



**GENÉTICA DA RESISTÊNCIA DA SOJA À RAÇA 4⁺
DO NEMATÓIDE DE CISTO, *Heterodera glycines***

WALDIR PEREIRA DIAS

2003

WALDIR PEREIRA DIAS

GENÉTICA DA RESISTÊNCIA DA SOJA À RAÇA 4⁺
DO NEMATÓIDE DE CISTO, *Heterodera glycines*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Nematologia, para obtenção do título de “Doutor”.

Orientador
Prof. Vicente Paulo Campos

LAVRAS
MINAS GERAIS- BRASIL
2003

Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA

Dias, Waldir Pereira

Genética da resistência da soja à raça 4⁺ do nematóide de cisto, *Heterodera glycines*/Waldir Pereira Dias. -- Lavras: UFLA, 2003.

83p. : il.

Orientador: Vicente Paulo Campos.

Dissertação (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Nematóides. 2. Resistência varietal. 3. *Heterodera glycines*.

4. Nematóide de cisto da soja. 5. Raças de nematóides I. Universidade Federal

de Lavras. II. Título.

WALDIR PEREIRA DIAS

**GENÉTICA DA RESISTÊNCIA DA SOJA À RAÇA 4⁺ DO NEMATÓIDE
DE CISTO, *Heterodera glycines***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Nematologia, para obtenção do título de "Doutor".

APROVADA em 12 de novembro de 2003

Dr. Carlos Arrabal Arias	Embrapa Soja
Dr. Edson Ampélio Pozza	DFP/UFLA
Dr. João Bosco dos Santos	DBI/UFLA
Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende	DFP/UFLA


Prof. Vicente Paulo Campos - DFP/UFLA

(Orientador)

LAVRAS

MINAS GERAIS-BRASIL

A Deus, pela vida e pela saúde para a realização deste trabalho.

Ofereço

À minha esposa Marlene e às filhas Márcia e Lillian pela compreensão e apoio.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela saúde.

À minha esposa Marlene e às filhas Márcia e Lílian pela compreensão e apoio nos momentos difíceis.

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realizar este curso.

Ao CNPq pela bolsa concedida no período de agosto/2001 a junho/2003.

À Embrapa, pela liberação para o curso, e também pela bolsa de estudos parcial.

À Embrapa Soja pela permissão para a utilização de suas dependências, equipamentos e materiais de consumo.

Ao Orientador, Prof. Vicente Paulo Campos, pela orientação e, especialmente, pela liberdade concedida na escolha e desenvolvimento do projeto de Tese.

Ao Dr. Romeu Afonso de Souza Kiihil pela realização dos cruzamentos, pela produção das sementes das gerações segregantes e pelas valiosas sugestões.

Ao Dr. Carlos Arrabal Arias, meu orientador na Embrapa Soja, pela ajuda nas análises de genética quantitativa e marcadores moleculares.

Aos professores Magno Antônio P. Ramalho e João Bosco dos Santos, do Departamento de Biologia da UFLA, pelos ensinamentos de genética e biologia molecular e pela orientação.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia da UFLA pelos novos conhecimentos adquiridos e pelo saudável convívio.

Aos colegas de curso, especialmente a Rita de Cássia, Patrícia, Zuleide, Carlos, Frederico, Rodrigo, Hércules e Cacilda, pela amizade e companheirismo.

A todos os novos amigos e amigas que conheci em Lavras.

Aos pesquisadores da Embrapa Soja pela amizade.

Ao Dr. João Flávio Veloso Silva pela amizade e pelas sugestões.

Ao Dr. Leo Pires Ferreira pelas correções de português.

Ao Dr. Elemar Voll pela ajuda no ABSTRACT.

Ao Dr. José Erivaldo Pereira pela ajuda em algumas análises estatísticas.

Aos funcionários da casa-de-vegetação e dos laboratórios de Nematologia e Biotecnologia da Embrapa Soja, pelo apoio na instalação, condução e avaliação dos experimentos.

À secretária Mabel, da Embrapa Soja, pela eficiência e amizade.

Ao meu concunhado, Manoel Lopes Serrano, pela amizade e ajuda na instalação dos experimentos em casa-de-vegetação.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para o êxito deste trabalho. Saibam que foram muito importantes para o meu progresso pessoal e que contribuíram para o desenvolvimento da sojicultura brasileira.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	4
2.1 Histórico e importância econômica da soja no Brasil.....	4
2.2 O nematóide de cisto da soja.....	5
2.2.1 Biologia, ciclo de vida, sintomas e medidas de controle do NCS.....	5
2.2.2 Variabilidade genética do NCS.....	7
2.2.3 Fontes de resistência ao NCS.....	10
2.2.4 Genética da resistência da soja ao NCS.....	14
2.2.5 Marcadores moleculares ligados a alelos de resistência ao NCS.....	16
2.2.5.1 Resistência derivada de ‘Peking’.....	17
2.2.5.2 Resistência derivada da PI 437654.....	20
2.2.5.3 Resistência derivada da PI 20932.....	23
2.2.5.4 Resistência derivada da PI 290136.....	24
2.2.5.5 Resistência derivada da PI 438489B.....	25
2.2.5.6 Resistência derivada da PI 89772.....	26
2.2.5.7 Resistência derivada de mais de uma fonte.....	26
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1 Estudo da herança da resistência à raça 4 ⁺ do NCS.....	30
3.1.1 Material genético.....	30
3.1.2 Obtenção das sementes.....	30
3.1.3 Avaliação da reação das plantas de soja à raça 4 ⁺ do NCS.....	31
3.1.4 Análise genética dos dados.....	33
3.1.4.1 Genética quantitativa.....	34
3.1.4.1.1 Componentes genéticos de média.....	34

3.1.4.1.2 Componentes genéticos e ambientais de variância.....	38
3.1.4.1.3 Herdabilidade.....	40
3.2 Identificação de marcadores SSR ligados a locos de resistência à raça 4 ⁺ do NCS.....	41
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
4.1 Estudo da herança da resistência à raça 4 ⁺ do NCS.....	47
4.1.1 Avaliação da reação das plantas de soja à raça 4 ⁺ do NCS.....	47
4.1.2 Análise genética dos dados.....	48
4.1.2.1 Determinação do número de genes.....	52
4.1.2.2 Parâmetros genéticos obtidos pelos componentes de médias e variâncias.....	53
4.1.2.2.1 Herdabilidade.....	56
4.2 Identificação de marcadores SSR ligados a locos de resistência à raça 4 ⁺ do NCS.....	58
5 CONCLUSÕES.....	68
6 CONSIDERAÇÕES FUTURAS.....	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

RESUMO

DIAS, Waldir Pereira. **Genética da resistência da soja à raça 4⁺ do nematóide de cisto, *Heterodera glycines***. 2003. 83 p. Dissertação (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

O trabalho teve como objetivos estudar a herança da resistência da soja à raça 4⁺ do nematóide de cisto da soja (NCS) e identificar marcadores de microssatélites e o loco *i* (cor do tegumento da semente), associados a locos de resistência. A raça 4⁺ refere-se a uma população de campo do NCS, identificada pela primeira vez no Brasil, e que difere da raça 4 tradicional pela sua habilidade em parasitar a cultivar Hartwig, mas não a sua ancestral PI 437654. Os experimentos foram conduzidos na Embrapa Soja, em Londrina, PR. A herança da resistência dos genótipos E97-2502-9-3-1 e E97-2502-9-3-5 (tipos PI 437654), cruzados com a linhagem susceptível E96-776 (tipo 'Hartwig'), foi estudada utilizando 120 famílias F_{2,3}, 120 plantas F₂, 20 plantas F₁ e 20 plantas de cada parental. Para possibilitar o estudo de ligação do loco *i* com a resistência, as plantas F₂ foram classificadas com relação à coloração do tegumento das sementes. As gerações de cada cruzamento foram avaliadas em experimentos separados, conduzidos em casa-de-vegetação nos meses de outubro, novembro e dezembro de 2000. Plântulas de cada geração, e também das diferenciadoras de raça foram transplantadas (uma por vaso de argila) e, dois dias depois, inoculadas com 4000 ovos do nematóide. Após trinta dias, o sistema radicular de cada planta foi lavado e as fêmeas, recuperadas e quantificadas. Em ambos os cruzamentos, as inoculações resultaram em números elevados de fêmeas nos genótipos susceptíveis e confirmaram a presença da raça 4⁺. Não houve efeito dos recíprocos e as estimativas de herdabilidade foram de magnitude média a alta. Houve segregação transgressiva e dominância parcial no sentido da resistência.

¹ Orientador: Vicente Paulo Campos-Dep. de Fitopatologia-UFLA;

2 Coorientadores: Magno A. P. Ramalho e João B. dos Santos-Dep. de Biologia-UFLA.

Para o cruzamento E96-776 x E97-2502-9-3-1, foram detectados efeitos aditivos de dominância e epistáticos do tipo aditivo x aditivo, com pelo menos dois genes controlando a resistência. No cruzamento E96-776 x E97-2502-9-3-5, um único gene foi suficiente para explicar a segregação observada e um modelo aditivo-dominante se ajustou perfeitamente aos dados. Os estudos para a identificação de marcadores moleculares de microssatélites foram conduzidos no laboratório de biotecnologia empregando DNA extraído de folhas de plantas dos parentais F₁'s e F₂'s do cruzamento E96-776 x E97-2502-9-3-1. Foram testados 74 *primers*, escolhidos a partir do mapa genético da soja e priorizando os localizados nos grupos de ligação A2 e G. . Desses *primers*, apenas 10 foram polimórficos entre os parentais. Os *Satt 177* e *Satt 341* localizados no grupo A2, próximos ao loco *i*, foram os únicos associados com a resistência. De acordo com as análises de correlação e o mapa de ligação construído para a população F₂, os três marcadores foram incluídos num mesmo grupo de ligação. O loco *i* foi localizado entre os dois microssatélites, a 28,2 cM do *Satt 177* e a 18,4 cM do *Satt 341*. A ordem dos marcadores no mapa gerado foi equivalente àquela do grupo A2. As análises sobre os três marcadores, realizadas com o programa MAPMAKER/QTL, indicaram a presença de um QTL de resistência situado a 4 cM do loco *i*, 24 cM do *Satt 177* e 14,4 cM do *Satt 341*. A região genômica identificada foi capaz de explicar 87% da variação do número de fêmeas e coincide com a região do grupo A2 onde está localizado, em 'Peking' e na PI 437654, o gene *Rhg₄* para resistência a várias raças do NCS. As variações no número de fêmeas explicadas pelos loco *i*, *Satt 341* e *Satt 177* foram, respectivamente, de 64,1%, 55,1% e 30,7%. A utilização dos *Satt 341* e *Satt 177*, combinados, permitiu explicar 65,0% da variação observada. Os dois marcadores de microssatélites, sozinhos ou combinados, apresentam potencial para utilização na identificação de genótipos resistentes à raça 4* do NCS.

ABSTRACT

DIAS, Waldir Pereira. **Genetics of resistance in soybean to race 4* of soybean cyst nematode, *Heterodera glycines***. 2003. 83 p. Dissertation (Doctorate in plant pathology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.¹

The objectives of the research was to study the inheritance of resistance in soybean to race 4* of soybean cyst nematode (SCN) and to identify SSR and seedcoat color (*i*-locus) markers associated to the resistance. Race 4* refers to the field population of SCN identified for the first time in Brazil, and which differs from classic race 4 for its ability to infect the cv. Hartwig, but not its ancestral PI 437654. The experiments were carried out at Embrapa Soybean, in Londrina, PR State, Brazil. The inheritance of resistance of genotypes E97-2502-9-3-1 and E97-2502-9-3-5 (types PI 437654), crossed with the susceptible parent E96-776 (type 'Hartwig'), was studied using 120 F₂₃-families, 120 F₂-plants, 20 F₁-plants and 20 plants for each parental genotype. To make possible to study the linkage of *i* and the resistance loci, the F₂-plants were classified in relation to the seedcoat color. The generations of each crossing were evaluated in separate experiments, that were carried out in the greenhouse during October, November and December of 2000. Seedlings of each generation and of the race diferencial cultivares were transplanted (one by clay pot) and, two days later, were inoculated with 4000 nematode eggs. After thirty days, the radicular system of each plant was washed and the females recuperated and quantified. In both crossings, the inoculations resulted in high numbers of females in the susceptible genotypes, confirming the presence of race 4*. There was no effect of the reciprocal crosses. The estimates of heritability were of medium to high

¹ Guidance Comitee: Vicente Paulo Campos- UFLA (Major Professor), Magno A. P. Ramalho- UFLA and João Bosco dos Santos- UFLA.

magnitude. Transgressive segregation and partial dominance to resistance were observed. For the crossing E96-776 x E97-2502-9-3-1 there were detected additive dominant and epistatics of additive x additive type effects, with at least two genes controlling the resistance. In the crossing E96-776 x E97-2502-9-3-5, only one gene was enough to explain the observed segregation. An additive-dominant model showed a good fit to the data. The studies for identification of SSR markers were set up in the biotechnology laboratory, using DNA extracted from parentals, F₁- and F₂-plants in the cross E96-776 x E97-2502-9-3-1. Seventy four primers, from the soybean genetic map and prioritizing those located in the A2 and G linkage groups, were tested. From these primers, only 10 were polymorphic between the parents. The markers *Satt 177* and *Satt 341*, located at A2 group and next to *i*-locus where the only associated with resistance. According to the correlation analyses and linkage map constructed for the F₂-population, the three markers were enclosed in the same linkage group. The *i*-locus was located between the two microsatélites, at 28.2 cM of *Satt 177* and at 18.4 cM of *Satt 341*. The markers order in the generated map was equivalent to that of A2 group. The analysis on the three markers, carried out through the MAPMAKER/QTL software, indicated the presence of a resistance QTL situated about 4 cM of *i*-locus, 24 cM of *Satt 177* and 14.4 cM of *Satt 341*. The identified genomic region explained 87% of the variation observed on the number of females and matches with that one of the A2 group where the *Rhg_r*-allele for resistance to some races of SCN is located, as in 'Peking' and PI 437654. Variations in the number of females were explained with *i*-locus, *Satt 341* and *Satt 177* by 64.1%, 55.1% and 30.7%, respectively. The combined use of *Satt 341* and *Satt 177* explains 65.0% of the observed variation. The two microsatélites markers, alone or combined, have potential use for identification of resistant genotypes to race 4* of SCN.

1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é originária do nordeste da China, entre as latitudes de 35° e 45° N. As maiores áreas de cultivo concentram-se em latitudes maiores que 30°. No Brasil, a soja desenvolveu-se inicialmente nos estados do sul, e hoje aproximadamente metade da produção é obtida na região central. Tal expansão da soja para médias e baixas latitudes foi possível pelo desenvolvimento de cultivares no próprio País. A estratégia na obtenção de tais cultivares consistiu no desenvolvimento de plantas com tipo de crescimento determinado, semelhantes às utilizadas no sul dos Estados Unidos, e com altura e ciclo adequados a estas condições. O controle da reação ao fotoperiodismo foi fundamental na obtenção de tais plantas. Tipos básicos para cada região foram desenvolvidos (Kihl et al., 2000).

No cenário mundial, o Brasil é o segundo maior produtor de soja, superado apenas pelos Estados Unidos e à frente da China desde o ano de 1976 (Arias et al., 2001). Na safra 2002/03, estima-se que foram produzidas, no País, 52.066.600 toneladas de soja, com produtividade média de 2.818 kg/ha (CONAB, agosto/2003). Esse bom desempenho deve-se a solos e climas adequados e, principalmente, à grande disponibilidade de materiais genéticos melhorados. Contudo, com o cultivo contínuo dessa leguminosa ao longo dos anos, novos problemas surgem a todo momento, exigindo desdobramento extra dos pesquisadores com o objetivo de alcançar novas tecnologias que possibilitem à cultura manter seu alto nível de produtividade. Um dos principais problemas que se tem apresentado é o surgimento de novas doenças e o agravamento de outras de menor importância, favorecidas principalmente pelo emprego da monocultura da soja. Na safra 1999/00, as doenças da soja foram responsáveis por prejuízos estimados em US\$1,39 bilhão. Desse montante, o

nematóide de cisto da soja (NCS) contribuiu com U\$133,2 milhões (Yorinori 2000, 2002).

O NCS é o principal problema fitossanitário da soja nos países onde ocorre, podendo provocar perdas de até 100% no rendimento. No Brasil foi detectado pela primeira vez na safra 1991/92, em Nova Ponte (MG), Chapadão do Sul (MS) e Campo Verde (MT). Atualmente, encontra-se disseminado em 103 municípios, em nove estados (MG, MT, MS, GO, SP, PR, RS, BA e TO), infestando uma área superior a 2.500.000 de hectares (Silva et al., 2002).

Apesar da existência de vários métodos que podem ajudar no controle do NCS, a maneira mais prática e econômica é por meio do uso de cultivares resistentes. Sua adoção pelos agricultores é simples, barata e permite aos mesmos continuar explorando a cultura, substituindo a cultivar suscetível por outra resistente. Entretanto, obter uma cultivar resistente não é tão simples quanto a sua utilização pelo agricultor; no caso do NCS, a durabilidade da resistência também não é muito grande, pois o patógeno apresenta grande variabilidade genética. No Brasil, a variabilidade constatada é ainda maior, pois apesar de o patógeno praticamente não ter sofrido pressão de seleção pelo uso de cultivares resistentes, já foram detectadas as raças 1, 2, 3, 4, 4*, 5, 6, 10, 14 e 14* (Dias et al., 1999b).

Das fontes de resistência ao NCS já identificadas, a PI 437654 é a única com resistência a todas as raças (Anand & Gallo, 1984; Anand, 1985; Rao-Arelli et al., 1992b). Como essa PI tem sementes com tegumentos pretos e apresenta estabilidade e produtividade baixas, teve que ser melhorada. Assim, do seu cruzamento com 'Forrest', foi produzida 'Hartwig' (Anand, 1992). Essa cultivar, por apresentar resistência a todas as raças do NCS conhecidas, tem sido utilizada em larga escala nos programas de melhoramento genético de soja. Entretanto, recentemente foram encontradas, no Brasil, duas populações (raças 4* e 14*) com habilidade em parasitar essa cultivar, mas não a PI 437654 (Dias et al.,

1998, 1999a). Isto mostra que 'Hartwig', provavelmente, não tenha herdado todos os alelos de resistência presentes na PI 437654. A definição de estratégias de melhoramento para recuperar esses alelos faltosos, com possibilidade de estarem fortemente ligados ao loco *i* (cor do tegumento da semente), exige conhecer, com antecedência, a base genética da resistência a essas populações.

Para conhecer a reação dos materiais segregantes ao NCS, os programas de melhoramento de soja geralmente adotam avaliações a campo ou em casa-de-vegetação. As avaliações em casa-de-vegetação são melhores, mas normalmente impraticáveis, dado o grande número de materiais a inocular. As deficiências desses métodos de avaliação tornam a incorporação de resistência ao NCS um caráter de difícil manipulação. O mapeamento dos genes de resistência com marcadores moleculares e a utilização dessas marcas na seleção indireta aumentam grandemente a eficiência dos programas de melhoramento (Arias et al., 2001).

Marcadores moleculares de várias naturezas já foram identificados associados a alelos de resistência ao NCS. Desses, os microssatélites (SSR) são preferíveis por terem expressão co-dominante, serem multialélicos e altamente reproduzíveis (Carneiro, 2002). Um grande número de *primers* SSR e mapas genéticos já está disponível para a cultura da soja, o que facilita a utilização rotineira desse tipo de marcador pelos programas de melhoramento. A eficiência de marcadores SSR, em mapear loco (s) de resistência às raças do NCS capazes de parasitar 'Hartwig', necessita ser testada. A possibilidade de o loco *i* estar ligado a esse (s) loco (s) de resistência também deve ser investigada.

Pelo exposto acima, o presente trabalho foi desenvolvido com os seguintes objetivos: 1)conhecer a herança da resistência à raça 4⁺ do NCS; 2)saber se existe ligação do loco *i* com o (s) loco (s) de resistência à raça 4⁺; e 3)identificar e mapear, com o auxílio de marcadores moleculares SSR, o (s) loco (s) de resistência à raça 4⁺.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Histórico e importância econômica da soja no Brasil

A soja, *Glycine max* (L) Merr., é originária do nordeste da China, onde foi domesticada. No Brasil, o primeiro registro de cultivo data de 1882, no Estado da Bahia. O Instituto Agrônomo de Campinas foi uma das instituições pioneiras em estudos com a cultura, promovendo a distribuição de sementes aos produtores rurais. Há também relato antigo, datado de 1900, de avaliação do potencial da soja para a produção de forragem no Rio Grande do Sul (Hasse, 1996, citado por Ferraz, 2002).

A notável expansão do cultivo da soja no Brasil teve lugar, no entanto, nos anos 70, quando a cultura passou a figurar entre os principais produtos capazes de gerar divisas ao País, em termos de exportação, e tomou-se, a partir de então, fator decisivo ao equilíbrio da balança comercial. Ao final da década de 1970, a cultura já ocupava uma área de cerrados, na Região Centro-Oeste, de aproximadamente 6 milhões de ha, o que representou grande desafio aos pesquisadores, haja vista que o cultivo em regiões com latitudes abaixo de 20° era considerado pouco recomendável sob o ponto de vista de desempenho econômico. O trabalho admirável desenvolvido pelos melhoristas possibilitou a obtenção de cultivares que se mostraram, a um só tempo, bem adaptadas àquela região e altamente produtivas (Silva, 2000). Na safra 2002/03, quando foram produzidas no País 52.066.600 toneladas de soja, as regiões com latitudes inferiores a 20° contribuíram com mais de 50% deste total (CONAB, agosto/2003).

2.2 O 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), e atualmente está presente em mais de 100 municípios, em nove estados (MG, MS, MT, GO, SP, PR, RS, BA e TO), cobrindo mais de 2.500.000 ha (Silva et al., 2002). Sua origem no País é desconhecida. Possivelmente tenha sido introduzido via semente ou outro meio que transporta solo, proveniente de países onde o problema já ocorre há vários anos (Mendes & Machado, 1992). Também considera-se a hipótese de que o nematóide de cisto da soja já existisse no país, em pequenos pontos isolados e em baixa população, e somente após vários anos de cultivo de soja tenha atingido níveis populacionais elevados, capazes de causar sintomas visíveis, a ponto de detectado. Entretanto, é pouco provável que essa última hipótese seja verdadeira, em função da alta agressividade do patógeno nas lavouras brasileiras.

2.2.1 Biologia, ciclo de vida, sintomas e medidas de controle do NCS

O gênero *Heterodera* se caracteriza pela formação de cistos. Cisto é o corpo da fêmea adulta morta, de cor marrom, altamente resistente às condições adversas e contendo, em média, 500 ovos (Taylor, 1971). Os ovos no interior do cisto, já fertilizados, sofrem embriogênese, dando origem ao juvenil de primeiro estágio (J_1). Esse tem sua ecdise, ou troca de cutícula, dentro do ovo e torna-se o juvenil de segundo estágio (J_2), que eclode, migra no solo e invade as raízes da planta hospedeira. Após a penetração, o J_2 , induzindo a modificação de um conjunto de células da soja no local de penetração, estabelece o sítio de alimentação, os sincítios, que passam a fornecer alimento para o nematóide. O

J₂ continua a se desenvolver, sofre mais três ecdises e, finalmente, atinge a fase adulta, de macho ou fêmea (Schmitt & Barker, 1985; Taylor, 1971). As fêmeas aumentam de volume, assumem o formato de limão, de coloração branca amarelada, e permanecem fixadas à raiz, com o corpo do lado de fora e a parte anterior internamente nos tecidos radiculares. Os machos têm corpo alongado, passam para o solo e, após a fertilização das fêmeas, morrem (Taylor, 1971). Durante a postura, a fêmea deposita cerca de um terço dos ovos numa pequena matriz gelatinosa, liberada pelo ânus, e o restante permanece retido no interior do seu corpo. Ao morrer, o corpo da fêmea transforma-se no cisto, que tem coloração marrom-escuro e é muito resistente à deterioração e à dessecação (Schmitt & Noel, 1984; Taylor, 1971). Os ovos protegidos pelo cisto podem sobreviver por oito anos ou mais no solo, na ausência de planta hospedeira (Moore et al., 1984).

A duração do ciclo de vida é muito influenciada pela temperatura e umidade do solo. Considerando apenas a temperatura do solo durante a estação de cultivo da soja, com médias semanais variando de 22°-29°C, *H. glycines* atinge a maturidade em três semanas (Schmitt & Riggs, 1989). Desse modo, em uma cultivar de soja de ciclo tardio são possíveis de seis a sete gerações do patógeno.

O sintoma inicial de ocorrência do NCS nas lavouras de soja caracteriza-se pela presença de reboleiras, onde as plantas mostram-se atrofiadas e cloróticas, com poucas vagens. Em locais onde a população do patógeno é muito alta, também pode ocorrer morte prematura de plantas (Riggs & Schmitt, 1989). Cuidados devem ser tomados, uma vez que deficiência de alguns elementos, especialmente nitrogênio, potássio e certos micronutrientes, fitotoxidade por defensivos agrícolas, compactação do solo e outras desordens fisiológicas podem ocasionar os mesmos sintomas na parte aérea das plantas. Portanto, o

diagnóstico definitivo deve ser realizado com base nos sinais, ou seja, a presença de fêmeas de cor branca ou amarela presas às raízes.

Por ser uma estrutura leve e altamente resistente, o cisto constitui a mais eficiente unidade de dispersão do nematóide. Isso permite que o mesmo seja facilmente levado de uma área para outra, a curtas ou longas distâncias, por qualquer meio que promova movimento de solo. Assim, o patógeno pode ser disseminado por vento, água (de chuva ou irrigação), máquinas agrícolas, homem e animais domésticos e selvagens (Moore et al., 1984). As sementes constituem outro importante meio de disseminação. Sementes de soja ou de outras espécies vegetais, provenientes de áreas infestadas, podem estar misturadas a torrões com cistos incrustados e serem responsáveis pela introdução do patógeno em áreas onde ainda não ocorra (Riggs & Schmitt, 1989; Moore et al., 1984). A limpeza de máquinas, implementos agrícolas, veículos e até mesmo calçados, para eliminar solo aderente (Palm et al., 1978), e o uso de sementes livres de torrões são medidas que podem prevenir a disseminação.

Em áreas onde o problema já foi identificado, o produtor deve conviver com o patógeno. Algumas medidas ajudam a minimizar as perdas. Entre elas, destacam-se a rotação de culturas com plantas não hospedeiras e o uso de cultivares resistentes. A utilização de cultivares resistentes, ainda que dificultada pela grande variabilidade genética do parasita, é o método de controle mais econômico e de melhor aceitação pelo produtor.

2.2.2 Variabilidade genética do NCS

Heterodera glycines apresenta grande variabilidade genética (Ross, 1962; Miller, 1969a,b; Miller, 1971; Riggs et al., 1968, 1981). Isso ficou muito bem documentado nos Estados Unidos, com a utilização de cultivares resistentes. A raça 3 era predominante naquele país quando a primeira cultivar

resistente, 'Pickett', foi desenvolvida (Brim & Ross, 1966). Depois de poucos anos de cultivo de 'Pickett' e de outras cultivares com resistência derivada de 'Peking', a raça 4, atualmente classificada como raça 14 (Riggs & Schmitt, 1988), foi detectada em algumas regiões. Novamente outras cultivares resistentes às raças 3 e 14, derivadas da PI 88788, foram liberadas para cultivo e a raça do nematóide mudou, tornando-se agora raça 5 ou 2 (Koenig & Barker, 1998; Young, 1990).

Pesquisadores observaram que isolados distintos do NCS exibiam capacidades similares de reprodução em introduções de plantas. Desse modo, uma classificação dessas populações tornou-se possível. Em 1969, um grupo de nematologistas e melhoristas de soja, reunidos em um simpósio de pesquisas sobre o NCS em Beltsville, Maryland, USA, propuseram o termo raça para diferenciar os isolados, com base nas suas habilidades em reproduzir sobre uma série diferenciadora de genótipos de soja (Golden et al., 1970). Foram escolhidas como diferenciadoras as cultivares Peking e Pickett e duas PIs, 88788 e 90763. A cultivar Lee foi recomendada como padrão de suscetibilidade. A designação da raça é feita com base no número de fêmeas do nematóide formado sobre cada diferenciadora, em relação ao número encontrado em 'Lee'. Para cada diferenciadora, é calculado um índice de fêmeas (IF), isto é, $IF (\%) = (\text{número médio de fêmeas na diferenciadora} / \text{número médio de fêmeas em 'Lee'}) \times 100$. Se a diferenciadora apresentar um $IF < 10\%$, é classificada como resistente (-). Ao contrário, se apresentar IF maior ou igual a 10%, é tida como suscetível (+). Inicialmente foram designadas quatro raças. Entretanto, com a crescente utilização de cultivares resistentes, surgiram isolados que não se enquadravam naquelas raças propostas. Para abrigá-los, o esquema de Golden et al. (1970) teve que ser expandido e permitiu a caracterização de até 16 raças (Riggs & Schmitt, 1988). Dessas, as raças 11, 12, 13 e 16 são apenas hipotéticas, visto que

a cultivar Pickett é derivada de 'Peking' e não herdou toda a sua resistência (Riggs et al., 1977).

No final da década de 80 foi identificada uma nova fonte de resistência ao NCS, a PI 437654. Esse genótipo apresenta resistência a todas as raças conhecidas (Anand et al., 1988; Anand, 1991, 1992). Do cruzamento dessa PI com 'Forrest', foi produzida 'Hartwig' (Anand, 1992). Essa cultivar, também com resistência múltipla, passou a ser amplamente utilizada nos programas de melhoramento de soja. Schmitt & Shanon (1992) e Rao-Arelli et al. (1992b), prevendo que a pressão de seleção dessa nova fonte de resistência (PI 437654 e sua descendência) resultaria em alterações na capacidade genética do nematóide em parasitar, propuseram a inclusão da PI 437654 como um genótipo adicional nos testes para identificação de raças. No Brasil, além dessa introdução, também é rotina a inclusão da cultivar Hartwig, o que possibilitou a detecção das raças 4⁺ e 14⁺ (Dias et al., 1998, 1999a). Essas duas populações diferem das raças 4 e 14 tradicionais pelo fato de multiplicarem em 'Hartwig'. Essas diferenças também foram detectadas molecularmente mediante a utilização de marcadores RAPD (Abdelnoor et al., 2001). Para permitir a separação de populações do NCS capazes de reproduzir em 'Hartwig', Dias et al. (1998) sugeriram a inclusão dessa cultivar, como uma nova diferenciadora, nos testes para identificação de raças. No entanto, ao invés de expandirem o esquema de Riggs & Schmitt (1988), propuseram que o número da raça venha acompanhado de um sinal positivo (+) toda vez que 'Hartwig' apresentar um IF superior a 10%.

No Brasil, apesar de o NCS praticamente ainda não ter sofrido pressão de seleção, pelo uso de cultivares resistentes, já foram detectadas as raças 1, 2, 3, 4, 4⁺, 5, 6, 9, 10, 14 e 14⁺ (Dias et al., 1999b), com predominância da raça 3. Isso mostra que a variabilidade genética do patógeno, em território brasileiro, parece ser ainda maior do que a observada nos Estados Unidos.

2.2.3 Fontes de resistência ao NCS

A utilização de cultivares resistentes é o método mais eficiente de controle do NCS. Tão logo esse patógeno foi detectado nos Estados Unidos (Winstead et al., 1955), fontes de resistência começaram a ser testadas, entre as quais várias foram identificadas e passaram a ser utilizadas, com sucesso, nos programas de melhoramento. Todavia, a base genética da resistência nas cultivares de soja americanas é relativamente estreita (Yue et al., 2000). Segundo Hartwig (1985) e Rao-Arelli (1994), a maioria dos materiais resistentes tem genes de 'Peking' (raças 1, 3 e 5), PI 88788 (raças 3 e 14) ou de ambas. Desse modo, o patógeno pode facilmente superar a resistência dessas cultivares. A coleta e a caracterização genética de novas fontes de resistência têm que ser atividades constantes.

A primeira pesquisa nos Estados Unidos, conduzida na Carolina do Norte para a identificação de fontes de resistência ao NCS, resultou na identificação das PIs 90763, 84751 e 209332 e das cultivares Ilsoy e Peking (Ross & Brim, 1957). Entretanto, todos os genótipos resistentes a essa população de campo, provavelmente raça 1, possuíam semente preta. 'Peking', por ser agronomicamente superior, passou a ser largamente utilizada nos programas americanos de melhoramento de soja (Hartwig, 1985; Skorupska et al., 1994).

Do cruzamento de 'Peking' com 'Lee' (suscetível) resultou 'Pickett', a primeira cultivar de soja com semente amarela e resistente às raças 1 e 3 do NCS (Brim & Ross, 1966). Em seguida surgiram 'Custer' (Lueders et al., 1968) e 'Dyer' (Hartwig & Epps, 1972). Todas essas cultivares possuíam alto grau de resistência às raças 1 e 3, mas na ausência do nematóide geralmente produziam menos que os materiais suscetíveis. Posteriormente foram surgindo cultivares resistentes e altamente produtivas, a exemplo de 'Forrest'. A utilização dessa cultivar em sete estados americanos, de 1975 a 1980, resultou em economia de

401 milhões de dólares (Bradley & Duffly, 1982, citados por Boerma & Hussey, 1992).

O uso contínuo das cultivares resistentes derivadas de 'Peking' resultou no aparecimento de populações do NCS capazes de multiplicar nesses genótipos. Na tentativa de encontrar maiores níveis de resistências às novas raças detectadas, avaliações intensivas do banco de germoplasma americano de soja foram realizadas. Oito materiais, PI 88788, PI 89772, PI 87631-1, 'Cloud', 'Columbia', 'Peking', PI 847521 e PI 90763, mostraram alguma resistência à raça 4 (Epps & Hartwig, 1972).

Embora pelo esquema de Golden et al. (1970) a PI 88788 tenha sido classificada como suscetível à raça 4, avaliações posteriores mostraram que a mesma possuía um nível relativamente alto de resistência (Thomas et al., 1975; Hartwig, 1985). Essa introdução também é resistente às raças 3, 6, 9 e 14 (Riggs & Schmitt, 1988). Assim, novas cultivares resistentes às raças 3 e 14, derivadas da PI 88788, tais como 'Bedford', 'Epps', 'Jeff' e 'Leflore', foram subsequenteiramente liberadas e passaram a ser cultivadas em larga escala nos Estados Unidos (Caviness, 1992).

Populações do NCS capazes de multiplicar na PI 88788 (raças 2 e 5) passaram a ser encontradas no Tennessee (Young, 1982b), Arkansas (Hancock et al., 1987) e Carolina do Norte (Koening & Barker, 1998). Fontes de resistência a essas novas raças tiveram que ser procuradas. 'Peking', PI 90763 e PI 89772 foram testadas e mostraram níveis relativamente altos de resistência à raça 5 (Hartwig, 1985). A raça 2, ao contrário da raça 5, se multiplica em 'Peking'. A PI 90763 é uma fonte de resistência para as raças 2 e 5, mas não chegou a ser muito utilizada. Uma cultivar resistente às raças 2, 3, 5 e 14, com genes de 'Peking', PI 88788 e da PI 90763, foi liberada com o nome de 'Cordell' (Hartwig & Young, 1990).

Anand & Galo (1984) avaliaram, em casa-de-vegetação, a reação de cerca de 10.000 linhagens à raça 3 do NCS e encontraram 45 resistentes ou moderadamente resistentes. Dessas, 20 mostraram níveis moderados ou altos de resistência à raça 4 e oito foram resistentes à raça 5. Uma introdução, a PI 437654, mostrou resistência às três raças testadas e surgiu como uma nova fonte de resistência.

A PI 437654 apresenta resistência à raça 3 (Anand & Galo, 1984), 1, 2, 5 e 14 (Anand 1985), 6 e 9 (Rao-Arelli et al., 1992b) e às raças 4, 4⁺ e 14⁺ (Dias et al., 1998, 1999a). Seus níveis de resistência, para a maioria das raças, são superiores aos apresentados por qualquer outro genótipo de soja conhecido (Webb et al., 1995). Segundo Myers & Anand (1991), essa PI possui dois ou três locos de resistência para a raça 3, dois ou quatro para a raça 5 e três ou quatro para a raça 14, podendo ser vista como uma pirâmide natural de genes de resistência ao NCS. Tentativas para selecionar populações de *H. glycines* capazes de parasitar esse genótipo não tiveram sucesso (Luedders & Anand, 1989). Espera-se que a resistência da PI 437654 permaneça estável por muitos anos. Entretanto, como essa introdução apresenta baixa adaptação e tem semente preta, sua resistência necessita ser introduzida em germoplasma elite de soja (Webb et al., 1995).

Do cruzamento da PI 437654 com 'Forrest', foi produzida 'Hartwig' (Anand, 1991, 1992). Essa cultivar tem semente amarela e apresenta resistência a todas as raças do NCS detectadas nos Estados Unidos. Por ser pouco produtiva, não chegou a ser muito cultivada, mas passou a ser largamente utilizada nos programas de melhoramento genético de soja em todo o mundo. No Brasil, diferentemente da PI 437654, mostrou-se suscetível a duas populações do NCS (Dias et al., 1998, 1999a).

Apesar da descoberta de uma fonte com resistência múltipla ao NCS, a PI 437654, outras fontes adicionais foram avaliadas quanto à reação às raças 3,

5 e 14 (Young, 1990). Dessas, a PI 424137B foi moderadamente resistente às três raças e as PIs, 399061, 424595 e 438342, altamente resistentes à raça 5, mas suscetíveis às raças 3 e 14. Esse foi o primeiro relato de um genótipo de soja suscetível à raça 3, mas altamente resistente a outras raças. Mais recentemente, foi encontrado um novo acesso de soja, a PI 438489B, com resistência às raças 1, 2, 3, 5, 6, 9 e 14 (Rao-Arelli et al., 1992b; Diers et al., 1997).

No Brasil, quando o NCS foi detectado pela primeira vez, não existia nenhuma cultivar resistente. Para solucionar o problema, a Embrapa Soja, juntamente com parceiros da pesquisa estadual e produtores de sementes, implementou um dinâmico programa de melhoramento para incorporar resistência às cultivares nacionais. São utilizados como fontes de resistência genótipos originados de 'Peking', PI 88788, PI 90763 ou da PI 437654. Os primeiros resultados desse trabalho possibilitaram o lançamento das cultivares BRSMG Renascença e BRSMG Liderança, resistentes à raça 3, para Minas Gerais; BRSMG Preciosa, resistente à raça 3, para Minas Gerais, São Paulo, Goiás e Distrito Federal; BRSMG Robusta, resistente à raça 3, para Minas Gerais, Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso e Bahia; BRSMT Pintado, BRSMT Tucunaré, BRSMT Caxara, BRSMT Matrinchã e BRSMT Piraíba, resistentes às raças 1 e 3, para Mato Grosso; BRSGO Chapadões, resistente às raças 1, 3, 4 e 14, e BRSGO Ipameri, resistente às raças 3 e 14, para Goiás, dentre outras. Diferentemente do ocorrido nos Estados Unidos, as primeiras cultivares resistentes brasileiras têm alcançado altas produtividades e, conseqüentemente, vêm tendo grande aceitação pelos sojicultores. Na safra 2001/02, cerca de 2.000.000 de hectares foram semeados com soja resistente.

2.2.4 Genética da resistência da soja ao NCS

A base genética da resistência em soja ao NCS é complexa e ainda não bem entendida (Anand & Rao-Arelli, 1989; Caviness, 1992). Podem estar envolvidos um bloco de genes e/ou um ou poucos genes com vários alelos (Anand & Rao-Arelli, 1989; Caviness, 1992; Hancock et al., 1987; Hartwig, 1985; Mansur et al., 1993). Análise de relacionamento genético indica que os genes de resistência podem estar compartilhados entre diferentes fontes (Rao-Arelli & Anand, 1988). Também é freqüente a ocorrência de ligação entre os alelos de resistência às diferentes raças (Hartwig & Young, 1986) e entre os locos de resistência e o loco *i*, que confere cor preta ao tegumento da semente da soja (Matson & Williams, 1965; Yue et al., 2000; Qiu et al., 1997; Webb et al., 1995). Segundo Mansur et al. (1993), trata-se de uma resistência quantitativa, pois distribuições contínuas dos fenótipos, de zero a muitos cistos, têm sido observadas. Entretanto, na grande maioria dos estudos realizados para conhecer o controle genético da resistência foram adotados modelos qualitativos (Tabela 1).

Mansur et al. (1993) investigaram, adotando procedimentos da genética quantitativa, a genética da resistência à raça 3 do NCS em cruzamentos envolvendo os genótipos de soja 'A20' (tipo 'Peking'), 'Jack' (tipo PI 88788) e 'Cordell' (genes de 'Peking', PI 90763 e PI 88788) como parentais resistentes e 'A2234' e 'DSR-284' como parentais suscetíveis. Segundo os autores, as estimativas de herdabilidade foram altas em todos os cruzamentos, um modelo genético aditivo foi suficiente para explicar a maioria da variação genética e não mais que quatro genes estavam envolvidos na herança do caráter.

Em outro estudo, em que também foi empregada a genética quantitativa, Assunção (2000) hipotetizou um modelo de dois genes, um principal e um

menor, para explicar a resistência à raça 3 do NCS nas PIs, 89772, 88788 89772 e 209332.

TABELA 1 Relação de alguns estudos adotando modelos qualitativos, para elucidar o controle genético da resistência ao NCS.

Fontes de Resist.	Raças	Genes Encontrados	Referências
'Peking'	1	3 recessivos	Caldwell et al. (1960)
'Peking'	3	3 recessivos e 1 dominante	Matson & Williams (1965)
PI 88788	3	1 recessivo e 2 dominantes	Rao-Arelli et al. (1992a)
PI 90763 e 'Peking'	3	1 dominante e 2 recessivos	Rao-Arelli et al. (1992a)
PIs 89772 e 209332	3	1 dominante e 2 recessivos	Rao-Arelli (1994)
PI 438489B	3	2 recessivos	Rao-Arelli (1994)
PI 438489B	1, 3 e 5	2 dominantes e 1 recessivo	Yue et al. (2000)
PI 438489B	2	1 dominante e 3 recessivos	Yue et al. (2000)
PI 438489B	14	3 recessivos	Yue et al. (2000)
PI 88788	4	2 dominantes e 1 recessivo	Thomas et al. (1975)
PI 90763	X (2)	1 recessivo	Hancock et al. (1987)
BR90-4722	3	1 dominante e 2 recessivos	Mauro et al. (1999)
PI 424595	5	3 recessivos	Anand (1994)
PI 90763	5	1 dominante e 2 recessivos	Anand (1994)
PI 424595	5	1 dominante e 1 recessivo	Anand (1994)
PIs 399061, 424595 e 438342	5	3 ou mais	Young & Kilen (1994)
PI 437654	5	2 dominantes e 2 recessivos	Myers & Anand (1991)
PI 437654	5	2 dominantes e 1 recessivo	Myers & Anand (1991)
'Peking'	1, 3 e 5	1 dominante e 2 recessivos	Qiu et al. (1997)

2.2.5 Marcadores moleculares ligados a alelos de resistência ao NCS

Atualmente, a utilização de marcadores moleculares em programas de introgressão de alelos por meio de retrocruzamentos é o exemplo mais concreto de melhoramento genético assistido por marcadores. O uso de marcadores moleculares ligados a alelos de resistência a doenças é de grande importância na seleção de genótipos resistentes, principalmente quando o objetivo é introduzir dois ou mais genes, quando o fenótipo é de determinação complexa ou quando o processo de avaliação requer a destruição da planta, como normalmente é o caso dos nematóides de cisto e galha (Lanza et al., 2000). A seleção assistida por marcadores apresenta várias vantagens sobre o método tradicional de seleção, pois permite que um grande número de linhagens seja analisado em poucos dias e em qualquer época do ano, uma vez que não é influenciada pelas condições ambientais. A identificação precoce das plantas resistentes permite a eliminação dos tipos indesejáveis nas fases iniciais do desenvolvimento das plantas, economizando mão-de-obra e espaço em casa-de-vegetação, além de reduzir o número de linhagens para a seleção pelos melhoristas (Abdelnoor & Almeida, 1999).

Diversos marcadores moleculares, como RFLP, RAPD, microssatélites e AFLP, já foram utilizados para mapear genes de resistência ao NCS em soja. Um loco principal recessivo (*rhg1*) para resistência parcial, localizado no grupo de ligação molecular G, está presente em várias fontes de resistência, incluindo 'Peking' (Mahlingam & Skorupska, 1995; Chang et al., 1997; Mathews et al., 1998; Meksem et al., 2001), PI 209332 (Concibido et al., 1996a,b), PI 88788 (Concibido et al., 1997; Bell-Johnson et al., 1998; Cregan et al., 1999a,b,c), PI 90763 (Concibido et al., 1997) e PI 437654 (Webb et al., 1995). Esse loco controla mais de 50% da variação total para a resistência e o alelo é efetivo contra várias raças (Concibido et al., 1994, 1995, 1996a,b; 1997; Webb et al.,

1995). Um segundo alelo dominante (*Rhg4*) confere igual porção da resistência em genótipos derivados de 'Peking' (Malhalinganm & Skoruska, 1995; Chang et al., 1997; Mathews et al., 1998; Mcksem et al., 2001) e PI 437654 (Webb et al., 1995; Prabhu et al., 1999), mas não naqueles derivados das PIs, 88788, 209332 ou 90763 (Concibido et al., 1997).

2.2.5.1 Resistência derivada de 'Peking'

Mahalingan & Skorupska (1995) empregaram marcadores RFLP e RAPD para mapear locos de resistência à raça 3 do NCS em uma população F_2 de soja derivada do cruzamento de 'Peking' (resistente) com 'Essex'. Dois marcadores RFLP (*pA136* e *pA635*), localizados, respectivamente, nos grupos de ligação molecular A e C e herdados independentemente, foram significativamente associados com resistência. Explicaram 12,5% e 8,0% da variação fenotípica total, respectivamente. A sonda *A136* hibridizou-se próximo ao loco *i* e foi altamente informativa com relação à resistência. Três marcadores RAPD (*E01c*, *G15d* e *S07a*) mostraram-se significativamente associados com resistência à raça 3. O *primer* *S07a*, localizado no grupo de ligação A, a 17,0 cM do loco *i*, explicou 8,0% da variação na resposta ao nematóide. *E01c* também foi mapeado no grupo A (a 23,5 cM da sonda *pA96a*) e, como não mostrou nenhuma ligação com o loco *i* ou com outras sondas ao redor de *i*, sugere a existência, nesse grupo, de um segundo loco de resistência com efeito menor. *G15d* foi mapeado a 30,0 cM de *pA401*, um *primer* localizado no grupo de ligação F. A constatação de dois marcadores associados com a resistência, próximos ao loco *i*, confirma a existência do gene *Rhg4* em 'Peking'.

Com base em análise de regressão entre marcadores RFLP, loco *i* e diferentes raças do NCS, Qiu et al. (1997) formularam a hipótese de que 'Peking' pode ter locos alélicos similares condicionando resistência às raças 1 e

3, mas não compartilha alelismo entre as raças 1 e 5 ou entre 3 e 5. Nesse estudo, em que foram avaliadas populações segregantes de soja originadas do cruzamento de 'Peking' (resistente) com 'Essex' (suscetível), quatro marcadores RFLP (*pT05* no grupo de ligação B (*pA18* em E, *pB72* em H e *pK104* em H ou F) foram significativamente associados a locos de resistência às raças 1 e 3, explicando, respectivamente, 52% e 28,5% das variações fenotípicas totais. Nenhum desses marcadores mostrou ligação com a resistência à raça 5. O loco *i* foi ligado com a resistência às raças 1 e 3, mas não à raça 5.

Qiu et al. (1999), estudando populações segregantes de soja oriundas do cruzamento de 'Peking' com 'Essex', identificaram marcadores RFLPs ligados a locos de resistência às raças 1, 3 e 5 do NCS. Cinco marcadores (*A593* e *T005*, no grupo de ligação B; *A018*, no E e *K014* e *B072*, no H) mostraram-se ligados a locos de resistência à raça 1; três (*B072* e *K014*, no grupo de ligação H e *T005*, no B) a locos de resistência à raça 3; e dois (*K011*, no grupo de ligação I e *A963*, no E) foram associados com a resistência à raça 5.

A resistência de campo à raça 3, em 'Forrest', é condicionada por dois QTLs (*quantitative trait loci*): um contendo o gene *rhg1*, no grupo de ligação G, e outro o *Rhg4*, no grupo de ligação A2. Meksem et al. (2001) empregaram populações de linhagens endogâmicas recombinantes (uma) e de linhagens quase isogênicas (duas), derivadas do cruzamento de 'Forrest' (resistente) com 'Essex' (suscetível), para mapear locos de resistência à raça 3. A análise de *bulks* segregantes, com 512 combinações de *primers* AFLP e microsatélites, produziu um mapa genético de alta densidade para o intervalo compreendendo os genes *rhg1* e *Rhg4*. Os dois QTLs envolvidos na resistência foram fortemente associados com os marcadores AFLP *E_{ATG}M_{CGA}87*, no grupo de ligação G, e *E_{CCG}M_{MC}405*, no grupo A2.

Chang et al. (1997), trabalhando com populações F₃ derivadas do cruzamento de 'Forrest' com 'Essex' (suscetível), verificaram a presença de um

loco para resistência parcial à raça 3 do NCS, no grupo de ligação G, próximo aos marcadores de RAPD *O103₄₅₀* e *OW15₄₀₀*. O QTL para resistência identificado pelo marcador *O103₄₅₀* está localizado dentro de uma região genômica fortemente associada com resistência à síndrome da morte súbita (SDS), causada por *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*.

Doubler et al. (1997), avaliando linhas quase isogênicas de soja provenientes do cruzamento de 'Forrest' (resistente) com 'Essex' (suscetível), identificaram, no grupo de ligação G, um QTL de resistência à raça 3 estreitamente ligado aos marcadores *Bng122D* (RFLP) e *O103₄₅₀* (RAPD).

Polimorfismos de DNA, RAPD e SSR foram utilizados para identificar marcadores moleculares ligados a locos de resistência à raça 3 (Carvalho, 1999). Nesse trabalho foram utilizadas 60 linhagens de soja segregantes (F_{4.5}) provenientes do cruzamento 'Centennial' x {[BR-16 x (BR-37-555 x 'Ocepar 9')] x 'Sharkey'}. De 1000 *primers* RAPD testados, quatro (*OPAG-05*, *OPF-04*, *OPAQ-01* e *OPAG-01*) foram polimórficos entre os *bulks* resistentes e suscetíveis. Dos sete microssatélites, somente o *Satt187* (mapeado no grupo de ligação A2) mostrou-se polimórfico. Análises de correlação indicaram que os marcadores *OPAG-05*, *OPF-04* e *OPAQ-01* estão localizados em uma mesma região genômica. Essa região é diferente daquela em que se encontram os marcadores *OPAG-01* e *Satt187*. As eficiências de seleção alcançadas com a utilização isolada dos *Satt187*, *OPAG-05*, *OPF-04*, *OPAQ-01* e *OPAG-01* foram, respectivamente, de 83,0%, 63%, 61%, 61% e 51%. A utilização do *Satt187*, em combinação com os marcadores *OPAG-05* ou *OPAQ-01*, resultaram em eficiências de seleção de 96,6% e 96,5%, respectivamente.

Na UNESP/FCAVJ, em Jaboticabal-SP, quatro marcadores SSR foram testados, com relação à associação a locos de resistência à raça 3 do NCS, em genótipos segregantes de soja provenientes do cruzamento de uma cultivar resistente (resistência derivada de 'Peking') com uma suscetível (Mauro et al.,

2002). Desses, três (*Satt309*, *Sat-168* e *Sat-163*) mostraram-se estreitamente ligados ao alelo de resistência *rhg1*, no grupo de ligação G, e um (*Sat-162*) ao alelo de resistência *Rhg4*, no grupo de ligação A2. Segundo os autores, dos *primers* testados, o melhor foi o *Sat-162*, que produziu bandas para genótipos resistentes (150pb) e suscetíveis (200 pb).

2.2.5.2 Resistência derivada da PI 437654

Na PI 437654, três locos para resistência à raça 3 do NCS foram mapeados, nos grupos de ligação A, G e M, pelos marcadores *i* (cor do tegumento da semente), *php05354a* (RFLP) e *php02301a* (RFLP), respectivamente (Webb et al., 1995). Os locos identificados nos grupos de ligação A e G, juntos, oferecem resistência completa a essa raça. O alelo de resistência *Rhg4* foi mapeado, no grupo de ligação A, a menos de 1 cM do loco *i*. Os dois QTLs de resistência identificados nos grupos G e M distaram dos respectivos marcadores em cerca de 3 cM. Segundo os autores, a PI 437654 e 'Peking' têm os mesmos locos para resistência à raça 3.


Para mapear locos de resistência à raça 3 do NCS na cultivar Hartwig, Vierling et al. (1996) avaliaram as reações de 200 linhagens F_{2:3} originadas do cruzamento de 'Hartwig' (resistente) com 'Williams 82' (susceptível) e testaram 56 marcadores moleculares polimórficos (53 RFLPs e 3 SSR). Quatro marcadores RFLP não ligados (*A006*, *A567*, *A487* e *A112*) mostraram efeitos significativos sobre a resistência, com coeficientes de determinação (R^2) de 91%, 1%, 1% e 1%, respectivamente. Entretanto, a resistência completa somente foi possível na presença dos quatro locos.

Prabhu et al. (1999) testaram a efetividade dos marcadores *BLT65* (RFLP) e *Satt 038* (SSR) em selecionar linhagens recombinates de soja oriundas do cruzamento de 'Hartwig' (resistente ao NCS e moderadamente resistente à

SDS) com 'Flyer' (susceptível a ambos os patógenos) com relação à reação à raça 3 do NCS e à SDS (síndrome da morte súbita). A seleção com o *primer* BLT65 identificou, entre 671 linhagens, 281 contendo o alelo *Rhg4* (resistência ao NCS). Com o *Satt 038* foram identificadas, entre 613 linhagens, 230 que continham os alelos *Rfs* (resistência à SDS) e *rhg1* (resistência ao NCS). Os autores verificaram, ainda, que os índices médios de parasitismo pelo NCS somente foram baixos naqueles genótipos contendo ambos os alelos de resistência (*Rhg4* e *rhg1*).

Schuster et al. (2001) utilizaram marcadores moleculares para identificar e mapear QTLs de resistência à raça 14 do NCS em progênie de soja RC₃F₂₃ e F₂₃ derivadas do cruzamento de 'Hartwig' (resistente) com a linhagem BR-92-31983 (susceptível). Utilizando a técnica da análise de *bulks* segregantes, Michelmore et al. (1991) identificaram, na população RC₃F₂₃, quatro marcadores SSR (*Satt 082*, *Sat-001*, *Satt 574* e *Satt 301*) e quatro RAPD (*OPAA-11795*, *OPAE-08837*, *OPR-07548* e *OPY072030*) polimórficos. Esses marcadores foram amplificados em 183 famílias F₂₃ e mapeados em um loco, que explicou mais de 40% da resistência. A eficiência de seleção utilizando tais marcadores foi similar, ou até maior, como no caso da utilização dos *Satt 082*, *Sat-001* ou *Satt 574*, do que a obtida com o método convencional (inoculação). Esse novo QTL para resistência à raça 14 localizou-se no grupo de ligação D2 do mapa de ligação da soja (Cregam et al., 1999a).

Cervigni (1999) testou *primers* RAPD e SSR em *bulks* de DNA, resistente e susceptível, extraídos de uma população de soja RC₁F₂ derivada do cruzamento de 'Hartwig' (resistente a todas as raças do NCS) com a linhagem susceptível Y23. Os marcadores RAPD foram ineficientes em identificar polimorfismos no genoma dessa população. Dois microssatélites, *Satt 038* e *Satt 163*, mostraram ligação altamente significativa com resistência à raça 3 do NCS. Mediante a utilização do programa MAPMAKER/EXP versão 3.0, foi detectado



um alelo dominante a 11,4 cM do *Satt 038* e a 16,3 cM do *Satt 163*. Esse loco de resistência foi posicionado na região telomérica do grupo de ligação G. Quando ambos os marcadores estavam associados com a resposta ao nematóide, pôde-se também inferir sobre a presença de genes de efeitos menores. As eficiências de seleção obtidas com os *Satt 038* e *Satt 163* foram, respectivamente, de 91,54% e 90,27%. Estes resultados demonstram a utilidade dos marcadores SSR na identificação de genes de resistência ao NCS.

Arias et al. (2001) testaram, em uma população F₂ constituída de 121 linhagens de soja provenientes do cruzamento da cultivar Hartwig com a PI 437654, a eficiência de 82 *primers* polimórficos (50 RAPDs e 32 microsatélites) em mapear alelos de resistência à raça 4⁺ do NCS. Todos os 32 microsatélites segregaram de forma codominante. Dos RAPDs, apenas dois apresentaram esse tipo de segregação. A combinação dos dados obtidos com os dois tipos de marcadores gerou um total de 98 marcas, das quais 62, distribuídas em 21 grupos de ligação, mostraram-se geneticamente ligadas. O mapa produzido contém cerca de 653 cM e foram encontrados pelo menos dois QTLs significativamente associados com resistência à raça 4⁺. Esses QTLs localizaram-se nos grupos de ligação molecular A2 e G do mapa genético da soja (Cregam et al., 1999a). O QTL localizado entre os marcadores *Satt 187* e *AG20*, no grupo de ligação A2, explicou cerca de 60% da variação fenotípica. No mapa de Cregam et al. (1999a), o marcador *Satt187* está ligado aos genes *Rhg4* e loco *i*, no grupo de ligação A2. O QTL definido entre os marcadores *H4a* e *M17*, no grupo G (próximo ao microsatélite *Satt 191*), explicou somente 19% da variação fenotípica, mas também foi considerado significativamente associado com resistência à raça 4⁺.

2.2.5.3 Resistência derivada da PI 209332

Mudge et al. (1997), trabalhando com linhagens F₄₅ de soja derivadas do cruzamento da PI 209332 (resistente) com 'Evans' (suscetível), detectaram dois microssatélites (*Satt 038* e *Satt 130*) flanqueando um loco principal de resistência à raça 3 do NCS, no grupo de ligação G. Esses marcadores identificaram eficientemente o fragmento do cromossomo contendo o alelo de resistência. O *Satt 038* foi localizado a cerca de 3 cM, na região distal (telomérica), ao lado do loco de resistência. O *Satt130* localizou-se a aproximadamente 20 cM, na região proximal (centromérica). As precisões com que esses dois microssatélites distinguiram linhagens de soja suscetíveis e resistentes foram de 95% e 74%, respectivamente, para o *Satt 038* e *Satt 130*. A utilização dos dois marcadores, em combinação, permitiu a identificação dos fenótipos com 98% de precisão.

Concibido et al. (1994) utilizaram marcadores RFLP para identificar locos de resistência à raça 3 do NCS na linhagem de soja M85-1430. O estudo foi conduzido em 56 plantas F₂, oriundas do cruzamento da linhagem M85-1430 (resistência derivada da PI 209332) com a M83-15 (suscetível e derivada de 'Essex'). Dois marcadores (*pA85* e *pB32*) foram verificados estreitamente associados com a resistência. Juntos, explicaram 51,7% da variação fenotípica total. O marcador *pA85* foi tentativamente localizado no grupo de ligação A do mapa de RFLP da soja e mostrou-se ligado (10,9 cM) à cor do hilo da semente. O marcador *pB32* foi localizado no grupo de ligação K e mostrou forte influência na resposta ao nematóide (38% da variação total).

Para identificar locos de resistência parcial às raças 1, 3 e 6 do NCS na PI 209332, essa foi cruzada com 'Essex' (suscetível) e duas populações, uma F₂₃ e outra F₅₆, foram analisadas com marcadores RFLP (Concibido et al., 1996b). Um loco principal para resistência parcial, no grupo de ligação G

(próximo ao marcador *C006V*), foi efetivo contra as três raças. As porcentagens das variações fenótípicas para as raças 1, 3 e 6, explicadas por esse loco, foram, respectivamente, de 35%, 50% e 54%. Locos menores de resistência foram identificados pelos marcadores *A0641-2*, *B032V-1*, *A023T* e *A3151*, nos grupos de ligação D, J, L e K, respectivamente. Esses locos tenderam a ser raça-específicos.

2.2.5.4 Resistência derivada da PI 290136

Weisman et al. (1992) identificaram, em populações F_2 e F_3 de soja provenientes do cruzamento da PI 290136 (resistente) com 'BARC-2' (suscetível), um QTL de resistência à raça 3 do NCS entre os marcadores RFLP *pBLT24* e *pBLT65*. Com base em análise de Qui-quadrado para ligação, os autores comprovaram a existência de forte ligação do loco *i* com ambos os marcadores. Como as frequências de recombinação entre *pBTL24* e o loco *i* e entre *i* e o *pBTL65* foram de 4,4% e 4,0%, respectivamente, o loco *i* foi posicionado entre esses dois marcadores, fortemente ligados. Uma vez que o *i* é fortemente ligado (0,35 cM) ao loco *Rhg4*, ambos, *pBTL24* e *pBTL65* (ligados ao loco *i*), também podem estar fortemente ligados ao loco *Rhg4*.

Yue et al. (1998) testaram 158 marcadores RFLP para separar os parentais PI 438489B (resistente) e 'Hamilton' (suscetível). Desses, três (*K493*, *A381K* e *B072*) foram relacionados com resistência à raça 1 e um com resistência às raças 3 (*A381*), 5 (*A381*) e 14 (*B078*). Nenhum marcador foi associado com resistência à raça 2 do NCS ou com a cor preta da semente.

2.2.5.5 Resistência derivada da PI 438489B

Yue et al. (2001a) conduziram um estudo para investigar, na PI438489B, a herança da resistência às raças 1, 2, 3, 5 e 14 do NCS e encontrar marcadores moleculares associados com a resistência. Famílias F₂ e F₂₃, geradas pelo cruzamento dessa PI com a cultivar Hamilton (suscetível), foram analisadas com marcadores RFLP e microssatélites. Cinquenta e um marcadores RFLP e 64 microssatélites mostraram polimorfismos. QTLs associados com resistência foram ancorados nos grupos de ligação A1, A2, B1, B2, C1, C2, D1a, E e G. Esses QTLs explicaram 47,3%, 45,8%, 51,5%, 34,5% e 37,2% das variâncias fenotípicas totais para as raças 1, 2, 3, 5 e 14, respectivamente. QTLs de resistência à raça 1 foram ancorados nos grupo B1, B2, C2 e G; desses, o localizado no grupo G entre os marcadores *A096* (RFLP) e o *Satt 130* (microssatélite) foi o mais significativo. Cinco locos (nos grupos A1, B1, C, E e G) foram significativamente associados com resistência à raça 2. Quatro locos (nos grupos A2, G, B2 e D1a) mostraram-se altamente associados com resistência à raça 3. O loco de resistência localizado no grupo A2, entre os marcadores *K400* e *T155*, foi o mais importante e mostrou forte ligação com o loco *i*. Quatro QTLs (nos grupos B1, C2, D1a e G) foram encontrados ligados a locos de resistência à raça 5. Desses, o mais importante foi o do grupo de ligação B1, localizado a 3 cM do *Satt 583*. Para a raça 14, foram detectados três locos de resistência: um no grupo de ligação E, entre o marcador *A656* e o *Satt452*; outro no grupo C1, a 2 cM do marcador *A059*; e um terceiro no grupo D1a, entre os marcadores *A398* e *K476*.

2.2.5.5 Resistência derivada da PI 89772

Populações F_2 e F_{23} resultantes do cruzamento da PI 89772 com a cultivar Hamilton (suscetível) foram analisadas para a identificação de marcadores moleculares associados com resistência ao NCS (Yue et al., 2001b). Trinta e nove marcadores RFLP e 54 microssatélites, polimórficos, foram utilizados para ancorar locos de resistência às raças 1, 2, 3 e 5. As cores do hilo e do tegumento da semente também foram empregadas como marcadores. Três QTLs foram associados com resistência à raça 1, explicando 47.8% da variação fenotípica total; o localizado no grupo de ligação G (a 2 cM do microssatélite *Satt 309*) explicou a maior porção da variação fenotípica. Dois QTLs, nos grupos B1 e G, respectivamente, foram associados com resistência à raça 2 e explicaram 10% da variação fenotípica total. Dois QTLs mostraram ligação com resistência à raça 3, um no grupo E e outro no grupo G; o localizado no grupo G, a cerca de 4 cM do microssatélite *Satt 309*, explicou 23% da variação fenotípica total. Três QTLs, nos grupos de ligação G, B1 e D1, foram encontrados ligados à resistência à raça 5, mas nenhum explicou uma grande proporção da variação fenotípica total. O QTL do grupo G encontra-se na mesma região em que estão os locos para resistência às raças 1, 2 e 3. O loco do grupo B1 mostrou forte associação com os locos para resistência às raças 1 e 2.

2.2.5.6 Resistência derivada de mais de uma fonte

Kilo et al. (1997) empregaram marcadores microssatélites (SSR), RAPD e RFLP para estudar, em linhagens recombinantes de soja derivadas do cruzamento de 'Pyramid' (resistente aos dois patógenos) e 'Douglas' (suscetível aos dois patógenos), a co-herança das resistências à raça 3 do NCS e à SDS. A resistência ao NCS em 'Pyramid' é derivada de 'Peking' e da PI 88788. Os

marcadores *OA12₁₀₀₀* (RAPD) e *A085H* (RFLP), distanciados em 20 cM, conseguiram identificar, no grupo de ligação A2, o QTL correspondente ao alelo *Rhg4* (resistência ao NCS). Os marcadores *OD04₉₅₀* (RAPD) e *Satt38* (SSR), distanciados em 39 cM, permitiram mapear, no grupo de ligação G, o QTL correspondente ao alelo *rhg1* (resistência ao NCS). O marcador RAPD *OG01₃₉₀* foi significativamente associado com a resistência à raça 3 do NCS, explicando 14% da variabilidade. Um outro QTL de resistência ao NCS foi assinalado, no grupo de ligação D, pelos marcadores ligados (31 cM) *OG01₃₉₀* (RAPD) e *Satt 71* (SSR). Segundo os autores, esse QTL pode corresponder ao alelo *rhg5* (da PI 88788), pois, não tem sido detectado em linhagens de soja derivadas de 'Peking'. Ao contrário do observado em progênies de soja derivadas do cruzamento de 'Forrest' com 'Essex' (Chang et al., 1997), os alelos de resistência ao NCS e à SDS foram agrupados muito distantes (cerca de 20 cM).

Progênies originadas do cruzamento da linhagem J87-233 (resistente às raças 1, 2, 3, 5 e moderadamente resistente à raça 14 do NCS) com a cultivar Hutcheson (suscetível) foram utilizadas para avaliar a reação às raças 1, 2, 3, 5 e 14 do NCS e testar os grupos de ligação A, B, F, G, J, M, N e S com 215 marcadores RFLP e 45 RAPD (Heer et al. (1998). Dois QTLs de resistência, um para a raça 1 e outro para a raça 3, foram detectados próximos aos marcadores *BLT65V* e *SCAR 548/563_{1100-1025, 975}*, no grupo de ligação A2. O marcador *BLT65V* (RFLP dominante) descreveu 11,2% e 17,1%, respectivamente, da variação da resistência às raças 1 e 3. Para o *SCAR 548/563_{1100-1025, 975}* (codominante), as variações explicadas foram de 17,5% e 18,9%, respectivamente. Análises de ligação confirmaram os dois marcadores na mesma região do grupo de ligação A. Ainda no grupo A, outro marcador RFLP, *K4001*, mostrou-se ligado (5,2 cM) ao *SCAR 548/563_{1100-1025, 975}* e foi altamente significativo para resistência às raças 1 e 3. No grupo G, o marcador RFLP *K69T* descreveu 11,9% da variação da resistência à raça 1. O marcador *K002H*

(RFLP) mostrou algum nível de associação com resistência às raças 1 e 5, no grupo F. No grupo M, os marcadores polimórficos *A226H* e *A131T* explicaram significativa variação da resistência para as raças 1, 3 e 5. Nos demais grupos de ligação não foram detectadas regiões associadas com resistência ao NCS. Com relação à resistência à raça 14, níveis de significância somente foram detectados com dois marcadores RAPD não ligados (*OA08780* e *OG081130*) e um RFLP (*A2426D*).

Concibido et al. (1997) conduziram um estudo para identificar QTLs de resistência ao NCS em 'Peking' e nas PIs 90763 e 88788. Utilizando marcadores moleculares RFLP, os autores analisaram populações F₂ de soja originadas dos cruzamentos de cada uma dessas fontes de resistência com a cultivar suscetível 'Evans'. Os resultados obtidos nesse estudo foram comparados com os de um experimento anterior, envolvendo a PI 209332. Nos estudos com 'Peking', PI 209332 e PI 90763 foram inoculadas as raças 1, 3 e 6. Naqueles envolvendo a PI 88788, a raça 1 não foi incluída. Detectaram-se quatro locos para resistência parcial ao NCS. Um, localizado no grupo de ligação G (próximo ao marcador *C006V*), foi significativo para todas as populações de soja e raças do NCS estudadas. Um segundo loco foi ancorado no final do grupo de ligação G (próximo ao marcador *A378H*), do lado oposto ao marcador *C006V*. Os terceiro e quarto locos localizaram-se nos grupos de ligação J (próximo ao marcador *B032V-1*) e N (próximo ao marcador *A280Hae-1*), respectivamente. Comparações entre as diferentes raças indicaram que alguns dos prováveis locos de resistência comportam-se de forma raça-específica.

Cregan et al. (1999c) reportaram dois marcadores SRR (*Satt 309* e *Sat-168*) que mapeiam (0,4 cM) o alelo *rhg1*. A variação alélica no loco *Satt 309*, portando quatro alelos SSR, foi capaz de distinguir praticamente todos os genótipos de soja suscetíveis dos contendo o alelo de resistência *rhg1*, incorporado a partir de 'Peking', PI 437654 ou PI 90763. Esse microssatélite

também foi efetivo em distinguir as fontes de resistência PI 88788 e PI 209332 da maioria dos genótipos suscetíveis, mas não das cultivares Lee, Bragg, Essex, Archer, CNS, Dunfied, Hill, Noir 1 e Ogden, que contêm o alelo 1 do *Satt 309* em comum com essas duas fontes. Para resolver tal problema, um segundo marcador, *Sat-168*, foi desenvolvido a partir de um clone identificado com o *primer Satt 309*. Assim, o *screening* de genótipos de soja contendo o alelo *rhg1* (incorporado a partir de qualquer fonte) com estes dois marcadores (*Satt 309* e *Sat-168*) pôde ser realizado com alto grau de sucesso.

Guillin et al. (2002) utilizaram sete marcadores moleculares para estimar a frequência e a distribuição dos alelos *rhg1* e *Rhg4* (resistência ao NCS) em germoplama argentino de soja. Desses marcadores, quatro (*TMA5*, *Satt 309*, *Sat-141* e *Sat-163*) mostraram forte ligação ao *rhg1* e três (*A2D8*, *AK-HSDS* e *Satt 187*), ao *Rhg4*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Estudo da herança da resistência à raça 4⁺ do NCS

3.1.1 Material genético

Os parentais utilizados no presente estudo foram desenvolvidos pelo programa de melhoramento genético da Embrapa Soja e são os seguintes: 1) parental suscetível (tipo 'Hartwig')= linhagem E96-776, com sementes amarelas e oriundas do cruzamento 'Hartwig'⁴ x BR92-31830; 2) parental resistente (tipo PI 437654)= plantas E97-2502-9-3-1 (primeiro experimento) e E97-2502-9-3-5 (segundo experimento), com sementes pretas e selecionadas na geração F₄ do cruzamento E96-776² x PI 437654. A utilização de duas plantas irmãs, como parental resistente, deveu-se ao fato de as mesmas terem mostrado, em testes preliminares com parte das sementes F₂, padrões de segregação diferentes.

3.1.2 Obtenção das sementes

As hibridações foram realizadas na primavera de 1999, em casa-de-vegetação da Embrapa Soja, em Londrina, PR. Para haver coincidência de floração, cada parental foi semeado (4 sementes/vaso plástico de 5 kg contendo solo devidamente adubado e corrigido) semanalmente, durante um mês. Os cruzamentos artificiais, utilizando a linhagem E96-776 como mãe, aconteceram diariamente, sempre que havia flores adequadas. Para verificar possível efeito materno ou citoplasmático sobre o caráter em estudo, alguns cruzamentos recíprocos também foram realizados. Metade das sementes F₁ foi guardada em câmara fria e o restante, semeado e avançado para F₂. Para confirmar os cruzamentos, foi utilizado o marcador fenotípico cor de flor. Como em soja a cor

roxa da flor é dominante sobre a branca e o parental materno tinha flores brancas, todas as plantas oriundas dos cruzamentos iniciais possuíam, obrigatoriamente, flores roxas. Desse modo, plantas com flores brancas foram eliminadas.

Das sementes F_2 produzidas foi retirada, ao acaso, uma amostra com cerca 150 sementes, as quais foram semeadas separadamente para originar as famílias $F_{2,3}$ (família F_3 derivada de planta F_2). Com o objetivo de obter, para os estudos de herança, sementes com a mesma idade fisiológica, simultaneamente à semeadura das sementes F_2 , também foram colocadas para germinar sementes dos parentais e dos cruzamentos iniciais (F_{1s}). Um mês após a emergência, de cada planta, foram coletados aproximadamente dois gramas de folhas jovens. Essas folhas foram mantidas a -80°C e se serviram para a extração do DNA empregado nos testes com marcadores moleculares.

As plantas F_2 , diferentemente dos parentais e F_{1s} , foram colhidas individualmente. Para possibilitar o estudo de ligação do loco i com o(s) loco(s) de resistência à raça 4^* , cada planta F_2 foi classificada, conforme a coloração do tegumento de suas sementes, com as notas 1 (preto), 2 (amarelo heterozigoto) ou 3 (amarelo).

3.1.3 Avaliação da reação das plantas de soja à raça 4^* do NCS

O trabalho foi desenvolvido em casa-de-vegetação da Embrapa Soja, em Londrina, PR, e constou de dois experimentos. No primeiro, conduzido em outubro/novembro/2000, foram testadas as plantas do cruzamento E96-776 x E97-2502-9-3-1. O segundo experimento foi implementado durante os meses de novembro e dezembro daquele mesmo ano e compreendeu as plantas do cruzamento E96-776 x E97-2502-9-3-5. De cada cruzamento, foram avaliadas 120 famílias $F_{2,3}$, com sete repetições, 120 indivíduos F_2 , 20 indivíduos F_1 , 20

indivíduos do parental suscetível (P₁) e 20 do parental resistente (P₂). Também foram incluídas, utilizando-se sete repetições por genótipo, as diferenciadoras para raças do NCS ('Peking', 'Pickett', PI88788, PI90763 e 'Hartwig'), a cultivar Lee 68 (padrão de suscetibilidade) e a PI 437654 (padrão de resistência). O delineamento experimental de ambos os experimentos foi o inteiramente casualizado, definindo-se previamente, por sorteio, a posição de cada planta em uma das 10 mesas utilizadas. As médias diárias das temperaturas mínimas e máximas, no interior da casa-de-vegetação, durante a condução dos primeiro e segundo experimentos, ficaram em 21° e 35°C e 22° e 33°C, respectivamente.

Sementes dos genótipos de soja avaliados foram colocadas, separadamente, para germinar em vasos de plástico contendo areia lavada. Três dias após a emergência, as mudas foram transplantadas (uma por vaso) para o centro de um vaso de argila, com capacidade para um kg de solo, contendo mistura de solo e areia (1:2) tratada com brometo de metila. Dois dias após o transplante, cada plântula foi inoculada com 4 mL da suspensão de ovos, depositados com uma pipeta automática, a cerca de 2 cm de profundidade, em dois orifícios próximos ao colo da plântula. Os vasos, assim preparados, permaneceram no interior da casa-de-vegetação por 28 dias, quando ocorreu a avaliação.

Como inóculo utilizou-se uma população pura de *H. glycines*, raça 4*, originalmente coletada no município de Sorriso (MT) e que vinha sendo multiplicada, a cerca de cinco anos, na cultivar Hartwig. Após 30-35 dias de cultivo em vasos contendo solo infestado, a parte aérea das plantas foi eliminada, os sistemas radiculares, lavados sob jato forte de água, sobre peneiras de 20 e 100 mesh e as fêmeas do nematóide, recuperadas. Na seqüência, as fêmeas foram rompidas por atrito com o fundo de um tubo de ensaio e os ovos, recolhidos em peneira de 500 mesh e centrifugados em solução de sacarose (454 g de açúcar/L de água), a 2400 r.p.m., durante um minuto. Lavado o excesso de

sacarose, a suspensão de ovos foi recolhida em béquer e a sua concentração, estimada ao microscópio óptico com o auxílio de uma câmara de Peters e padronizada para 1000 ovos/mL.

Na avaliação, cada planta foi cuidadosamente retirada do vaso e teve o seu sistema radicular lavado sob jato forte de água, em peneira de 20 mesh acoplada sobre uma de 60, para a extração das fêmeas do nematóide. Em seguida, as fêmeas foram transferidas, em suspensão aquosa, para béquer devidamente identificado e, sob microscópio estereoscópico e com o auxílio de uma placa de acrílico quadriculada, foram quantificadas. No caso das famílias $F_{2,3}$ com sementes amarelas, as plantas resistentes foram transplantadas, para que pudessem produzir sementes. Foram consideradas resistentes as planta com índices de fêmeas (IF) inferiores a 10%, $IF (\%) = (\text{número médio de fêmeas no genótipo testado/número médio de fêmeas na cultivar Lee 68}) \times 100$ (Golden et al., 1970). Para identificação da raça, foram adotados o esquema de Riggs & Schmitt (1988) e as sugestões de Dias et al. (1998).

3.1.4 Análise Genética dos dados

Inicialmente foram construídos, com o auxílio do *software* Excel, para cada uma das gerações de ambos os cruzamentos, os gráficos de distribuição de frequências dos números de fêmeas do nematóide/planta.

Para a determinação do número de genes envolvidos na resistência, as famílias F_3 foram divididas em classes e testaram-se, aplicando o teste de Qui-quadrado (χ^2), modelos com um ou dois genes.

3.1.4.1 Genética quantitativa

Os dados de contagem das fêmeas foram organizados e analisados utilizando o Sistema de Genética Quantitativa (SGQ) da Embrapa Soja. Esse sistema permite determinar, para os parentais e gerações F_1 , F_2 e F_3 , os graus de liberdade, as médias, as variâncias totais e as variâncias entre e dentro das famílias.

As informações sobre a natureza dos efeitos genéticos envolvidos nos cruzamentos foram obtidas pelo ajuste de modelos genéticos para os componentes de média e variância, utilizando o conjunto composto pelos parentais, F_1 e as gerações segregantes F_2 e F_3 .

3.1.4.1.1 Componentes genéticos de média

Inicialmente foi adaptado um modelo genético simples do tipo aditivo-dominante, envolvendo os componentes m , $[d]$ e $[h]$ (Tabela 2). Nesse modelo, m representa a média da distribuição genotípica de todas as linhagens puras extraídas, sem seleção, de um cruzamento (Van Der Veen, 1959), ou o valor médio entre os parentais; $[d]$ é a soma algébrica dos efeitos aditivos de todos os k locos para os quais P_1 e P_2 diferiram; e $[h]$ define a soma algébrica dos efeitos de dominância dos mesmos k locos. Os parâmetros genéticos dos componentes de média foram estimados pelo teste conjunto de escala (Cavalli, 1952), com a utilização de um programa Fortran (Toledo, 1991). Esse teste proporciona uma avaliação da qualidade do ajuste do modelo genético obtido a partir de um teste de Qui-quadrado. O teste de χ^2 possui um número de graus de liberdade igual ao número de gerações menos o número de parâmetros estudados. Quando o número de gerações é igual ao número de parâmetros genéticos, não sobram graus de liberdade para o teste de qualidade de ajuste do modelo genético.

TABELA 2 Componentes genéticos aditivos e dominantes de média dos parentais, F_1 e das gerações segregantes F_2 e F_3 , segundo Mather & Jinks (1982).

Geração	m	[d]	[h]
P_1	1	1	0
P_2	1	-1	0
F_1	1	0	1
F_2	1	0	1/2
F_3	1	0	1/4

O teste conjunto de escala utiliza o método dos quadrados mínimos ponderados (*Weighted Least Squares- WLS*) para estimar os parâmetros genéticos. Nesse método, é necessário fornecer os dados de média e variância observados em cada geração. O peso (W_i) utilizado para ponderar a quantidade de informação fornecida por geração é obtido a partir do inverso da variância das médias (V_x) de cada geração. A variância das médias, por sua vez, é obtida pela divisão da variância de cada geração pelo número de indivíduos que a compõem (Oliveira, 1994). O ajuste de um modelo genético envolve tão somente efeitos aditivos e dominantes (m, [d] e [h]), que podem ser estimados a partir dos dados apresentados na Tabela 3.

TABELA 3 Informações necessárias para o teste conjunto de escala envolvendo dois parentais, F₁ e as gerações segregantes F₂, F₃, conforme Souza (1992).

Geração	N	V _x *	Peso (W _i)	Média esperada			Média obs. (Y _i)
				m	[d]	[h]	
P ₁	n ₁	VP ₁ /n ₁	n ₁ /VP ₁	1	1	0	P ₁
P ₂	n ₂	VP ₂ /n ₂	n ₂ /VP ₂	1	-1	0	P ₂
F ₁	n ₃	VF ₁ /n ₃	n ₃ /VF ₁	1	0	1	F ₁
F ₂	n ₄	VF ₂ /n ₄	n ₄ /VF ₂	1	0	1/2	F ₂
F ₃	n ₅	VF ₃ /n ