inoculados 3000 ovos, e depois de 30 dias, quantificado o número de fêmeas por raiz. As reações foram determinadas pelo índice de fêmeas (IF). Utilizaram-se bancos de dados para associar marcadores genéticos aos genes de NCS raça 14 como *NCBI*, *Scopus*, *Science Direct* e Periódicos CAPES, além da plataforma *SoyBase* para rastrear *SNPs* próximos aos marcadores selecionados. Foram genotipados 46 cultivares considerando para cada grupo genético um valor limite do coeficiente de ancestralidade ($\geq 0,70$), mas não apresentaram, porém, uma organização coincidente com a resposta de resistência e suscetibilidade ao NCS. Entre as 46 cultivares testadas apenas TMG 4182, BRS MT Pintado foram resistentes (4%) no teste fenotípico enquanto BRS GO Chapadões, BRS GO Ipameri, NK 7059, BMX Extra, BRS 263, SYN 1059, BMX Foco, CD 237, NK 7059 expressaram moderada resistência (17%), sendo todas essas postuladas como candidatas para a busca de marcadores do tipo *SNPs* ligados à resistência do NCS, raça 14. Dentre os 48 marcadores *SNPs* rastreados no *SoyBase* baseados na literatura, apenas 6 marcadores, Gm16_33360539_T_C; Gm16_35700223_G_T; Gm17_32038975_T_G; Gm18_1620585_T_C; Gm18_3169557_A_C e Gm18_4680723_C_T, apresentaram compatibilidade com os resultados adquiridos através do mapeamento dos 316 *SNPs* candidatos à resistência ao NCS, raça 14. A coleção de cultivares comerciais de soja avaliada apresentou uma expressiva divergência genética e estruturada em dois grupos principais, com leves sinais de subestruturação para $\Delta K=5$ e 7, destacando a crescente ancestralidade mista entre as cultivares. A correlação entre os resultados fenotípicos e moleculares indicou que apenas os marcadores *SNPs* 60, 110 e 244 estiveram relacionados à baixa infestação de nematóides, sendo estes candidatos à resistência ao nematoide de cisto da soja, raça 14. O marcador *SNP* 110 apresentou correlação consideravelmente alta (-0,40), além de possuir efeito direto com os marcadores *SNPs* 60 e 244 com ligação à variável IF, tornando-se o principal marcador candidato.

Palavras-chave: *Glycines max*; *Heterodera glycines*; *RAPD*; *SoyBase*; *SSR*.

ABSTRACT

The cyst nematode (NCS) is one of the most damaging pathogens in soybean producing areas. With their high genetic variability, the use of DNA markers became useful tools to break this barrier because it presents a high degree of identification of source of variation of genetic resistance. The objective of this work was to determine candidate *SNPs* molecular markers linked to resistance to NCS, race 14, in Brazilian soybean cultivars. The experiment was conducted in a greenhouse in a completely randomized design, each experimental unit was characterized by a group of 6 tubes with 6 replicates. The distribution of the 46 cultivars was randomly, also for the differentiating series, which were seeded in plastic trays with a capacity of 54 tubes of 180cm³, filled with soil and medium sand in the proportion of 1: 3, with 2 seeds per tube. 3000 eggs were inoculated, and after 30 days, the number of females per root was quantified. The reactions were determined by the female index (IF). Databases were used to associate genetic markers to NCS race 14 genes such as NCBI, Scopus, Science Direct and CAPES Periods, as well as the SoyBase platform to track *SNPs*. A total of 46 cultivars were genotyped considering a coefficient of ancestry coefficient (≥ 0.70) for each genetic group, but it is not, however, an organization coincident with a response of resistance and susceptibility to NCS. Among the 46 cultivars tested only TMG 4182, BRS MT Pintado were resistant (4%) in the phenotypic test while BRS GO Chapadões, BRS GO Ipameri, NK 7059, BMX Extra, BRS 263, SYN 1059, BMX Focus, CD 237, NK 7059 expressed moderate resistance (17%), all of which were postulated as candidates for the search for SNP-type markers linked to NCS resistance, race 14.. Of the 48 *SNPs* markers screened in the SoyBase based on the literature, only 6 markers, Gm16_33360539_T_C; Gm16_35700223_G_T; Gm17_32038975_T_G; Gm18_1620585_T_C; Gm18_3169557_A_C and Gm18_4680723_C_T, showed compatibility with the results obtained by mapping the 316 *SNPs* candidates for resistance to NCS, race 14. The collection of commercial soybean cultivars evaluated showed a significant genetic divergence and structured in two main groups with slight signs of substructure for $\Delta K = 5$ and 7, highlighting the growing mixed ancestry among the cultivars. The correlation between the phenotypic and molecular results indicated that only the *SNPs* markers 60, 110 and 244 were related to the low nematode infestation, being these candidates for resistance to the soybean cyst nematode race 14. The *SNP* 110 marker showed a very high correlation (-0.40), in addition to having direct effect with the *SNPs* markers 60 and 244 with binding to the IF variable, becoming the main candidate marker.

Key words: *Glycines max*; *Heterodera glycines*; *RAPD*; *SoyBase*; *SSR*.

1. INTRODUÇÃO

A Soja (*Glycines max (L.) Merr.*), se enquadra dentre as leguminosas mais cultivadas e consumidas em todo o mundo, possuindo uma extensa área cultivada e elevada capacidade produtiva. No ano de 2018, o Brasil superou a produção de soja em relação ao Estados Unidos, alcançando pela primeira vez a liderança global na exportação de grãos, farelo e óleo. As vendas brasileiras continuam crescendo, estimando para safra 2018/2019, uma produção com 81 milhões de toneladas, prevendo alcançar até novembro 77 milhões, segundo USDA (MENDES, 2018). Essa cultura está sujeita ao ataque de diversas doenças que causam sérios prejuízos, acarretando-se em muitos casos na perda de produtividade. A soja é hospedeira de cerca de 125 micro-organismo patogênicos (SEDIYAMA, 2009), sendo que 40 dessas doenças já foram identificadas e registradas como de importância econômica para o país (GODOY, 2017).

Dentre esses patógenos, os fitonematoides são responsáveis por causar sérios danos a essa cultura. Dias et al. (2010) relata que mais de 100 espécies já foram identificadas, associando à soja, cerca de 50 gêneros em nível mundial. Por ano os nematoides proporcionam cerca R\$ 35 bilhões de reais de danos ao agronegócio, somente na soja essas perdas estão estimadas em cerca R\$ 16 bilhões entre as espécies (RIVAS, 2015). *Heterodera glycines* Ichinohe, 1952 (Nematoide de cisto soja - NCS) é considerado um dos patógenos mais agressivos da sojicultura, induzindo sintomas no campo como reboleiras, cloroses, plantas atrofiadas e baixa produtividade. Sua identificação ocorre por meio da observação das fêmeas no sistema radicular da planta e pela visualização no solo da estrutura de resistência denominada cisto (DIAS, et al., 2010).

O ciclo de vida desse patógeno depende muito da temperatura e a umidade do solo, mas de forma geral dura de 21 a 24 dias (sob 21-23°C), podendo gerar em um cultivo de três a seis gerações, dependendo da cultivar (BERGAMIN et al.,1995). No Brasil esse processo pode ocorrer em menos tempo, na maioria das vezes em 15 dias se controlarmos a temperatura para 28 a 31°C (CUNHA et al., 2008). Seu desenvolvimento abrange até 4 ecdises, sendo o juvenil de segundo estágio (j2) a forma infectante do parasita. O juvenil penetra nas raízes dificultando a absorção de água e nutrientes, o que reduz o sistema radicular da planta. Suas fêmeas possuem o formato de limão “Tahiti”, de coloração branca amarelada, que ao fertilizarem produzem os ovos e armazenam parte deles no interior do seu corpo. Após a sua morte, sua cutícula sofre alterações químicas, adquirindo uma coloração

marrom escura e alterando-se para uma estrutura rígida, denominada cisto. O cisto é muito leve, de difícil deterioração, e sobrevive no solo na ausência de uma hospedeira por mais de oito anos (FARIA et al., 2011).

A forma de disseminação desse cisto pode ser representada principalmente, pelo transporte de solo infestado, que pode ocorrer por meio dos equipamentos agrícolas, pelo vento, pela água, animais e pessoas. Este cisto uma vez estabelecido no campo torna-se muito difícil a erradicação desse parasita, devido sua grande variabilidade genética e sua capacidade de superar os genes de resistência da planta hospedeira (VUONG et al., 2015).

No Brasil a variabilidade genética do nematoidenematóide de cisto da soja tem se mostrado maior em relação à outros países que possuem seu registro. Até agora, com base na metodologia para definição de raça, foram determinadas as raças 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10 e 14, além 4+ e 14+ presente somente em nosso país (ASMUM et al., 2011). Essas raças podem ser distinguidas por uma série de cultivares diferenciadora, atualmente utilizadas para os testes fenotípicos (RIGGS e SCHMITT, 1988).

Embora a elevada variabilidade genética encontrada do parasita no campo dificulte seu controle, uma das formas de manejo econômico e eficiente se baseia na utilização de cultivares resistentes. Estudos investigativos de identificação e utilização de novas fontes de resistência ao NCS são necessários na prática de controle desses nematoides. Neste sentido, torna-se estratégico o uso formas complementares que contribua com a identificação de genes de resistência, a exemplo da utilização de marcadores de DNA. Vários estudos contribuíram para a localização de *QTLs* (*Quantitative Trait Loci*) e validação de marcadores *Simple Sequence Repeats* (SSR) e *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) ligados a resistência ao NCS (ROSA, 2015).

Entretanto, os marcadores de *RAPD* apresentam limitações de reprodutibilidade e assim como os *SSRs* não apresentam plataforma automatizada para estudos de genotipagem em larga escala, elevando o custo benefício de seu uso. Com os avanços do sequenciamento de nova geração (NGS), os marcadores *Single Nucleotide Polymorphism* (*SNPs*) têm se destacado para tal propósito e além de apresentar baixo custo por “*data point*” em relação aos demais marcadores na genotipagem em larga escala (GAUR et al., 2012). Milhares de *SNPs* já foram disponíveis para *G. max* (LAM et al., 2010) e utilizados para estudos genômicos como a associação de ampla genômica (ATWELL et al., 2010; BRANCA et al., 2010; HUANG et al., 2010; TIAN et al., 2011), genômica comparativa (LUO et al., 2009; MUCHERO et al.,

2009) e construção de mapa de ligação genética (SHIRASAWA et al., 2010; HUO et al., 2011).

O mapeamento deste elevado número de marcadores *SNPs* aumentam a chance de sucesso na identificação de *QTLs* de grande importância (LIGHTFOOT, 2008) que compõe extensão de genes candidatos ligados as características resistência de interesse. Várias plataformas para marcadores *SNPs* foram criadas nos últimos anos, para identificar e mapear um grande volume de marcadores ao mesmo tempo. Para soja, por exemplo, um painel universal de ligação denominado como *Illumina GoldenGate*, *Infinium Beadchip* e *Illumina Infinium* com cerca de 1.536, 6.000 e 50.000 *SNPs* foram desenvolvidos e disponibilizados (HYTEN et al., 2010; GANAL et al., 2011; SONG et al., 2013).

Embora se tenha essa elevada disponibilidade de informação genética acerca dos marcadores *SNPs* na soja, pouco ou nada se conhece sobre marcadores *SNPs* ligados a genes de resistência ao NCS, raça 14, considerando que não foram encontrados publicações técnicas ou acadêmicas disponíveis sobre tal. Tendo em vista o impacto dessa praga na cultura da soja, buscamos neste trabalho identificar e disponibilizar marcadores *SNPs* candidatos ligados a resistência ao NCS, raça 14, a partir de estudos de correlação genética e fenotípicas utilizando um germoplasma de 46 cultivares de soja brasileiras lançadas até 2017 com resistência, moderada resistência e susceptibilidade.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Identificar marcadores moleculares *SNPs* candidatos ligados à resistência ao Nematóide do Cisto da Soja (NCS), raça 14, em cultivares de soja brasileiras.

2.2 Objetivos Específicos

Caracterizar fenotipicamente a reação das 46 cultivares de soja, descritas como resistentes, moderadamente resistentes e suscetíveis ao NCS, raça 14;

Selecionar marcadores de DNA disponíveis na literatura que conferem resistência e suscetibilidade à raça 14 do NCS;

Prospectar e selecionar marcadores moleculares *SNPs* associados à resistência ao NCS raça 14, por meio da plataforma *SoyBase*;

Caracterizar os marcadores *SNPs* candidatos ligados à resistência ao NCS, raça 14, por meio da plataforma *Infinium*;

Identificar a diversidade genética entre os marcadores *SNPs* selecionados e realizar estudos de ancestralidade das cultivares de soja;

Correlacionar os resultados fenotípicos e genotípicos identificados nas 46 cultivares brasileiras;

Indicar os marcadores *SNPs* candidatos ligados à resistência ao NCS, raça 14, para uma futura validação molecular.

3. CULTIVARES E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

A execução do presente trabalho considerou avaliações fenotípicas e genotípicas de cultivares de soja nacionais com níveis variados de resistência a nematoidenematóide de cisto da soja, raça 14. Para tal, sementes das 46 cultivares comerciais nacionais lançadas até 2017 com resistência, moderada resistência e susceptibilidade ao NCS, foram obtidas a partir de bancos ativos de germoplasma da Nidera Seeds Brasil e da Embrapa Soja (Tabela 1). Estas foram armazenadas na câmara fria da unidade de fenotipagem da Nidera Seeds Brasil Ltda, em Uberlândia-MG, para manutenção da viabilidade até o momento da fase de multiplicação das sementes e das avaliações.

Para a avaliação dos testes fenotípicos, além das 46 cultivares, considerou-se também as cultivares controle (série diferenciadora) PI 088788, PI 437654 e *Hartwig* caracterizadas como resistente e PI 090763, *Lee 74*, *Pickett* e *Peking* como suscetível, para confirmação da raça em questão, totalizando 53 cultivares (Tabela 2).

Tabela 1: Cultivares comerciais de soja resistentes (R), moderadamente resistentes (MR) e suscetíveis (S) à *Heterodera glycines*, raça 14, analisadas fenotipicamente e genotipicamente.

Cultivar	Obetentor	Geneologia	Reação à raça 14	Representação no croqui
BRS 231	Embrapa	Sharkey x (Hatwig x BR92-31814)	MR 14	CV1
BRS 263	Embrapa	Hartwig x {Sharkey x [Florrest (3) x (Lancer x BR80-6989)]}	MR 14	CV2
BRS Jiripoca	Embrapa	Sharkey x [Hatwig x (BR87-567 (3) x FT Estrela)]	MR 14	CV3
BRSGO Chapadões	Embrapa	Hartwig (4) x (BR90-7063 x BR90-7213)	S 14	CV4
BRSGO Ipameri	Embrapa	Leflore (4) x BR90-7057;	S 14	CV5
BRS MT Pintado	Embrapa	Sharkey x [Hatwig x (BR87-567 (3) x FT Estrela)]	MR 14	CV6
FMT Matrinxã	Fundação MT	Leflore x [Hartwig x (BR87-567(3) x Ft-Estrela)]	MR 14	CV7
FMT Tucunaré	Fundação MT	Sharkey x [Hatwig x (BR87-567 (3) x FT Estrela)]	MR 14	CV8
NK V-Max	Syngenta	PI 88788	S 14	CV9
NK 7059RR	Syngenta	Peking x PI437654	S 14	CV10
TMG 115RR	TMG	Peking x PI437654	MR 14	CV11
TMG 121RR	TMG	Não Informado	MR 14	CV12
TMG 1188RR	TMG	Não Informado	S 14	CV13
Cultivar	Obetentor	Geneologia	Reação à raça 14	Representação no croqui

“Continua”

TMG 4182	TMG	Não Informado	S 14	CV14
TMG 4185	TMG	Não Informado	S 14	CV15
Syn 1059RR	Syngenta	Não Informado	MR 14	CV16
BMX Foco	Brasmax	Não Informado	S 14	CV17
BMX Extra	Brasmax	Não Informado	S 14	CV18
BMX Ponta	Brasmax	Não Informado	MR 14	CV19
BMX Ativa	Brasmax	Não Informado	S 14	CV20
BMX Potência	Brasmax	Não Informado	S 14	CV21
CD 217	Coodetec	Não Informado	-	CV22
CD 237	Coodetec	Não Informado	-	CV23
CD 202	Coodetec	CEPS77-16 × Invicta;	S 14	CV24
BRS 7380 RR	Embrapa	Não Informado	S 14	CV25
BRS MG 810C	Embrapa	Não Informado	-	CV26
BRS 48	Embrapa	(Davis x Paraná) x (IAS 4 x BR-5); Peking (Sharkey) e BR904630	S 14	CV27
BRS GO Iara	Embrapa		-	CV28
M8133	Monsoy	Não Informado	S 14	CV29
M6972	Monsoy	Não Informado	-	CV30
M7739	Monsoy	Não Informado	-	CV31
M8001	Monsoy	Empaer 10 X Coker 6738	-	CV32
Cultivar	Obetentor	Geneologia	Reações à raça 14	Representação
M8372	Monsoy	Não Informado	-	“Continua”
NS6909	Nidera	Não Informado	S 14	CV34
NS7497	Nidera	Não Informado	S 14	CV35
NS8490	Nidera	Não Informado	3 e S 14	CV36

NS7490	Nidera	Não Informado	3 e S 14	CV37
P98Y30	Pioneer	Não Informado	3 e S 14	CV38
P98Y51	Pioneer	Não Informado	3 e S 14	CV39
TMG 1176	TMG	Não Informado	3 e S 14	CV40
TMG 1180	TMG	Não Informado	3 e S 14	CV41
TMG 132	TMG	Não Informado	3 e S 14	CV42
TMG 133	TMG	Não Informado	3 e S 14	CV43
TMG 2181	TMG	Não Informado	3 e S 14	CV44
TMG Anta	TMG	Não Informado	3 e S 14	CV45
P98Y12	Pioneer	Pintado X Pioneer P95B43	3 e S 14	CV46

“Conclusão

3.1.1 Instalação do ensaio de fenotipagem e delineamento experimental

As análises fenotípicas foram conduzidas na unidade de fenotipagem vegetal da Nidera Seeds Brasil Ltda. Localizada em Uberlândia/MG, utilizando casas de vegetação com ambiente controlado, com temperatura constante de 25°C (± 2). As cultivares/série diferenciadora foram semeadas em tubetes com 180 cm³ de capacidade, preenchidos com substrato composto por solo e areia média na proporção de 1:3. Os tubetes foram suportados por bandejas plásticas com capacidade de 54 tubetes cada (disposição de tubetes: 6 x 9). O planejamento experimental utilizado foi baseado no Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), com 6 repetições. Cada unidade experimental ou repetição (R), foram caracterizadas por um grupo de 6 tubetes. A distribuição aleatória das cultivares/linhas (CV) e suas repetições (R) no ensaio podem ser verificadas no croqui representado abaixo (Anexo – Figura 1).

