

FERNANDA ABREU SANTANA

**SELEÇÃO ASSISTIDA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE FONTES DE
RESISTÊNCIA AO NEMATÓIDE DE CISTO DA SOJA**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

FERNANDA ABREU SANTANA

**SELEÇÃO ASSISTIDA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE FONTES DE
RESISTÊNCIA AO NEMATÓIDE DE CISTO DA SOJA**

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

APROVADA: 26 de fevereiro de 2008.

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros
(Co-Orientador)

Prof. Cosme Damião Cruz
(Co-Orientador)

Prof. Marcia Flores da Silva

Prof. Adésio Ferreira

Prof. Maurilio Alves Moreira (Orientador)

A Deus,

Ao querido Alan,

Aos meus pais,

Aos meus irmãos.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Genética e Melhoramento pela oportunidade da realização do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo auxílio financeiro para realização deste trabalho.

À Embrapa Soja por ter possibilitado o uso de sua infra-estrutura, na realização de parte deste trabalho, em especial ao pesquisador Dr. Waldir Pereira Dias, pelo apoio e dedicação.

Ao Professor Maurilio Alves Moreira, pela orientação, seriedade, amizade e pelo exemplo de dedicação ao progresso científico da UFV e do país.

Ao Professor Everaldo Gonçalves de Barros pelos ensinamentos, paciência, amizade, colaboração e pelo exemplo de comprometimento profissional.

Ao Professor Cosme Damião Cruz pelas sugestões, amizade, incentivo, disposição em ajudar e pelo exemplo de competência e simplicidade.

A todos os Professores que ministraram as disciplinas do Programa de Genética e Melhoramento, pelos ensinamentos.

À querida Professora Marcia Flores da Silva pelos ensinamentos, dedicação, amizade, paciência sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.

Ao Newton Deniz Piovesan pelo apoio efetivo e indispensável na etapa inicial deste trabalho e pelos ensinamentos, sugestões, conselhos e amizade.

Ao Professor Adésio Ferreira e ao amigo Pedro Ivo Good God pelo apoio, amizade e atenção.

Aos funcionários Gláucia, Cássio e José Carlos pelo auxílio e colaboração durante a realização deste trabalho.

À Rita e à Rose pela disposição em ajudar na secretária da Genética.

Ao estagiário Julierme pelo auxílio e dedicação durante toda a execução deste trabalho. Agradeço também à Martha pelo apoio efetivo e indispensável.

Aos amigos do laboratório: Ana Paula, Bruno, Cássia, Demerson, Derval, Gabriela, Janaína, Leandro, Marcelo, Matheus, Naldo, Renato, Suelen, Thiago e Valéria pela amizade, apoio e agradável convivência.

Às amigas Lorêta e Josiane pelo apoio, amizade e por todos os aprendizados que tivemos.

Aos meus pais Geraldo e Rosângela, obrigada por confiarem em mim. Aos meus irmãos Flávia e Guilherme pelo carinho e incentivo.

A meu noivo Alan pelo amor, companheirismo, carinho, disposição em ajudar em todos os momentos, e também por tornar a minha vida mais feliz.

À sociedade brasileira, pela manutenção da universidade pública, gratuita e de qualidade.

A Deus, pela constante proteção e por todas as bênçãos.

Enfim, a todos aqueles que estiveram do meu lado não só nas horas de sucesso e de alegria, mas que se esforçaram em me ajudar quando os problemas se fizeram presentes e os desafios se tornaram grandes demais para uma única pessoa. A todos devo minha gratidão e grande parte da felicidade que conquisei ao ter finalizado este trabalho.

BIOGRAFIA

Fernanda Abreu Santana, filha de Geraldo Magela Santana e Rosângela Abreu Grassa Santana, nasceu na cidade de Raul Soares, Minas Gerais, em 07 de outubro de 1982.

Em abril de 2001, iniciou o curso de graduação em Tecnologia de Laticínios na Universidade Federal de Viçosa, tendo transferido para o curso de Bioquímica no segundo semestre de 2003 e graduando-se em maio de 2006.

Em maio de 2006, iniciou o curso de pós-graduação em Genética e Melhoramento na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se aos exames finais de defesa de tese para obtenção do título de *Magister Scientiae*, no dia 26 de fevereiro de 2008.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1. Importância econômica da soja	03
2.2. Nematóide de cisto da soja	04
2.2.1. Base genética da resistência ao NCS	07
2.3. Seleção assistida por marcadores nos programas de melhoramento de soja	09
2.4. Avaliação de diversidade genética utilizando marcadores moleculares	10
2.4.1. Diversidade genética entre as fontes de resistência x variabilidade genética do <i>Heterodera glycines</i>	11
3. BIBLIOGRAFIA	13

CAPÍTULO 1

ESTRATÉGIAS DE SELEÇÃO ASSISTIDA PARA A RESISTÊNCIA AO NEMATÓIDE DE CISTO DA SOJA EM PROGRAMAS DE MELHORAMENTO

RESUMO	22
INTRODUÇÃO	24
MATERIAL E MÉTODOS	26
Material genético	26
Estratégia de melhoramento assistido por marcadores microssatélites para a resistência ao NCS	27
Extração de DNA	28
Amplificações dos microssatélites	28
Avaliação fenotípica	29
Análise estatística	30
Parâmetros estatísticos estimados	31
Determinação da eficiência da seleção	32

RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
Seleção de microssatélites polimórficos e posterior seleção das populações	33
Avaliação fenotípica das populações selecionadas	33
Avaliação genotípica das famílias F _{6:7} selecionadas.....	36
Avaliação genotípica e fenotípica das famílias F _{6:7} resistentes e suscetíveis	37
Avaliação genotípica e fenotípica das famílias F _{6:7} moderadamente resistentes.....	38
Eficiência de seleção.....	39
CONCLUSÕES	41
BIBLIOGRAFIA	42

CAPÍTULO 2

DIVERSIDADE GENÉTICA EM CULTIVARES DE SOJA RESISTENTE AO NEMATÓIDE DE CISTO DA SOJA

RESUMO	46
INTRODUÇÃO	48
MATERIAL E MÉTODOS	50
Material genético	50
Seleção e amplificação dos microssatélites	53
Análises estatísticas	54
Cálculo da diversidade genética dos locos microssatélites.....	54
Cálculo do complemento do índice de similaridade ponderado	55
Análise de variância molecular	55
Análise de agrupamento pelos métodos de Tocher e por dispersão gráfica	56
RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
Diversidade genética dos locos microssatélites	57
Dissimilaridades dos genótipos avaliados	58
Análise de variância molecular	61
Análises de agrupamento.....	62
CONCLUSÕES	70
BIBLIOGRAFIA	70

RESUMO

SANTANA, Fernanda Abreu, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2008. **Seleção assistida e diversidade genética de fontes de resistência ao nematóide de cisto da soja.** Orientador: Maurilio Alves Moreira. Co-Orientadores: Everaldo Gonçalves de Barros e Cosme Damião Cruz.

Diante da dificuldade na realização da seleção fenotípica para a resistência ao nematóide de cisto da soja (NCS), da necessidade da implantação da seleção assistida por marcadores a este patógeno e do pouco conhecimento da diversidade genética das cultivares resistentes desenvolvidas pelos programas de melhoramento do Brasil, este trabalho teve como objetivos: (1) utilizar estratégias de seleção assistida por marcadores para avaliar a eficiência de seleção de microssatélites próximos a QTLs (*Quantitative trait loci*) dos grupos de ligação (GL) G e A2 em populações originadas do cruzamento entre isolinhas derivadas das cultivares CD201 e Vmax; e (2) avaliar a diversidade genética entre cultivares de soja resistentes ao NCS desenvolvidas por seis programas de melhoramento do Brasil e entre fontes de resistência ao NCS, por meio de marcadores microssatélites próximos a QTLs que conferem resistência ao patógeno. Em relação ao primeiro objetivo, foram selecionadas sete populações F₅ com base no polimorfismo de marcadores microssatélites dos GL G e A2, as quais foram avaliadas fenotipicamente quanto à resistência à raça 3 do NCS (HG tipo 5.7). Famílias F_{6,7} das populações selecionadas pelo GL A2 foram suscetíveis, e as selecionadas pelos GL G e A2 tiveram quatro famílias resistentes e quatro moderadamente resistentes, evidenciando que o QTL de efeito maior do GL A2 não está presente na fonte de resistência do presente estudo. Os microssatélites do GL G apresentaram alta eficiência de seleção e podem ser utilizados com sucesso na seleção assistida para a resistência à raça 3 e em populações derivadas de Vmax. Em relação ao segundo objetivo, foram utilizados 36 genótipos, incluindo cultivares resistentes do Brasil e genótipos originais (fontes de resistência ao NCS e a cultivar Lee, utilizada como padrão de suscetibilidade). Foram utilizados 24 microssatélites próximos aos QTLs de resistência ao NCS presentes nos grupos de ligação (GL) G, A2, D2, E, J e

M. A diversidade genética de cada loco microssatélite foi avaliada pelo conteúdo da informação de polimorfismo (PIC) e pela dissimilaridade média de um genótipo em relação aos demais genótipos avaliados. Foram realizadas análises de agrupamento dos genótipos pelo método de Tocher e dispersão gráfica. Um total de 77 alelos, com uma média de 3,2 alelos por loco, foi obtido para as 36 cultivares. O PIC variou de 0,11 a 0,71, com uma média de 0,36. Entre as fontes originais encontrou-se um número de alelos maior que entre as variedades comerciais. O GL D2 foi muito importante na discriminação entre genótipos resistentes e moderadamente resistentes à raça 14. A base genética quanto à resistência ao NCS nas variedades comerciais desenvolvidas pelos programas de melhoramento no Brasil é muito estreita, sendo necessário aumentar a diversidade de genes utilizados, por meio da introdução de diferentes acessos.

ABSTRACT

SANTANA, Fernanda Abreu, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2008. **Assisted selection and genetic diversity of resistance sources to the resistance to soybean cyst nematode.** Adviser: Maurilio Alves Moreira. Co-Advisers: Everaldo Gonçalves de Barros and Cosme Damião Cruz.

Due to difficulties in the performance of the phenotypic selection for the resistance to the soybean cyst nematode (NCS), the need to implant the marker-assisted selection to this pathogen, and the little knowledge about the genetic diversity of the resistant cultivars developed by the Brazilian breeding programs, the objectives of this work were (1) to use marker-assisted selection strategies to evaluate the efficiency of the selection of the QTL (Quantitative trait loci) near microsatellites of the linkage groups (GL) G and A2 in populations come from the crossing between isolines from the cultivars CD201 and Vmax and (2) to evaluate the genetic diversity in NCS resistant soybean cultivars developed by six Brazilian breeding programs and in sources of resistance to NCS, by means of QTL near microsatellites, which give resistance to the pathogen. As to the first objective, seven F_5 populations were selected based on the microsatellite marker polymorphism of GL G and A2. These populations were phenotypically evaluated as to the resistance to the race 3 of the NCS (HG type 5.7). Families $F_{6:7}$ of the populations selected by the GL A2 were susceptible and those selected by the GL G and A2 achieved four resistant families and four moderately resistant families, thus demonstrating that the QTL of greater effect of the GL A2 is not present in the source of resistance of the present study. The microsatellites of the GL G presented high selection efficiency and can be used with success in the assisted selection for the resistance to race 3 and in populations come from Vmax. As to the second objective, 36 genotypes were used, including Brazilian resistant cultivars and original genotypes (sources of resistance to NCS and the cultivar Lee, used as a standard of susceptibility). 24 QTLs near microsatellites were used of NCS resistance present in the linkage groups G, A2, D2, E, J and M. The genetic diversity of each microsatellite was evaluated by the polymorphism index content (PIC) and by the average dissimilarity of a genotype in relation to the other

genotypes evaluated. Genotype grouping analyses were carried out by the Tocher method and graphic dispersion. A total of 77 alleles, with an average of 3.2 alleles per locus, was achieved for the 36 cultivars. The PIC varied from 0.11 to 0.71, with an average of 0.36. A greater number of alleles were found in the original sources, in comparison to the commercial varieties. The GL D2 was very important in the discrimination of genotypes which are resistant and moderately resistant to the race 14. The genetic basis as to the NCS resistance in the commercial variety developed by the Brazilian breeding programs is very narrow, and it is necessary to increase the diversity of the genes used, by introducing different accesses.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos 30 anos, entre as grandes culturas produtoras de grãos a soja foi a que mais cresceu, em nível mundial e nacional. No Brasil, desde a década de 1970 a área cultivada, produção e produtividade da soja vêm crescendo, o que se deve aos esforços dos diversos programas de melhoramento no desenvolvimento de variedades adaptadas às diferentes regiões do País (EMBRAPA, 2007) e também ao desenvolvimento de cultivares resistentes às principais doenças que acometem a cultura da soja.

As doenças que afetam a soja são responsáveis por significativos prejuízos nas safras. Entre essas doenças, o nematóide de cisto da soja (NCS), *Heterodera glycines* Ichinohe, causa sérios problemas de redução de rendimento da soja nas principais regiões do mundo onde é cultivada (WRATHER et al., 2001). Estimativas de perdas anuais de aproximadamente 11% da produção mundial já foram atribuídas a esse parasita (BARKER, 1998).

Além de causar grande prejuízo à produção, o NCS também é de difícil manejo. O método de controle mais econômico e eficiente é o uso de cultivares resistentes associado à rotação com culturas não hospedeiras (EMBRAPA, 2007).

A principal dificuldade para o desenvolvimento de variedades resistentes aos nematóides é a seleção fenotípica, pois são necessários: inóculos do patógeno; estrutura para avaliação das plantas (casas de vegetação, o que reduz o número de plantas a serem avaliadas); e pessoal treinado para a experimentação. Além disso, a seleção fenotípica é demorada, tediosa e de alto custo (DIERS; ARELLI, 1999).

Apesar de terem sido identificadas diferentes fontes de resistência ao NCS, poucas foram utilizadas para o desenvolvimento das cultivares resistentes, caracterizando a vulnerabilidade do germoplasma de soja melhorado.

Com uma base genética estreita dos genótipos, esse patógeno pode facilmente superar a resistência nas cultivares de soja pela pressão de seleção de raças, devido à grande variabilidade genética desse parasita (RIGGS et al., 1981; DONG et al., 1997).

O desenvolvimento de marcadores moleculares de DNA do tipo microssatélites, possibilitou a elaboração de mapas genéticos altamente saturados do genoma da soja (CREGAN et al., 1999a; SONG et al., 2004), facilitando a busca de QTLs (*Quantitative trait loci*) para a resistência ao NCS.

A tecnologia dos marcadores de DNA tem sido uma grande promessa de auxílio nos programas de melhoramento para a seleção assistida de características de difícil avaliação, como é o caso do NCS, que poderá acelerar o desenvolvimento de cultivares resistentes com o melhoramento assistido por marcadores (TAMULONIS et al., 1997, SILVA et al., 2001).

No estudo da diversidade genética, os marcadores moleculares permitem fazer distinção genética entre indivíduos diretamente em nível de DNA, possibilitando acessar a variabilidade genética dentro do complexo gênico de espécies cultivadas, assim como identificar a diversidade disponível em bancos de germoplasma.

Nesse sentido, o presente trabalho teve por objetivos: 1) utilizar estratégias de seleção assistida por marcadores para avaliar a eficiência de seleção de marcadores microssatélites próximos a QTLs dos GL G e A2 visando a seleção de genótipos resistentes em populações segregantes originadas do cruzamento entre isolinhas derivadas das cultivares CD201 e Vmax; e 2) avaliar a diversidade genética das fontes de resistência e cultivares resistentes ao NCS, de diferentes programas de melhoramento de soja do Brasil, com base em locos microssatélites próximos aos QTLs que condicionam a resistência ao patógeno.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Importância econômica da soja

Os relatos de introdução da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) no Brasil são de 1882 na Bahia. Em 1891, novos genótipos foram avaliados no Estado de São Paulo, e em 1900 no Rio Grande do Sul, onde tiveram mais sucesso. No entanto, apenas na década de 1970 essa cultura adquiriu importância econômica para o País (EMBRAPA, 2007).

A partir da década de 1980 a região central do Brasil já se destacava em níveis de produtividade. Em 31 anos (1976/77 a 2007/08) a produção da soja passou de 12 milhões para 59 milhões de toneladas (CONAB, 2008). Considerando que há extensas áreas disponíveis no País para o cultivo dessa leguminosa, sua produção pode ser ainda maior.

No Brasil, a soja expandiu-se de norte a sul, sendo cultivada em 17 Estados. Os principais Estados produtores de soja são: Mato Grosso, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Bahia e São Paulo. Esses Estados produziram em 2006/07 aproximadamente 55 milhões de toneladas, o que corresponde a 93,1% da produção brasileira de soja (CONAB, 2008).

Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor e exportador mundial de soja, com cerca de 21 milhões de hectares cultivados e com uma produtividade média de 2.822 kg/ha (CONAB, 2008).

Estima-se que em poucos anos a produção brasileira possa superar a dos Estados Unidos, detentores de 37% da produção mundial, uma vez que a produção de soja dos principais concorrentes do Brasil (EUA, Argentina e China) tenderá a estabilizar-se por falta de áreas disponíveis para expansão em seus territórios (DALL'AGNOL, 2006).

A crescente demanda pelo grão da oleaginosa nos mercados nacional e internacional, que buscam tanto o farelo, para elaboração de rações animais, quanto o óleo, para uso doméstico e biodiesel, faz com que a soja e seus derivados tenham grande participação em divisas na pauta de exportação do País (ROESSING; GUEDES, 1993; DALL'AGNOL, 2006).

Embora já tenham sido desenvolvidas variedades adaptadas ao cultivo em todo o País, vários fatores limitam a obtenção de bons rendimentos para essas cultivares. Entre esses fatores estão as doenças que impedem que variedades melhoradas expressem seu potencial de rendimento (YORINORI et al., 1993).

2.2. Nematóide de cisto da soja

O nematóide de cisto da soja (NCS), *Heterodera glycines* Ichinohe, foi detectado pela primeira vez no Brasil na safra 1991/92 (LIMA et al., 1992; LORDELLO et al., 1992; MONTEIRO; MORAIS, 1992). Atualmente está presente em mais de 107 municípios de dez estados brasileiros (BA, GO, MA, MT, MS, MG, PR, SP, RS e TO) (EMBRAPA, 2007).

Na ausência de plantas hospedeiras, o cisto do nematóide pode sobreviver no solo por mais de oito anos. Portanto, onde há a ocorrência desse nematóide é praticamente impossível eliminá-lo (EMBRAPA, 2007).

O NCS é uma das principais limitações para a produção da soja no Brasil e no mundo (WRATHER et al., 1997). Ao parasitar as raízes de plantas de soja, o NCS dificulta a absorção de água e de nutrientes, retardando o crescimento e inibindo a nodulação do *Bradyrhizobium japonicum* (Kirchner) Buchanan, causando redução do porte e do número de vagens e, como consequência, a baixa produtividade (RIGGS; SCHMITT, 1987).

Em 1998, a CONAB reportou que as perdas na produção da soja brasileira devido ao NCS, desde a safra 1991/92, superaram US\$ 200 milhões, ressaltando que somente na safra 1997/98 esse valor foi de US\$ 140 milhões. Noel (1992) constatou 20 a 30% de prejuízo no rendimento da soja em campos infestados com nematóides, mesmo na ausência de sintomas severos. De acordo com Garcia et al. (2005), as cultivares suscetíveis apresentam uma produtividade em média de 400 kg/ha menor que a das resistentes.

O termo raça é utilizado para designar as formas intra específicas do NCS, porém o conceito de raça aplicado a esse patógeno não é baseado no seu genótipo e sim no fenótipo predominante em uma determinada

população, em um determinado tempo (EMBRAPA, 2007). Golden et al. (1970) e posteriormente Riggs e Schmitt (1988) propuseram descrever a diversidade do NCS por um sistema de raças fisiológicas utilizando quatro genótipos de soja resistentes (Pickett 71, Peking, PI 88788 e PI 90763) e um padrão suscetível (Lee) (Quadro1).

De acordo com essa classificação, 12 raças já são conhecidas nos EUA (raças 1 a 10, 14 e 15), e no Brasil já foram encontradas 11 (1, 2, 3, 4, 4+, 5, 6, 9, 10, 14 e 14+). A raça 3 é a mais comum nos EUA e também no Brasil (NOEL et al., 1994; EMBRAPA, 2007), e as raças 1, 2, 9 e 14 vêm se tornando cada vez mais importantes. Atualmente, a distribuição das raças do NCS no Brasil é a seguinte: Mato Grosso, raças 1, 2, 3, 4, 4+, 5, 6, 9, 10, 14 e 14+; Mato Grosso do Sul e Goiás, raças 3, 4, 5, 6, 10 e 14; Minas Gerais e Rio Grande do Sul, raças 3 e 6; Paraná, São Paulo e Bahia, raça 3; Tocantins, raça 1; e Maranhão, raça 9 (EMBRAPA, 2007).

Quadro 1 - Esquema utilizado para identificação de raças de *Heterodera glycines* proposto por Riggs e Schmitt (1988)

Raças	Pickett 71	Peking	PI 88788	PI 90763
1	-	-	+	-
2	+	+	+	-
3	-	-	-	-
4	+	+	+	+
5	+	-	+	-
6	+	-	-	-
7	-	-	+	+
8	-	-	-	+
9	+	+	-	-
10	+	-	-	+
11	-	+	+	-
12	-	+	-	+
13	-	+	-	-
14	+	+	-	+
15	+	-	+	-
16	-	+	+	+

- = número de fêmeas e cistos <10% em relação ao padrão suscetível Lee.

+ = número de fêmeas e cistos ≥ 10% em relação ao padrão suscetível Lee.

A classificação dos hospedeiros em resistentes ou suscetíveis a determinada raça é baseada em um índice de parasitismo (IP). Este mede o grau de parasitismo a que tais hospedeiros são submetidos, comparados com o padrão suscetível (Lee), em que $IP = (\text{no de fêmeas e cistos no hospedeiro diferenciador} / \text{n}^\circ \text{de fêmeas e cistos em Lee}) \times 100$. Quando esse índice é igual ou superior a 10, o hospedeiro é considerado suscetível e, quando menor, resistente (SCHMITT; SHANNON, 1992).

Embora o esquema de diferenciadoras seja usado com sucesso na identificação de raças, não existe padronização completa dos fatores envolvidos, e um mesmo isolado pode ser classificado em raças diferentes, dependendo do local onde foi feito o teste. Isso é atribuído às variações nos testes de raça, às diferenças genéticas das plantas e à variabilidade genética nas populações de nematóides (RIGGS et al., 1988).

Considerando que o sistema de raças não avalia toda a variabilidade presente nas populações de *Heterodera glycines*, Niblack et al. (2002) propuseram um novo esquema de classificação com sete variedades diferenciadoras ou linhas indicadoras (Peking, PI 887888, PI 90763, PI 437654, PI 209332, PI 89772 e PI 548316) para melhor descrever a diversidade do patógeno. Adicionalmente, eles sugeriram classificar as populações de nematóides como “tipos *H. glycines*” (tipos HG) e não em raças. No entanto, a grande maioria dos estudos foi realizada antes do desenvolvimento deste sistema, e ainda é comum usar a classificação de Riggs e Schmitt (1988).

O tipo HG de uma população de *Heterodera glycines* é determinado por um ensaio muito similar ao usado para determinação de raças, sendo a única diferença a inclusão das linhas indicadoras propostas por Niblack et al. (2002). A classificação do tipo HG de uma população de NCS é baseada simplesmente em uma lista de números que está apresentada no Quadro 2. Os números indicam o hospedeiro suscetível, que correspondem às linhas indicadoras. Por exemplo, uma população que apresenta IP igual ou superior a 10 em PI 88788, PI 209332 e PI 89772 é classificada como do tipo HG 2.5.6.

Quadro 2 - Linhas indicadoras para a classificação do tipo HG de populações de *Heterodera glycines*, proposta por Niblack et al. (2002)

Número	Linha Indicadora	Referência
1	PI 548402 (Peking)	Brim e Ross, 1966
2	PI 88788	Hartwig e Epps, 1978
3	PI 90763	Hartwig e Young, 1990
4	PI 437654	Anand, 1992a
5	PI 209332	Anand, 1992b
6	PI 89772	Nickell et al., 1994a
7	PI 548316 (Cloud)	Nickell et al., 1994b

2.2.1. Base genética da resistência ao NCS

Diversos estudos de genética clássica foram realizados para o esclarecimento da base genética da resistência ao NCS. Foram relatados genes com alelos recessivos e dominantes no controle da resistência em diversas fontes de resistência (CALDWELL et al., 1960; MATSON; WILLIAMS, 1965; RAO-ARELLI; ANAND, 1988; RAO-ARELLI, 1994; EPPS; HARTWIG, 1972; ANAND; GALLO, 1984; YOUNG, 1990; RAO-ARELLI et al., 1997).

Mansur et al. (1993) propuseram que se estudasse a herança da resistência ao NCS como quantitativa, com base na distribuição contínua do número de cistos na população. Nessa abordagem, o advento dos marcadores moleculares foi de grande importância para o mapeamento de QTLs (*Quantitative trait loci*) de resistência às diferentes raças do NCS, em diferentes fontes de resistência (CONCIBIDO et al., 2004).

Em estudos de mapeamento de QTLs para as diferentes raças do NCS foram identificadas, nas várias fontes de resistência, diversas regiões genômicas ligadas à resistência, presentes em 17 a 20 grupos de ligação (GL) da soja (CONCIBIDO et al., 2004; WINTER et al., 2006). Das fontes de resistência estudadas, nove QTLs em regiões independentes foram mapeados em Peking, oito na PI 438489B, seis na PI 437654 e cinco ou menos QTLs em outras PIs, com efeitos variando de 1 a 91% da variação

fenotípica total para resistência nas populações utilizadas (CONCIBIDO et al., 2004).

A herança ao NCS é complexa e o número e tipo de ação gênica varia de uma fonte de resistência para outra, bem como o número de genes de resistência presentes nas diferentes fontes.

Dentre os diversos QTLs identificados para a resistência ao NCS, um de efeito maior foi mapeado no grupo de ligação G da soja, designado *rhg1* (CONCIBIDO et al., 1994). Estudos independentes apontam que Peking (CHANG et al., 1997; CONCIBIDO et al., 1997; MEKSEM et al., 2001), PI 90763 (CONCIBIDO et al., 1997), PI 88788 (CONCIBIDO et al., 1997; GLOVER et al., 2004), PI 209332 (CONCIBIDO et al., 1994), PI 89772 (YUE et al., 2001), PI 437654 (WEBB et al., 1995) e uma linhagem derivada de Peking, PI 88788 e PI 90763 (HEER et al., 1998) possuem esse QTL no GL G. A capacidade de o loco *rhg1* condicionar resistência a múltiplas raças tem sido resultado de um mapeamento intensivo nesta região (CHANG et al., 1997; CONCIBIDO et al., 1997; MEKSEM et al., 2001; YUE et al., 2001; GLOVER et al., 2004, SILVA et al., 2007). Os marcadores microssatélites Satt309 e Sat_168 foram localizados a 0,4 cM do loco de resistência *rhg1* no GL G (CREGAN et al., 1999b).

Um segundo QTL de efeito maior para a resistência ao NCS foi detectado na região GL A2 e designado *Rhg4* (WEISEMANN et al., 1992; WEBB et al., 1995; PRABHU et al., 1999; WANG et al., 2004). O loco *Rhg4* é estreitamente ligado ao loco *i*, que confere cor preta ao tegumento da semente de soja (MATSON; WILLIAMS, 1965) e foi o primeiro loco de resistência a ser mapeado usando marcadores moleculares (WEISEMANN et al., 1992). O GL A2 explica 15% da variação fenotípica total em PI 209332 para a raça 3 NCS (CONCIBIDO et al., 1994) e uma parte significativa da variação em Peking (MAHALINGAM; SKORUPSKA, 1995; CHANG et al., 1997; MEKSEM et al., 2001), PI 437654 (WEBB et al., 1995) e em uma linhagem derivada de Peking, PI 88788 e PI 90763 (HEER et al., 1998).

A interação entre ambos os locos, *rhg1* e *Rhg4*, responde por quase a totalidade da variabilidade para a resistência à raça 3 do NCS e grande parte da variabilidade para as outras raças (CONCIBIDO et al., 2004).

No GL D2, Schuster et al. (2001) identificaram um QTL de efeito

maior conferindo resistência à raça 14. YUE et al. (2001) também mapearam QTLs de resistência à raça 14, mas foram posicionados nos grupos de ligação C1, D1a e E.

Muitos outros QTLs de efeito menor têm sido identificados nos GL A1, B1, B2, C1, C2, D1a, D2, E, F, G, H, I, J, L, M e N (CONCIBIDO et al., 2004). Sugere-se que os locos de efeitos menores reportados em outros GL possam estar envolvidos na “raça especificidade”, porém necessitam de mais validação (SCHUSTER et al., 2001).

Recentemente, a busca de QTLs associados com a resistência ao NCS tem sido feita na espécie *Glycine soja*, um ancestral selvagem da soja domesticada (KABELKA et al., 2005; LU et al., 2006; WINTER et al., 2007). A falta de diversidade de genes de resistência ao NCS em cultivares de soja faz com que haja uma necessidade de identificar diferentes fontes de resistência. Acredita-se que a espécie *Glycine soja* seja uma fonte potencial de novos alelos e que possa ser útil para diversificar os genes de resistência usados nas cultivares atuais.

2.3. Uso da seleção assistida por marcadores nos programas de melhoramento da soja

A identificação e a seleção de linhagens resistentes ao NCS é um processo trabalhoso e demorado, uma vez que a avaliação fenotípica necessita de grande espaço físico e muita mão-de-obra (YOUNG; MUDGE, 2002; CERVIGNI et al., 2004; CONCIBIDO et al., 2004).

Dessa forma, a seleção assistida por marcadores (SAM) é bastante promissora no caso do NCS, podendo reduzir o número de linhagens a serem avaliadas fenotipicamente, com conseqüente redução de custo. Concibido et al. (2004) compararam os custos nos dois tipos de seleção e verificaram que, dependendo do volume da operação, o custo da SAM para a resistência ao NCS varia de 0,25 a 1,0 dólar por planta, enquanto a fenotipagem, em casa de vegetação, custa de 1,50 a 5,0 dólares por planta, além de demorar cerca de 30 dias.

Casos de sucesso têm sido obtidos na SAM em populações onde os QTLs foram mapeados, principalmente, com a utilização de microssatélites

na região já validada do loco *rhg1*, que apresenta grande efeito para a maioria das raças. Utilizando esta região, MUDGE et al. (1997) obtiveram 98% de acurácia na identificação de linhas resistentes à raça 3 usando SSR que flanqueava o loco *rhg1*. Cervigni (1999) relatou eficiência de seleção de 92% para resistência à raça 3 do NCS. Schuster et al. (2001) reportaram um decréscimo, em média, de 70% no índice de parasitismo (IP) para a raça 14. Além disso, Concibido et al. (1996) obtiveram eficiência de seleção de 83-90% usando marcadores RFLP.

A SAM é mais efetiva quanto mais próximo do loco estiver o marcador molecular, reduzindo a possibilidade de ocorrer uma recombinação entre os dois. Durante o processo de seleção, as associações entre os locos marcadores e QTLs poderão mudar devido à recombinação e, portanto, é importante realizar contínuas reavaliações das associações com o avanço das gerações.

2.4. Avaliação de diversidade genética utilizando marcadores moleculares

O conhecimento relacionado à diversidade genética das espécies traz duas vantagens a um programa de melhoramento. A primeira diz respeito à heterogeneidade genética, que reduz a vulnerabilidade das espécies às pragas e doenças, e a segunda está relacionada ao fornecimento de amplo suprimento de variação alélica, que pode ser usada para criar novas combinações de genes favoráveis (BERTINI, 2004).

A importância da variabilidade genética dentro de uma população é que, sem ela, a seleção não é possível. Sob o ponto de vista agrônomo, a importância dessa variabilidade está relacionada à tentativa de se diminuir a vulnerabilidade da cultura ao ataque de pragas e doenças e a outras adversidades (KÖLLIKER et al., 2001).

A variabilidade genética pode ser estimada por meio de vários parâmetros: número médio ou total de alelos/loco, diversidade genética ou, ainda, conteúdo de informação de polimorfismo (PIC). A diversidade depende diretamente do número de alelos e da maneira que as frequências desses alelos estão distribuídas. Quanto mais homogêneas forem as

freqüências alélicas, maior é a diversidade da população.

A utilização de marcadores moleculares na caracterização do germoplasma da soja tem sido adotada na determinação da diversidade genética (NARVEL et al., 2000; NETO, 2001; WANG et al., 2006).

Os marcadores moleculares possibilitam a detecção de polimorfismo genético diretamente na seqüência de DNA. Entre os vários tipos de marcadores existentes, os microssatélites apresentam a vantagem de serem codominantes, bastante informativos e de fácil utilização (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Também chamados de seqüências simples repetidas (SSR), os microssatélites consistem de dois a seis nucleotídeos repetidos em *tandem* ao longo do genoma (LITT; LUTY, 1989). Essas regiões são amplificadas por meio da reação de polimerase em cadeia (PCR), utilizando um par de *primers* específicos complementares a seqüências conservadas que flanqueiam o microssatélite. Cada segmento amplificado de tamanho diferente representa um alelo diferente do mesmo loco (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Estudos de divergência genética baseados em SSR indicam que esta classe de marcadores é bastante informativa (NETO, 2001), além de que eles não sofrem a influência dos efeitos ambientais a que estão sujeitos os caracteres quantitativos.

Utilizando marcadores SSR para caracterizar um grupo de 41 cultivares brasileiras, Priolli et al. (2002) concluíram que a utilização dessa ferramenta pode substituir o uso de critérios morfológicos e bioquímicos, em alguns casos, na análise de diversidade e registro de cultivares, principalmente quando se tem uma base genética estreita e um *pool* genético limitado, como no caso da soja.

2.4.1. Diversidade genética entre as fontes de resistência x variabilidade genética do *Heterodera glycines*

Embora muitas PIs tenham sido identificadas como fontes de resistência, poucas foram utilizadas para desenvolver cultivares resistentes ao NCS, caracterizando a vulnerabilidade do germoplasma melhorado de

soja ao nematóide de cisto da soja (EMBRAPA, 2007).

De acordo com Anand (1991), as principais fontes de resistência utilizadas nos EUA derivam de Peking e PI88788. Já no Brasil a cultivar Hartwig e Pecking é a fonte de resistência mais usada nos programas de melhoramento visando à resistência ao NCS (EMBRAPA, 2007).

O grande problema de utilizar as mesmas fontes de resistência é que o parasita pode sofrer pressão de seleção; com isso, surgem novas populações de *Heterodera glycines* com capacidade de parasitar esses genótipos, uma vez que esse parasita apresenta grande variabilidade genética (RIGGS et al., 1981; DONG et al., 1997).

No Brasil, a variabilidade do patógeno parece ser maior que a observada nos EUA. Desde que o NCS apareceu no Brasil, em 1992, já foram detectadas as raças 1, 2, 3, 4, 4+, 5, 6, 9, 10, 14 e 14+ (EMBRAPA, 2007). O aparecimento de novas raças no Brasil está acontecendo de forma muito rápida, uma vez que a detecção do NCS no País é relativamente recente e o parasita praticamente não sofreu pressão de seleção.

Diers et al. (1997) avaliaram a diversidade genética entre PIs com resistência ao NCS e verificaram que aquelas que apresentam resistência a múltiplas raças associam-se em poucos grupos maiores, baseados em marcadores RFLP, caracterizando uma pequena diversidade genética entre as fontes de resistência.

3. BIBLIOGRAFIA

- ANAND, S.C.; GALLO, K.M. Identification of additional soybean germplasm with resistance to race 3 of soybean cyst nematode. **Plant Disease**, v. 68, p. 593-595, 1984.
- ANAND, S.C. Sources of resistance to *Heterodera glycines* in soybean cultivars. In: **Proc. Southern soybean Disease workers 18th Ann. Meet.** COLYER, P.T. (Ed.). Lexington, KY, 1991.
- ANAND, S.C. Registration of 'Hartwig' soybean. **Crop Science**, v. 32, p. 1069-1070, 1992a.
- ANAND, S.C. Registration of 'Delsoy 4710' soybean. **Crop Science**, v. 32, p. 1294, 1992b.
- BARKER, K.R. Introduction. In: BARKER, K.R.; PEDERSON, G.A.; EINHHAN, G.L. (Eds) **Plant and nematodes interactions**. Madison: American Society of Agronomy, 1998. p. 1-120.
- BERTINI, C.H.C.M. **Caracterização e análise de diversidade genética em algodoeiro herbáceo por marcadores microssatélites e genealogia**. 122 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2004.
- BRIM, C.A.; ROSS, J.P. Registration of Pickett soybeans. **Crop Science**, v. 6, p. 305, 1966.
- CALDWELL, B.E.; BRIM, C.A.; ROSS, J.P. Inheritance of resistance to soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*. **Agronomy Journal**, v. 52, n. 6, p. 635-636, 1960.
- CERVIGNI, G.D.L. **Mapeamento de genes de resistência à raça 3 do nematóide de cisto da soja (*Heterodera glycines* Ichinohe)**. 52 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1999.
- CERVIGNI, G.D.L.; SCHUSTER, I.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Two microsatellite markers flanking a dominant gene for resistance to soybean cyst nematode race 3. **Euphytica**, v. 135, p. 99-105, 2004.

- CHANG, S.J.C.; DOUBLER, T.W.; KILO, V.Y.; ABU-THREDEIH, J.; PRABHU, R.; FREIRE, V.; SUTTNER, R.; KLEIN, J.; SCHMIDT, M.E.; GIBSON, P.T.; LIGHTFOOT, D.A. Association of loci underlying field resistance to soybeans sudden death syndrome (SDS) and cyst nematode (SCN) race 3. **Crop Science**, v. 37, p. 965-971, 1997.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Central de informações agropecuárias**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>> Acesso em: 08 jan. 2008.
- CONCIBIDO, V.C.; DENNY, R.L.; BOUTIN, S.R.; HAUTEA, R.; ORF, J.H.; YOUNG, N.D. DNA marker analysis of loci underlying resistance to soybean cyst nematode (*Heterodera glycines* Ichinohe). **Crop Science**, v. 34, n. 1, p. 240-246, 1994.
- CONCIBIDO, V.C.; DENNY, R.L.; LANGE, D.A.; ORF, J.H.; YOUNG, N.D. RFLP mapping and marker-assisted selection of soybean cyst nematode resistance in PI 209332. **Crop Science**, v. 36, n. 6, p. 1643-1650, 1996.
- CONCIBIDO, V.C.; DOUGLAS, L.; DENNY, R.L.; ORF, J.H.; YOUNG, N.D. Genome mapping of soybean cyst nematode resistance genes in Peking, PI 90763, and PI 88788 using DNA markers. **Crop Science**, v. 37, n. 1, p. 258-264, 1997.
- 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.
- CREGAN, P.B.; JARVIK, T.; BUSH, A.L.; SHOEMAKER, R.C.; LARK, K.G.; KAHLER, A.L.; KAYA, N.; VANTOAI, T.T.; LOHNES, D.G.; CHUNG, J.; SPECHT, J.E. An integrated genetic linkage map of the soybean. **Crop Science**, v. 39, p. 1464-1490. 1999a.
- CREGAN, P.; MUDGE, J.; FICHUS, E.W.; DENNY, D.R.; YOUNG, N.D. Two simple sequence repeat markers to select for soybean cyst nematode resistance conditioned by the *rhg1* locus. **Theoretical Applied Genetics**, v. 99, p. 811-818, 1999b.

- DALL'AGNOL, A. **Perspectivas da Soja Brasileira - Embrapa Soja 2006**. Disponível em: <[http://www.portaldoagronegocio.com.br/index.php?p=texto &&idT=831](http://www.portaldoagronegocio.com.br/index.php?p=texto&&idT=831)>. Acesso em: 05 dez. 2006.
- DIERS, B.W.; SKORUPSKA, H.T.; RAO-ARELLI, A.P.; CIANZIO, S.R. Genetic relationships among soybean plant introductions with resistance to soybean cyst nematodes. **Crop Science**, v. 37, p. 1966-1972, 1997.
- DIERS, B.W.; ARELLI, P.R. Management of parasitic nematodes of soybean through genetic resistance. In KAUFFMAN, H.E. (ed.) **Proc. World Soybean Research Conf. VI**, Chicago, IL p. 300-306, 4-7 Aug. 1999.
- DONG, K.; BAKER, K.R.; OPPERMAN, C.H. Genetic of soybean *Heterodera glycines* interactions. **Journal of Nematology**, v. 29, p. 509-522, 1997.
- EMBRAPA. **Tecnologia de produção de soja para a região central do Brasil**. Londrina: Embrapa, Embrapa Agropecuária Oeste, 228p. 2007
- EPPS, J.M.; HARTWIG, E.E. Reaction of soybean varieties and strain to race 4 of soybean cyst nematode. **Journal of Nematology**, v. 4, n. 4, p. 222. 1972. (Abstract).
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa-Cernagem, 1998. 220 p.
- GARCIA, A.; SILVA, J.F.V. ; LONIEN, G.; PEREIRA, E. Avaliação de perdas em soja causadas pelo nematóide de cisto através da comparação de rendimentos entre cultivares resistentes e suscetíveis. In: XXV Congresso Brasileiro de Nematologia, 2005, Piracicaba. **Anais do XXV CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA**, 2005. p. 109-109.
- GLOVER, K.D.; WANG, D.; ARELLI, P.R.; CARLSON, S.R.; CIANZIO, S.R.; DIERS, B.W. Near isogenic lines confirm a soybean cyst nematode resistance gene from PI 88788 on linkage group J. **Crop Science**, v. 44, p. 936-941, 2004.

- GOLDEN, A.M.; EPPS, J.M.; RIGGS, R.D.; DUCLOS, L.A.; FOX, J.A.; BERNARD, R.L. Terminology and identity of intra specific forms of the soybean cyst nematode *Heterodera glycines*. **Plant Disease Report**, v. 54, n. 2, p. 544-546, 1970.
- HARTWIG, E.E.; EPPS, J.M. Registration of Bedford soybeans. **Crop Science**, v. 18, p. 915, 1978.
- HARTWIG, E.E.; YOUNG, L.D. Registration of 'Cordell' soybean. **Crop Science**, v. 30, p. 231, 1990.
- HEER, J.A.; KNAP, H.T.; MAHALINGAM, R.; SHIPE, E.R.; ARELLI, P.R.; MATTHEWS, B.F. Molecular markers for resistance to *Heterodera glycines* in advanced soybean germplasm. **Molecular Breeding**, v. 4, p. 359-367, 1998.
- KABELKA, E.A.; CARLSON, S.R.; DIERS, B.W. Localization of two loci that confer resistance to soybean cyst nematode from *Glycine soja* PI 468916. **Crop Science**, v. 45, p. 2473-2481, 2005.
- KÖLLIKER, R.; JONES, E.S.; JAHUFER, M.Z.Z.; FORSTER, J.W. Bulked AFLP analysis for the assessment of genetic diversity in white clover (*Trifolium repens* L.). **Euphytica**, v. 121, p. 305-315, 2001.
- LIMA, R.D.; FERRAZ, S.; SANTOS, J.M. Ocorrência de *Heterodera* sp. em soja no Triângulo Mineiro. **Nematologia Brasileira**, v. 16, n. 1/2, p. 101-102, 1992.
- LITT, M.; LUTY, J.A.A. hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**. v. 44, p. 397-401, 1989.
- LORDELLO, A.I.L.; LORDELLO, R.R.A.; QUAGGIO, J.A. Ocorrência do nematóide de cisto da soja (*Heterodera glycines*) no Brasil. **Revista de Agricultura**, v. 67, n. 3, p. 223-225, 1992.
- LU, P.; SHANNON, J.G.; SLEPER, D.A.; NGUYEN, H.T.; CIANZIO, S.R.; ARELLI, P.R. Genetics of cyst nematode resistance in soybean PIs 467312 and 507354. **Euphytica**, v. 149, p. 259-265, 2006.

- MAHALINGAM, R.; SKORUPSKA, H.T. DNA markers for resistance to *Heterodera glycines* I. race 3 in soybean cultivar Peking. **Breeding Science** v. 45, p. 435-443, 1995.
- MANSUR, L.M.; CARRIQUIRY, A.L.; RAO-ARELLI, A.P. Generation mean analysis of resistance to race 3 of soybean cyst nematode. **Crop Science**, v. 33, n. 3, p. 1249-1253, 1993.
- MATSON, A.L.; WILLIAMS, L.F. Evidence of a fourth gene for resistance to the soybean cyst nematode. **Crop Science**, v. 5, p. 477, 1965.
- MEKSEM, K.; PANTAZOPOULOS, P.; NJITI, V.N.; HYTEN, L.D.; ARELLI, P.R.; LIGHTFOOT, D.A. 'Forrest' resistance to the soybean cyst nematode is bigenic: saturation mapping of the *Rhg1* and *Rhg4* loci. **Theoretical Applied Genetics**, v. 103, p. 710-717, 2001.
- MONTEIRO, W.F.; MORAIS, S.R.A.C. **Ocorrência do nematóide de cisto da soja, *Heterodera glycines*, Ichinohe, 1952, prejudicando a cultura da soja no Mato Grosso do Sul.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 16., Lavras, 1992.
- MUDGE, J.; CREGAN, P.B.; KENWORTHY, J.P.; KENWORTHY, J.W.; ORF, J.H.; YOUNG, N.D. Two microsatellite markers that flank the major soybean cyst nematode resistance locus. **Crop Science**, v. 37, n. 3, p. 1611-1615, 1997.
- NARVEL, J.M.; FEHR, W.R.; CHU, W.C.; GRANT, D.; SHOEMAKER, R.C. Simple sequence repeat diversity among soybean plant introductions and elite genotypes. **Crop Science**, v. 40, p. 1452-1458, 2000.
- NETO, F.A. **Caracterização de cultivares de soja por marcadores microssatélites.** 46 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001.
- NIBLACK, T.L.; ARELLI, P.R.; NOEL, G.R.; OPPERMAN, C.H.; ORF, J.H.; SCHMITT, D.P.; SHANNON, J.G.; TYLKA, G.L. A revised classification scheme for genetically diverse populations of *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology**, v. 34, n. 4, p. 279-288, 2002.

- NICKELL, C.D.; NOEL, G.R.; BERNARD, R.L.; THOMAS, D. J.; FREY, K.
Registration of soybean germplasm line 'LN89-5699' resistant to soybean cyst nematode. **Crop Science**, v. 34, p. 1133-1134, 1994a.
- NICKELL, C.D.; NOEL, G.R.; BERNARD, R.L.; THOMAS, D.J.; PRACT, J.
Registration of soybean germplasm line 'LN89-5612' moderately resistant to soybean cyst nematode. **Crop Science**, v. 34, p. 1134, 1994b.
- NOEL, G.R. History, distribution and economics. p.1-13. In : RIGGS, R.D.; WRATHER, J.A. (Ed.) **Biology and management of the soybean nematode cyst**. APS press, St. Paul, MN. 1992.
- NOEL, G.R.; MENDES, M.L.; MACHADO, C.C. Distribution of *Heterodera glycines* races in Brazil. **Nematropica**, v. 24, p. 63-68. 1994.
- PRABHU, R.R.; NJITI, V.N.; BELL JOHNSON, B.; JOHNSON, J.E.; SCHIMIDT; M.E.; KLEIN, J.H.; LIGHTFOOT, D.A. Selecting soybean cultivars for dual resistance to soybean cyst nematode and sudden death syndrome using two DNA markers. **Crop Science**, v. 39, p. 982-987, 1999.
- PRIOLLI, R.H.G.; MENDES-JUNIOR, C.T.; ARANTES, N.E.; CONTEL, E.P.B. Characterization of Brazilian soybean cultivars using microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**. V. 25, p. 185-193. 2002.
- RAO-ARELLI, A.P.; ANAND, S.C. Genetic relationships among soybean plant introductions for resistance to race 3 of soybean cyst nematode. **Crop Science**, v. 28, p. 650-652, 1988.
- RAO-ARELLI, A.P. Inheritance of resistance to *Heterodera glycines* race 3 in soybean accessions. **Plant Disease**, v. 78, p. 898-900, 1994.
- RAO-ARELLI, A.P.; WILCOX, J.A.; MYERS, O.Jr.; GIBSON, P.T. Soybean germoplasm resistant to races 1 and 2 of *Heterodera glycines*. **Crop Science**, v. 37, p. 1367-1369, 1997.
- RIGGS, R.D.; HAMBLIN, M.L.; SLACK, D.A. Infra-species variation in reaction to hosts in *Heterodera glycines* populations. **Journal of Nematology**, v. 13, p. 171-179, 1981.

- RIGGS, R.D.; SCHMITT, D.P. Nematodes. In: Wilcox, J.R. (Ed.) **Soybeans: Improvement, production, and uses**. 2 ed. Agron. Mongr. 16. ASA, CSSA, and SSSA, Madison, WI, 1987. p. 757-778.
- RIGGS, R.D.; SCHMITT, D.P. Complete characterization of the race scheme for *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology**, St. Paul, MN, v. 20, n. 3, p. 392-395, 1988.
- RIGGS, R.D.; SCHMITT, D.P.; NOEL, G.R. Variability in race tests with *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology**, St. Paul, MN, v. 20, n. 4, p. 565-572, 1988.
- ROESSING, A.C.; GUEDES, L.C.A. Aspectos econômicos do complexo soja: sua participação na economia brasileira e evolução na região central. In: ARANTES, N.E.; SOUZA, P.I.M. (Eds.). **A cultura da soja nos cerrados**. Piracicaba: Potafos, 1993. p.1-69.
- SCHMITT, D.P.; SHANNON, G. Differentiating soybean to *Heterodera glycines* races. **Crop Science**, v. 32, p. 275-277, 1992.
- SCHUSTER, I.; ABDELNOOR, R.V.; MARIN, S.R.R.; CARVALHO, V.P.; KIIHL, R.A.S.; SILVA, J.F.V.; SEDIYAMA, C.S.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Identification of a new major QTL associated with resistance to soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*). **Theoretical Applied Genetics**, v. 102, p. 91-96, 2001.
- SILVA, J.F.V.; FERRAZ, L.C.B.C.; ARIAS, C.A.A.; ABDELNOOR, R.J.E. Identificação de marcadores moleculares de microssatélite associados à resistência de genótipos de soja a *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, v. 25, n. 1, p. 79-83, 2001.
- SILVA, M.F.; SCHUSTER, I.; SILVA, J.F.V.; FERREIRA, A.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Validation of microsatellite markers for assisted selection of soybean resistance to cyst nematode races 3 and 14. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 8, p. 1143-1150, 2007.
- SONG, Q.J.; MAREK, L.F.; SHOEMAKER, R.C.; LARK, K.G.; CONCIBIDO, V.C.; DELANNAY, X.; SPETCH, J.E.; CREGAN, P.B. A new integrated

- genetic linkage map of the soybean. **Theoretical Applied Genetics**, v. 109, p. 122-128, 2004.
- TAMULONIS, J.P.; LUZZI, B.M.; HUSSEY, R.S.; PARROT, W.A.; BOERMA, H.R. DNA markers analysis of loci conferring resistance to peanut root-knot nematode in soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 95, p. 664-670, 1997.
- WANG, D.; GRAEF, G.L.; PROCOPIUK, A.M.; DIERS, B.W. Identification of putative QTL that underlies yield in interspecific soybean backcross populations. **Theoretical Applied Genetics**, v. 108, n. 3, p. 458-467. 2004
- WANG, L.; GUAN, R.; LIU, Z.; CHANG, R.; QIU, L. Genetic diversity of Chinese cultivated soybean revealed by SSR markers. **Crop Science**, v. 46, p. 1032-1038, 2006.
- WEBB, D.M.; BALTAZAR, B.M.; RAO-ARELLI, A.P.; SCHUPP, J.; CLAYTON, K.; KEIM, P.; BEAVIS, W.D. Genetics mapping of soybean cyst nematode race-3 resistance loci in the soybean PI 437654. **Theoretical Applied Genetics**, v. 91, n. 1, p. 574-581, 1995.
- WEISEMANN, J.M.; MATTHEWS, B.S.; DEVINE, T.E. Molecular markers located to the soybean cyst nematode resistance gene, *Rhg4*. **Theoretical Applied Genetics**, v. 85, n. 1, p. 136-138, 1992.
- WINTER, S.M.J.; RAJCAN, I.; SHELP, B.J. Soybean cyst nematode: Challenges and opportunities. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 86, p. 25-32, 2006.
- WINTER, S.M.J.; SHELP, B.J.; ANDERSON, T.R.; WELACKY, T.W.; RAJCAN, I. QTL associated with horizontal resistance to soybean cyst nematode in *Glycine soja* PI464925B. **Theoretical Applied Genetics**, v. 114, p. 461-472, 2007.
- WRATHER, J.A.; ANDERSON, T.R.; ARSYAD, D.M.; GAI, J.; PLOPER, L.D.; PORTA-PUGLIA, A.; RAM, H.H.; YORINORI, J.T. Soybean disease loss estimates for the top soybean producing countries in 1994. **Plant**

- Disease**, v. 81, p. 107-110, 1997.
- WRATHER, J.; ANDERSON, T.; ARSYAD, D; TAN, Y.; PLOPER, L.; PORTO-PUGLIA, A.; RAM, H.; YORINORI, J. Soybean disease loss estimates for the top ten soybean producing countries in 1998. **Canadian Journal Pathology**, v. 23, p. 115-121, 2001.
- YORINORI, J.T.; CHARCHAR, M.J.D.; NASSER, L.C.B.; HENNING, A.A. Doenças da soja e seu controle. In: ARANTES, N.E.; SOUZA, P.I.M. (Eds.). **Cultura de soja nos cerrados**. Piracicaba: POTAFOS, 1993. p. 535.
- YOUNG, L.D. Survey of soybean cyst nematode races in Tennessee. **Journal of Nematology**, v. 22, p. 672-675, 1990.
- YOUNG, N.D.; MUDGE, J. Marker-assisted selection for soybean cyst nematode resistance. In: STARR, J.L.; COOK, R.; BRIDGE, J. (Eds) **Plant resistance to parasitic nematodes**, 2002. p. 241-251.
- YUE, P.; SLEPER, D.A.; ARELLI, P.R. Mapping resistance to multiple races of *Heterodera glycines* in soybean PI 89772. **Crop Science**, v. 41, p. 1587-1595, 2001.

CAPÍTULO 1

ESTRATÉGIAS DE SELEÇÃO ASSISTIDA PARA A RESISTÊNCIA AO NEMATÓIDE DE CISTO DA SOJA EM PROGRAMAS DE MELHORAMENTO

RESUMO

A seleção assistida por marcadores permite a identificação de linhagens com base nos alelos de marcadores genéticos ligados à resistência, reduzindo o número de linhagens a serem avaliadas fenotipicamente, que é a maior limitação para o desenvolvimento de cultivares resistentes ao nematóide de cisto da soja. O presente trabalho teve como objetivo utilizar estratégias de seleção assistida por marcadores para avaliar a eficiência de seleção de microssatélites próximos a QTLs de resistência dos grupos de ligação (GL) G e A2 para a seleção de genótipos resistentes em populações originadas do cruzamento entre isolinhas derivadas de Vmax e CD201. Inicialmente, foram selecionadas genotipicamente sete populações F_5 com base no polimorfismo de *bulks* de sementes de 65 populações iniciais; das sete populações, quatro foram selecionadas com base em microssatélites dos GL G e A2 e outras três com base no GL A2. Essas populações foram avaliadas fenotipicamente quanto à resistência à raça 3 do NCS. Cada população foi composta, em média, de 9 famílias. As famílias F_6 derivadas das populações selecionadas com base nos GL G e A2 foram genotipadas em *bulk* com os microssatélites do GL G, sendo a eficiência de seleção calculada para esses microssatélites. A população de NCS utilizada foi classificada como HG tipo 5.7.(raça 3). As populações selecionadas com base no GL A2 geraram famílias $F_{6:7}$, que foram classificadas fenotipicamente como altamente suscetíveis. Nas populações selecionadas com base nos GL G e A2, foram encontradas quatro famílias resistentes e quatro moderadamente resistentes, indicando que o QTL de efeito maior para a resistência ao NCS no GL A2 não está presente na fonte de resistência utilizada neste trabalho, que é derivada de PI 88788. Famílias $F_{6:7}$ classificadas fenotipicamente como suscetíveis

apresentaram plantas exibindo resistência completa ou moderada, evidenciando que nessas famílias suscetíveis existem genes de resistência segregando. Os marcadores avaliados do GL G discriminaram as famílias suscetíveis, porém não permitiram a discriminação das famílias F_{6:7} resistentes das moderadamente resistentes, indicando que outros genes de resistência (efeito menor) são necessários para a resistência completa à raça 3. A estratégia usada na seleção assistida foi eficaz na seleção de famílias F_{6:7} resistentes e moderadamente resistentes à raça 3 do NCS com a utilização de microssatélites do GL G. Os valores de eficiência de seleção para os microssatélites Sat_168, Satt309 e Sat_141 foram de 97,05, 96,55 e 93,55% respectivamente, mostrando que esses marcadores são ferramentas úteis na seleção para a resistência à raça 3 do NCS, nas populações avaliadas.

INTRODUÇÃO

O nematóide de cisto da soja (*Heterodera glycines* Ichinohe) é a principal doença responsável por perdas na produção da soja (WRATHER et al., 2001). O método de controle mais econômico e eficiente é o uso de cultivares resistentes associadas à rotação com culturas não hospedeiras (EMBRAPA, 2007). A maior limitação para o desenvolvimento de cultivares resistentes é a avaliação fenotípica, que é demorada e trabalhosa, necessitando de grande espaço físico e muita mão-de-obra (YOUNG; MUDGE, 2002; CERVIGNI, 2004; CONCIBIDO et al., 2004).

O uso de marcadores moleculares é uma alternativa para auxiliar no desenvolvimento de cultivares resistentes. O desenvolvimento de mais de 1.000 marcadores moleculares do tipo microssatélite (*Simple Sequence Repeat*), que são conservados e altamente polimórficos, possibilitou a construção de um mapa genético integrado, saturado e consenso para soja (SONG et al., 2004, CREGAN et al., 1999a). Dessa maneira, marcadores próximos a um QTL (*Quantitative trait loci*) de interesse podem ser usados como âncoras para localizar as regiões dentro do mapa de ligação da soja em diferentes populações (SCHUSTER et al., 2001).

Muitos QTLs já foram descritos e validados para diferentes raças do nematóide de cisto da soja (NCS) em diferentes fontes de resistência (CONCIBIDO et al., 2004), sendo predominante um QTL de efeito maior no grupo de ligação (GL) G, designado *rhg1*, que confere maior resistência para várias raças do nematóide (CHANG et al., 1997; CONCIBIDO et al., 1997; MEKSEM et al., 2001; YUE et al., 2001; GLOVER et al., 2004, SILVA et al., 2007). O outro QTL de grande importância está localizado no GL A2, com efeito maior, principalmente, para a raça 3 (WEBB et al., 1995; MAHALINGAM; SKORUPSKA, 1995; CHANG et al., 1997; MEKSEM et al., 2001; WANG et al., 2004). Estes QTLs são ditos validados, por terem sido detectados em populações independentes, com alta eficiência de seleção; portanto, são de grande utilidade nos programas de melhoramento.

A seleção assistida por marcadores é uma valiosa ferramenta de auxílio nos programas de melhoramento, permitindo que a seleção de linhagens resistentes seja feita com base em alelos de marcadores

genéticos ligados a genes de resistência, reduzindo o número de linhagens para serem avaliadas em casa de vegetação (YOUNG; MUDGE, 2002; CONCIBIDO et al., 2004).

O presente trabalho teve como objetivo utilizar estratégias de seleção assistida por marcadores para avaliar a eficiência de seleção de microssatélites próximos a QTLs dos GL G e A2 visando a seleção de genótipos resistentes em sete populações originadas do cruzamento entre isolinhas de alto teor protéico derivadas de CD201 e Vmax.

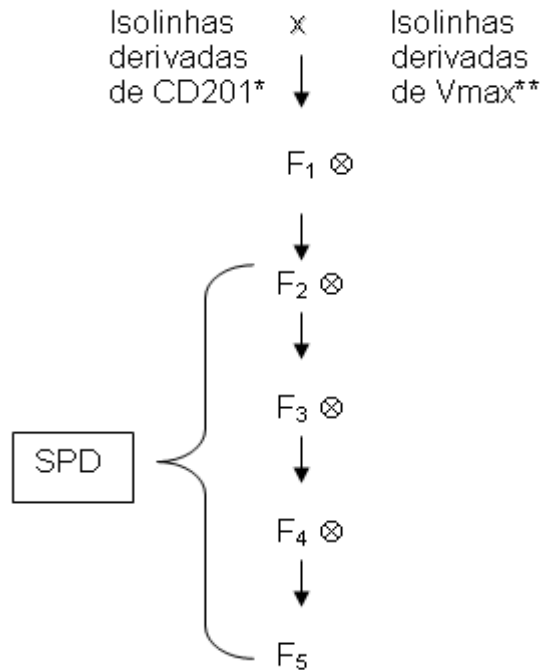
MATERIAL E MÉTODOS

Material genético

Foram utilizados cruzamentos entre isolinhas de alto teor de proteína derivadas dos progenitores Vmax e de CD201, que são variedades adaptadas à região Sul do Brasil. As isolinhas derivadas de Vmax e CD201 foram obtidas por dois retrocruzamentos parciais assistidos por marcadores moleculares (*fingerprinting*), tendo como fonte de alta proteína derivados de BARC-8 e BR80-14883, respectivamente. Vmax apresenta resistência às raças 3 e 14 do nematóide de cisto da soja, além de ser geneticamente mais divergente em relação às demais variedades resistentes ao NCS do Brasil (ver capítulo 2). CD201 apresenta alto teor protéico e resistência moderada ao nematóide de galha.

A partir dos cruzamentos entre as isolinhas derivadas dos progenitores Vmax e de CD201 foram obtidas 65 populações, que foram conduzidas até a geração F₅ pelo método SPD (*single pod descendent*) (Figura 1). Inicialmente, os cruzamentos foram conduzidos em casa de vegetação da Universidade Federal de Viçosa e, a partir da geração F₂, em campo experimental da cidade de Visconde do Rio Branco pertencente à UFV. Durante a condução do experimento não foi realizado nenhum tipo de seleção.

Essas populações são provenientes do programa de melhoramento para a qualidade da soja do BIOAGRO/UFV, cujo objetivo é a seleção para alto conteúdo protéico e para a resistência ao nematóide de cisto da soja e nematóide de galha.



* fonte protéica derivada de Barc-8
 ** fonte protéica derivada de BR80-14883

Figura 1 - Esquema dos cruzamentos realizados para obtenção das 65 populações.

Estratégia de melhoramento assistido por marcadores microssatélites para a resistência ao NCS

Os marcadores microssatélites próximos aos QTLs para a resistência ao NCS dos GL G e A2 (Tabela 1) foram avaliados quanto ao polimorfismo entre os progenitores Vmax e CD201. Os marcadores que apresentaram polimorfismo entre os progenitores foram amplificados, utilizando-se amostras de DNA extraído de *bulks* de sementes de cada uma das 65 populações F₅.

As populações F₅ segregantes para o NCS, que apresentaram polimorfismo nos microssatélites próximos aos QTLs para a resistência ao NCS, foram selecionadas e plantadas em *bulks* (SPD) para obtenção da geração F₆. Cada população apresentou, em média, 20 plantas. Essas plantas foram colhidas individualmente, e sete sementes F₇ foram separadas para avaliação fenotípica quanto à resistência à raça 3 do NCS.

Tabela 1 - Microssatélites próximos aos QTLs para a resistência ao NCS e os respectivos grupos de ligação avaliados nos progenitores para a seleção assistida

Microssatélite	GL ^a	Posição ^b	Microssatélite	GL ^a	Posição ^b
Satt163	G	0,00	Sat_157	A2	51,57
Satt038	G	1,84	Sat_162	A2	51,86
Satt275	G	2,20	BLT 065	A2	52,85
Sat_168	G	3,90	Satt187	A2	54,92
Satt309	G	4,53	GMENOD 2B	A2	58,44
Sat_141	G	9,18			
Sat_163	G	10,06			

^a Grupo de ligação como definido pelo mapa consenso da soja (SONG et al., 2004).

^b Posição no mapa consenso da soja (SONG et al., 2004).

Famílias F_{6:7} das populações selecionadas foram genotipadas utilizando os *primers* microssatélites previamente selecionados. A genotipagem foi realizada utilizando *bulks* de DNA de cada uma das famílias F_{6:7} constituídas por sete plantas F₇.

Extração de DNA

A extração de DNA das folhas de soja foi feita com base no protocolo descrito por Doyle e Doyle (1990), com algumas modificações propostas por Abdelnoor et al. (1995). A concentração do DNA foi estimada por espectrofotometria, considerando que uma unidade de absorvância a 260 nm equivale a 50 µg de DNA por mL. Com base na concentração estimada, procedeu-se à diluição das amostras para uma concentração final de 10 ng/µL.

Amplificações dos microssatélites

As reações de amplificação foram efetuadas em um volume final de 15 µL, contendo Tris-HCl 10 mM, pH 8,3; KCl 50 mM; MgCl₂ 2 mM; Triton X100 0,1%; 100 µM de cada um dos desoxinucleotídeos; 0,3 µM de cada iniciador; uma unidade de *Taq* polimerase; e 30 ng de DNA.

As reações de PCR foram realizadas em termociclador programado para um passo inicial de 94°C por 4 min, 30 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 1 min, 72° C por 2 min, seguidos de uma etapa final de 72°C por 7 min.

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em géis nativos verticais de poliacrilamida 10%, usando-se tampão TAE 1X (Tris-acetato 40 mM e EDTA 1 mM), por aproximadamente três horas a 140 volts. Após a eletroforese, os géis foram corados com brometo de etídio (10 mg/ml) e fotografados pelo sistema de fotodocumentação *Eagle Eye II* (Stratagene).

Avaliação fenotípica

Foram avaliadas 64 famílias F_{6:7} derivadas das sete populações selecionadas, quanto à resistência para a raça 3 do NCS. Cada família foi representada em média por sete plantas, e o número de plantas por família variou de 5 a 7. Os ensaios foram realizados em casa de vegetação no Centro Nacional de Pesquisa de Soja - CNPSo, em Londrina, PR, sob condições controladas (temperatura entre 25 a 30°C e 16 horas de luz).

O inóculo da raça 3 foi mantido na cultivar suscetível em casa de vegetação com temperatura variando de 25 a 30°C. Quanto à inoculação, a quantidade de cistos foi aumentada para proporcionar inóculo suficiente. Os experimentos foram montados no esquema de delineamento inteiramente casualizado.

Foram colocadas para germinar em areia sementes dos progenitores, das famílias selecionadas, das diferenciadoras, segundo Niblack et al. (2002), e da testemunha suscetível (Lee). Dois dias após a emergência, as plântulas foram transferidas para vasos de argila com capacidade de 500 g, contendo mistura de solo e areia na proporção de 1:2, previamente tratada com brometo de metila. A inoculação foi feita um dia após o transplante, com a aplicação de uma suspensão de 4.000 ovos por mL. As plantas foram mantidas em casa de vegetação a 25-30°C e 16 horas de luz.

Trinta dias após a inoculação, a parte aérea de cada planta foi eliminada e o sistema radicular arrancado e lavado sob jato forte de água em

peneira de 20 mesh acoplada a uma de 60 mesh. Os cistos foram contados em microscópio estereoscópico e transformados em índice de parasitismo (IP), estimado pela fórmula:

$$IP = \frac{\text{Número de cistos e fêmeas em uma dada planta}}{\text{Número médio de cistos e fêmeas presentes no genitor suscetível}} \times 100$$

Para confirmação da raça do NCS, o IP foi calculado substituindo-se o denominador da expressão anterior pelo número de cistos e fêmeas em Lee (padrão suscetível), conforme proposto por Riggs et al. (1988). Quanto a especificação da população de NCS utilizada, foi levado em consideração o tipo HG, como proposto por Niblack et al. (2002).

Foi utilizado o esquema de delineamento inteiramente casualizado, com quatro a sete repetições (plantas) por tratamento (família). Os efeitos dos tratamentos foram considerados aleatórios.

Análise estatística

Os dados fenotípicos de cada uma das sete populações foram preliminarmente submetidos à análise de variância para constatar a existência de variabilidade genética entre os genótipos das famílias de cada população.

O delineamento experimental empregado foi o inteiramente casualizado. O modelo estatístico adequado para a análise de variância é descrito a seguir:

$$Y_{ij} = \mu + t_i + e_{ij}$$

em que:

Y_{ij} = j-ésima observação na i-ésima família;

μ = média geral;

t_i = efeito aleatório da i-ésima família; e

e_{ij} = erro experimental, sendo $e_{ij} \sim \text{NID}(0, \sigma^2)$.

No Quadro 1 encontra-se o esquema de análise de variância desse modelo.

Quadro 1 - Esquema da análise de variância do modelo estatístico inteiramente casualizado

FV	GL	QM	E(QM)	F
Genótipos	$g - 1$	QMG	$\sigma^2 + k\sigma_g^2$	QMG/QMR
Resíduo	$g(r - 1)$	QMR	σ^2	

Sendo $k = \frac{N - \left(\frac{1}{N} \sum_{i=1}^g r_i \right)}{g - 1}$ e $N = \sum_{i=1}^g r_i$

Parâmetros estatísticos estimados

Média: $\hat{\mu} = \frac{\sum_{ij} Y_{ij}}{gk}$

Variância genética: $\hat{\sigma}_g^2 = \frac{QMG - QMR}{k}$

Variância fenotípica: $\hat{\sigma}_f^2 = \frac{QMG}{k}$

Variância residual: $\hat{\sigma}_e^2 = \frac{QMR}{k}$

Coefficiente de variação experimental: $CV_e(\%) = \frac{\sqrt{QMR}}{\hat{\mu}} \times 100$

Herdabilidade no sentido amplo: $h_a^2(\%) = \frac{\hat{\sigma}_g^2}{\hat{\sigma}_f^2} \times 100$

Coefficiente de variação genético: $CV_g(\%) = \frac{\sqrt{\hat{\sigma}_g^2}}{\hat{\mu}} \times 100$

A análise de variância e a obtenção da estimativa dos parâmetros genéticos foram realizadas com o auxílio do programa GENES (CRUZ, 1997).

Determinação da eficiência da seleção

A eficiência de seleção (ES) dos marcadores ligados aos locos de resistência foi baseada na comparação entre as avaliações fenotípica e genotípica e calculada como descrito por Silva et al. (2007):

$$ES = 100 [(MFMF + mfmf) / (MM + mm)]$$

em que:

MFMF - número de famílias selecionadas corretamente como resistentes, com base no marcador e na avaliação fenotípica;

mfmf - número de famílias selecionadas corretamente como suscetíveis, com base no marcador e na avaliação fenotípica; e

MM + mm - total de famílias selecionadas como resistentes e suscetíveis, com base apenas nos marcadores.

A eficiência de seleção foi calculada utilizando tanto o critério de resistência, considerando $IP < 10$, quanto o de resistência moderada, considerando $IP < 30$ (SCHMITT; SHANNON, 1992).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Seleção de microssatélites polimórficos e posterior seleção das populações

Dos marcadores microssatélites avaliados quanto ao polimorfismo nos progenitores, apenas os microssatélites Satt309, Sat_168, Sat_141 (localizados no GL G) e Satt187 (localizado no GL A2) foram polimórficos. Eles foram então utilizados para a primeira seleção assistida das 65 populações F_5 .

A partir do polimorfismo dos *bulks* de sementes de cada uma das 65 populações F_5 , foram selecionadas sete populações, sendo quatro com base no polimorfismo dos quatro microssatélites e três com base apenas no Satt187 (GL A2). O baixo número de populações segregantes encontrado com os marcadores nas populações avaliadas pode ter sido devido ao fato de as isolinhas utilizadas como genitores de cada população não terem recuperado todos os alelos de resistência ao NCS provenientes de Vmax. Uma outra possível explicação é a possibilidade de mistura da Vmax usada nos cruzamentos iniciais (obtida de uma firma comercial), contendo materiais resistentes e suscetíveis ao NCS (Dr. Waldir Pereira Dias, comunicação pessoal).

Avaliação fenotípica das populações selecionadas

Das sete populações F_5 selecionadas, foram derivadas 64 famílias $F_{6:7}$, que foram avaliadas quanto à resistência à raça 3 do NCS, classificada como HG tipo 5.7.

A distribuição média das famílias $F_{6:7}$ conforme a classificação com base no índice de parasitismo (IP) está demonstrada na Tabela 2. Segundo essa classificação encontrou-se quatro famílias resistentes, quatro moderadamente resistentes e as demais suscetíveis. As famílias resistentes e moderadamente resistentes foram encontradas nas populações selecionadas com base no polimorfismo dos SSR dos GL G e A2.

Embora nessas populações a maioria das famílias tenha sido classificada fenotipicamente como suscetíveis, com base nos valores de IP

médios, detectaram-se plantas dentro dessas famílias suscetíveis exibindo resistência ou resistência moderada. Estes dados evidenciam que nessas famílias existem genes de resistência segregando.

Tabela 2 - Número de famílias resistentes-R ($IP < 10$), moderadamente resistentes-MR ($10 \leq IP < 30$), moderadamente suscetíveis-MS ($30 \leq IP < 60$) e suscetíveis-S ($IP \geq 60$) de cada população avaliada fenotipicamente para a raça 3 do NCS (HG tipo 5.7)

Família	Populações selecionadas com base nos SSR dos GL G e A2					Populações selecionadas com base apenas no SSR dos GL A2			
	1	2	3	4	Total	5	6	7	Total
R	1	-	-	3	4	-	-	-	-
MR	-	1	1	2	4	-	-	-	-
MS	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S	11	9	10	2	32	7	9	8	24
Total de Famílias*	12	10	11	7	40	7	9	8	24

*O número de plantas avaliadas em cada família variou de 5 a 7.

Foram observados contrastes entre os progenitores resistente (Vmax) e suscetível (CD201), que apresentaram número médio de cisto de 7,7 e 191, respectivamente. Houve grande variação da resistência entre as famílias das populações que foram selecionadas com base nos SSR dos GL G e A2. As famílias das populações selecionadas com base no SSR Satt187 (GL A2) apresentaram-se altamente suscetíveis (Tabela 3).

Tabela 3 - Número médio, mínimo e máximo de cistos detectados nas populações selecionadas

Populações selecionadas com base nos quatro SSR (GL G e A2)			Populações selecionadas com base apenas no SSR do GL A2		
População	Média	Mín - Máx	População	Média	Mín - Máx
1	240,4	5,0 - 335,7	5	250,1	180,0 - 306,3
2	217,8	47,1 - 285,3	6	246,2	207,3 - 322,8
3	179,1	34,3 - 307,7	7	196,6	127,7 - 270,7
4	65,0	15,4 - 182,1			

Média do progenitor resistente: 7,7.

Média do progenitor suscetível: 191,0.

O menor e o maior número médio de cistos foram encontrados na população 1, que correspondeu a uma variação no IP de 2,6 a 175%. Somente nesta população verificou-se que havia segregação transgressiva, tanto para a redução quanto para o aumento do número de cistos, em relação às médias dos progenitores. Em todas as demais populações houve segregação transgressiva, porém apenas para o aumento do número de cistos, o que não é interessante para os programas de melhoramento. Esses dados evidenciam um possível efeito de interação gênica no controle da resistência (epistasia aditivo x aditivo).

Com exceção das populações 3 e 4, todas as demais apresentaram um valor médio do número de cistos maior que o progenitor suscetível. O diferente nível de resistência das famílias em cada população indica que os genitores (isolinhas) derivados de Vmax podem não ter recuperado todos os genes de resistência, principalmente os genes de efeito menor, ou o tamanho da população foi insuficiente para que se encontre uma combinação com todos os alelos.

Os resultados da análise de variância e as estimativas dos diferentes parâmetros genéticos das populações avaliadas estão apresentados na Tabela 4. Pela análise de variância dos dados fenotípicos, constatou-se a existência de variância genética significativa a 1% entre as famílias $F_{6:7}$ selecionadas com base nos quatro microssatélites avaliados e foi possível realizar a seleção de famílias superiores nessas populações.

Famílias $F_{6:7}$ das populações selecionadas com base apenas no microssatélite do GL A2 (Satt187) não apresentaram variabilidade genética para a característica em estudo. Isso indica que o gene de resistência *Rhg4* do GL A2 não estava segregando para a resistência nas populações avaliadas. Portanto, a discussão será feita apenas sobre as populações que apresentaram variabilidade genética significativa.

As estimativas de herdabilidades variaram de 75,94 a 95,71% (Tabela 4). A alta herdabilidade detectada pode ser resultante do elevado nível de homozigose das famílias avaliadas, do pequeno número de genes de efeito maior envolvido e do controle ambiental na condução do experimento. As estimativas das herdabilidades dependem do material

genético, do método de estimação utilizado e do experimento avaliado (FALCONER; MACKAY, 1996).

Tabela 4 - Estimativas dos parâmetros genéticos avaliados para a raça 3 (HG tipo 5.7) nas populações avaliadas

	Populações selecionadas com base nos GL G e A2				Populações selecionadas com base apenas no GL A2		
	1	2	3	4	5	6	7
QMG	50004**	28389 **	44308 **	35779**	13895 ^{ns}	10142 ^{ns}	17242 ^{ns}
QMR	8196,30	6830,57	7525,53	1533,94	11932,42	8368,97	7956,56
$\hat{\sigma}_g^2$	6198,15	3079,91	5786,01	4996,34	312,87	233,51	1459,03
$\hat{\sigma}_f^2$	7413,27	4055,71	6969,8	5220,14	2215,15	1575,04	2709,25
$\hat{\sigma}_e^2$	1215,13	975,8	1183,79	223,8	1902,27	1341,53	1250,22
h_a^2 (%)	83,61	75,94	83,02	95,71	14,12	14,83	53,85
CV_g (%)	32,83	25,48	42,46	107,17	7,16	6,24	19,16
CV_e (%)	37,74	37,95	48,42	59,38	44,2	37,95	44,73
CV_g / CV_e	0,87	0,67	0,88	1,80	0,16	0,16	0,43
NMR	6,75	7	6,36	6,85	6,27	6,44	6,36
Nº. Famílias	12	10	11	7	7	9	8

** significativo a 1% de probabilidade; ns: não significativo; QMG: quadrado médio de genótipos; QMR: do resíduo; $\hat{\sigma}_g^2$: estimativa da variância genética; $\hat{\sigma}_f^2$: estimativa da variância fenotípica; $\hat{\sigma}_e^2$: estimativa da variância ambiental; h_a^2 (%): herdabilidade no sentido amplo, em porcentagem; CV_g : coeficiente de variação genético, em porcentagem; CV_e : coeficiente de variação experimental, em porcentagem; NMR: número médio de repetições (plantas).

Na literatura são relatados altos valores de herdabilidades no sentido amplo para resistência à raça 3. Webb et al. (1995) detectaram herdabilidade no sentido amplo de 97% para resistência à raça 3 em cruzamentos envolvendo a PI 437654. Portanto, a eficiência de seleção fenotípica deve ser alta para esta raça do NCS.

Avaliação genotípica das famílias F_{6:7} selecionadas

Uma segunda avaliação genotípica foi realizada apenas em *bulks* de DNAs de plantas das famílias F_{6:7} oriundas das populações F₅ selecionadas como segregantes com base nos quatro SSR avaliados. No entanto, a

genotipagem das famílias selecionadas foi realizada utilizando apenas os microssatélites do GL G, excluindo o microssatélite do GL A2 (Satt187). Este microssatélite foi excluído porque as famílias das populações selecionadas por ele apresentaram-se altamente suscetíveis, indicando que esse marcador não estava ligado à resistência do NCS nessas populações avaliadas.

Embora o marcador Satt187 do GL A2 esteja próximo ao loco de resistência *Rhg4*, não há evidência de que esse alelo de resistência esteja presente no progenitor resistente, Vmax, que é oriundo da fonte de resistência PI 88788. Glover et al. (2004), estudando a PI 88788, identificaram QTLs nos GL G e J por mapeamento por intervalo composto a 5% de significância, não mencionando nenhum QTL de resistência ao NCS na região do GL A2. Da mesma forma, Concibido et al. (1997) também não evidenciaram a presença do loco de resistência no GL A2 para a raça 3 nessa mesma fonte de resistência. Provavelmente, PI 88788 não possui o loco de resistência ao NCS para raça 3 no GL A2.

No entanto, o GL A2 é importante para o controle da resistência à raça 3 do NCS em diferentes fontes de resistência como PI 209332 (CONCIBIDO et al., 1994), Peking (MAHALINGAM; SKORUPSKA, 1995; CHANG et al., 1997; MEKSEM et al., 2001), PI 437654 (WEBB et al., 1995; PRABHU et al., 1999), PI 90763 (GUO et al., 2005) e Hartwig (SILVA et al., 2007).

Avaliação genotípica e fenotípica das famílias F_{6:7} resistentes e suscetíveis

As quatro famílias F_{6:7} resistentes fenotipicamente apresentaram os alelos de resistência dos três marcadores microssatélites do GL G, indicando que estes marcadores foram extremamente eficientes em selecionar famílias resistentes. Já as famílias suscetíveis apresentaram os alelos de resistência dos microssatélites avaliados, porém isso aconteceu em poucos casos. Esse fato se deve à recombinação entre o gene de resistência e os marcadores.

Um outro caso foi que algumas famílias F_{6:7} classificadas fenotipicamente como suscetíveis apresentaram plantas exibindo resistência

ou resistência moderada. Pela avaliação dos microssatélites, algumas foram detectadas como segregantes e outras não. Esses dados evidenciam que nessas famílias suscetíveis existem genes de resistência segregando.

Avaliação genotípica e fenotípica das famílias F_{6:7} moderadamente resistentes

Das quatro famílias F_{6:7} moderadamente resistentes (Tabela 5), uma foi segregante tanto para os marcadores SSR como para a avaliação fenotípica, incluindo plantas resistentes, moderadamente resistentes, moderadamente suscetíveis e suscetíveis.

Tabela 5 - Número de plantas resistentes (R), moderadamente resistentes (MR), moderadamente suscetíveis (MS) e suscetíveis (S), entre as famílias moderadamente resistentes e segregação dos marcadores SSR

Família MR	SSR	Plantas R	Plantas MR	Plantas MS	Plantas S
1	Seg	3	2	1	1
2	N Seg	3	4	-	-
3	N Seg	2	5	-	-
4	N Seg	1	5	1	-

Outras duas famílias foram segregantes com plantas resistentes e moderadamente resistentes, porém não segregantes para os marcadores SSR, e todas as plantas apresentaram o alelo de resistência para os microssatélites do GL G.

Uma outra família moderadamente resistente apresentou plantas resistentes, moderadamente resistentes e moderadamente suscetíveis, porém não segregou para os marcadores, mostrando o alelo de resistência dos SSR do GL G em todas as plantas.

Como não houve segregação entre os marcadores SSR do GL G entre três famílias moderadamente resistentes, conclui-se que esses marcadores não discriminaram famílias resistentes das moderadamente resistentes, uma vez que essas famílias apresentaram os alelos de resistência dos SSR. Também não foi possível fazer discriminação

genotípica em plantas resistentes, moderadamente resistentes e moderadamente suscetíveis, em uma das famílias moderadamente resistentes. Isso indica que, além do QTL de resistência no grupo G, outros QTLs de resistência (efeito menor) são necessários para a resistência completa da raça 3 do NCS.

Como não foi evidenciada a existência de genes de resistência no grupo de ligação A2 nas populações avaliadas, o que é comum em diversas fontes de resistência (CONCIBIDO et al., 2004), possivelmente esses genes devem estar presentes em outros grupos de ligação.

Eficiência de seleção

A eficiência de seleção foi avaliada considerando todas as famílias $F_{6:7}$ das quatro populações conjuntamente. Com a utilização do marcador SSR Sat_168, que se mostrou mais eficiente, foi obtida eficiência de seleção de 97,05%. O Satt309 e o Sat_141, individualmente, apresentaram eficiência de seleção de 96,55 e 93,55%, respectivamente. As combinações dos microssatélites, dois a dois, aumentaram a eficiência de seleção para 100% em todos os casos (Tabela 6).

Tabela 6 - Eficiência de seleção dos marcadores microssatélites para a raça 3 do NCS, nas populações avaliadas, utilizando o critério de resistência (IP < 10) e resistência moderada (IP < 30)

Marcador	ES % (IP < 10)	ES % (IP < 30)
Sat_168	97,05	97,29
Satt309	96,55	96,87
Sat_141	93,55	94,12
Sat_168 + Sat_141	100	100
Satt309 + Sat_141	100	100
Sat_168 + Satt309	100	100

Ao se calcular a eficiência de seleção utilizando o critério de resistência moderada (IP < 30), percebeu-se que a eficiência de seleção aumentou, porém muito pouco (Tabela 6). Em todos os casos, o aumento foi

obtido não por distinguir as famílias resistentes, mas por classificar corretamente as suscetíveis.

Esses dados confirmaram que esses marcadores estão muito próximos da região do loco *rhg1*, que é extensivamente estudada por explicar uma grande variação fenotípica da resistência à raça 3 e a outras raças do NCS (CONCIBIDO et al., 2004).

Segundo Cregan et al. (1999b), os SSR Satt309 e Sat_168 estão a 0,4 cM do loco *rhg1* e a utilização de um desses marcadores garante alto sucesso na seleção genotípica.

Alta eficiência de seleção também foi encontrada por Mudge et al. (1997), que obtiveram 98% de acurácia na identificação de linhas resistentes à raça 3 usando SSR flanqueando apenas a região do gene *rhg1*. Silva (2006) também relatou alta eficiência de seleção (94%) para resistência à raça 3 avaliando famílias $F_{2:3}$ com apenas um SSR do GL G: o Satt309.

No entanto, os altos valores de eficiência de seleção relatados na literatura foram obtidos em populações de mapeamento, onde foi detectado o QTL na população avaliada. Neste estudo em particular, trata-se de uma população de melhoramento em geração avançada, e mesmo assim foi possível obter alta eficiência de seleção com os SSR do GL G, próximo ao loco *rhg1*.

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados, chegou-se às seguintes conclusões:

- ✓ A estratégia usada na seleção assistida foi eficaz na seleção de famílias $F_{6:7}$ resistentes e moderadamente resistentes à raça 3 do NCS com a utilização de microssatélites do GL G nas populações avaliadas.
- ✓ Além do QTL de efeito maior presente no GL G, outros genes de resistência são necessários para a resistência completa do NCS (raça 3, HG tipo 5.7) nessas populações.
- ✓ O alelo de resistência ao NCS localizado no GL A2 não está presente em Vmax que é derivada de PI 88788.
- ✓ Os marcadores do GL G mostraram-se uma ferramenta útil na seleção para a resistência ao NCS, raça 3, nas populações avaliadas e podem ser utilizados em outras populações derivadas de Vmax.

BIBLIOGRAFIA

- ABDELNOOR, R.V.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Determination of genetic diversity within Brazilian soybean germplasm using random amplified polymorphic DNA techniques and comparative analysis with pedigree. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 18, p. 265-273, 1995.
- CERVIGNI, G.D.L.; SCHUSTER, I.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Two microsatellite markers flanking a dominant gene for resistance to soybean cyst nematode race 3. **Euphytica**, v. 135, p. 99-105, 2004.
- CHANG, S.J.C.; DOUBLER, T.W.; KILO, V.Y.; ABU-THREDEIH, J.; PRABHU, R.; FREIRE, V.; SUTTNER, R.; KLEIN, J.; SCHMIDT, M.E.; GIBSON, P.T.; LIGHTFOOT, D.A. Association of loci underlying field resistance to soybeans sudden death syndrome (SDS) and cyst nematode (SCN) race 3. **Crop Science**, v. 37, p. 965-971, 1997.
- CONCIBIDO, V.C.; DENNY, R.L.; BOUTIN, S.R.; HAUTEA, R.; ORF, J.H.; YOUNG, N.D. DNA marker analysis of loci underlying resistance to soybean cyst nematode (*Heterodera glycines* Ichinohe). **Crop Science**, v. 34, n. 1, p. 240-246, 1994.
- CONCIBIDO, V.C.; DOUGLAS, L.; DENNY, R.L.; ORF, J.H.; YOUNG, N.D. Genome mapping of soybean cyst nematode resistance genes in Peking, PI 90763, and PI 88788 using DNA markers. **Crop Science**, v. 37, n. 1, p. 258-264, 1997.
- 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.
- CREGAN, P.B.; JARVIK, T.; BUSH, A.L.; SHOEMAKER, R.C.; LARK, K.G.; KAHLER, A.L.; KAYA, N.; VANTOAI, T.T.; LOHNES, D.G.; CHUNG, J.; SPECHT, J.E. An integrated genetic linkage map of the soybean. **Crop Science**, v. 39, p. 1464-1490. 1999a.

- CREGAN, P.; MUDGE, J.; FICHUS, E.W.; DENNY, D.R.; YOUNG, N.D. Two simple sequence repeat markers to select for soybean cyst nematode resistance conditioned by the *rhg1* locus. **Theoretical Applied Genetics**, v. 99, p. 811-818, 1999b.
- CRUZ, C.D. **Programa Genes: aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: UFV, 1997. 442 p.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.
- EMBRAPA. **Tecnologia de produção de soja para a região central do Brasil**. Londrina: Embrapa, Embrapa Agropecuária Oeste, 228 p. 2007
- FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. **Introduction to quantitative genetics**. 4^a ed. Longman Malaysia. Edinburgh, 1996, 464 p.
- GLOVER, K.D.; WANG, D.; ARELLI, P.R.; CARLSON, S.R.; CIANZIO, S.R.; DIERS, B.W. Near isogenic lines confirm a soybean cyst nematode resistance gene from PI 88788 on linkage group J. **Crop Science**, v. 44, p. 936-941, 2004.
- GUO, B.; SLEPER, D.A.; ARELLI, P.R.; SHANNON, J.G.; NGUYEN, H.T. Identification of QTLs associated with resistance to soybean cyst nematode races 2, 3 and 5 in soybean PI 90763. **Theoretical Applied Genetics**, v. 111, p. 965-971, 2005.
- MAHALINGAM, R.; SKORUPSKA, H.T. DNA markers for resistance to *Heterodera glycines* l. race 3 in soybean cultivar Peking. **Breeding Science** v. 45, p. 435-443, 1995.
- MEKSEM, K.; PANTAZOPOULOS, P.; NJITI, V.N.; HYTEN, L.D.; ARELLI, P.R.; LIGHTFOOT, D.A. 'Forrest' resistance to the soybean cyst nematode is bigenic: saturation mapping of the *Rhg1* and *Rhg4* loci. **Theoretical Applied Genetics**, v. 103, p. 710-717, 2001.
- MUDGE, J.; CREGAN, P.B.; KENWORTHY, J.P.; KENWORTHY, J.W.; ORF, J.H.; YOUNG, N.D. Two microsatellite markers that flank the major soybean cyst nematode resistance locus. **Crop Science**, v. 37, n. 3, p.

1611-1615, 1997.

NIBLACK, T.L.; ARELLI, P.R.; NOEL, G.R.; OPPERMAN, C.H.; ORF, J.H.; SCHMITT, D.P.; SHANNON, J.G.; TYLKA, G.L. A revised classification scheme for genetically diverse populations of *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology**, v. 34, n. 4, p. 279-288, 2002.

PRABHU, R.R.; NJITI, V.N.; BELL JOHNSON, B.; JOHNSON, J.E.; SCHIMIDT, M.E.; KLEIN, J.H.; LIGHTFOOT, D.A. Selecting soybean cultivars for dual resistance to soybean cyst nematode and sudden death syndrome using two DNA markers. **Crop Science**, v. 39, p. 982-987, 1999.

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

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

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

SILVA, M.F. **Mapeamento e validação de QTLs de resistência ao nematóide de cisto da soja**. 124 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.

SILVA, M.F.; SCHUSTER, I.; SILVA, J.F.V.; FERREIRA, A.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Validation of microsatellite markers for assisted selection of soybean resistance to cyst nematode races 3 and 14. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 8, p. 1143-1150, 2007.

SONG, Q.J.; MAREK, L.F.; SHOEMAKER, R.C.; LARK, K.G.; CONCIBIDO, V.C.; DELANNAY, X.; SPETCH, J.E.; CREGAN, P.B. A new integrated genetic linkage map of the soybean. **Theoretical Applied Genetics**, v.

109, p. 122-128, 2004.

WANG, D.; GRAEF, G.L.; PROCOPIUK, A.M.; DIERS, B.W. Identification of putative QTL that underlies yield in interspecific soybean backcross populations. **Theoretical Applied Genetics**, v. 108, n. 3, p. 458-467. 2004

WEBB, D.M.; BALTAZAR, B.M.; RAO-ARELLI, A.P.; SCHUPP, J.; CLAYTON, K.; KEIM, P.; BEAVIS, W.D. Genetics mapping of soybean cyst nematode race-3 resistance loci in the soybean PI 437654. **Theoretical Applied Genetics**, v. 91, n. 1, p. 574-581, 1995.

WRATHER, J.; ANDERSON, T.; ARSYAD, D.; TAN, Y.; PLOPER, L.; PORTO-PUGLIA, A.; RAM, H.; YORINORI, J. Soybean disease loss estimates for the top ten soybean producing countries in 1998. **Canadian Journal Pathology**, v. 23, p. 115-121, 2001.

YOUNG, N.D.; MUDGE, J. Marker-assisted selection for soybean cyst nematode resistance. In: STARR, J.L.; COOK., R.; BRIDGE, J. (Ed). **Plant resistance to parasitic nematodos**, 2002, p. 241-251.

YUE, P.; SLEPER, D.A.; ARELLI, P.R. Mapping resistance to multiple races of *Heterodera glycines* in soybean PI 89772. **Crop Science**, v. 41, p. 1587-1595, 2001.

CAPÍTULO 2

DIVERSIDADE GENÉTICA EM CULTIVARES DE SOJA RESISTENTE AO NEMATÓIDE DE CISTO DA SOJA

RESUMO

O conhecimento da diversidade genética ou alélica entre as fontes de resistência ao nematóide de cisto da soja (NCS) e a relação entre os genótipos superiores são de grande importância para o melhoramento. Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade genética em cultivares de soja resistentes ao NCS, desenvolvidas por seis programas de melhoramento do Brasil, por meio de marcadores microssatélites próximos a QTLs que conferem resistência ao NCS e determinar um grupo de microssatélites que melhor caracterize as cultivares com base na sua resistência. Entre os 36 genótipos avaliados, estão cultivares resistentes, adaptadas às diferentes regiões do Brasil, e genótipos originais (fontes de resistência ao NCS e a cultivar Lee utilizada como padrão de suscetibilidade). Foram utilizados 24 microssatélites próximos aos QTLs (*Quantitative trait loci*) de resistência ao NCS presentes nos grupos de ligação (GL) G, A2, D2, E, J e M. A diversidade genética de cada loco microssatélite foi avaliada pela informação do conteúdo de polimorfismo (PIC) e pela dissimilaridade média de um genótipo em relação aos demais genótipos avaliados. A partir da matriz de dissimilaridade obtida com as marcas geradas pelos marcadores SSR, foi realizada a análise de agrupamento dos genótipos pelo método de Tocher e por dispersão gráfica. A análise de variância molecular foi realizada para estimar os componentes da variância, considerando como fonte de variação os diferentes programas de melhoramento e as cultivares dentro de cada programa. Um total de 77 alelos, com uma média de 3,2 alelos por loco, foi obtido para as 36 cultivares. O PIC variou de 0,11 a 0,71, com média de 0,36. Entre as cultivares originais encontrou-se um número de alelos maior que entre as variedades comerciais. As dissimilaridades médias obtidas utilizando os SSR dos GL G, A2 e D2 foram maiores que as obtidas com todos os SSR. A utilização de microssatélites próximos aos QTLs de efeito maior nos GL G,

A2, e D2 discriminou cultivares com resistência às raças 1 e 3 de cultivares com resistência à raça 14. O GL D2 foi muito importante na discriminação de genótipos resistentes e moderadamente resistentes à raça 14. Com os microssatélites avaliados não foi possível realizar a separação de cultivares resistentes à raça 3 das que apresentam resistência às raças 1 e 3. Das variedades elites avaliadas, Vmax e BRSGO Iara foram as mais divergentes. As empresas de melhoramento do Brasil apresentam objetivos comuns quanto ao desenvolvimento de variedades resistentes ao NCS, apesar de possuírem estratégias diferentes e desenvolverem variedades que apresentam resistência às diferentes raças do NCS. A base genética quanto à resistência ao NCS nas variedades comerciais desenvolvidas pelos programas de melhoramento no Brasil é muito estreita, sendo necessário aumentar a diversidade de genes utilizados.

INTRODUÇÃO

A informação sobre a diversidade genética ou alélica dentro de coleções de germoplasma pode ser usada para identificar combinações apropriadas de parentais para a produção de populações com alto desempenho agrônomico e também para prevenir a vulnerabilidade da cultura ao ataque de pragas e doenças e a outras adversidades, evitando a erosão progressiva da base genética de populações de melhoramento (KÖLLIKER et al., 2001).

Os primeiros trabalhos que envolveram a utilização de marcadores moleculares no estudo da diversidade entre fontes de resistência ao NCS empregaram marcadores RFLP (DIERS et al., 1997; ZHANG et al., 1999). Diers et al. (1997), utilizando estes marcadores, verificaram que PIs com resistência a múltiplas raças associam-se em poucos grupos maiores, caracterizando relativamente pouca diversidade genética entre as fontes de resistência.

Chen et al. (2006), ao estudarem a diversidade genética entre genótipos de soja resistentes ao NCS, utilizaram SSR dos 20 GL do mapa consenso da soja e verificaram que não existia diferença significativa entre indivíduos agrupados no mesmo *cluster*, indicando que eles podem ter genes de efeito maior em comum e devem ser evitados nos programas de melhoramento.

Apesar de vários estudos terem sido realizados para identificar novas fontes de resistência ao NCS e caracterizar os genes de resistência associados (DIERS et al., 1997; ZHANG et al., 1999), poucas fontes de resistência foram usadas para desenvolver cultivares resistentes, caracterizando a vulnerabilidade do germoplasma melhorado de soja ao nematóide de cisto da soja (EMBRAPA, 2007). No Brasil, as principais fontes de resistência utilizadas nos programas de melhoramento são Hartwig e PI 437654, caracterizando a estreita base genética do germoplasma brasileiro (EMBRAPA, 2007). Portanto, o conhecimento da diversidade genética e da relação entre os genótipos superiores é de grande importância para o melhoramento.

Quanto à classificação das raças dos NCS, segundo Riggs e Schmitt (1988), utiliza-se um grupo de quatro linhagens diferenciadoras (Pickett 71, Peking, PI 88788 e PI 90763). Niblack et al. (2002) propuseram um novo esquema com sete diferenciadoras (Peking, PI 887888, PI 90763, PI 437654, PI 209332, PI 89772 e PI 548316) para melhor descrever a diversidade do patógeno, classificando as populações do NCS como tipo HG. No entanto, a maioria dos trabalhos publicados empregou a classificação proposta por Riggs e Shcmitt, (1988) uma vez que muitos trabalhos foram publicados antes dessa nova proposta. Ao fazer comparações entre trabalhos, é necessário utilizar a classificação antiga, baseada em raças.

Para o NCS, muitos QTLs já foram descritos e validados para diferentes raças e em diferentes fontes de resistência em diversos grupos de ligação, sendo predominante um QTL de efeito maior no GL G, atribuído ao loco denominado *rhg1*, que confere resistência a várias raças do nematóide. Outra região de importância está localizada no GL A2, com efeito maior principalmente para a raça 3 (CONCIBIDO et al., 2004). Um QTL de efeito maior para a resistência a raça 14 foi identificado no GL D2 por Schuster et al. (2001) e ainda não teve sua validação confirmada. Vários outros QTLs de efeito menor para a resistência à raça 3 do NCS já foram identificados nos GL E (SILVA, 2006; KABELKA et al., 2005; WANG et al., 2001), J (CONCIBIDO et al., 2004, GLOVER et al., 2004; SILVA, 2006) e M (CONCIBIDO et al., 2004; SILVA, 2006).

Várias metodologias moleculares têm sido desenvolvidas, contribuindo significativamente para um grande avanço do conhecimento sobre a variabilidade genética entre acessos e germoplasmas; os marcadores microssatélites têm sido bastante utilizados na caracterização de genótipos (NARVEL et al., 2000; NETO, 2001; WANG et al., 2006).

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivos: avaliar a diversidade genética, por microssatélites, nas diferenciadoras de soja para a resistência ao NCS e em cultivares de soja resistentes a diferentes raças, desenvolvida por seis programas de melhoramento do Brasil; e determinar um grupo de SSR que melhor caracterize as cultivares com base em sua resistência.

MATERIAL E MÉTODOS

Material genético

O material genético utilizado neste trabalho foi obtido do banco de germoplasma de soja do Centro Nacional de Pesquisa de Soja (EMBRAPA SOJA).

Os genótipos utilizados foram selecionados de modo a representar o germoplasma resistente ao NCS, incluindo as cultivares desenvolvidas no Brasil (Tabela 1), as cultivares Pickett e Hartwig, e as diferenciadoras, propostas por Niblack et al. (2002) (Tabela 2). Como padrão de suscetibilidade a todas as raças do NCS, foi incluída a cultivar Lee.

As cultivares brasileiras têm em comum a resistência à raça 3 e diferem quanto à resistência às demais raças do NCS e também pelas fontes de resistência que as originou. Essas cultivares foram desenvolvidas por diferentes programas de melhoramento no Brasil (Embrapa, Monsanto, Fundação Mato Grosso, UFV, Syngenta e COODETEC) e são adaptadas às diferentes regiões do País.

As cultivares diferenciadoras, segundo Niblack et al. (2002), são Peking, PI 887888, PI 90763, PI 437654, PI 209332, PI 89772 e PI 548316. Todas as diferenciadoras apresentam semente com tegumento preto, que está ligado ao loco de resistência *Rhg4* no GL A2.

A cultivar Hartwig (originada da PI 437654), mas com semente amarela, foi incluída por ser utilizada como fonte doadora de genes de resistência ao NCS nos diversos programas de melhoramento do Brasil. A cultivar Pickett (originada do cruzamento de Peking e Lee) foi incluída por ser a primeira cultivar de soja resistente à raça 3 do NCS com semente amarela, nos EUA (BRIM; ROSS, 1966).

Sementes de cada genótipo foram semeadas em bandejas, em casa de vegetação. Após o surgimento do primeiro trifólio, as folhas de cada genótipo foram coletadas, imediatamente congeladas com nitrogênio líquido e armazenadas à temperatura de -80°C, para posterior extração de DNA.

Tabela 1 - Cultivares de soja com resistência ao nematóide de cisto, indicadas para cultivo no Brasil (EMBRAPA, 2007)

Cultivar	Raças	Ano de Liberação	Programa de Melhoramento	Fonte de Resistência	Área de Recomendação
BRSGO Raíssa	R 3	2005	Embrapa	Peking (Sharkey)	BA, DF, GO, MG, MS
BRSGO Iara	R 3	2005	Embrapa	Peking (Sharkey)	DF, GO, MG
BRS 262	R 3	2005	Embrapa	Peking (Sharkey) e PI 437654 (Hartwig)	SP, PR
BRSMG Liderança	R 3	1998	Embrapa	Peking (Centennial)	BA, DF, GO, MG, MT, SP
M-Soy 8400	R 3	1998	Monsanto	Peking (Coker 6738)	DF, GO, MG, MS, MT, SP
M-Soy 7901	R 3	1998	Monsanto	Peking (Coker 6727)	DF, GO, MG, MS, SP
M-Soy 8200	R 3	1999	Monsanto	Peking (Kirby)	DF, GO, MG, MS, MT, SP
CD 217	R 3	-	COODETEC	-	DF, GO, MG, MS, MT, PR, RS
TMG 117RR	R 3	2006		-	MT
UFVS 2011	R 3	2003	UFV	PI 437654 (Hartwig)	MG
UFVS 2012	R 3	2003	UFV	PI 437654 (Hartwig)	MG
BRS Invernada	R 1 e 3	-	Embrapa	Peking (Stonewall), PI 88788 e PI 209332 (Delsoy 4710)	PR, SP
BRSMG250 Nobreza	R 1 e 3	2003	Embrapa	PI 88788 (Avery) e Peking (Sharkey, Padre e Stonewall)	BA, DF, GO, MG, MT, SP
M-Soy 8001	R 1 e 3	1998	Monsanto	Peking (Coker 6738)	DF, GO, MG, MS, SP

Cont - Tabela 1

M-Soy 8757	R 1 e 3	1999	Monsanto	Peking (Coker 6738)	DF, GO, MG, MS, MT
FMT Tabarana	R 1 e 3	2000	Fundação MT	Peking (Centennial)	MT
BRS 263 [Diferente]	R1 e 3, e MR 14	2005	Embrapa	Peking (Sharkey, Forrest e Lancer) e PI 437654 (Hartwig)	BA
BRS 231	R1 e 3, e MR 14	2003	Embrapa	Peking (Sharkey) e PI 437654 (Hartwig)	SC, PR, SP
FMT Tucunaré	R1 e 3, e MR 14	1999	Fundação MT	Peking (Sharkey) e PI 437654 (Hartwig)	DF, GO, MG, MT
FMT Matrinxã	R1 e 3, e MR 14	1999	Fundação MT	Peking (Sharkey) e PI 437654 (Hartwig)	MT
TMG 121RR	R1 e 3, e MR 14	2006	Fundação MT	Peking e PI 437654	MT
TMG 115RR	R1 e 3, e MR 14	2006	Fundação MT	Peking e PI 437654	MT
VMax	R 3 e 14	-	Syngenta	PI 88788	MS, PR, SP
BRS Jiripoca	R 1, 3 e 14, e MR 5	2000	Embrapa	Peking (Sharkey) e PI 437654 (Hartwig)	MT
BRSMT Pintado	R 1 e 3, 6, 9 e 14, e MR 5	1998	Embrapa	Peking (Sharkey) e PI 437654 (Hartwig)	DF, GO, MG, MT
BRSGO Chapadões	R 1, 2, 3, 4, 5 e 14	2002	Embrapa	PI 437654 (Hartwig)	DF, GO, MG, MT, TO

R: resistente.

MR: moderadamente resistente.

Tabela 2 - Identificação das fontes de resistência ao NCS e do padrão de suscetibilidade avaliados no estudo da diversidade genética

Cultivar	Raças	Origem	Ano de liberação	Cor do tegumento
Pickett	R 1 e 3	EUA	1966	Amarelo
Hartwig	R a todas as raças, exceto 4+ e 14+	EUA	1992	Amarelo
PI 548316 (Cloud)	R 3 e MR 14	China	1905	Preto
PI 209332	R 3, 5 e 14	Japão	1953	Preto
PI 548402 (Peking)	R 1, 3 e 5	China	1906	Preto
PI 88788	R 3 e 14	China	1930	Preto
PI 90763	R 1, 2, 3 e 5	China	1930	Preto
PI 437654	R a todas as raças	Rússia	1980	Preto
PI 89772	R 1, 2, 3 e 5	China	1930	Preto

R: resistente.

MR: moderadamente resistente.

Seleção e amplificação dos microssatélites

Foram selecionados 24 pares de *primers* microssatélites próximos aos QTLs de grande efeito (presentes nos GL G, A2 e D2) e de pequeno efeito (presentes nos GL E, J e M) para a resistência ao NCS (Tabela 3).

As reações de amplificação foram efetuadas em um volume final de 15 μ L, contendo Tris-HCl 10 mM, pH 8,3; KCl 50 mM; MgCl₂ 2 mM; Triton X100 0,1%; 100 μ M de cada um dos desoxinucleotídios; 0,3 μ M de cada iniciador; uma unidade de *Taq* polimerase; e 30 ng de DNA. As reações de PCR foram realizadas em termociclador programado para um passo inicial de 94°C por 4 min; 30 ciclos de 94°C por 1 min; 55°C por 1 min; 72°C por 2 min, seguidos de uma etapa final de 72°C por 7 min.

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em géis nativos verticais de poliacrilamida 10%, usando-se tampão TAE 1X (Tris-acetato 40 mM e EDTA 1 mM), por aproximadamente três horas a 140 volts. Após a eletroforese, os géis foram corados com brometo de etídio (10 mg/ml) e fotografados pelo sistema de fotodocumentação *Eagle Eye II* (Stratagene).

Tabela 3 - Microssatélites utilizados no estudo de diversidade genética nos genótipos de soja avaliados e os respectivos GL

Microssatélite	GL ^a	Posição ^b	Microssatélite	GL ^a	Posição ^b
Satt163	G	0,0	Satt573	E	35,8
Satt275	G	2,2	Sat_136	E	39,2
Sat_168	G	3,9	Satt204	E	43,1
Satt309	G	4,5	Satt452	E	45,1
Sat_141	G	9,2	Satt215	J	44,1
Satt356	G	12,2	Sat_366	J	52,8
Sat_162	A2	51,9	Satt431	J	78,6
BLT 065	A2	52,85	Satt551	M	95,5
Sat_215	A2	53,7	Satt346	M	112,7
Satt424	A2	60,6			
Satt528	D2	86,3			
Satt082	D2	87,3			
Satt574	D2	87,7			
Satt543	D2	88,0			
Satt448	D2	89,2			

^a Grupo de ligação como definido pelo mapa consenso da soja (SONG et al., 2004).

^b Posição no mapa consenso da soja (SONG et al., 2004).

Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com base nos dados gerados a partir de marcadores moleculares microssatélites, com auxílio do programa GENES (CRUZ, 1997).

Cálculo da diversidade genética dos locos microssatélites

A diversidade genética de cada loco microssatélite foi obtida por meio da frequência dos alelos, utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{PIC (Conteúdo de Informação de Polimorfismo)} = 1 - \sum_{i=1}^a p_i^2 - \sum_{i,j=1(i \neq j)}^a p_i^2 p_j^2$$

em que:

p_i é a frequência do i -ésimo alelo do loco estudado; e

p_j é a frequência do j -ésimo alelo do loco estudado (BOTSTEIN et al., 1980).

Cálculo do complemento do índice de similaridade ponderado

A matriz de dissimilaridade foi gerada a partir do complemento do índice de similaridade ponderado calculado para cada combinação das 36 cultivares, utilizando os alelos de cada loco microssatélite avaliado. Considerando que:

$$D = 1 - S_{ii'}$$

$$\text{Sendo } S_{ii'} = \frac{1}{2} \sum_{j=1}^L p_j c_j$$

em que

$$p_j = \frac{a_j}{A} = \text{peso associado ao loco } j \text{ determinado por:}$$

a_j = número total de alelos do loco j

A = número total de alelos estudados

c_j = número de alelos comuns entre os pares de acessos i e i' .

Análise de variância molecular

A análise de variância molecular (AMOVA) foi utilizada para estimar os componentes da variância, que são atribuídos às diferenças entre os grupos e entre indivíduos dentro de grupos, com base na matriz de distância genética (EXCOFFIER et al., 1992). A AMOVA foi realizada considerando como fonte de variação os diferentes programas de melhoramento e as cultivares dentro de cada programa. Essa análise foi realizada apenas para os programas onde havia pelo menos duas cultivares representantes, excluindo da análise os programas de melhoramento COODETEC e Syngenta.

Componentes de variância significativos associados com os diferentes níveis possíveis da estrutura genética deste estudo foram testados por um procedimento de permutação não paramétrico com 1.000 permutações (EXCOFFIER et al., 1992).

A estatística F , valor F_{st} , foi usada para estimar a correlação de genes de diferentes indivíduos reunidos no mesmo programa de melhoramento e para medir as diferenças genéticas entre os diferentes programas.

Análise de agrupamento pelos métodos de Tocher e por dispersão gráfica

Na análise de agrupamento dos genótipos foi utilizado o método de otimização de Tocher, que consiste em identificar na matriz de dissimilaridade o par de genótipos mais similares, formando um grupo inicial; a partir deste, é avaliada a possibilidade de inclusão de novos acessos no grupo, adotando-se o critério de que a média das medidas de dissimilaridade dentro de cada grupo deve ser maior que as distâncias médias entre quaisquer grupos (CRUZ et al., 2004).

Na análise de agrupamento, os acessos foram reunidos em vários grupos, com base nas fontes de resistência, de forma que houvesse homogeneidade dentro do grupo e heterogeneidade entre grupos. Na formação dos grupos foram considerados os SSR próximos aos QTLs de efeito maior e menor para a resistência do NCS.

No caso do primeiro agrupamento, foram considerados todos os 24 SSR avaliados. Posteriormente, foi realizada uma análise com os SSR dos GL G, A2 e D2 e, depois somente com os SSR de cada GL individualmente, além de agrupamentos com todas as combinações destes três GL (G, A2 e D2).

Como forma alternativa de apresentar a dissimilaridade entre os acessos, foi realizada a análise da dispersão gráfica por meio da projeção de distâncias em gráficos tridimensionais, para facilitar a visualização dos agrupamentos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diversidade genética dos locos microssatélites

Com os 24 pares de *primers* usados na avaliação dos 36 genótipos foram obtidos 77 alelos, com uma média de 3,2 alelos por loco SSR. O número de alelos detectados por loco variou de 2 a 7. Os SSR do grupo de ligação (GL) D2 apresentaram o maior número de alelos diferentes (Tabela 4).

Foram encontrados 71 alelos entre as fontes de resistência e a cultivar Lee, que correspondem a 10 genótipos, e 60 alelos entre as 26 variedades comerciais brasileiras resistentes (Tabela 4), evidenciando que existe maior diversidade de alelos entre os genótipos originais que entre as variedades comerciais. Essa maior diversidade de alelos entre as PIs tem sido observada por outros autores (KEIM et al., 1989; DIERS et al., 1997; NARVEL et al., 2000) e é esperada porque o germoplasma de soja resistente ao NCS no Brasil é derivado de um número reduzido de fontes de resistência.

O valor da informação do conteúdo polimórfico (PIC) calculado para estimar a informatividade de cada *primer* variou de 0,11 a 0,71, com uma média de 0,36 (Tabela 4). Essa variação está associada ao número de alelos e suas freqüências respectivas detectadas em cada loco. Os três locos mais informativos estavam presentes no GL D 2 (Satt528, Satt574 e Satt543).

Entre as cultivares originais, o valor médio do PIC foi de 0,41, variando de 0 a 0,80. Já entre as variedades comerciais foi de 0,27, variando de 0 a 0,60. Resultados similares foram encontrados por Narvel et al. (2000), que ao estudarem a diversidade genética entre variedades elites de soja e acessos (PIs) utilizando marcadores SSR, detectaram valores de PIC associados a cada marcador microssatélite variando de 0 a 0,84, com média de 0,56 entre as PIs, e de 0 a 0,79, com média de 0,50 nas variedades elites.

Tabela 4 - Valor da informação do conteúdo polimórfico (PIC) referente aos SSR usados na análise de diversidade genética das 36 cultivares de soja

Loco	GL	Nº. de alelos (36 cultivares)	PIC	Nº. de alelos (cultivares originais)	Nº. de alelos (cultivares elites)
Sat_141	G	6	0,62	5	3
Satt309	G	2	0,24	2	2
Satt235	G	4	0,47	4	3
Sat_168	G	2	0,18	2	2
Satt356	G	2	0,34	2	2
Satt163	G	3	0,24	2	3
Sat_162	A2	2	0,11	2	2
BLT 065	A2	2	0,18	2	2
Satt424	A2	3	0,45	3	3
Sat_215	A2	5	0,48	5	4
Satt082	D2	4	0,60	4	3
Satt448	D2	2	0,36	2	2
Satt543	D2	7	0,63	6	3
Satt574	D2	4	0,66	4	3
Satt528	D2	7	0,71	7	5
Sat_366	J	2	0,10	2	2
Satt215	J	3	0,45	2	3
Satt431	J	3	0,11	1	3
Satt551	M	2	0,26	2	2
Satt346	M	3	0,35	3	2
Satt573	E	2	0,37	2	2
Satt452	E	2	0,23	2	1
Satt204	E	3	0,43	3	2
Sat_136	E	2	0,11	2	1
Total		77	-	71	60
Média		3,2	0,36	2,96	2,50

Dissimilaridades dos genótipos avaliados

A diversidade genética dos genótipos foi avaliada pela dissimilaridade média de um genótipo em relação aos demais. Portanto, foram feitas comparações entre os genótipos originais (fontes de resistência ao NCS e a cultivar Lee), entre as cultivares elites e entre as cultivares originais x cultivares elites. Essa medida foi avaliada considerando todos os locos SSR avaliados (que correspondem aos SSR próximos aos QTLs de efeito maior e menor para a resistência do NCS) e apenas os locos SSR dos

GL G, A2 e D2 (que correspondem aos SSR próximos aos QTLs de efeito maior).

A correlação entre as matrizes de dissimilaridade obtidas considerando todos os SSR e apenas os SSR dos GL G, A2 e D2 foi de 0,95, com significância de 1% de probabilidade pelo teste de Mantel; portanto, os dois conjuntos de dados apresentam alta correspondência.

No entanto, as dissimilaridades médias obtidas com todos os SSR foram menores que as obtidas apenas com os SSR dos GL G, A2 e D2, que são locos de efeito maior no controle da resistência para as diferentes raças do NCS (Tabela 5). Assim, a inclusão de SSR próximos a QTLs de efeito menor diminuiu a dissimilaridade entre os genótipos, não permitindo a diferenciação das cultivares quanto à resistência ao NCS. Dessa forma, optou-se por dar ênfase ao estudo da diversidade considerando apenas os locos de efeito maior dos GL G, A2 e D2.

A dissimilaridade média obtida entre os dez genótipos originais, considerando os SSR dos GL G, A2 e D2, variou de 0,64 a 0,83. Lee foi a cultivar que apresentou o maior valor de dissimilaridade média. Esse dado é coerente, uma vez que Lee é o padrão de suscetibilidade. A PI 20933 foi a mais dissimilar entre as diferentes fontes de resistência, apresentando valor médio de dissimilaridade de 0,81 em relação às demais. Entre as cultivares elites, Vmax foi a que se apresentou mais dissimilar, com valor de dissimilaridade médio de 0,74.

Comparando as dissimilaridades médias dos genótipos originais em relação às cultivares elites, Pickett e Hartwig foram os menos dissimilares, com médias de 0,47 e 0,66, respectivamente. Esses resultados foram consistentes com as principais fontes de resistência utilizadas nos programas de melhoramento, visto que a maioria das variedades elites avaliadas apresenta resistência de genótipos originados de Peking e Hartwig, sendo que Pickett apresenta resistência derivada de Peking (BRIM; ROSS, 1966).

As cultivares elites resistentes, mais dissimilares em relação às originais, foram UFV2011 e Vmax, com dissimilaridades médias de 0,78 e 0,77, respectivamente.

Tabela 5 - Germoplasma de soja avaliado quanto à dissimilaridade média entre as cultivares originais (1 a 10) e cultivares elites resistentes ao NCS (11 a 36)

Cultivar	TODOS SSR			SSR dos GL G, A2 e D2		
	DIS MÉD ORIG	DIS MÉD ELIT	DIS MÉD GERAL	DIS MÉD ORIG	DIS MÉD ELIT	DIS MÉD GERAL
1 Lee	0,76	0,60	0,64	0,83	0,71	0,74
2 PI 548316	0,69	0,70	0,70	0,71	0,78	0,76
3 PI 209332	0,72	0,69	0,70	0,81	0,71	0,74
4 Peking	0,60	0,66	0,65	0,68	0,73	0,72
5 PI 88788	0,58	0,70	0,67	0,68	0,75	0,73
6 PI 90763	0,55	0,66	0,63	0,64	0,70	0,69
7 PI 437654	0,58	0,69	0,66	0,66	0,71	0,70
8 PI 89772	0,60	0,69	0,67	0,67	0,72	0,70
9 Hartwig	0,62	0,56	0,57	0,69	0,66	0,67
10 Pickett	0,62	0,46	0,50	0,68	0,47	0,52
Média	0,63	0,64	0,64	0,70	0,69	0,70
11 BRSGO Raíssa	0,65	0,43	0,49	0,68	0,43	0,49
12 BRSGO Iara	0,72	0,71	0,71	0,76	0,69	0,71
13 BRS 262	0,68	0,47	0,53	0,75	0,56	0,61
14 BRSMG Liderança	0,60	0,42	0,47	0,69	0,47	0,53
15 M-Soy 8400	0,72	0,54	0,59	0,74	0,58	0,62
16 M-Soy 7901	0,63	0,47	0,51	0,68	0,54	0,57
17 M-Soy 8200	0,65	0,41	0,47	0,69	0,46	0,52
18 CD 217	0,70	0,48	0,54	0,76	0,54	0,60
19 TMG 117RR	0,65	0,51	0,55	0,69	0,55	0,59
20 UFVS 2011	0,71	0,52	0,57	0,78	0,60	0,65
21 UFVS 2012	0,63	0,50	0,54	0,70	0,55	0,59
22 BRS Invernada	0,66	0,47	0,52	0,71	0,51	0,56
23 BRSMG250 Nobreza	0,67	0,51	0,56	0,72	0,59	0,62
24 M-Soy 8001	0,66	0,49	0,53	0,68	0,54	0,57
25 M-Soy 8757	0,67	0,54	0,58	0,74	0,63	0,66
26 FMTTabarana	0,65	0,50	0,54	0,72	0,58	0,62
27 BRS 263 [Diferente]	0,62	0,49	0,53	0,69	0,57	0,60
28 BRS 231	0,67	0,54	0,57	0,76	0,61	0,65
29 FMT Tucunaré	0,66	0,47	0,51	0,70	0,51	0,56
30 FMT Matrinxã	0,68	0,53	0,57	0,72	0,57	0,61
31 TMG 121RR	0,61	0,47	0,51	0,69	0,56	0,59
32 TMG 115RR	0,64	0,52	0,55	0,73	0,62	0,65
33 VMax	0,71	0,63	0,65	0,77	0,74	0,75
34 BRS Jiripoca	0,61	0,45	0,49	0,68	0,51	0,55
35 BRSMT Pintado	0,68	0,51	0,55	0,74	0,56	0,60
36 BRSGO Chapadões	0,68	0,54	0,58	0,72	0,57	0,60
Média	0,66	0,51	0,55	0,72	0,56	0,60
Média geral	0,65	0,54	0,57	0,72	0,60	0,63

As menores dissimilaridades médias foram encontradas no grupo de elites, onde foram encontradas dissimilaridades médias que variaram de 0,43 a 0,74, com média de 0,56, evidenciado que, em geral, existe baixa variabilidade genética entre esses genótipos para os locos de resistência do NCS. Portanto, há necessidade de aumentar a diversidade de fontes de genes de resistência ao NCS. Vmax e BRSGO lara foram os genótipos que apresentaram as maiores dissimilaridades médias em relação aos demais, com média de 0,74 e 0,69, respectivamente.

Ao considerar a dissimilaridade média geral (de um genótipo em relação a todos os outros), entre as cultivares originais a mais dissimilar foi a PI 548316, e entre as elites, a Vmax.

Análise de variância molecular

Os resultados da AMOVA (Tabela 6) mostraram que existe diferença significativa entre os diferentes programas de melhoramento a 1% de probabilidade e, dentro das cultivares de cada programa, a 5%. A maior variação foi dentro das cultivares agrupadas pelos seus respectivos programas, onde apresentou 90,37% de variância; entre os programas, a variação foi de 9,63%.

Esses dados evidenciaram que as empresas de melhoramento do Brasil, em geral, apresentam objetivos comuns quanto ao desenvolvimento de variedades resistentes ao NCS, apesar de utilizarem estratégias diferentes dentro do seu programa, desenvolvendo variedades que apresentam diferenças quanto à resistência ao NCS.

Tabela 6 - Análise de variância molecular para os 24 genótipos referentes aos programas de melhoramento Embrapa, Monsanto, COODETEC e UFV

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Estimativa do componente da variância	% de variação
Entre os programas de melhoramento	3	1,004	0,226*	9,63
Dentro das cultivares dos programas	20	4,243	0,2122**	90,37

* significativo a 5 % por teste de permutação (1.000 permutações).

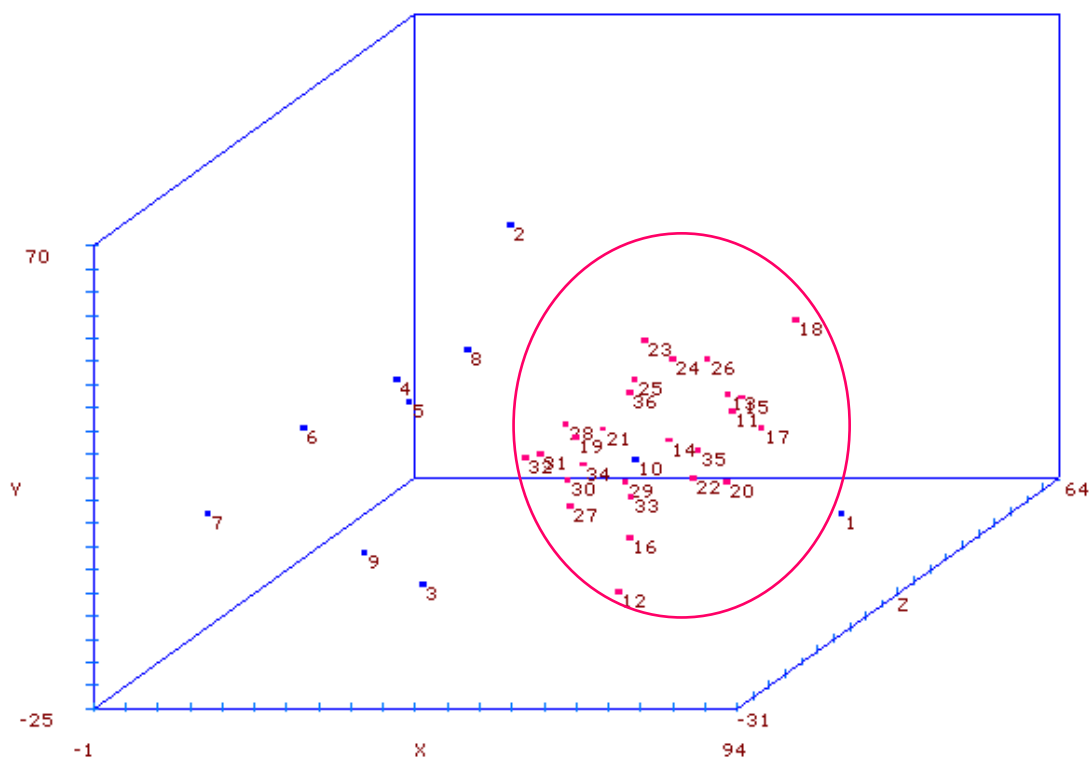
** significativo a 1% por teste de permutação (1.000 permutações).

Análises de agrupamento

As análises de agrupamento foram realizadas pelo método de Tocher e podem ser observadas na Tabela 7.

A análise de agrupamento com base no método de Tocher considerando os 24 SSR (que incluiu os SSR próximos aos QTLs de efeito maior e menor) (Tabela 7a) não permitiu discriminar as cultivares utilizadas quanto à diferença de resistência às várias raças do NCS. Como já evidenciado neste estudo, os dados de dissimilaridade média incluindo todos os SSR foram menores em relação àqueles que incluíram apenas os SSR dos GL G, A2 e D2 (Tabela 5). Portanto, os QTLs de menor efeito não foram utilizados na discriminação entre os genótipos quanto às diferenças entre raças neste estudo.

Pela análise de dispersão gráfica (Figura 1), evidenciou-se que as variedades comerciais agruparam-se em uma única região, não havendo discriminação entre esses genótipos. Com exceção de Pickett, os genótipos originais ficaram dispersos no espaço, indicando que eles são dissimilares entre si e entre as cultivares comerciais. Esses dados também podem ser confirmados pelas dissimilaridades médias (Tabela 5), em que a média geral de dissimilaridade entre os genótipos originais foi de 0,64 e, entre as cultivares elites, de 0,55. Como já evidenciado, Pickett foi o genótipo menos dissimilar entre os originais, com dissimilaridade média de 0,50.



Correlação 0.774 **Distorção(%)** 34.573 **Estresse(%)** 38.228

Identificação dos grupos:

- Variedades originais.
- Variedades comerciais.

Figura 1 - Análise da dispersão gráfica em relação aos 36 genótipos de soja, considerando todos os SSR

Considerando apenas os SSR dos GL G, A2 e D2, foi possível discriminar dois grupos maiores (Tabela 7b): o primeiro inclui cultivares com resistência à raça 3 e às raças 1 e 3; e o segundo alocou todas as cultivares que apresentavam resistência à raça 14, exceto Vmax. Também foi alocada neste grupo a cultivar TMG 117RR, que é resistente apenas à raça 3, mas do mesmo programa de melhoramento de outras duas cultivares também inseridas neste mesmo grupo (TMG 121RR e TMG 115RR). Além disso, também estão incluídas PI 437654 e Hartwig, que são as fontes de resistência aos NCS para as variedades incluídas neste grupo.

Tabela 7 - Agrupamento dos genótipos de soja pelo método de Tocher, considerando os SSR avaliados

Grupos Genótipos	
Análise considerando todos os 24 SSR	
7a	1 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 36
	2 1, 12
	3 2
	4 3
	5 4, 5, 6, 7, 8
	6 33
Análise considerando os SSR dos GL G, A2 e D2	
7b	1 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 26
	2 7, 9, 19, 27, 28, 29, 30, 32, 31, 34, 35, 36
	3 1, 12
	4 4, 8, 6
	5 2, 5
	6 3
	7 25
	8 33
Análise considerando os SSR dos GL A2 e D2	
7c	1 3, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 23, 24
	2 7, 9, 19, 25, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 36
	3 1, 12, 35
	4 2, 5
	5 4, 6, 8
	6 26
	7 33
Análise considerando os SSR dos GL G e D2	
7d	1 7, 9, 19, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 36
	2 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 33
	3 1, 2, 35
	4 2, 5, 6
	5 26
	6 4, 8
	7 25
	8 3
Análise considerando os SSR do GL D2	
7e	1 7, 9, 19, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 36
	2 1, 3, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 20, 21, 22, 33
	3 13, 18, 24, 23
	4 2, 5
	5 4, 8
	6 6
	7 25
	8 35

Cont - Tabela 7

Análise considerando os SSR dos GL G e A2		
7f	1	1, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 36,
	2	2, 5
	3	3, 20
	4	12
	5	33
Análise considerando os SSR do GL G		
7g	1	4, 10, 14, 15, 17, 18, 21, 22, 24, 27, 30, 36
	2	6, 8, 11, 13, 16, 19, 20, 23, 26, 29, 31, 34, 35,
	3	1, 12
	4	2, 5
	5	3, 7, 9
	6	25, 33
	7	32
Análise considerando os SSR do GL A2		
7h	1	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 36
	2	20, 33

Identificação das cultivares e variedades:

Cultivares originais	Raças
1 Lee	Padrão de suscetibilidade
2 PI 548316	R 3 e MR 14
3 PI 209332	R 3, 5 e 14
4 Peking	R 1, 3 e 5
5 PI 88788	R 3 e 14
6 PI 90763	R 1, 2, 3 e 5
7 PI 437654	R a todas as raças
8 PI 89772	R 1, 2, 3 e 5
9 Hartwig	R a todas as raças, exceto 4+ e 14+
10 Pickett	R 1 e 3

R: resistente; MR: moderadamente resistente.

Variedades resistentes à raça 3	Variedades resistentes às raças 1 e 3	Variedades resistentes à raça 14
11 BRSGO Raíssa	22 BRS Invernada	27 BRS 263 Diferente
12 BRSGO Iara	23 BRSMG 250	28 BRS 231
13 BRS 262	24 M-Soy 8001	29 FMT Tucunaré
14 BRSMG Liderança	25 M-Soy 8757	30 FMT Matrinxã
15 M-Soy 8400	26 FMTTabarana	32 TMG 115RR
16 M-Soy 7901		33 Vmax
17 M-Soy 8200		34 BRS Jiripoca
18 CD 217		35 BRSMT Pintado
19 TMG 117RR		36 BRSGO Chapadões
20 UFVS 2011		
21 UFVS 2012		

Ao realizar novos agrupamentos envolvendo os SSR do GL D2 (Tabela 7c, d, e), percebeu-se que a inclusão dos marcadores deste GL permitiu a separação da maioria das variedades com resistência à raça 14. Verificou-se também que Hartwig e PI 437654 agruparam-se sempre juntas às cultivares com resistência à raça 14. Embora Vmax apresente resistência à raça 14, esta cultivar não se agrupou com os genótipos resistentes a esta raça, provavelmente porque ela é derivada de PI 88788 e não de Hartwig e PI 437654, como as demais variedades. Contudo, Vmax também não se alocou próxima da PI 88788 e se mostrou bem distanciada de todos os genótipos, pelas dissimilaridades médias (Tabela 5).

O QTL de resistência à raça 14 no GL D2 foi identificado por Schuster et al. (2001), usando 183 famílias $F_{2:3}$ derivadas do cruzamento de Hartwig e BR-39-31983. Segundo esses autores, este QTL foi capaz de explicar 41,1% da resistência, porém este QTL ainda não foi validado e é o único relato associando a resistência ao NCS ao GL D2. Ao avaliar uma população de RILs, também derivada do cruzamento de Hartwig, Silva (2006) identificou apenas um marcador nessa mesma região, mas com associação de apenas 5%, pela análise de marca simples, ou seja, de baixa associação. Em outro estudo, Silva et al. (2007) tentaram validar o QTL, porém na população estudada não foi detectado polimorfismo na região de interesse. No entanto, neste trabalho percebeu-se que o GL D2 foi de extrema importância na discriminação dos genótipos com resistência à raça 14; apesar de ainda não validado, este QTL provavelmente existe, e deve ser explorado.

No agrupamento considerando os SSR dos GL G e A2 (Tabela 7f), houve a formação de um grupo maior, com 23 cultivares elites resistentes às diferentes raças, não diferenciando os genótipos por raça. Esses dois locos respondem por quase a totalidade da variabilidade da resistência da soja à raça 3 do NCS e grande parte da variabilidade para as outras raças (CONCIBIDO et al., 2004).

Pela dispersão gráfica considerando os GL G e A20, também se percebeu que a maioria dos genótipos resistentes estão próximos entre si. As exceções entre as variedades comerciais foram Vmax e UFV 2011, e entre as fontes de resistência, Hartwig e PI 437654. Isso indica que estes genótipos agrupados compartilham alelos localizados nessa região destes GL.

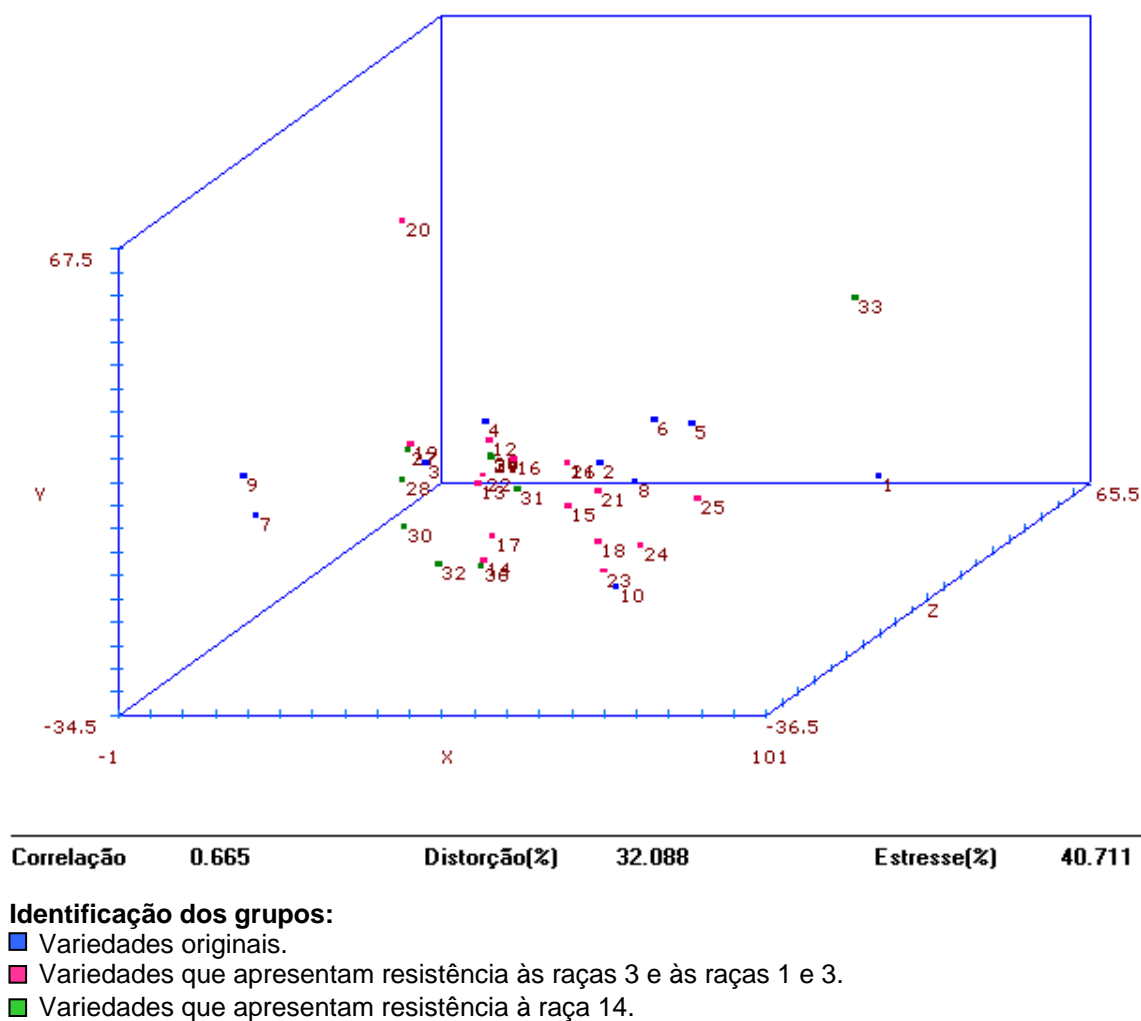
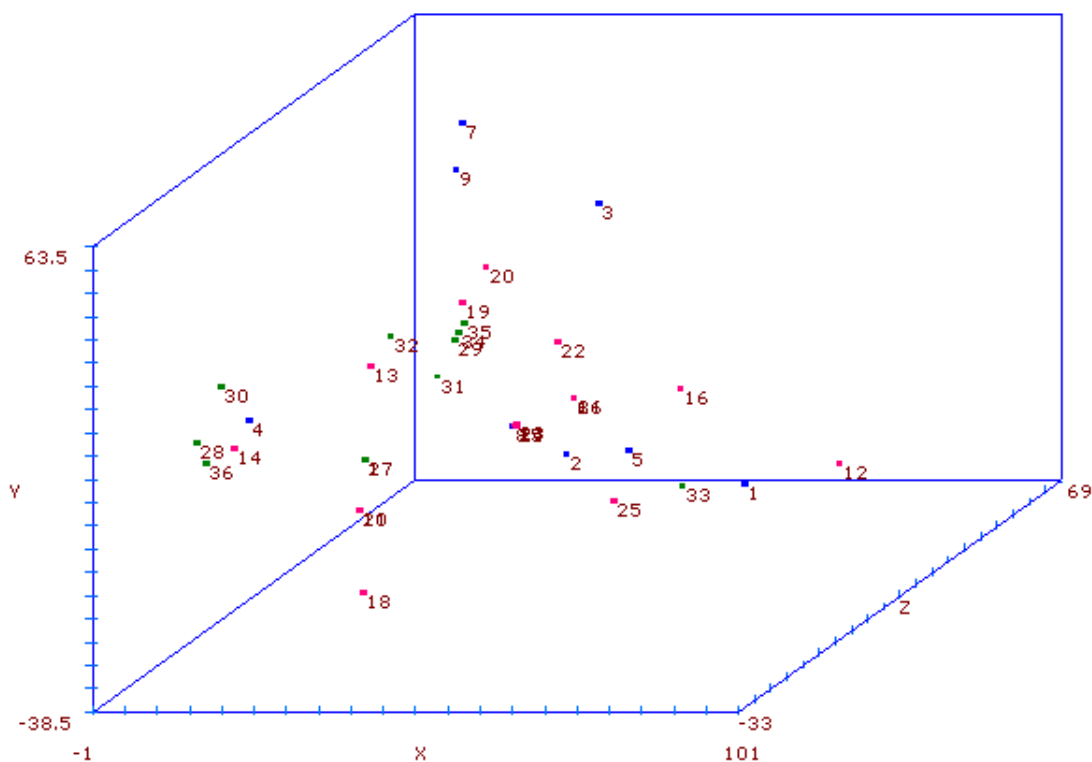


Figura 2 - Análise da dispersão gráfica em relação aos 36 genótipos de soja, considerando os SSR dos GL G e A2

A utilização apenas do GL G (Tabela 7g e Figura 3) não permitiu a separação dos genótipos resistentes por raça. Sabe-se que os locos de efeito maior para o controle de múltiplas raças do NCS estão localizados no GL G (CONCIBIDO et al., 2004). Provavelmente, esse tenha sido o motivo de não ser possível realizar a separação dos genótipos por raças.



Correlação	0.793	Distorção[%]	23.951	Estresse[%]	31.583
-------------------	--------------	---------------------	---------------	--------------------	---------------

Identificação dos grupos:

- Variedades originais.
- Variedades que apresentam resistência às raças 3 e às raças 1 e 3.
- Variedades que apresentam resistência à raça 14.

Figura 3 - Análise da dispersão gráfica em relação aos 36 genótipos de soja, considerando os SSR do GL G

O agrupamento realizado pelos SSR do GL A2 (Tabela 7h) não foi informativo. O QTL que condiciona resistência ao NCS presente no GL A2 foi identificado como responsável por uma grande parte da variação fenotípica para a raça 3 em diferentes fontes de resistência (MAHALINGAM; SKORUPSKA 1995; WEBB et al., 1995; CHANG et al., 1997; MEKSEM et al., 2001; CONCIBIDO et al., 2004). A resistência à raça 3 é comum em todos os genótipos resistentes. Portanto, não era esperada separação ao utilizar SSR próximos ao QTL que condiciona resistência a esta raça. Apesar de não discriminar os genótipos por raça, esse GL teve sua importância revelada em outros agrupamentos.

Com todos os agrupamentos realizados, não foi possível fazer a separação dos genótipos resistentes à raça 3 dos resistentes às raças 1 e 3.

Na maioria dos agrupamentos, Lee e BRSGO lara sempre foram alocadas juntas. Apenas em um caso elas foram alocadas em grupos únicos. Em se tratando das médias de dissimilaridade (Tabela 5), percebeu-se que em ambas elas foram altas, indicando que são diferentes entre o conjunto de genótipos avaliados. Apesar de Lee ser suscetível a todas as raças do NCS, ela apresenta proximidade a cultivar BRSGO lara.

As fontes de resistência foram alocadas na maioria dos agrupamentos distantes das variedades comerciais, exceto Hartwig e PI 437654, que se agruparam com cultivares resistentes a pelo menos às raças 1, 3 e 14. Zhang et al. (1999), realizando análise de *cluster*, verificaram que Peking, PI 90763 e PI 88788 foram alocadas em três grupos diferentes e são geneticamente distantes. Neste trabalho, como foram considerados apenas SSR próximos a locos de resistência ao NCS, Peking, PI 90763, PI 89772, PI 548316 e PI 88788, na maioria dos agrupamentos, ficaram próximas entre si.

A PI 209332, na maioria dos agrupamentos, encontrou-se isolada. Isso indica que essa fonte de resistência possui alelos diferentes e pode ser utilizada como uma fonte de resistência a ser explorada. Estudos de diversidade genética entre várias fontes de resistência utilizando RFLP, realizados por Zhang et al. (1999) e Diers et al. (1997), também não conseguiram agrupar esta PI com as demais fontes de resistência utilizadas neste trabalho.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos possibilitaram chegar às seguintes conclusões:

- ✓ Há maior diversidade de alelos entre os genótipos originais que entre as variedades comerciais.
- ✓ As empresas de melhoramento do Brasil são similares quanto ao desenvolvimento de variedades resistentes ao NCS, apesar de possuírem estratégias diferentes e desenvolverem variedades que apresentam resistência às diferentes raças.
- ✓ A utilização de marcadores microssatélites próximos aos QTLs de efeito maior (GL G, A2 e D2) permitiu a separação de cultivares que apresentam resistência às raças 1 e/ou 3 de cultivares que apresentam resistência à raça 14.
- ✓ Os SSR do GL D2 permitiram diferenciar as cultivares resistentes ou com resistência moderadamente resistente à raça 14 das demais.
- ✓ Com os microssatélites avaliados, não foi possível proceder à separação de cultivares resistentes à raça 3 das que apresentam resistência às raças 1 e 3.
- ✓ Vmax e BRSGO Iara são fontes de resistência ao NCS divergentes de todas as demais variedades avaliadas no presente estudo.
- ✓ Hartwig, provavelmente, é a fonte de resistência mais utilizada para a resistência à raça 14 nos programas de melhoramento do Brasil.
- ✓ A maioria das variedades resistentes desenvolvidas pelos programas de melhoramento do Brasil são similares, sendo necessário aumentar a diversidade de fontes de genes de resistência ao NCS.

BIBLIOGRAFIA

- BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLMICK, M.; DAVIS, R. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v. 32, p. 314-331, 1980.
- BRIM, C.A.; ROSS, J.P. Registration of Pickett soybeans. **Crop Science**, v. 6, p. 305, 1966.
- CHANG, S.J.C.; DOUBLER, T.W.; KILO, V.Y.; ABU-THREDEIH, J.; PRABHU, R.; FREIRE, V.; SUTTNER, R.; KLEIN, J.; SCHMIDT, M.E.; GIBSON, P.T.; LIGHTFOOT, D.A. Association of loci underlying field resistance to soybeans sudden death syndrome (SDS) and cyst nematode (SCN) race 3. **Crop Science**, v. 37, p. 965-971, 1997.
- CHEN, Y.; WANG, D.; ARELLI, P.; EBRAHIMI, M.; NELSON, R.L. Molecular marker diversity of SCN-resistant sources in soybean. **Genome**, v. 49, p. 938-949, 2006.
- 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.
- CRUZ, C.D. **Programa Genes: aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: UFV, 1997. 442 p.
- CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 3 ed. Viçosa: UFV, 2004. 480 p.
- DIERS, B.W.; SKORUPSKA, H.T.; RAO-ARELLI, A.P.; CIANZIO, S.R. Genetic relationships among soybean plant introductions with resistance nematodes. **Crop Science**, v. 37, p. 1966-1972, 1997.
- EMBRAPA. **Tecnologia de produção de soja para a região central do Brasil**. Londrina: Embrapa, Embrapa Agropecuária Oeste, 228 p. 2007.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E.; QUATTRO, J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes:

- Application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131, p. 479-491, 1992.
- GLOVER, K.D.; WANG, D.; ARELLI, P.R.; CARLSON, S.R.; CIANZIO, S.R.; DIERS, B.W. Near isogenic lines confirm a soybean cyst nematode resistance gene from PI 88788 on linkage group J. **Crop Science**, v. 44, p. 936-941, 2004.
- KABELKA, E.A.; CARLSON, S.R.; DIERS, B. W. Localization of two loci that confer resistance to soybean cyst nematode from *Glycine soja* PI 468916. **Crop Science**, v. 45, p. 2473-2481, 2005.
- KEIM, P.; SHOEMAKER, R.C.; PALMER, R.G. Restriction fragment length polymorphism diversity in soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 77, p. 786-792, 1989.
- KÖLLIKER, R.; JONES, E.S.; JAHUFER, M.Z.Z.; FORSTER, J.W. Bulked AFLP analysis for the assessment of genetic diversity in white clover (*Trifolium repens* L.). **Euphytica**, v. 121, p. 305-315, 2001.
- MAHALINGAM, R.; SKORUPSKA, H.T. DNA markers for resistance to *Heterodera glycines* I. race 3 in soybean cultivar Peking. **Breeding Science** v. 45, p. 435-443, 1995.
- MEKSEM, K.; PANTAZOPOULOS, P.; NJITI, V.N.; HYTEN, L.D.; ARELLI, P.R.; LIGHTFOOT, D.A. 'Forrest' resistance to the soybean cyst nematode is bigenic: saturation mapping of the *Rhg1* and *Rhg4* loci. **Theoretical Applied Genetics**, v. 103, p. 710-717, 2001.
- NARVEL, J.M.; FEHR, W.R.; CHU, W.C.; GRANT, D.; SHOEMAKER, R.C. Simple sequence repeat diversity among soybean plant introductions and elite genotypes. **Crop Science**, v. 40, p. 1452-1458, 2000.
- NETO, F.A. **Caracterização de cultivares de soja por marcadores microssatélites**. 46 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001.
- NIBLACK, T.L.; ARELLI, P.R.; NOEL, G.R.; OPPERMAN, C.H.; ORF, J.H.; SCHMITT, D.P.; SHANNON, J.G.; TYLKA, G.L. A revised classification

- scheme for genetically diverse populations of *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology**, v. 34, n. 4, p. 279-288, 2002.
- RIGGS, R.D.; SCHMITT, D.P. Complete characterization of the race scheme for *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology**, St. Paul, MN, v. 20, n. 3, p. 392-395, 1988.
- SCHUSTER, I.; ABDELNOOR, R.V.; MARIN, S.R.R.; CARVALHO, V.P.; KIIHL, R.A.S.; SILVA, J.F.V.; SEDIYAMA, C.S.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Identification of a new major QTL associated with resistance to soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*). **Theoretical Applied Genetics**, v. 102, p. 91-96, 2001.
- SILVA, M.F. **Mapeamento e validação de QTLs de resistência ao nematóide de cisto da soja**. 124 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.
- SILVA, M.F.; SCHUSTER, I.; SILVA, J.F.V.; FERREIRA, A.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Validation of microsatellite markers for assisted selection of soybean resistance to cyst nematode races 3 and 14. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 8, p. 1143-1150, 2007.
- SONG, Q.J.; MAREK, L.F.; SHOEMAKER, R.C.; LARK, K.G.; CONCIBIDO, V.C.; DELANNAY, X.; SPETCH, J.E.; CREGAN, P.B. A new integrated genetic linkage map of the soybean. **Theoretical Applied Genetics**, v. 109, p. 122-128, 2004.
- WANG, D.; ARELLI, P.R.; SHOEMAKER, R.C.; DIERS, B.W. Loci underlying resistance to Race 3 of soybean cyst nematode in *Glycine soja* plant introduction 468916. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 103, p. 561-566, 2001.
- WANG, L.; GUAN, R.; LIU, Z.; CHANG, R.; QIU, L. Genetic diversity of Chinese cultivated soybean revealed by SSR markers. **Crop Science**, v. 46, p. 1032-1038, 2006.
- WEBB, D.M.; BALTAZAR, B.M.; RAO-ARELLI, A.P.; SCHUPP, J.; CLAYTON, K.; KEIM, P.; BEAVIS, W.D. Genetics mapping of soybean

cyst nematode race-3 resistance loci in the soybean PI 437654.
Theoretical Applied Genetics, v. 91, n. 1, p. 574-581, 1995.

ZHANG, J.; ARELLI, P.R.; SLEPER, D.A.; QIU, B.X.; ELLERSIECK, M.R.
Genetic diversity of soybean germplasm resistant to *Heterodera glycines*.
Euphytica, v. 107, n. 3, p. 205-216, 1999.