Para o plantio, foram realizadas a semeadura de duas sementes em cada tubete, e após a emergência o estande foi ajustado para uma plântula por tubete (arranquio da planta excedente e/ou transplante na ausência de germinação), no dia definido para a inoculação (Anexo – Figura 2). A irrigação das plântulas foi realizada manualmente 2 (duas) vezes ao dia.

3.1.2 Obtenção e preparo do inóculo de NCS

Para a extração de ovos e preparação do inóculo, fêmeas foram extraídas das raízes de plantas mantenedoras de 30 dias, previamente cultivadas em vasos de barro (1,5 litros de capacidade) sob as condições de 28°C da casa de vegetação própria para essa finalidade (Anexo – Figura 3).

As raízes das plantas mantenedoras foram lavadas com um forte jato de água no Laboratório de Nematologia da unidade de fenotipagem da Nidera Seeds Brasil Ltda, sobre a peneira de 20 *mesh* acoplada à outra de 100 *mesh*, onde as fêmeas ficaram retidas. Em seguida, a peneira de 100 *mesh* foi acoplada sobre uma peneira de 400 *mesh* e as fêmeas esmagadas para a liberação dos ovos e juvenis. Na sequência, os ovos e juvenis retidos na peneira de 400 *mesh* foram coletados e concentrados por centrifugação utilizando tubos tipo falcon. O processo de centrifugação foi realizado em duas etapas, sendo inicialmente em água por 5 minutos a 2000 *rpm* e posteriormente em solução de sacarose (400g de açúcar para 750 ml de água) por 1 minutos a 2000 *rpm*. Ao final da primeira etapa, os ovos e juvenis ficaram

depositados no fundo do tubo da centrífuga junto com sedimentos de argila, areia e matéria orgânica, o que permitiu o descarte da água e sobrenadantes. Ao final da segunda etapa, após a suspensão e centrifugação dos ovos e juvenis remanescentes da primeira etapa, ovos e juvenis se concentraram como sobrenadante, enquanto resíduos de solo, areia e matéria orgânica ficaram depositados no fundo dos tubos falcon. Desse modo, o sobrenadante pode ser vertido para uma peneira 400 *mesh*, e transferidos concentradamente para um frasco de vidro.

Os ovos e juvenis extraídos foram utilizados para o preparo da solução de ovos, em quantidade suficiente para a inoculação de todos os tubetes do ensaio, considerando um total de 3 mL por planta (tubete). Para o preparo da solução, os ovos em concentração foram suspensos em água e homogeneizados com agitador magnético. Uma alíquota de 1 mL da solução contendo ovos foi coletada e depositada em câmara de Peters para a quantificação em microscópico óptico 10x até que a solução atingisse a concentração de 1000 ovos por mililitro. Os procedimentos de extração das fêmeas e de preparação do inóculo podem ser visualizados no Anexo – Figura 4.

3.1.3 Inoculação de NCS e determinação da reação fenotípica das cultivares

Durante a inoculação na casa de vegetação, foram depositados cuidadosamente 3000 ovos por planta na base de cada plântula (o mesmo que 3mL de uma solução de 1000 ovos por mL), mantendo a solução do inóculo, preparada previamente, em constante agitação. Nessa etapa foram utilizadas pipetas monocanais com capacidade máxima de 5 mL para a deposição da solução de ovos (Anexo – Figura5). As plântulas foram regadas apenas no segundo dia após a inoculação para evitar a lixiviação dos ovos no solo. Posteriormente, as plantas foram regadas diariamente para manutenção de umidade entre a “capacidade de campo” e a “máxima capacidade de retenção de água” do solo durante os 30 dias de condução do teste.

Trinta dias após a inoculação, foi realizado o arranquio do ensaio para quantificação do número médio de fêmeas por raiz de cada repetição no Laboratório de Nematologia. Para tanto, as fêmeas foram extraídas com um jato forte de água sobre peneiras de 20 *mesh* acoplada sobre outra de 100 *mesh*. Em seguida, as fêmeas depositadas na peneira de 100 *mesh* foram coletadas em copo americano de vidro (um copo americano para cada tubete) encaminhando-os para o procedimento de quantificação. A quantificação do número de fêmeas foi realizada visualmente com auxílio de microscópio estereoscópico. O método

proposto para quantificação do número médio de fêmeas (NF) obtido em cada cultivar foi o de SCHMITT; SHANNON (1992), em que os resultados são obtidos através da determinação do índice de fêmeas (IF), onde $IF = (\text{número médio de fêmeas em cada cultivar} \div \text{número médio obtido no padrão de suscetibilidade [cultivar Lee 74]}) \times 100$. A reação de cada cultivar foi classificada em resistente (se $IF \leq 10\%$), moderadamente resistente (se IF entre 10,1% e 30%) e suscetível (se $IF \geq 30,1\%$) (Anexo – Figura 6).

A certificação da raça 14 durante o teste foi realizada avaliando-se a reação da série diferenciadora (PI 088788, PI 437654, *Hartwig* (Resistente) e PI 090763, *Lee 74*, *Pickett* e *Peking* (Suscetível)) testada juntamente com as cultivares comerciais. A observação das reações esperadas descritas na para a raça 14, confirma a identidade da raça testada (Tabela 2).

Tabela 2: Reação esperada das linhas de soja da série diferenciadora de NCS, como proposto por RIGGS e SCHMITT (1988).

Cultivar	Geneologia	Raça										
		1	2	3	4	5	9	0	1	2	3	4
PI 437654	Plant Introduction	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
PI 88788	Plant Introduction	S	S	R	S	S	R	R	S	R	R	R
PI 90763	Plant Introduction	R	R	R	S	R	R	S	R	S	R	S
<i>Hartwig</i>	<i>Forrest</i> (3) X PI 437654	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>Lee 74</i>	<i>Lee 68</i> X R66-1517	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Pickett</i>	(D49-2491 (6) x <i>Dorman</i>) X (<i>Lee</i> (4) x <i>Peking</i>)	R	S	R	S	S	S	S	R	R	R	S
<i>Peking</i>	Introduction	R	S	R	S	R	S	R	S	S	S	S

* Reação: R – Resistente; S – Suscetível; MR - Moderadamente Resistente. Método proposto por RIGGS e SCHMITT (1988).

3.2 Análise genotípica

As análises genotípicas foram conduzidas no Laboratório de Marcadores Moleculares da Nidera Seeds Brasil em Uberlândia/MG e no laboratório *Eurofins Biodiagnostics Inc.* (EBDI) nos Estados Unidos. As mesmas plantas cultivadas em casa de vegetação para a avaliação fenotípica foram utilizadas para coleta de tecido foliar e extração de DNA (Tabela 1).

3.2.1 Análise de Seleção de marcadores *SNPs* ligados a fontes de resistência a NCS

Marcadores *SSR* e *RAPD* associado a genes com reações de resistência à NCS, raça 14, em soja foram prospectados em banco de dados: *NCBI*, *Scopus*, *Science Direct* e Periódicos CAPES. A pesquisa foi realizada entre o setembro e dezembro de 2017, usando palavras chave em várias combinações em Inglês ou Português: (1) *Glycine max*; (2) Microssatélites; (3) *QTL*; (4) *Loci*; (5) *RAPD*; (6) *SNPs*; (7) Resistência; (8) Nematóide de cisto da soja. Artigos publicados entre 2001 a 2011 foram encontrados, os quais também serviram de base para busca de outras referências que tratam sobre genes que conferem resistência a NCS.

Nos artigos selecionados, marcadores *RAPD* e *SSR* associados à *QTLs* (*Quantitative Trats Loci*) ou genes que conferem resistência a NCS foram selecionados. Baseado no nome ou grupo de ligação do marcador selecionado buscou acessar marcadores *SNPs* mapeados e que flanqueiam o gene de resistência ou o marcador associado à resistência a NCS. Esse rastreamento de *SNPs* candidatos foi realizado através da plataforma *SoyBase* (<https://soybase.org/>). Basicamente, o esquema de identificação do *SNPs* no *SoyBase* segue os passos esquematizado abaixo (Anexo – Figura 8 e 9).

A primeira forma de busca no *Soybase* foi pelo nome (Satt309) que foram prospectados da literatura. A segunda opção de busca foi através do grupo de ligação (LG G) de cada marcador e a terceira forma de busca foi através do número de cromossomo (Gm18). Em seguida, o mapa de posicionamento nos permite a busca do nome (GmComposite2003_G 4.53) e posicionamento em centimorgan. Posteriormente, foi rastreado posicionado a direita e a esquerda no mapa de sequenciamento marcadores os *SNPs* flanqueados a 50kbp na base soySNP50K com 50.000 *SNPs* perto dos microssatélites, determinando *QTLs* de associação de resistência ao nematóide de cisto soja, raça 14 (Anexo – Figura 10 e 11).

3.2.2 Genotipagem das cultivares de Soja no marcador *SNP*

Foi utilizado um total de 46 (quarenta e seis) cultivares de soja de diferentes instituições públicas e privadas, pertencentes ao germoplasma da Nidera Seeds LTDA, compreendendo cultivares comerciais nacionais lançadas até 2017 com resistência ou moderada resistência e susceptibilidade ao NCS, raça 14. Adicionalmente, 7 (sete) linhas diferenciadoras de confirmação da raça em questão (PI0 088788, PI 437654 e *Hartwig*

(Resistente) e PI 090763, *Lee 74*, *Pickett* e *Peking* (Suscetível)) foram utilizadas como controles genéticos para análise genética de agrupamento, totalizando 53 (cinquenta e três) cultivares.

3.3 Genotipagem dos *SNPs*

O tecido foliar de cada cultivar em estágio V2 foram coletados em tubos falcon de 15 mL e acondicionado com gelo para transporte até o laboratório molecular Nidera Seeds Brasil e, em seguida mantidas a -80°C por 50 minutos e liofilizados à -54°C por 21 dias. A maceração do material foliar liofilizado foi realizada com auxílio de uma esfera de aço de 5 mm em cada tubo por 2 minutos à 1750 rpm. Uma amostra de 40 mg, devidamente pesada, foi transferida para criotubos de 2 mL e armazenados até o envio para a *Eurofins Biodiagnostics Inc.* (EBDI) nos Estados Unidos para genotipagem.

O DNA foi extraído por procedimento específico do laboratório EBDI e genotipado seguindo protocolo Infinium® II Assay Workflow (www.Illumina.com). Os dados genotípicos das cultivares foram obtidos através da plataforma *Illumina iScan* e o painel *Infinium iSelect HD Custom Genotyping BeadChips 6k* (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA), personalizados para soja, contendo 53 (cinquenta e três) amostras das cultivares em cada *Beadchip*. A genotipagem das cultivares resultou em 8 (oito) *beadchip*, separados pelo número de cromossomos (Chr) de cada marcadores selecionados, composto com 6000 *SNPs*.

3.3.1 Análise de diversidade e estruturação genética

A diversidade genética descritiva dos cultivares de soja comum foi estimada utilizando os marcadores *SNPs* em equilíbrio de ligação. Estas análises foram realizadas no software GenAlex v. 6.501 (PEAKALL AND SMOUSE, 2012) e foram estimados parâmetros como: porcentagem de polimorfismo (%P), número de alelos privados (N_p), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), coeficiente de endogamia (F), probabilidade de identidade (PI) e exclusão (PE). Para determinar a estruturação da diversidade, foram estimadas as estatísticas F de Wright através do programa GenAlex v.6.501.

A estruturação genética através do método Bayesiano foi investigada através do modelo implementado no software *Structure* versão 2.3.4 (PRITCHARD et al., 2000). Para esta análise foram utilizados somente os *SNPs* neutros e que estavam em equilíbrio de ligação,

os quais foram selecionados através do software GenAlex v.6.501. Foi assumido um número de população (K) variando de 1 a 10, com 10 interações cada. O *Structure* foi executado de acordo com o modelo *admixture* usando 1.000.000 de interações MCMC (Markov Chain Monte Carlo), após um período de *burn-in* de 500.000 interações. O valor mais provável para K foi estimado de acordo com a estatística DeltaK proposta por Evanno et al. (2005) através do programa *Structure Harvester* v0.6.93 (EARL AND VON HOLDT, 2012), seguido pela análise usando o software CLUMPP v1.1.2 (JAKOBSSON AND ROSENBERG, 2007) para determinar o consenso entre as 10 interações dos cluster (K) mais prováveis. Um dendograma foi construído pelo método *neighbour joining* (NJ) através do software Mega versão 5 (TAMURA et al., 2011), a partir da matriz de distância genética de Roger modificada por Wright (Figura 12).

3.4 Análises Estatísticas

Os dados obtidos no experimento foram analisados estatisticamente no software R versão 3.5.1 (R Core Team, 2018), com código do pacote ScottKnott (Enio et al 2014). Foi usado um modelo de desenho totalmente aleatório, que foi alterado (6 plantas = 1 repetição) para (cada plantas germinadas = 1 repetição). A média de cada cultivar seguiu o método proposto por Riggs e Schmitt (1988), estimando IF = 100 (número médio de fêmea em cada cultivar/ número médio encontrado Lee 74) x 100. A caracterização seguiu o método proposto por Schmitt & Shannon (1992) classificando IF= resistente (se IF \leq 10%), moderadamente resistente (se IF entre 10,1% e 30%) e suscetível (se IF \geq 30,1%).

O teste Box & Cox (1964) para normalidade foi realizado para quarenta e quatro cultivares, havendo necessidade de transformar os dados. Para as médias do índice de fêmeas (IF) realizou o teste de análise de variância (ANOVA) verificando a variação entre as cultivares (CV baixo = até 15%; CV médio = 15% a 30% e CV alto = acima de 30%) e o teste *t*, cuja hipótese foi rejeitada ($p < 0,05$) (STATGRAPHICS, 2014). O teste do erro padrão foi determinado com intervalo de confiança 5% (FLORES, 2014). A análise de probabilidade foi construída com intervalos de 95% de confiança para o número de fêmeas de cada cultivar a partir de um modelo linear generalizado do tipo Poisson (1938).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Análise Fenotípica

A reação da série diferenciadora (PI 088788, PI 437654, PI 090763, *Hartwig*, *Lee 74*, *Pickett* e *Peking*) demonstrou uma diferença no comportamento da cultivar PI 88788 (Tabela 3), embora esta cultivar seja determinada por Riggs e Schmitt (1992) com 97% de genes de resistente ao NCS, raças 3, 9, 10, 12, 13 e 14. No experimento estudado a cultivar apresentou reação de moderada resistência. Atualmente, estudos relatam mudança no comportamento da PI 88788, caracterizando como quebra de resistência ao nematoide de cisto. Faghihi (2007) da Unirvesity Purdue Extension relata que a cultivar norte americana PI 88788 está apresentando quebra de resistência ao NCS desde 2005 e exacerbando gradativamente. Guiping Yan e Richard Baidoo (2018) realizaram um estudo com relatos crescentes de populações NCS virulentas que são capazes de quebrar a resistência dentro de fontes comumente usadas, cujo comportamento pode estar relacionado à expressão gênica específica do genótipo. Desta forma, o resultado apresentado na série diferenciadora é similar aos resultados esperados, confirmando que o inóculo utilizado para o nematoide de cisto tratou-se mesmo da raça 14.

Tabela 3: Reações esperadas do teste fenotípicos validas pela reação da série diferenciadoras do NCS, raça14.

Raça	Reações da série diferenciadoras do NCS*						
	<i>Pickett</i>	<i>Peking</i>	PI 88788	PI 90763	PI 437654	<i>Hartwig</i>	<i>Lee 74</i>
1	R	R	S	R	R	R	S
2	S	S	S	R	R	R	S
3	R	R	R	R	R	R	S
4	S	S	S	S	R	R	S
5	S	R	S	R	R	R	S
9	S	S	R	R	R	R	S
10	S	R	R	S	R	R	S
11	R	S	S	R	R	R	S
12	R	S	R	S	R	R	S
13	R	S	R	R	R	R	S
14	S	S	R	S	R	R	S
Raça	Reação obtida pelo teste fenotípico						
	<i>Pickett</i>	<i>Peking</i>	PI 88788	PI 90763	PI 437654	<i>Hartwig</i>	<i>Lee 74</i>
14	S	S	MR	S	R	R	S

* Reação: R – Resistente; S – Suscetível; MR Moderada Resistência. Método proposto por RIGGS e SCHMITT (1988).

O resultado obtido pela análise quantitativa do número médio de fêmeas determinou uma variação no número médio de cistos por planta. Os dados foram transformados para a obtenção da homocedasticidade do experimento.

Na análise de variância (ANOVA) observou-se que o *P*valor atribuído foi menor ($p < 0,05$) com resultado de $2,2 \times 10^{-16}$ (transformado em potência de 10), representado estatisticamente diferenças significativas entre as cultivares. Também com essa mesma análise pôde-se obter o coeficiente de variação destacado por média de 27,02%, o que significa alta dispersão dos dados considerando a heterogeneidade dos dados e também uma muito baixa precisão experimental (Tabela 4).

Nos experimentos com nematoide de cisto, é normal se obterem diferenças de comportamento entre as cultivares, o que está atrelado às variações nas condições ambientais, comportamento do patógeno, comportamento do hospedeiro e interação entre os três fatores (MOURA et al., 2008).

Tabela 4: Resultado da análise de variância (ANOVA) para o índice de fêmeas das cultivares para resistência ao nematoide de cisto (raça, 14) obtida no software R.

FONTE	^a DF	^b SS	^c MS	^d Fc	^e Pr>Fc
Tratamento	52	1020.9	19.633	6.309	6.51×10^{-16}
Resíduo	106	329.9	3.112		
Total	158	1350.8			

^f CV = 28,14%

^aDF= Degree of Freedom (Grau de liberdade); ^bSS= Sum of Squares (Soma dos Quadrados); ^cMS= Mean Square (Média da Soma dos Quadrados); ^dFc= Fator de correção; ^ePr>Fc = probabilidade; ^fCV = Coeficiente de Variação.

Dentre o comportamento dos quarenta e seis genótipos testados, dois (4,55%) mostraram-se resistentes, enquanto oito (18,18%) caracterizaram-se com moderada resistência, e trinta e quatro (77,27%) foram classificados como suscetíveis. Esses dados revelam a predominância de genótipos com comportamento suscetível em relação às demais, que podem ser associados ao método utilizado para caracterização da reação da cultivar. Noel (1992); Arantes et al. (1999); Carvalho et al. (1999); Concibido et al. (2004) descreveram que os testes fenotípicos requerem recursos, espaço, mão-de-obra e sua avaliação é bastante demorada, principalmente para melhoramento genético, que desenvolve testes com elevados

número de linhagem. Além de ressaltar sobre os métodos utilizados para avaliação, onde geralmente ocorre uma grande variação no número de repetições, em uma mesma cultivar, quanto a resposta do patógeno (Tabela 5).

Tabela 5: Caracterização das 46 cultivares de soja quanto ao ataque do NCS*, raça 14.

Nível de Resistência	Cultivares	
	Nº	%
Resistente	2	4,55
Moderada resistência	8	18,18
Suscetível	36	77,27
Total	46	100

A partir dos resultados apresentados na tabela 6, observou-se que dentre as 46 (quarenta e seis) cultivares semeadas, 29 (vinte nove) não apresentaram divergências nas reações quando comparado com as reações publicadas pelas respectivas companhias desenvolvedoras, ao serem relacionadas com as reações obtidas no experimento fenotípico. No entanto, 15 (quinze) cultivares apresentaram divergências de comportamento.

A BRS MT Pintado caracterizada comercialmente como resistente variou sua reação para moderada resistência. Do mesmo modo, BMX Extra, BMX Foco, BRS GO Ipameri, BRS GO Chapadões e NK 7059 classificadas comercialmente com Moderada Resistência, apresentaram reações de Resistência. Igualmente, para CD 237 que comercialmente está caracterizada com Moderada Resistência, apresentou comportamento Suscetível e considerando a reação inversa que se refere ao fator do comportamento inesperado quanto ao padrão de resistência para as cultivares BRS 7380, BRS Jiripoca, TMG 115, TMG 121, FMT Tucunaré, FMT Matrinxã, BMX Ponta e BRS 231. Já as cultivares NS 8490, Nk V-max e TMG 4185 caracterizadas comercialmente como resistentes, apresentaram reações suscetíveis (Tabela 6).

Tabela 6: Probabilidades de classificação em percentual quanto à resistência (**R**), moderada resistência (**MR**) e susceptibilidade (**S**), dos quarenta e seis genótipos testados fenotipicamente e resumo do teste de médias para índice de fêmeas.

CULTIVARES	NF	IF	R	MR	S	RTF	RPD
BMX Ativa	92.3	70	0%	5.6%	94.4%	S	S
BMX Extra	8.3	6.3	83.3%	11.1%	5.6%	R	R
BMX Foco	12.5	9.5	55.6%	44.4%	0%	R	R

BMX Ponta	38.3	29	0%	66.7%	33.3%	MR	MR
BMX Potencia	94.2	71.4	5.6%	5.6%	88.8%	S	S
BRS 231	34.2	25.9	44.4%	11.2%	44.4%	MR	MR
BRS 263	18.2	13.8	50%	22.2%	27.8%	MR	MR
BRS 48	160.4	121.6	0%	0%	100%	S	S
BRS 7380	14.9	11.3	61.1%	16.7%	22.2%	MR	MR
BRS Chapadões	4.1	3.1	94.4%	5.6%	0%	R	R
BRS GO Iara	104.1	78.9	5.6%	5.6%	88.8%	S	S
BRS Ipameri	17.6	13.3	16.7%	72.2%	11.1%	MR	R
BRS Jiripoca	32.8	24.8	0%	50%	50%	MR	MR
BRS MG 810C	95.5	72.4	0%	0%	100%	S	S
BRS Pintado	22.9	17.4	16.7%	55.5%	27.8%	MR	MR
CD 202	126.8	96.2	0%	0%	100%	S	S
CD 217	126.8	88.2	0%	0%	100%	S	S
CD 237	33.7	25.6	0%	61.1%	38.9%	MR	S
FMT Matrinxã	36	27.3	5.6%	5.6%	88.8%	MR	MR
FMT Tucunare	16.3	12.4	38.9%	50%	11.1%	MR	MR
Hartwig	7	5.3	83.3%	16.7%	0.0%	R	R
Lee 74	131.9	100	0%	0%	100%	S	S
M 6972	52.4	39.7	0%	16.7%	83.3%	S	S
M 7739	68.2	51.7	5.6%	22.2%	72.2%	S	S
M 8001	86.2	65.4	0%	5.6%	94.4%	S	S
M 8133	89.9	68.2	0%	0%	100%	S	S
M 8372	79.9	60.6	0%	0%	100%	S	S
NK 7059	17.3	13.1	22.2%	72.2%	5.6%	MR	R
NS 6909	180.9	137.2	0%	0%	100%	S	S
NS 7490	91.5	69.4	0%	0%	100%	S	S
NS 7497	70.4	53.4	0%	5.6%	94.4%	S	S
NS 8490	98.4	74.6	0%	16.7%	83.3%	S	S
P98Y12	73.7	55.9	5.6%	16.7%	77.7%	S	S
P98y30	86.7	65.8	5.6%	0%	94.4%	S	S
P98y51	110.6	83.8	11.1%	11.1%	77.8%	S	S
Peking	77	58.3	0%	11.1%	88.9%	S	S
PI 437654	5.6	4.3	88.9%	11.1%	0.0%	R	R
PI 88788	19.5	14.8	33.3%	38.9%	27.8%	MR	R
PI 90763	65.3	49.5	0%	38.9%	61.1%	S	S
Pickett	101.7	77.1	0%	0%	100%	S	S
SYN 1059	27.7	21	22.2%	55.6%	22.2%	MR	MR
TMG 115	21.3	16.2	38.9%	27.8%	33.3%	MR	MR
TMG 1176	46.5	35.3	0%	22.2%	77.8%	S	S
TMG 1180	110.1	75.9	0%	22.2%	77.8%	S	S
TMG 1188	91.9	69.7	0%	5.6%	94.4%	S	S
TMG 121	51.7	39.2	0%	5.6%	94.4%	S	MR
TMG 132	133.2	101	0%	0%	100%	S	S
TMG 133	71.5	54.2	0%	16.7%	83.3%	S	S
TMG 2181	80.3	60.9	0%	0%	100%	S	S

“Continua”

TMG 4182	3.5	2.7	94.4%	5.6%	0%	R	R
TMG 4185	11.1	8.4	55.5%	38.9%	5.6%	R	R
TMG Anta	66.3	50.3	0%	16.7%	83.3%	S	S
V.Max	29.8	22.6	16.7%	44.4%	38.9%	MR	R

“Conclusão”

*NF = Número de Fêmeas; IF = Índice de Fêmeas; RTF = Reação Teste Fenotípico pela média do índice de fêmeas (IF); R.P.P.O = Reações Publicadas Pelas Obtentoras.

No estudo realizado por Dias et al. (2009), cujo objetivo foi determinar a distribuição das raças do *Heterodera glycines* entre os estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, São Paulo, Rio Grande do Sul e Tocantins, os resultados apresentam semelhanças com os deste experimento. As cultivares BRS MT Pintado, BRS 7380, BRS Jiripoca, FMT Tucunaré, FMT Matrinxã, TMG 115, TMG 121, BMX Ponta e BRS 231 determinaram reações de moderada resistência e BRS GO Ipameri, BRS Chapadões e NK 7059 com reações de resistência. Igualmente, para CD 237 com comportamento suscetível. Para cultivar NS 8490 a reação foi suscetível, porém para cultivares NK V-max e TMG 4185 o estudo indicou reações de Resistência.

Dias et al. (2009) relata que principalmente nos estados de Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, o número de cultivares com resistência à múltiplas raças do NCS tem se elevado, rapidamente, no entanto, ainda existe carência de cultivares resistente para algumas raças, pois em seu estudo a maioria das cultivares testada caracterizou resistência a raça 1 e 3. Essa dificuldade de estabelecimento de um portfolio mais completo com cultivares resistentes à multiraças pode estar atrelado às dificuldades de obtenção de cultivares adaptadas em algumas regiões de cultivo da soja.

Para as cultivares NK V-Max e TMG 4185 cujo comportamento no experimento indicou divergência em relação aos resultados comerciais, é possível que a heterogeneidade no número de plantas germinadas (de 9 a 36 plantas) no experimento, tenha impactado a correta classificação de suas reações, sendo estas classificadas como Suscetíveis.

No entanto, a parte as particularidades de alguns resultados obtidos no teste fenotípico, a análise de probabilidade do índice de fêmeas (IF) de cada cultivar indicou uma confiança de 95%, fato que valida assim o método utilizado no experimento. Em suma, o experimento conduzido nessa etapa da pesquisa evidenciou que as cultivares TMG 4182, BRS MT Pintado identificadas como resistente e BRS GO Chapadões, BRS GO Ipameri, NK 7059, BMX Extra, BRS 263, SYN 1059, BMX Foco, CD 237 e NK 7059, identificadas como

moderadamente resistentes, podem ser consideradas candidatas para a busca de marcadores moleculares do tipo *SNP* ligados à resistência do nematoide de cisto da soja, raça 14.

4.2 Seleção de marcadores *SNPs* prospectados da literatura

Um total de vinte e quatro marcadores associados à resistência ao NCS, raça 14, foram prospectados com base nos bancos de dados (Tabela 7). Entre estes marcadores de DNA, dezesseis foram marcadores microssatélite, oito marcadores de intervalos *SSRs* e quatro marcadores *RAPDs* (Tabela 7). Essa amostra de marcadores referência apresenta uma expressiva cobertura, estando distribuídos em oito grupos de ligações: A2, C1, C2, D1a, D2, E, G e J.

Tabela 7: Marcadores microssatélites e *RAPD* associados a genes de resistência a NCS identificados em publicações de 2001 a 2011.

Marcador Microssatélite	Grupo de ligação	Referências
Satt 309	G	SILVA et al. (2007)
Sat_168	G	SILVA et al. (2007)
Sat_141	G	FERREIRA et al. (2011), SILVA et al. (2007)
Satt 570	G	SILVA et al. (2007)
Satt 356	G	SILVA et al. (2007)
Satt 217	G	SILVA et al. (2007)
Satt 038	G	FERREIRA et al. (2011)
Satt 376	C2	FERREIRA et al. (2011)
Satt 370	D1a	FERREIRA et al. (2011)
Satt 177	A2	SILVA et al. (2007)
Satt 082	D2	FERREIRA et al. (2011), SCHUSTER et al. (2001)
Satt 389	D2	SCHUSTER et al. (2001), SILVA et al. (2007)
Sat-001	D2	SCHUSTER et al. (2001)
Marcador Microssatélite	Grupo de ligação	Referências
Satt 574	D2	SCHUSTER et al. (2001)
Satt 301	D2	SCHUSTER et al. (2001)
cqSCN003	J	GLOVER et al. (2004)
Intervalo de Microssatélite	Grupo de ligação	Referências
Satt_141/Satt 610	G	FERREIRA et al. (2011)
A059-A443	C1	YUE et al. (2011)
A398-K487	D1a	YUE et al. (2011)

“Continua”

A656-Satt452	E	YUE et al. (2011)
Marcador <i>RAPD</i>	Grupo de ligação	Referências
OPAA-11 ₇₉₅	D2	SCHUSTER et al. (2001)
OPAE-08 ₈₃₇	D2	SCHUSTER et al. (2001)
OPR-07 ₅₄₈	D2	SCHUSTER et al. (2001)
OPY-07 ₂₀₃₀	D2	SCHUSTER et al. (2001)

“Conclusão”

Para a busca de marcadores tipo SNPs associados à esses marcadores na plataforma *Soybase*, os quatro marcadores *RAPD* foram desconsiderados por não ter sido possível a localização de suas sequencias descritas na plataforma *soybase*. No caso dos marcadores Sat_168, Satt356, Satt177, cqSCN003 e os marcadores dos intervalos A059-A443, A398-K487, A656-Satt452, igualmente não foi possível localizá-los na plataforma *SoyBase*, porém estes marcadores foram substituídos por outros marcadores sequenciados mais próximos no mapa genético, de modo que Sat_168 foi substituído pelo Sat_210 posicionado à 0,2 cM; Satt 356 substituído por Satt610 a 1,09 cM; Satt177 substituído por Sat_409 a 1,26 cM e cqSCN003 substituído por Satt409 e Satt431.

Dessa maneira, a partir dos 20 marcadores SSRs pré-definidos, conseguiu-se associar 46 marcadores tipo *SNPs* a partir da busca no *Soybase*. Esses marcadores *SNPs* associados foram considerados por estarem posicionados à direita e à esquerda de cada marcador tipo SSR pré-definido (Tabela 8). De acordo com as análises realizadas pelo laboratório *EBDI*, dentre os 40 marcadores *SNPs* rastreados no *SoyBase*, apenas 6 marcadores apresentaram compatibilidade com os resultados adquiridos através do mapeamento dos *SNPs* (316 marcadores) candidatos à resistência ao NCS, raça 14. Os *SNPs* compatíveis foram: Gm16_33360539_T_C; Gm16_35700223_G_T; Gm17_32038975_T_G; Gm18_1620585_T_C; Gm18_3169557_A_C; Gm18_4680723_C_T, podendo ser visualizados na tabela 8.

Tabela 8: SNPs rastreados no mapa de sequenciamento da plataforma SoyBase.

Cultivar	Marcador Microssatélite	GL	Posição SNP	SNPs franqueadores (Designação Illumina 50k)						
				db SNP	rs	Alelos	Alelos 1	Alelos 2	chr_glyma_v1.01	pos_glyma_v1.01
BRS 231	Satt 309	G	Esquerda	ss715629312	Gm18_1735487_G_A	G/A	G	A	18	1735487
BRS 263			Direita	ss715629315	Gm18_1737445_T_C	T/C	T	C	18	1737445
BRS Jiripoca	Sat_168, associado Sat_210 (0,2cM)	G	Esquerda	ss715629217	Gm18_1620585_T_C	T/C	T	C	18	1620585
BRS GO Chapadões			Direita	ss715629226	Gm18_1625693_A_G	A/G	A	G	18	1625693
BRS GO Ipameri	Satt_141	G	Esquerda	ss715629996	Gm18_2401678_A_G	A/G	A	G	18	2401678
BRS MT Pintado			Direita	ss715630002	Gm18_2431585_T_C	T/C	T	C	18	2431585
FMT Matrinxã	Satt 570	G	Esquerda	ss715630231	Gm18_3157912_T_C	T/C	T	C	18	3157912
FMT Tucunaré			Direita	ss715630235	Gm18_3169557_A_C	A/C	A	C	18	3169557
NK 7059RR	Satt 217	G	Direita	ss715630076	Gm18_2675291_G_A	G/A	G	A	18	2675291
TMG 115RR			Esquerda	ss715630683	Gm18_4480723_C_T	C/T	C	T	18	44800723
TMG 121RR	Satt 038	G	Direita	ss715630690	Gm18_4702681_T_G	T/G	T	G	18	4702681
TMG 1188RR			Esquerda	ss715628872	Gm18_1340190_T_C	T/C	T	C	18	1340190
TMG 4182	Satt 370	D1a	Direita	ss715628880	Gm18_1348367_A_G	A/G	A	G	18	1348367
Syn 1059RR			Direita	ss715593374	Gm06_15488504_C_T	C/T	C	T	06	15488504
BMX Foco	Satt 177, associado Sat_409 (1,26cM)	A2	Esquerda	ss715579579	Gm01_44441009_T_C	T/C	T	C	01	44441009
BMX Extra			Direita	ss715579580	Gm01_44500880_A_G	A/G	A	G	01	44500880
BMX Ponta	Satt 082	D2	Esquerda	ss715602603	Gm08_5702524_T_C	T/C	T	C	08	5702524
PI 088788			Direita	ss715602604	Gm08_5717188_G_T	G/T	G	T	08	5717188
PI 437654	Satt 389	D2	Esquerda	ss715626362	Gm17_19719211_T_G	T/G	T	G	17	19719211
Hartwig			Direita	ss715626363	Gm17_19759026_G_A	G/A	G	A	17	19759026
Lee 74	Sat_001	D2	Esquerda	ss715626145	Gm17_14023276_A_G	A/G	A	G	17	14023276
PI 090763			Direita	ss715626144	Gm17_14026115_T_G	T/G	T	G	17	14026115
Pickett	Satt 574	D2	Esquerda	ss715627048	Gm17_36738479_C_T	C/T	C	T	17	36738479
Peking			Direita	ss715627049	Gm17_36753289_A_C	A/C	A	C	17	36753289
BMX Ativa	Satt 574	D2	Esquerda	ss715626722	Gm17_31912048_T_C	T/C	T	C	17	31912048
BMX Potência			Direita	ss715626724	Gm17_32038975_T_G	T/G	T	G	17	32038975

“Continua”

Cultivar	Marcador Microsatélite	GL	Posição SNP	SNPs franqueadores (Designação Illumina 50k)						
				db SNP	rs	Alelos	Alelos 1	Alelos 2	chr_glyma_v1.01	pos_glyma_v1.01
CD 217	Satt 301	D2	Esquerda	ss715627113	Gm17_37004518_G_A	G/A	G	A	17	37004518
CD 237			Direita	ss715627114	Gm17_37015253_T_C	T/C	T	C	17	37015253
CD 202			Esquerda	ss715624431	Gm16_33271679_G_T	G/T	G	T	16	33271679
BRS 7380 RR	cqSCN003 associados (Satt 244/ Satt 431)	J	Direita	ss715624432	Gm16_33360539_T_C	T/C	T	C	16	33360539
BRS MG 810C			Esquerda	ss715624819	Gm16_35700223_G_T	G/T	G	T	16	35700223
BRS 48			Direita	ss715624820	Gm16_35729180_A_G	A/G	A	G	16	35729180
Cultivar	Intervalo de SSR x RFLP	GL	Posição SNP	SNPs franqueadores (Designação Illumina 50k)						
				db SNP	rs	Alelos	Alelos 1	Alelos 2	chr_glyma_v1.01	pos_glyma_v1.01
BRS GO Iara	Sat_141 Satt 610	G	Esquerda	ss715629996	Gm18_2401678_A_G	A/G	A	G	18	2401678
M8133			Direita	ss715630002	Gm18_2431585_T_C	T/C	T	C	18	2431585
M6972			Esquerda	ss715630073	Gm18_2662699_C_T	C/T	C	T	18	2662699
M7739	A059-A443 associados SCN21-1 = BARC-029425- 06191	C1	Direita	ss715630076	Gm18_2675291_G_A	G/A	G	A	18	2675291
M8001			Esquerda	ss715587398	Gm04_2207255_G_T	G/T	G	T	04	2207255
M8372			Direita	Ss715587399	Gm04_2210362_A_G	A/G	A	G	04	2210362
NS6909	A398-K487 associados SCN 20-3= Sat_353/Sat_332)	D1a	Esquerda	ss715580804	Gm01_7683057_G_T	G/T	G	T	01	7683057
NS7497			Direita	ss715580806	Gm01_7729726_C_T	C/T	C	T	01	7729726
NS8490			Esquerda	ss715579052	Gm01_336090_A_G	A/G	A	G	01	336090
NS7490	A656 associados SCN 21-3= Satt355/BARC- 054023-12243) - Satt452	E	Direita	ss715579179	Gm01_367189_G_A	G/A	G	A	01	367189
P98Y30			Esquerda	ss715621594	Gm15_32148841_C_T	C/T	C	T	15	32148841
P98Y51			Direita	ss715621596	Gm15_32221790_A_G	G/A	G	A	15	32221790
TMG 1176	Satt355/BARC- 054023-12243) - Satt452	E	Esquerda	ss715621791	Gm15_38873997_A_G	A/G	A	G	15	38873997
TMG 1180			Direita	ss715621792	Gm15_38933693_T_C	T/C	T	C	15	38933693

“Continua”

Cultivar	RAPD marker	GL	Posição SNP	SNPs franqueadores (Designação Illumina 50k)					
				db SNP	rs	Alelos	Alelos 1	Alelos 2	chr_glyma_v1.01
TMG 132	OPAA-11 ₇₉₅	D2							
TMG 133	OPAE-08 ₈₃₇								
TMG 2181	OPR-07 ₅₄₈								
TMG Anta	OPY-07 ₂₀₃₀								

Marcadores *RAPD* não estão descritos na plataforma SoyBase

“Conclusão”

4.3 Genotipagem

Códigos foram gerados para identificar o posicionamento de cada marcador tipo *SNP* na linha mapeada com o *BeadChip* 6K. A codificação é restrita à empresa Nidera Seeds Brasil Ltda, a fim de preservar o conflito de interesse da companhia.

A partir dos 6K marcadores do *BeadChip* avaliados nas 46 cultivares comerciais nacionais selecionadas, um total de 316 marcadores *SNPs* apresentaram amplificação (cerca de 5,26% do total), sendo que 282 foram polimórficos e 34 monomórficos, ou seja, obteve-se uma taxa de 92% de polimorfismo entre os 316 marcadores *SNPs* amplificados. Entre os marcadores polimórficos apenas 8 (oito) *SNPs* apresentaram estar em desequilíbrio de ligação ($p > 0,05$), logo apenas os marcadores *SNPs* em equilíbrio de ligação foram utilizados nas estimativas dos parâmetros genéticos, totalizando 276 *SNPs*.

Na tabela 9 apresenta-se o valor médio da diversidade gênica (H_E) total que foi de 0,338 ($\pm 0,009$), enquanto o valor médio da heterozigosidade observada (H_O) total foi 0,032 ($\pm 0,003$). A estimativa do valor médio de fixação total (F) foi de 0,884 ($\pm 0,012$). O poder de exclusão foi alto, obtendo uma probabilidade de exclusão (PE) de 100% e uma probabilidade de identidade (PI) de $1,8 \times 10^{-7}$ para um conjunto 19 *SNPs*, diferenciando todos os genótipos.

Tabela 9: Descritores da diversidade genética do germoplasma de 46 cultivares comerciais de soja nacionais lançadas até 2017 com resistência ou moderada resistência e susceptibilidade ao NCS, raça 14, usando 276 marcadores *SNPs*.

Grupos	N	P%	A	Ap	H_E (EP)	H_O (EP)	F (EP)
R	2	3,2	290	0	0,021 ($\pm 0,007$)	0,000 ($\pm 0,000$)	1,000 ($\pm 0,000$)
MR	8	65	464	2	0,261 ($\pm 0,013$)	0,005 ($\pm 0,002$)	0,982 ($\pm 0,005$)
S	36	99	562	100	0,352 ($\pm 0,009$)	0,040 ($\pm 0,009$)	0,867 ($\pm 0,013$)
Total	46	100	565	102	0,338 ($\pm 0,009$)	0,032 ($\pm 0,003$)	0,884 ($\pm 0,012$)

Grupos de Resistência genética: R – Resistente; MR – Moderadamente Resistente; S – Suscetível. Fatores avaliados: N – Número de cultivares; P% - Porcentagem de locus *SNPs* polimórfico; A – Número de alelos *SNPs* amplificados; Ap – Número de alelos privados; H_E – Diversidade gênica ou heterozigosidade esperada; H_O – Heterozigosidade observada; F – Índice de fixação; EP – Erro padrão.

Considerando a resposta fenotípica dos cultivares de soja quanto a resistência ao NCS, raça 14, foi possível organizar o germoplasma em resistentes (R, 2 cultivares), mediantemente resistente (MR, 8 cultivares) e suscetível (S, 36 cultivares). O grupo S apresentou a maior

diversidade genética descritiva com os valores de $P\%= 99$, $A= 562$ e $H_E=0,352 (\pm 0,009)$, seguido do grupo MR com $P\%=65$, $A=444$ e $H_E= 0,261 (\pm 0,013)$ e o grupo R com $P\%= 3,2$, $A=290$ e $H_E=0,021 (\pm 0,007)$. A heterozigosidade observada foi baixa nos três grupos ($R=0,00$, $MR= 0,005$ e $S=0,040$), gerando elevados índices de fixação nos três grupos (Tabela 1). Estes valores de H_E , H_O e F , revelam que a variação genética está organizada em genótipos homocigotos, como esperado para uma espécie predominantemente autógama, além de indicar também, o compromisso dos programas de melhoramento com a pureza das cultivares lançadas, assim com a sua homogeneidade e estabilidade.

Cento e dois alelos privativos (Ap) foram constatados entre os 565 alelos amplificados, isto é, aqueles que estão presentes em apenas um grupo específico. Os Ap amplificados foram quase exclusivamente pertencentes ao grupo S (100 alelos privativos), representando 18% do total de alelos *SNPs* polimórficos amplificados (Tabela 1). Considerando as 53 cultivares de soja incluindo as diferenciadoras genotipadas neste estudo, de um total de 612 alelos amplificados, 157 alelos foram privativos, ou seja, aqueles que estão presentes em apenas uma cultivar específica (Tabela 2). Este total de Ap representa 25% dos alelos amplificados.

Entre as dez cultivares de soja com resposta fenotípica de resistência ao NCS, apenas a cultivar BMX FOCO apresentou um alelo privativo comparado com as demais. Diferente das susceptíveis ao NCS, a cultivar diferenciadora Lee 74 apresentou o maior número de Ap, seguida das cultivares NS 6909 e M 8001 com 20, 10 e 10, respectivamente. Tendo em vista que o elevado número de Ap encontrado na cultivar indica uma base genética mais ampla comparada entre as demais, fica claro a estreita base genética das cultivares consideradas fontes de variação de resistência, fato que deve ser considerado pelos programas de melhoramento.

Tabela 10: Descrição dos locus com alelos privativos (Ap) por cultivar de soja.

Cultivares	Nº de Ap.	Loco com Ap
<i>Hartwig</i>	1	SNP110
PI437654	2	SNP60; SNP110
PI 088788	1	SNP244
<i>Lee 74</i>	20	SNP51; SNP52; SNP133; SNP138; SNP142; SNP143; SNP144; SNP145; SNP144; SNP147; SNP148; SNP153; SNP164; SNP198; SNP228; SNP270; SNP284; SNP287 SNP288; SNP289

“Continua”

<i>Peking</i>	9	SNP144; SNP145; SNP144; SNP147; SNP148; SNP154; SNP261; SNP310; SNP313;
PI 090763	1	SNP262;
Cultivares	Nº de Ap.	Loco com Ap
<i>Pickett</i>	3	SNP228; SNP310; SNP313
BMX FOCO	1	SNP171
NK V-MAX	3	SNP85; SNP92; SNP228
NS 8490	6	SNP201; SNP271; SNP272; SNP289; SNP310; SNP313
TMG 4185	7	SNP133; SNP138; SNP142; SNP143; SNP145; SNP148; SNP153
BMX PONTA	3	SNP85; SNP92; SNP228
BRS 231	1	SNP163
BRS 7380 RR	1	SNP142
FMT	6	SNP144; SNP145; SNP144; SNP147; SNP148; SNP149
MATRINXÃ	6	SNP149
FMT	1	SNP168
TUCUNARÉ	1	SNP168
BMX ATIVA	8	SNP92; SNP117; SNP118; SNP270; SNP271; SNP272; SNP288; SNP289
BMX	7	SNP144; SNP145; SNP144; SNP147; SNP148; SNP270; SNP313
POTÊNCIA	7	SNP270; SNP313
BRS 48	3	SNP51; SNP53; SNP270
BRS GO IARA	6	SNP117; SNP118; SNP287; SNP288; SNP289; SNP313
BRS MG 810C	6	SNP144; SNP145; SNP144; SNP147; SNP148; SNP149;
CD 202	3	SNP270; SNP288; SNP289
CD 217	4	SNP105; SNP201; SNP310; SNP313
M6972	8	SNP32; SNP85; SNP92; SNP117; SNP118; SNP168; SNP288; SNP290
M7739	4	SNP105; SNP113; SNP201; SNP313
M8001	10	SNP51; SNP53; SNP105; SNP113; SNP138; SNP142 SNP145; SNP148; SNP153; SNP201
M8133	1	SNP85
M8372	2	SNP32; SNP85
NS 6909	10	SNP32; SNP85; SNP168; SNP228; SNP270; SNP272 SNP284; SNP287; SNP288; SNP289
NS 7490	4	SNP85; SNP92; SNP310; SNP313
NS 7497	4	SNP32; SNP105; SNP113; SNP198
P98Y51	1	SNP310
TMG 1176	3	SNP163; SNP310; SNP313
TMG 1180	1	SNP163
TMG 1188 RR	2	SNP310 SNP313
TMG 132	1	SNP288
TMG 2181	2	SNP85 SNP222
TMG ANTA	1	SNP168

Através da Análise Molecular de Variância (AMOVA – Analysis of Molecular Variance), os marcadores *SNPs* mostraram que 84% da variação genética observada nas 46 cultivares de soja estudadas, que apenas 10% da variação se deve aos grupos R, MR e 6% dentro das cultivares no grupo S. A diferenciação genética entre os grupos R, MR e S foi expressiva e significativa com valor de F_{ST} de 0,09 (p-valor = 0,001). Na análise par-a-par de F_{ST} a maior diferenciação genética foi entre os grupos R e MR ($F_{ST}=0,20$ e p-valor= 0,03), seguido R e S ($F_{ST}=0,17$ e p-valor= 0,03) e MR e S ($F_{ST}=0,07$ e p-valor= 0,001). Estes maiores valores em relação ao grupo R eram esperados, visto que a estimativa de F_{ST} é diretamente relacionada com a variação na frequência do alelo entre as amostras e, como este grupo R amostral é pequeno ($n=2$) teve apenas 3,2% de polimorfismo apresentando discrepâncias na frequência alélica da maioria dos locus *SNPs* genotipado.

Uma elevada e expressiva divergência genética foi mantida entre as 46 cultivares comerciais de soja avaliadas, como indicado pelo valor médio da distância genética (DG) de Roger Modificada de 0,540 e 73% das comparações par-a-par entre as cultivares com $DG \geq 0,500$. O menor valor de DG foi zero entre as cultivares BRSM Pintado e BRSGO Chapadões, enquanto o maior valor de DG foi 0,759 entre as cultivares FMT Matrinxã e NS 6909.

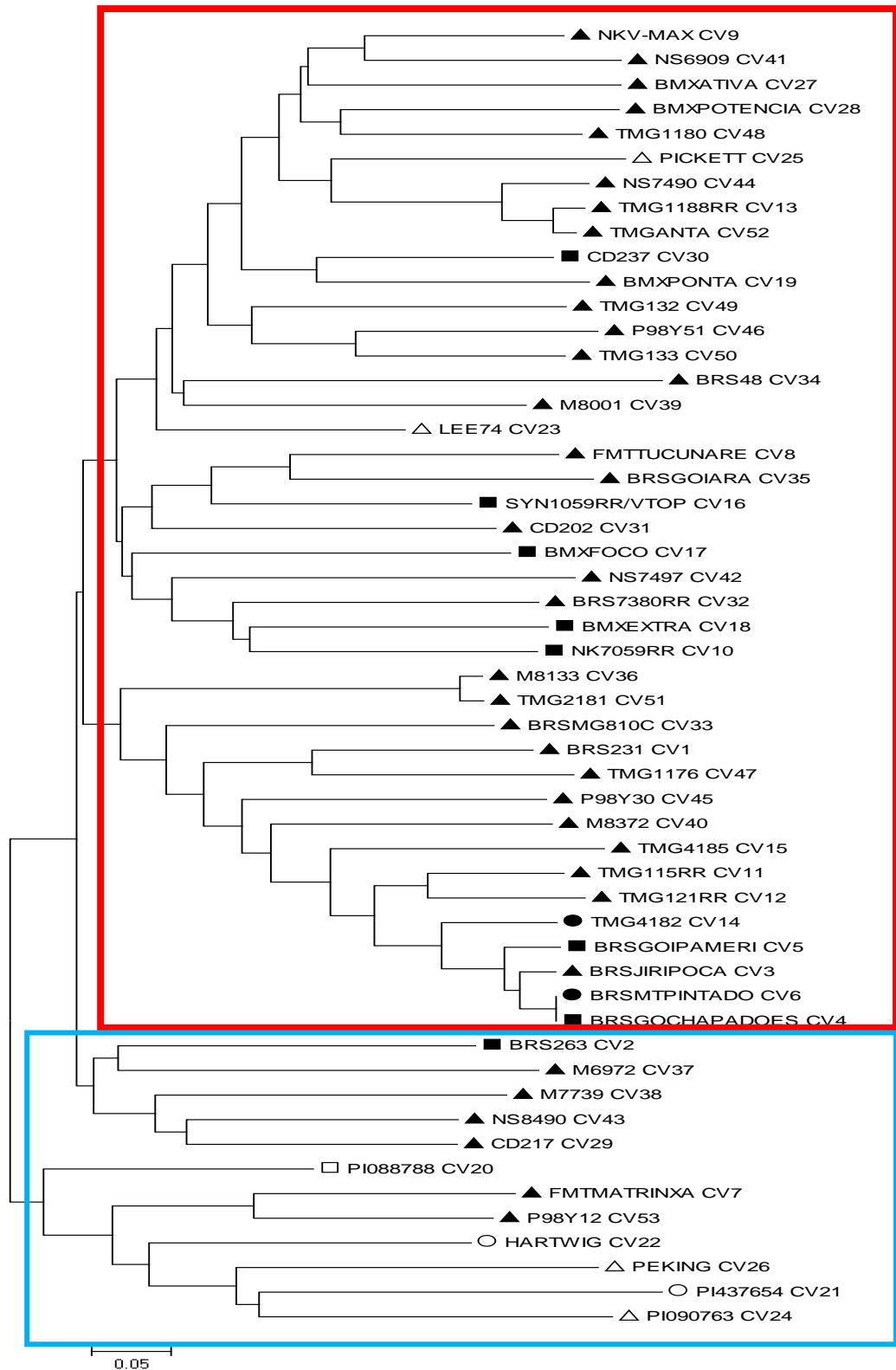


Figura 12: Dendograma que demonstram a relação de 46 cultivares comerciais de soja e sete cultivares diferenciadoras construído pelo método *neighbour joining* com base na distância genética de Rogers modificada por Wright usando 302 marcadores *SNPs*. As cultivares diferenciadoras estão representadas pelos símbolos vazios, enquanto as cultivares comerciais

de soja pelos símbolos cheios, sendo o grupo R pelo círculo, o grupo MR pelo quadrado e o grupo S pelo triângulo.

A análise de agrupamento de *neighbor joining* da coleção das 46 cultivares de soja e as sete raças diferenciados produziu a formação de dois grupos principais e cinco subgrupos entre os genótipos avaliados (Figura 12). O primeiro grupo principal, amostrado na figura 12 em contorno vermelho, aglomerou 41 genótipos, entre eles as cultivares NK V-max, NS 6909, BMX Ativa, BMX Potência, TMG 1180, NS 7490, TMG 1188, TMG Anta, BMX Ponta, TMG 132, P98Y51, TMG 133, BRS 48, M 8001, FMT Tucunaré, BRS GO Iara, CD 202, NS 7497, BRS 7380, M 8133, TMG 2181, BRS MG 810C, BRS 231, TMG 1176, P98Y30, M 8372, TMG 4185, TMG 115 RR, TMG 121 RR, BRS Jiripoca, todas oriundas dos genes de suscetibilidade ao nematoide de cisto raça 14; as cultivares CD 237, Syn 1059 RR, BMX Foco, BMX Extra, NK 7059 RR, BRS GO Ipameri, BRS GO Chapadões com genes de moderada resistência ao nematoide de cisto raça 14; além das duas cultivares diferenciadoras *Pickett* e *Lee 74* também com o gene de suscetibilidade ao nematoide de cisto raça 14 (Figura 12).

O segundo grupo, amostrado na figura 12 em contorno azul, aglomerou 12 genótipos composto pelas cultivares M 6972, M 7739, NS 8490, CD 217, FMT Matrinxã, P98Y12, todos com genes de suscetibilidade ao nematoide de cisto raça 14. Já a cultivar BRS 263 e as cultivares controle PI 88788, *Peking*, PI 90763, *Hartwig* e PI 437654 apresentaram gene de moderada resistência ao NCS, raça 14 (Figura 12).

De maneira geral, entre os dois grupos de cultivares foi possível identificar um subgrupo gerado por dezessete cultivares, um segundo subgrupo composto por nove cultivares, um terceiro subgrupo gerado por quinze cultivares, um quarto subgrupo gerado por cinco cultivares e um quinto subgrupo por seis cultivares.

O valor médio da probabilidade posteriori [LnP(D)] simulada na análise do *Structure* para sucessivos valores de K (1 a 10) testados aumentou com o aumento de K, entretanto nenhuma diferença expressiva foi observada entre os valores LnP(D). Com o auxílio da estimativa de ΔK proposta por Evanno et al. (2005) foi observado um elevado pico para $\Delta K=2$, sugerindo dois grupos genéticos. Adicionalmente, outros dois picos não acentuados foram constatados, sendo um para $\Delta K=5$ e outro para $\Delta K=7$, sugerindo uma subestruturarão da coleção de soja estudada (Figura 13).

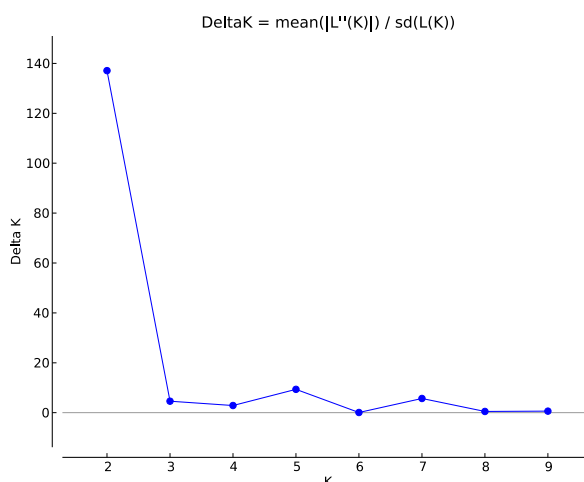


Figura 13: Estimativa do número de grupos genéticos (ΔK) em uma coleção de 46 cultivares de soja comerciais nacionais lançadas até 2017 com resistência ou moderada resistência e susceptibilidade ao NCS, raça 14, e sete linhas diferenciadoras de confirmação da raça em questão (*Hartwig*, PI 437654, PI 088788, *Lee* 74, *Peking*, PI 090763 e *Pickett*) usando o método de Evanno na análise do *Structure*.

As cultivares foram atribuídos a cada grupo genético baseado considerando um valor limite do coeficiente de ancestralidade ($\geq 0,70$). Os valores do coeficiente de ancestralidade de cada cultivar estão representados pelas colunas, nas quais as cores representam a probabilidade de atribuição nos grupos genéticos (Figura 13). Nesta análise, é possível destacar que as cultivares de soja avaliados não apresentam uma organização genética que coincide com a resposta de resistência e suscetibilidade ao NCS, raça 14, além de demonstrar um crescente compartilhamento de ancestralidade mista entre os grupos com o aumento de K, indicando um estreitamento da base genética dado o uso compartilhado de genitores no desenvolvimento das cultivares como pode ser observado na descrição genealógica quando disponível (Tabela 1), assim como o uso recorrente de poucos genótipos como fonte de resistência as diferentes raças de NCS (Figura 14).

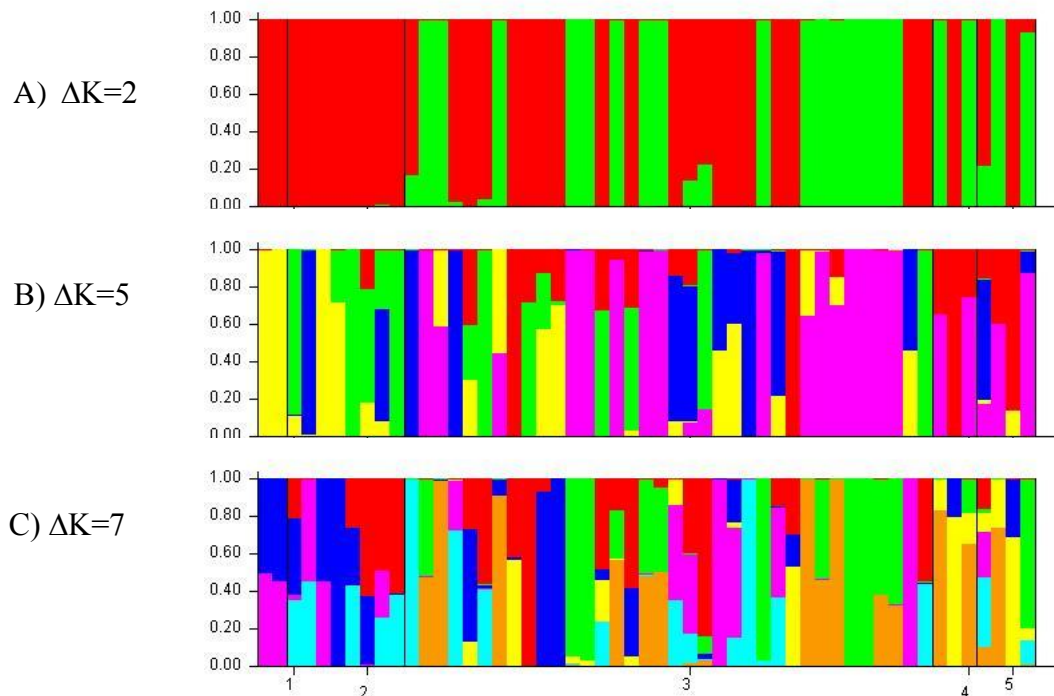


Figura 14: Análise da organização da estrutura genética entre as 46 cultivares de soja comerciais nacionais lançadas até 2017 com resistência (1-2) ou moderada resistência (3-10) e susceptibilidade (11-46) ao NCS, raça 14, e sete linhas diferenciadoras (47-53) de confirmação da raça em questão (*Hartwig*, PI 437654, PI 088788, *Lee 74*, *Peking*, PI 090763 e *Pickett*), respectivamente, para $\Delta K=2$, 5 e 7. Cada acesso está representado por uma barra numeradas de 1 a 53, os números correspondem os grupos quanto a resposta de fenotípica de reação a NCS: (1) resistente; (2) moderadamente resistente; (3) susceptível; (4) diferenciadora resistente; (5) diferenciadora susceptível.

4.4 Análise de correlação fenotípica e genotípica

O tipo de análise realizada para correlação fenotípica e genotípica foi à correlação ponto-bisserial e posteriormente, a análise de trilha das variáveis. Nessa análise relacionou-se uma variável com característica quantitativa (Índice de fêmeas) com a variável que é binária caracterizada como marcador molecular (Figura 14).

Os coeficientes de correlação são adimensionais e seu valor absoluto não ultrapassa a unidade, tanto positivo quanto negativa; o coeficiente de correlação igual a zero evidencia a falta de relação linear entre duas variáveis e não a ausência de relação ou de dependência.

Os valores de correlações dependem da base genética da população para a qual os caracteres são avaliados, apresentando oscilação entre estimativas positivas e negativas, propiciando indicativo de como a seleção de um caráter pode influenciar outro (HEIKO, 2001).

Lopes et al. (2002) relata que seja possível acrescentar níveis de significância estatística para as correlações fenotípicas e genotípicas, existe uma tendência entre os melhoristas de plantas a valorizar mais o sinal (positivo e negativo) e a magnitude dos valores na interpretação aplicada das correlações.

Contudo, para se calcular a correlação entre esta variável e a outra variável (numérica) o cálculo do coeficiente de correlação de Pearson é mais indicado. Também conhecido como coeficiente de correlação ponto-bisserial esse método é usado para se medir a correlação entre uma variável nominal dicotômica e uma variável numérica (FERGUSON, 1981).

Apesar das correlações serem de grande importância no melhoramento genético, elas podem conduzir a estratégias de seleção equivocadas, se interpretadas inadequadamente, pois suas estimativas não expressam uma relação de causa e efeito, tal como estimado em análises de trilha.

A análise de trilha consiste no desdobramento das correlações nos efeitos diretos e indiretos de caracteres independentes e explicativos sobre uma variável principal básica, cujas estimativas são obtidas por meio de equações de regressão, em que as variáveis são previamente padronizadas (WRIGHT, 1921; 1923; LI, 1975).

Em inúmeras culturas têm-se verificado o emprego da análise de trilha, como, por exemplo, no amendoim (SANTOS et al., 2000), capim elefante (DAHER et al., 2004), eucalipto (CORREIA et al., 1996), feijão (COIMBRA et al., 1999; FURTADO et al., 2002), pimentão (CARVALHO et al., 1999), mandioca (GOMES et al., 2007) e também, na soja (CARVALHO et al., 2002; IQBAL et al., 2003; BIZETI et al., 2004).

O êxito na análise de trilha reside, basicamente, na formulação do relacionamento de causa e efeito entre as variáveis. Além disso, o desdobramento das correlações depende do conjunto de caracteres estudados, que normalmente é estabelecido pelo conhecimento prévio do pesquisador, de sua importância e das possíveis inter-relações expressas em diagramas de trilha (CRUZ et al., 2004).

Na figura 14 têm-se a representação da matriz gráfica de correlação com os 316 marcadores e a variável IF (índice de fêmeas), totalizando em 317 variáveis.

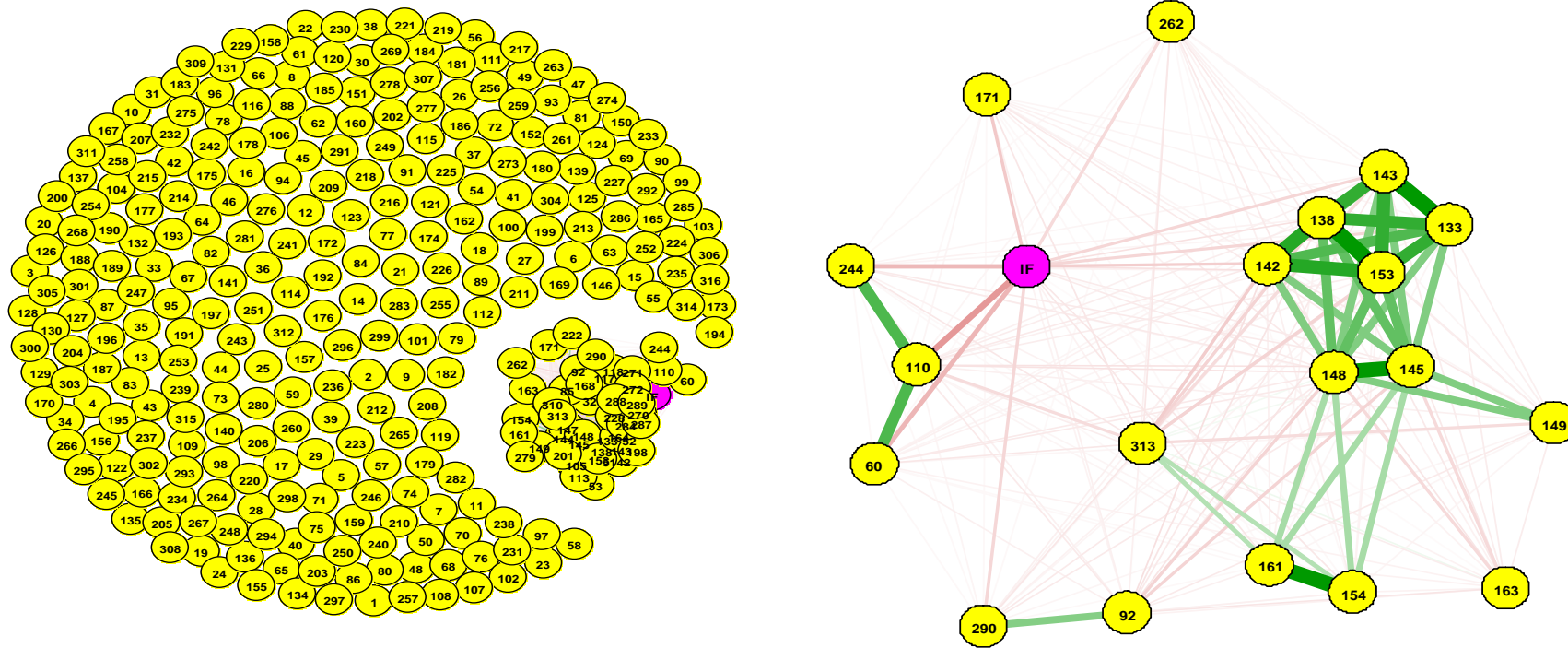


Figura 15: Redes de correlações entre *SNPs* e índice de fêmeas (IF).

Muitos marcadores que não possuem relação entre si estão segregados. Na figura 14 (imagem à esquerda), possui um grupo de marcadores que mostra a relação de distância mais próxima ao do índice de fêmeas (IF), apresentando assim, a correlação dos marcadores com a variável índice de fêmeas.

O grupo de marcadores que apresentaram correlação em efeito “zoom” à direita na figura 14, caracteriza que todos os marcadores têm relação com a variável IF, mas muitos possuem relação fraca expressado na espessura da linha de ligação que corresponde na coloração verde (ligação positiva) e vermelha (ligação negativa). No estudo a ligação de interesse representada na rede de correlações entre *SNPs* e índice de fêmeas (Figura 14) é a ligação negativa. Essa ligação negativa determina que os marcadores *SNPs* com a variável IF expressa à presença desses marcadores nas cultivares genéticas garantindo um menor índice de fêmeas.

Como exemplo, o *SNP* 110 está presente nas cultivares *Hartwig* e PI437654 (tabela 10) justificando sua associação ao índice de fêmeas (IF) menores, ou seja, se selecionar esse marcador aumentará a chance de encontrar genótipos resistentes, e quanto mais estiver presente maior será a chance de ter um genótipo resistente. O marcador *SNP* 244 aparece apenas na cultivar diferenciadora PI 088788 e quanto ao *SNP* 60 é encontrada na cultivar PI437654, exposta na tabela 10. A cultivar PI437654 apresenta resistência a todas as raças conhecidas do NCS (ANAND et al., 1988; ANANCI, 1991, 1992) e foi expressa nos marcadores *SNPs* 60 e 110 permitindo utilizá-lo como fonte de resistência nos programas de melhoramento para o desenvolvimento de cultivares de soja com resistência ao nematoide de cisto (DIAS et al., 1998).

Os marcadores *SNPs* 244, 110 e 60 possuem ligação positivas entre si e ligação com a variável IF, mas tanto a 244 e 60 caracterizam-se por possuírem ligação negativa fraca com a variável IF.

Selecionaram-se os marcadores que apresentaram ligações negativas com IF e realizou a análise de trilha para obter dados explicativos da correlação dos marcadores *SNPs* sobre o IF (Tabela 11).

Tabela 11: Análise de trilha: efeitos diretos (diagonal principal) e indiretos (fora da diagonal) de marcadores *SNP* sobre o índice de fêmeas.

<i>SNP</i>	60	92	110	133	138	142	143	145	148	149	153	154	161	163	171	244	262	290	313	^a <i>Cor</i>	
60	-0.19	0.01	-0.19	0.00	0.00	0.03	0.00	-0.01	-0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.03	-0.29
92	0.01	-0.09	0.02	0.01	-0.01	0.06	0.01	-0.02	-0.02	0.03	-0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	-0.10	0.00	0.00	-0.05
110	-0.13	0.01	-0.27	0.01	0.00	0.04	0.01	-0.02	-0.02	0.02	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	-0.13	0.01	0.01	0.01	0.04	-0.40
133	0.01	0.01	0.02	-0.09	0.05	-0.36	-0.09	0.07	0.07	0.02	0.05	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.04	-0.16
138	0.01	0.01	0.02	-0.07	0.06	-0.45	-0.07	0.09	0.09	0.02	0.06	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.05	-0.12
142	0.01	0.01	0.02	-0.06	0.05	-0.52	-0.06	0.07	0.07	0.03	0.05	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.06	-0.19
143	0.01	0.01	0.02	-0.09	0.05	-0.36	-0.09	0.07	0.07	0.02	0.05	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.04	-0.16
145	0.02	0.02	0.03	-0.05	0.04	-0.26	-0.05	0.15	0.15	-0.16	0.04	-0.04	-0.04	0.02	0.03	0.01	0.02	0.02	-0.01	-0.01	-0.08
148	0.02	0.02	0.03	-0.05	0.04	-0.26	-0.05	0.15	0.15	-0.16	0.04	-0.04	-0.04	0.02	0.03	0.01	0.02	0.02	-0.01	-0.01	-0.08
149	0.01	0.01	0.02	0.01	0.00	0.04	0.01	0.07	0.07	-0.33	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.04	-0.01
153	0.01	0.01	0.02	-0.07	0.06	-0.45	-0.07	0.09	0.09	0.02	0.06	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.05	-0.12
154	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.03	0.00	0.05	0.05	0.01	0.00	-0.10	-0.10	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	-0.09	-0.09	-0.09
161	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.03	0.00	0.05	0.05	0.01	0.00	-0.10	-0.10	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	-0.09	-0.09
163	0.01	0.01	0.02	0.01	-0.01	0.05	0.01	-0.02	-0.02	0.02	-0.01	0.01	0.01	-0.14	0.02	0.01	0.01	0.01	-0.02	-0.02	-0.02
171	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.03	0.00	-0.01	-0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	-0.31	0.01	0.01	0.01	0.03	0.03	-0.21
244	0.01	0.01	-0.19	0.00	0.00	0.03	0.00	-0.01	-0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	-0.18	0.01	0.01	0.03	0.03	-0.28
262	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.03	0.00	-0.01	-0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	-0.25	0.01	0.03	0.03	-0.15
290	0.01	-0.04	0.01	0.00	0.00	0.03	0.00	-0.01	-0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	-0.21	0.03	0.03	-0.16
313	0.02	0.00	0.04	0.01	-0.01	0.10	0.01	0.01	0.01	0.04	-0.01	-0.03	-0.03	-0.01	0.03	0.02	0.02	0.02	-0.29	-0.29	-0.05

$R^2 = 0.50$. ^a*Cor*= Correlação dos marcadores *SNPs*.

Na tabela 11 pode-se notar o realce dos *SNPs* 60, 110 e 244 quanto aos efeitos diretos e o percentual de correlação. O *SNP* 60 possui efeito direto de -0,19 e com o *SNP* 110 efeito de ligação ao IF de -0,19, já o *SNP* 244 possui efeito direto baixo de 0,01 e com *SNP* 110 o efeito de ligação ao IF é de também de -0,19. O marcador *SNP* 110 apresentou correlação consideravelmente alta, -0,40, além de possuir efeito direto com os marcadores *SNPs* 60 e 244 com ligação à variável IF.

5. CONCLUSÃO

No mapeamento de 46 cultivares analisadas, apenas 2 apresentaram resistência (4%) e 8 moderada resistência (17%). Esses números de cultivares de interesse (resistência NCS, raça 14) são muito baixos para usar uma estratégia de descoberta de *SNP* mais poderosa estatisticamente, como estudo de Mapeamento de Associação (AM).

No entanto, as cultivares TMG 4182, BRS MT Pintado tidas como resistente e BRS GO Chapadões, BRS GO Ipameri, NK 7059, BMX Extra, BRS 263, SYN 1059, BMX Foco, CD 237, expressadas com moderada resistência, são candidatas para a busca de marcadores moleculares do tipo *SNP* ligado à resistência do nematoidenematóide de cisto da soja, raça 14;

Quarenta e oito marcadores *SNPs* flanqueando marcadores *SSR* ligados a genes de resistência a NCS descritos na literatura estão disponíveis para serem validados;

Apenas 6 marcadores foram selecionados pela análise de mapeamento;

Elevada expressiva divergência genética e estruturação entre as 46 cultivares comerciais de soja avaliadas, foram atribuídos a cada grupo genético baseado considerando um valor limite do coeficiente de ancestralidade ($\geq 0,70$).

A correlação entre resultado fenotípicos e moleculares indicou por aproximação ao índice fêmeas três marcador *SNPs* 60, 110 e 224 candidatos a resistência ao nematoide de cisto da soja, raça 14.

O marcador *SNP* 110 apresentou correlação consideravelmente alta (-0,40), além de possuir efeito direto com os marcadores *SNPs* 60 e 244 com ligação à variável IF, tornando se o principal marcador candidato.

Através dos resultados aqui obtidos podem ser validades em um próximo trabalho de pesquisa utilizando uma população segregante para o nematoide de cisto raça 14

6. REFERÊNCIAS

- ARANTES, N. E.; KIIHL, R. A. S.; ALMEIDA, L. A. Melhoria genética visando à resistência. *In*: SILVA, J. F. V. **O nematoide de cisto da soja: a experiência brasileira**. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Nematologia (SBN), 1999. p. 105-117.
- ASMUS, G. L.; TELES T. S. Primeiro registro do nematoide de cisto da soja na região Centro-Sul de Mato Grosso do Sul. Comunicado Técnico. Dourados, MS. n.170, Out., 2011.
- ATWELL, S.; HUANG, Y. S.; VILHJÁLMSSON, B. J, WILLEMS, G; HORTON M, Li Y, *et al*. Genome-wide association study of 107 phenotypes in Arabidopsis thaliana inbred lines. **Nature**. 2010;445(7298): p. 627–31.
- BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. **Manual de fitopatologia: Volume 1: Princípios e Conceitos** Terceira Edição. São Paulo/SP: ed. Agronômico Ceres Ltda, 1995. 473-476p.
- BOX GEP; COX DR. 1964. An analysis of transformations. *Journal of the Royal Society*, 26: 211-252.
- BRANCA, A.; PAAPE, T. D.; ZHOU, P.; BRISKINE, R.; FARMER, A. D.; MUDGE, J.; BHARTI, A.; WOODWARD, J.; MAY, G.; GENTZBITTEL, L.; BEM, C.; DENNY, R.; SADOWSKY, M.; RONFORT, J.; BATAILLON, T.; YOUNG, N.; TIFFIN, P. 2010 Whole genome nucleotide diversity, recombination, and linkage disequilibrium in the model legume *Medicago truncatula*. **Proc. Natl. Acad. Sci** 108(42): E864 -E870.
- CARVALHO, V.P. 1999. Identificação de marcadores moleculares para resistência ao de cisto da soja (*Heterodera glycines* Ichinohe, raça 3). (Dissertação de Mestrado em Genética e Melhoramento). Universidade Estadual de Londrina, Londrina (PR), 75 p.
- CARVALHO, C.G.P.; ARIAS, C.A.A.; TOLEDO, J.F.F. Análise de trilha sob multicolinearidade em pimentão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, n.4, p.603-613, 1999.
- CARVALHO, C.G.P.; ARIAS, C.A.A.; TOLEDO, J.F.F.; OLIVEIRA, M.F.; VELLO, N.A. Correlações e análise de trilha em linhagens de soja semeadas em diferentes épocas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, n.3, p.311-320, 2002.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Acompanhamento da safra brasileira de grãos. Safra 2018/19, v.6, n.3, p.19-23; 2018. Disponível: < file:///C:/Users/pmalvarenga/Downloads/BoletimZGraosZdezembroZ2018%20(2).pdf >. Acesso em: 26 dez. 2018.
- COIMBRA, J.L.M.; GUILDON, A.F.; CARVALHO, F.I.F.; COIMBRA, S.M.M.; MARCHIORO, V.S. Análise de trilha I: análise do rendimento de grãos e seus componentes. *Ciência Rural*, v. 29, p. 213-218, 1999.

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.

CORREIA, J.R.; COSTA, L.M.; NEVES, J.C.L.; CRUZ, C.D. Análise de trilha (“path analysis”) no estudo do relacionamento entre características físicas e químicas do solo e a produtividade do eucalypto. **Revista Árvore**, v.20, p.161-169, 1996.

CRUZ, C.D. Programa Genes: Aplicativo computacional em genética e estatística. Versão Windows – 2007, Viçosa, UFV.

CUNHA, R. P.; MAIA, G. L.; RODACKI, M. E. P.; SILVA, G. S.; MEYER, M. C. Ciclo de vida *Heterodera glycines* raça 9 em soja no estado do Maranhão. **Summa Phytopathol. Botucatu/SP**, v. 34, n. 03, p. 262-264, 2008.

DAHER, R.R.; PEREIRA, M.G.; LÉDO, F.J.; AMARAL JUNIOR, A.T.; ROCABADO, J.M.; FERREIRA, C.F.; TARDIN, F. D. Análise de trilha de caracteres forrageiros do capim-elefante. **Ciência Rural**, v.34, p.1531-1535, 2004.

DIAS, W. P.; GARCIA, A.; SILVA, J. F. V.; CARNEIRO, G. E. DE S. **em soja: Identificação e Controle**. Londrina/PR: Embrapa Soja, 2010. (Circular Técnica 76).

DIAS, W. P.; SILVA, J. F. V.; CARNEIRO, G. E. S.; GARCIA, A.; ARIAS, C. A. A. Nematóide de cisto da soja: biologia e manejo pelo uso da resistência genética. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba/SP, v. 33, n. 01, p. 01-16, 2009.

DU PONT PIONEER DO BRASIL. **Manejo de nematoides em soja**. 21 de outubro de 2014. Disponível em: <<http://www.pioneersementes.com.br/soja/manejo-nematoides-soja>>. Acesso em: 19 mai.2017.

DU PONT PIONEER DO BRASIL. **Soluções de controle para nematoides**. 12 de julho 2016. Disponível em: <<http://www.pioneersementes.com.br/blog/105/solucoes-de-controle-para-nematoides>>. Acesso em: 21 mai.2017.

FAGHIHI, J. Nematodes worming free of common soybean resistance genes. News Purdue, 2007. Disponível: <<https://news.uns.purdue.edu/x/2007b/071114FaghihiSCN.html>>. Acesso: 08 jan. 2019.

FARIA, J. R. B.; LEITE, R. M. V. B. DE C.; BUENO, A. DE F.; OLIVEIRA, A. J.; CAMPOS, C. B. H.; SEIXAS, C. D. S.; CARVALHO, C. G. P. DE.; OLIVEIRA, M. A. DE.; OLIVEIRA, M. C. N. DE.; NEUMAIER, N. Tecnologias de Produção de Soja Região Central do Brasil 2012 e 2013. Londrina/PR: **Embrapa Soja**, 2011. 262 p. (Sistemas de Produção n.º 15).

FEDERAÇÃO DAS INDÚSTRIAS DO ESTADO DE SÃO PAULO (FIESP), 2018. Safra Mundial de Soja 2018/19 – 7º Levantamento do USDA. **Informativo de novembro 2018**. Disponível: <<file:///C:/Users/pmalvarenga/Downloads/file-20181112185731-boletimsojanovembro2018.pdf>> . Acesso em: 26 dez. 2018.

Ferguson, G. A.; “Statistical analysis in psychology and education”. 5.ed. New York: McGraw-Hill book, 1981.

FLORES, F.J. Análise Ergonômica de Produto-Percepção do usuário do posto de trabalho em ônibus rodoviários. **Universidade Tecnológica Federal do Paraná Departamento Acadêmico de Engenharia Mecânica curso de Engenharia Mecânica**. Pato Branco/ PR, 2014.

FURTADO, M.R.; CRUZ, C.D.; CARDOSO, A.A.; COELHO, A.D.F.; PETERNELLI, L.A. Análise de trilha do rendimento do feijoeiro e seus componentes primários em monocultivo e em consórcio com a cultura do milho. **Ciência Rural**, v.32, p.217-220, 2002.

GANAL, M. W.; GREGOR, D.; ANDREAS, P.; LIE, B. A.; EDWARD, B. S.; ALAIN, C.; JOSEPH, C. D.; EVA-MARIA, G.; MARK, H.; JOHANN, J.; MARIE-CHRISTINE P. Le, MICHAEL, M. D.; PIERRE M.; MARK R.; CHRIS-CAROLIN, S.; QI, S.; HILDRUN, W.; OLIVIER, M. C.; MATTHIEU, F. 2011. A large maize (*Zea mays* L.) SNP genotyping array: Development and germplasm genotyping, and genetic mapping to compare with the B73 reference **genome**. **PLoS ONE** 6: e28334.

GARCIA, A.; SILVA, J.F.V. Interação entre a população de cistos de *Heterodera glycines* e o pH do solo. **Fitopatologia Brasileira**. Piracicaba, v. 21 (supl.), p. 420, 1996.

GAUR, R., AZAM, S., JEENA, G., KHAN, A.W., CHOUDHARY, S., JAIN, M., YADAV, G., TYAGI, A. K., CHATTOPADHYA, D. and Bhatia S. 2012. High Throughput SNP Discovery and Genotyping for Constructing a Saturated Linkage Map of Chickpea (*Cicer arietinum* L.). **DNA Res** 19 (5): p. 357-373.

GODOY, C. V. O Manejo de doenças na cultura da soja. **EMBRAPA**, 2017. p. 25. Disponível: < <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/162976/1/ID-380530001.pdf>>. Acesso em: 07 jul.2018.

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.

HEIKO, R. Estimativas de parâmetros genéticos e fenotípicos de uma população de soja em quatro anos. 2001. 80p. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Genética e melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2001.

HUANG, X.; WEI, X.; SANG, T.; ZHAO, Q; FENG, Q.; ZHAO, Y, *et al.* Genome-wide association studies of 14 agronomic traits in rice landraces. **Nat Genet.** 2010;42(11): p.961–7.

HUO, N.; GARVIN, D. F.; You F.M., McMahon S., Luo M.C., Gu Y.Q., Lazo G.R., Vogel J.P. 2011. Comparison of a high-density genetic linkage map to genome features in the model grass *Brachy podium distachyon*. **Theor. Appl. Genet.**, 123, 455–64.

HYTEN, D. L.; CANNON, S. B.; SONG, Q.; WEEKS, N.; FICKUS, E.W.; SHOEMAKER, R. C.; SPECHT, J. E., FARMER, A. D.; MAY, G. D.; CREGAN, P. B. 2010. High throughput SNP discovery through deep resequencing of a reduced representation library to anchor and orient scaffolds in the soybean whole genome sequence. **BMC Genomics**, 11, p. 38.

ILLUMINA. Product literature. Disponível em: www.Illumina.com.br. Acesso em: Jan.2018.

LAM, H.M.; XU, X.; LIU, X.; CHEN, W.; YANG, G.; WONG, F. L., *et al.* Resequencing of 31 wild and cultivated soybean genomes identifies patterns of genetic diversity and selection. **Nat Genet.** 2010;42(12): p.1053–9.

LI, C.C. Path analysis – a primer. Boxwood: Pacific Grove, 1975, 346p.

LIGHTFOOT D.A. 2008. Soybean Genomics: Developments through the use of cultivar Forrest. **Internat J of Plant Genom** 2008: p.1-22.

LOPES, A.C.A.; VELLO, N.A.; PANDINI, F.; MOURA, R.M.M.; TSUTAUMI, C.Y. Variabilidade e correlações entre caracteres em cruzamentos de soja. *Scientia Agrícola*, v.59, n.2, p.341-348,2002.

LUO, M. C.; DEAL, K. R.; AKHUNOV, E. D.; AKHUNOVA, A. R.; ANDERSON, O. D.; ANDERSON, J. A.; BLAKE, N.; CLEGG, M. T.; COLEMAN-DERR, D.; CONLEY, E. E.; CROSSMAN, C. C.; DUBCOVSKY, J.; GILL, B. S.; GU, Y. Q.; HADAM, J.; HEO, H.; HUO, N.; LAZO, G. R.; LUNDY, K. E.; MA, Y.; MATTHEWS, D. E.; MCGUIRE, P. E.; MORRELL, P. L.; NICOLET, C. M.; QUALSET, C. O.; RENFRO, J.; TABANO, D.; TALBERT, L. E.; TIAN, A.; TOLENO, D. M.; WARBURTON, M. L.; YOU, F. M.; ZHANG, W. J.; DVORAK, J. 2009. Genome Comparisons Reveal a Dominant Mechanism of Chromosome Number Reduction in Grasses and Accelerated Genome Evolution in Triticeae. **Proc. Natl Acad. Sci.**, 106, 15780–5.

MENDES, C. USDA aumenta safra e exportações de soja do Brasil para 81 mil de t; números dos EUA sem alterações. **NOTÍCIAS AGRÍCOLAS**, 2018. Disponível: <<https://www.noticiasagricolas.com.br/noticias/usda/226710-usda-aumenta-safra-e-exportacoes-de-soja-do-brasil-para-81-mi-de-t-numeros-dos-eua-semalteracoes.html#XCOZblxKjIU>>. Acesso em: 26 dez.2018.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECÚARIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Projeções do Agronegócio - Brasil 2017/18 a 2027/28 Projeções a Longo Prazo. **Secretária de Política Agrícola - SPA**. Brasília: MAPA/ACE, 2018. p. 112.

MOURA, F. M.; VENCOSKY, R.; SILVA, V. F. J.; MORAIS, K. L.; MOURA, F. N.; PINHEIRO, B. J. Parâmetros genéticos da resistência da soja ao nematoides-de-cisto raça 1. **Bragantia**, Campinas/SP, v. 67, n. 01, p. 119-125, 2008.

MUCHERO, W.; DIOP, N. N.; BHAT, P. R., FENTON, R. D.; WANAMAKER, S.; POTTORFF, M.; HEARNE, S.; CISSE, N.; FATOKUN, C.; EHLERS, J. D.; ROBERTS, P. A.; CLOSE, T. J. 2009. A consensus genetic map of cowpea [*Vigna unguiculata* (L) Walp.] and synteny based on EST-derived SNPs. **Proc. Natl Acad. Sci.** USA, 106, 181, p. 59–64.

NIBLACK T, ARELLI P, NOEL G, OPPERMAN C, ORF J, SCHIMITT D, et al. A revised classification scheme for genetically diverse populations of *Heterodera glycines*. **J Nematol.** 2002; 34 (4): p. 279–288.

NOEL, G. R. History, distribution, and economics. *In*: RIGGS, R. D.; WRATHER, J. A. (Eds.). **Biology and management of the soybean cyst nematode**. ST. Paul: The American Phytopathological Society. St. Paul, p. 1-3, 1992.

R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <http://www.R-project.org/>. Acesso em: novembro de 2018.

RIGGS, R. D.; SCHMITT, D. P.; NOEL, G. R. Variability in races tests with *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology**, College Park, v. 20, n. 4, p. 565-572, 1988.

RIGGS, R.D.; SCHMITT, D. P. Complete characterization of the race scheme for *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology**, v. 20, n. 3, p. 392-395, 1988.

RIGGS, R.D.; SCHMITT, D.P. Optimization of the *Heterodera glycines* race test procedure. **Journal of Nematology**, College Park, v. 23, n. 2, p. 149-154, 1991.

RIVAS, L. Por ano, nematoides causam prejuízos de R\$35 milhões ao agronegócio nacional. **Agrolink**, 2015. Disponível: https://www.agrolink.com.br/noticias/por-ano--nematoides-causam-prejuizos-de-r--35-bilhoes-ao-agronegocio-nacional_343212.html. Acesso em: 08 ago.2018.

ROSA, E. R. C. Identificação de marcadores SNP (Single Nucleotide Polymorphism) associados ao gene de resistência Rpp4 da soja (*Glycine max* (L.) Merr.) a ferrugem (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow). 2015. 116 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – **Universidade de Brasília** (UnB), Brasília/DF, 2015.

SANTOS, R.C.; CARVALHO, L.P.; SANTOS, V.F. Análise de coeficiente de trilha para os componentes de produção em amendoim *Ciênc. agrotec.*, Lavras, v.24, n.1, p.13-16, jan./mar., 2000.

SASSER, J. N. Plant parasit nematodes: The farm's hidden enemy. Raleigh: **North Carolina State University**, 1989. p.115.

SCHMITT, D. P.; SHANNON, J. G. Differentiating soybean responses to *Heterodera glycines* races. **Crop Science**, Madison, v. 32, n. 1, p. 275-277, 1992.

SEDIYAMA, T.; TEIXEIRA, R. C.; BARROS, H. B. Origem, evolução e importância econômica. *In*: SEDIYAMA, T. (Ed.). **Tecnologias de produção e usos da soja**. Londrina: Mecnas, 2009, p. 1-5.

SHIRASAWA, K.; ISOBE, S.; HIRAKAWA, H.; ASAMIZU, E.; FUKUOKA, H.; JUST, D.; ROTHAN, C.; SASAMOTO, S.; FUJISHIRO, T.; KISHIDA, Y.; KOHARA, M.;

TSURUOKA, H.; WADA, T.; NAKAMURA, Y.; SATO, S.; TABATA, S. 2010. SNP discovery and linkage map construction in cultivated tomato. **DNA Res.**, 17, p. 381–91.

SONG, Q.; HYTEN, D. L.; JIA, G.; QUIGLEY, C.V.; FICKUS, E.W.; NELSON, R.L.; CREGAN, P. B; 2013. Development and Evaluation of SoySNP50K, The High Density Genotyping Array for Soybean. **PLoS ONE** 8(1): e54985.

STATGRAPHICS. ® Centurion XVI 2010 by Stat Point Technologies Inc.,2014. Disponível: <https://www.statgraphics.net/wp-content/uploads/2015/03/Centurion-XVI-Manual-Principal.pdf>. Acesso em: 05 nov.2018.

TECHNOLOGY SPOTLIGHT: SNP Genotyping. Infinium Assay Workflow – The Illumina Infinium assay provides unlimited multiplexing for whole-genome genotyping applications with a manual or automated workflow, 2012. Disponível: < http://www.bea.ki.se/documents/workflow_infinium.pdf>. Acesso em: 16 ago. 2018

TIAN, F.; BRADBURY, P. J.; BROWN, P. J.; HUNG, H.; SUN, Q.; FLINT-GARCIA, S.; ROCHEFORD, T. R.; MCMULLEN M. D.; HOLLAND, J. B.; BUCKLER, E. S. 2011. Genome wide association study of leaf architecture in the maize nested association mapping population. **Nat. Genet.**, 43, p.159–62.

VUONG, T.D.; SONAH, H.; MEINHARDT, C.G.; DESHMUKH, R.; KADAM, S.; NELSON, R. L.; SHANNON, J. G.; NGUYEN, H. T. Genetic architecture of cyst nematode resistance revealed by genome-wide association study in soybean. **BMC. Genomics**, 2015.

WRIGHT, S. Correlation and causation. *Journal of Agricultural Research*, v.20, p.557-585, 1921.

7. ANEXO

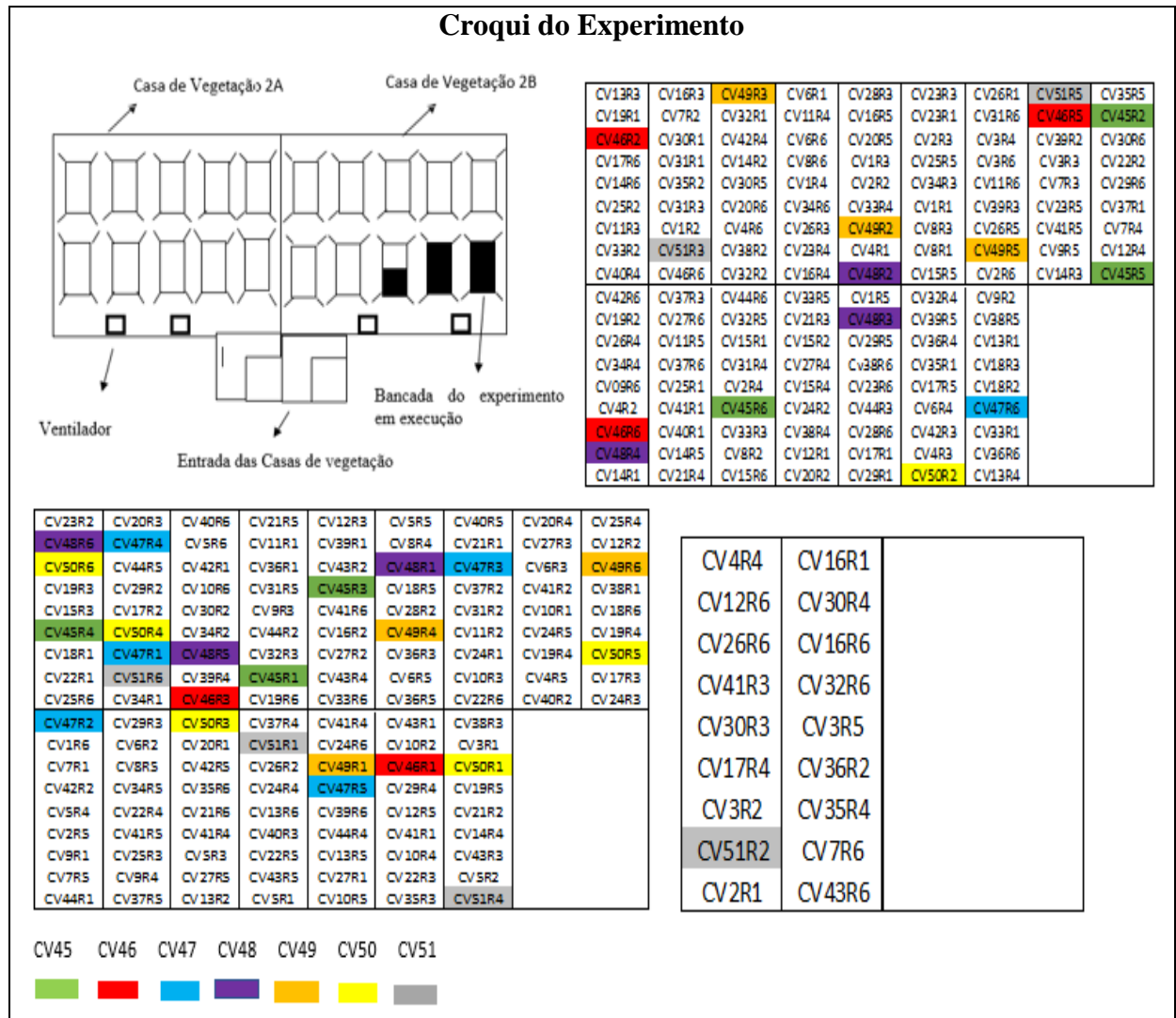


Figura 1: Disposição do ensaio na casa de vegetação de número 2 (dois), destinada para o ensaio (esquerda e abaixo) e croqui demonstrando a distribuição das unidades experimentais ou cultivares (CV*) e suas repetições (R). * A lista de cultivares foi apresentada na tabela 1.

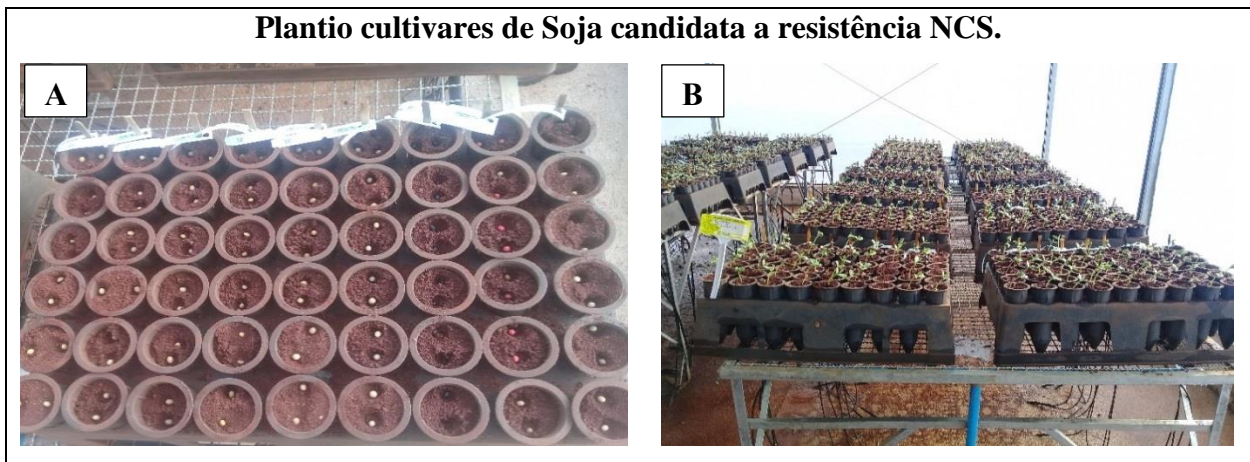


Figura 2: Instalação do ensaio. (A) semeio de duas sementes por tubetes; (B) desbaste de plantas após sete dias. Fonte: Alvarenga, 2018.



Figura 3: Arranquio das raízes para preparação do inóculo. (A) plantas mantedoras do inóculo raça 14; (B) arranquio das raízes para extração de inóculo. Fonte: Alvarenga, 2018.



Figura 4: Método de calibração do inóculo. (A) identificação das raízes armazenadas em sacos plásticos; (B) lavagem das raízes para extração das fêmeas; (C) processo de

centrifugação e homogeneização do inóculo; (D) calibração do inóculo em microscópio óptico. Fonte: Alvarenga, 2018.

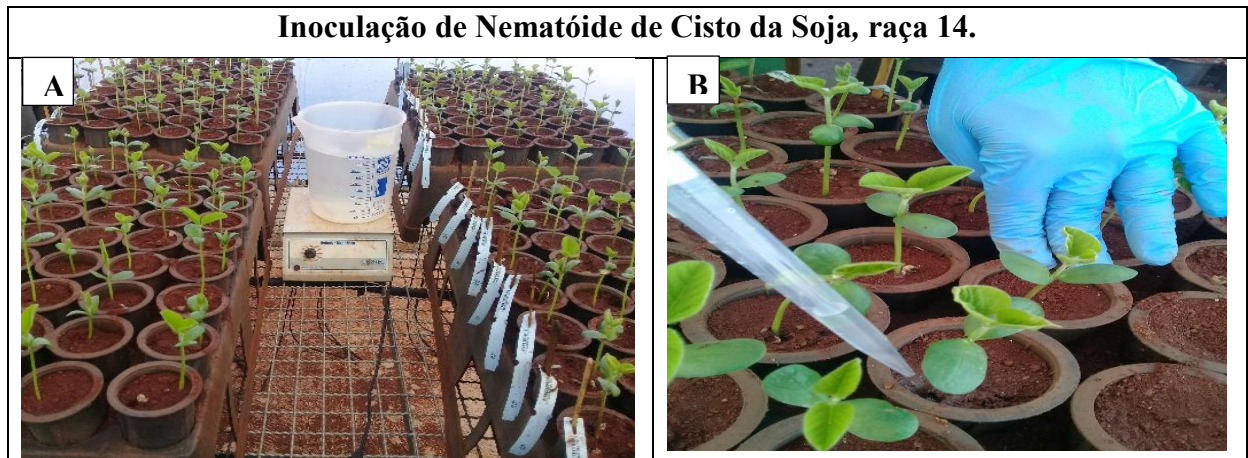


Figura 5: Caracterização das 46 cultivares de soja quanto ao ataque do NCS, raça 14. Fonte: Alvarenga, 2018.



Figura 6: Método de avaliação fenotípica para nematóide-de-cisto-da-soja. (A) estágio da planta, após 30 dias, para avaliação; (B) desbaste das plantas; (C) distribuição e transporte das raízes para o laboratório; (D) lavagem da raiz e extração do cisto em jato d'água; (E) deposição dos cistos em copo de vidro e quantificação do número de fêmeas em microscópio estereoscópio; (F) visualização da massa de cisto em microscópio estereoscópio e equação

para cálculo do número de fêmeas segundo SCHIMITT e SHANNON, 1992. Fonte: Alvarenga, 2018.

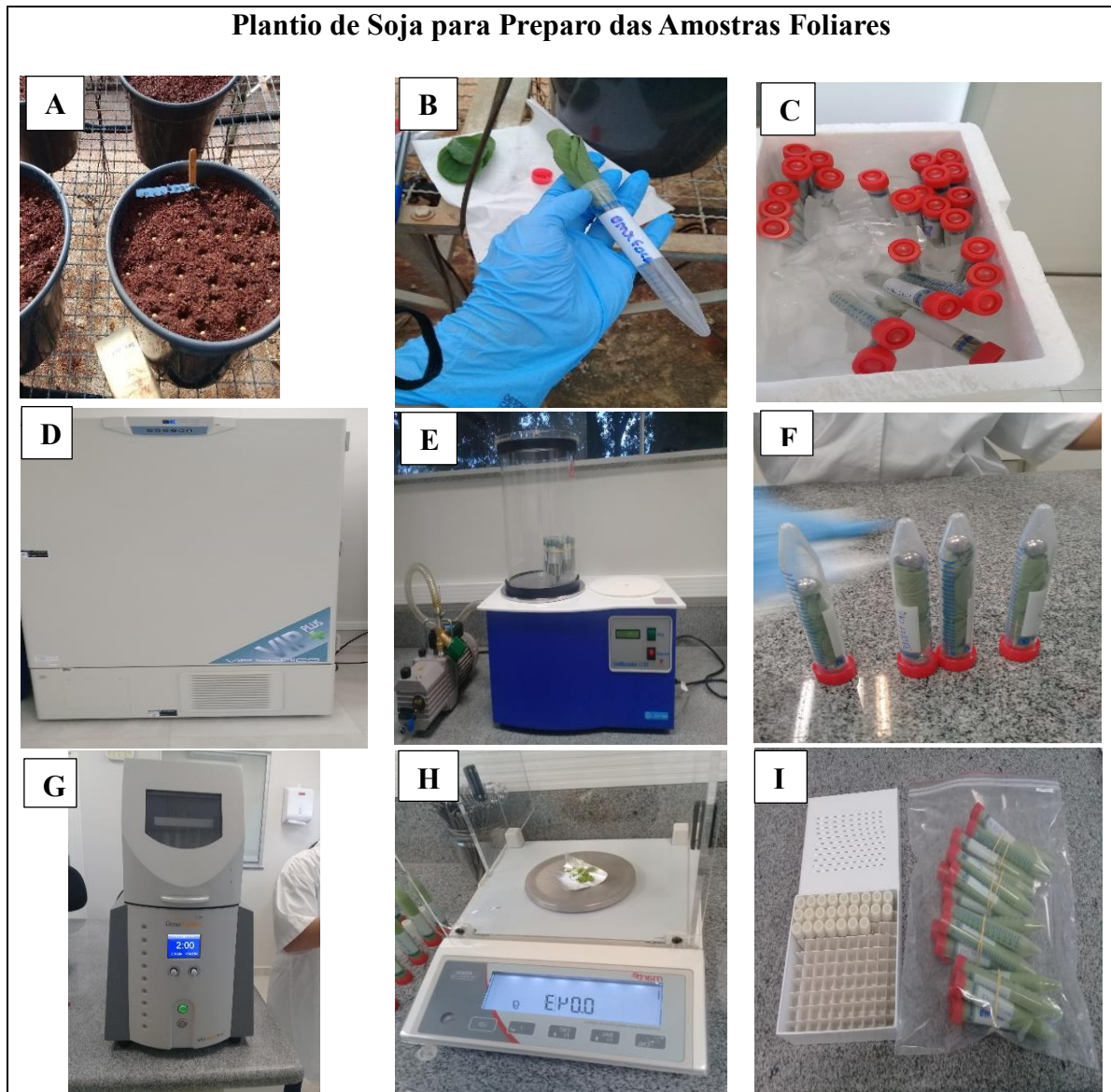


Figura 7: Preparo da amostra para análise genotípica para nematóide-de-cisto-da-soja. (A) Plantio das cultivares; (B) Coletas das folhas e armazenagem dos tecidos foliares em tubo falcon; (C) Transporte em caixa de Isopor; (D) Armazenagem no freezer à -80°C ; (E) Liofilização no Liofilizador L101; (F) Preparo para maceração; (G) Maceragem em Geno/Grinder; (H) Pesagem da amostra e (I) Envio da amostra e armazenagem da contraprova. Fonte: Alvarenga, 2018.

The screenshot shows the SoyBase website interface. The top navigation bar includes links for Home, Help & Tutorials, Genetic Map, Genome Browser, Expression, Mutants, Projects, Tools, Community, and Site Map. A red notice states: "Due to a lapse in federal funding, this USDA website will not be actively updated. Once funding has been reestablished, online operations will continue. Registration for the Soybean Breeders Workshop is still available at https://www.soybase.org/SBW/registration/".

The main content area is divided into two columns. The left column, titled "SoyBase Toolbox", contains a search box for "Soybase" with a "Search" button. Below it are links for "Download Soybean Data" and "Soybean Data Download Page". The "Quick Wm82 Genome BLAST" section includes dropdown menus for "Select Output Format" (set to "NCBI BLAST report"), "Select BLAST" (set to "blastn"), and "Select a Database". A text input field is labeled "Enter sequence below in FASTA format". There are also options to "Or load it from disk" and "Or load an Example Sequence".

The right column, titled "SoyBase News", features several news items with "Read More" links, including "Additional Commercial Pedigrees in SoyBase" (dated July 04 2018) and "New Reference Genome Assemblies" (dated February 07 2018). Below the news is a section for "Upcoming Meetings" with items like "Soybean Breeders Workshop 2019" (Date: 2-11-2019 TO 2-13-2019) and "World Soybean Research Conference XI" (Date: 9-8-2020 TO 9-11-2020). At the bottom right, there are social media links for Twitter (@SoyBaseDatabase) and Facebook (www.facebook.com/SoyBase).

Figura 8: Esquema de identificação do *SNPs* no SoyBase, através da busca pelo nome dos marcadores moleculares associados a resistência a raça 14. Fonte: <https://www.soybase.org/>, 2018.

This screenshot shows the same SoyBase website interface as Figure 8. The "Quick Wm82 Genome BLAST" section in the "SoyBase Toolbox" is the primary focus. The "Select a Database" dropdown menu is open, displaying a list of linkage groups: A1[Gm05], A2[Gm08], B1[Gm11], B2[Gm14], C1[Gm04], C2[Gm06], D1a[Gm01], D1b[Gm02], D2[Gm17], E[Gm15], F[Gm13], G[Gm18], H[Gm12], I[Gm20], J[Gm16], K[Gm09], L[Gm19], M[Gm07], and N[Gm03]. The "Select BLAST" dropdown is set to "blastn". The "Enter sequence below in FASTA format" field is empty. The "Soybean Breeder's Toolbox Quick Jump" section below it shows dropdown menus for "Linkage Group" (set to "-SELECT-") and "Chromosome" (set to "-SELECT-").

The right column and the top navigation bar are identical to those in Figure 8.

Figura 9: Esquema de identificação do *SNPs* no SoyBase, através da busca pelo grupo de ligação ou pelo número de cromossomo. Fonte: <https://www.soybase.org/>, 2018.

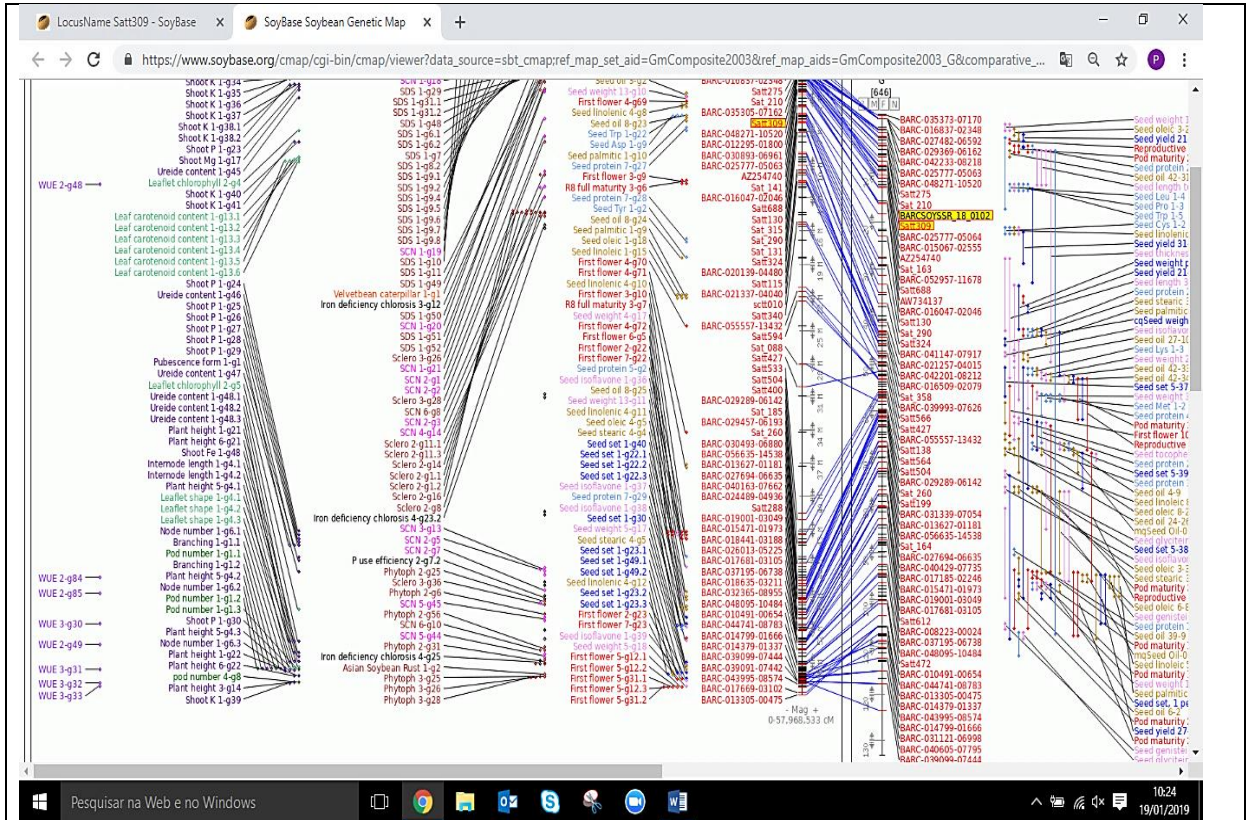


Figura 10: Esquema de rastreamento dos SNPs candidatos no SoyBase, através do mapa de posicionamento. Fonte: <<https://www.soybase.org/>>, 2018.

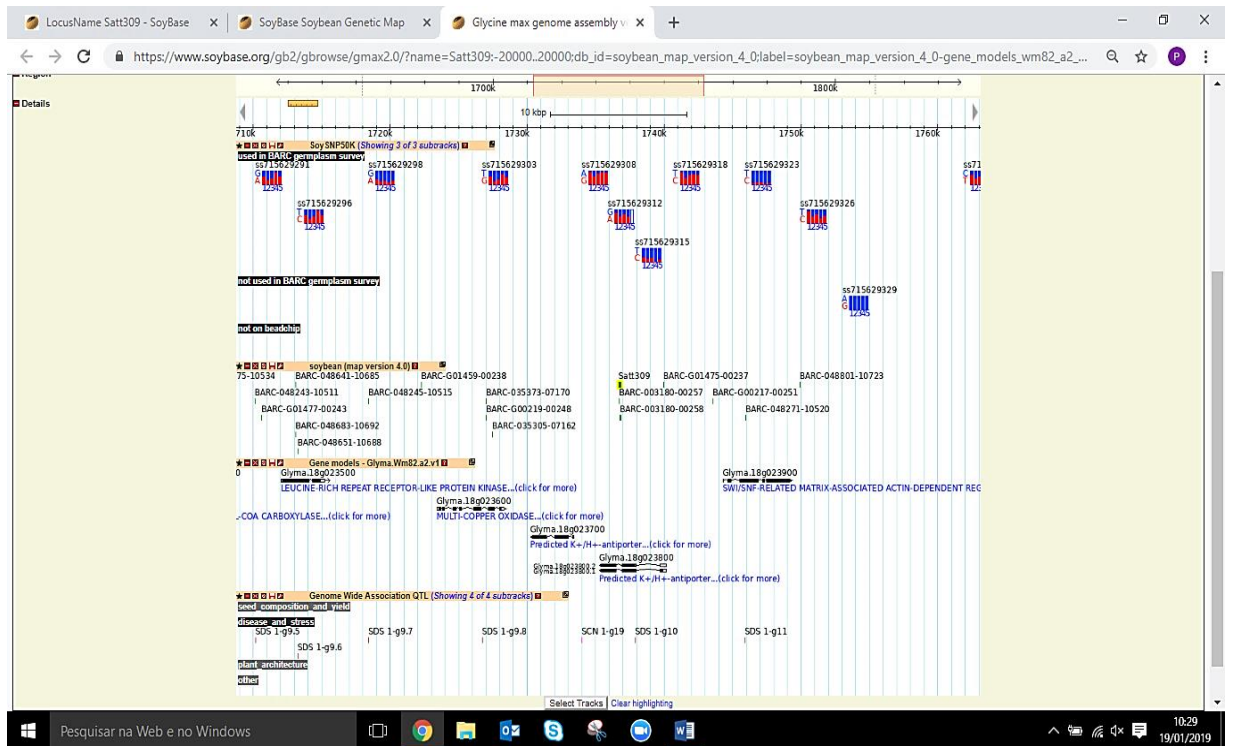


Figura 11: Esquema de rastreamento dos SNPs candidatos no SoyBase, através do mapa de sequenciamento. Fonte: <<https://www.soybase.org/>>, 2018.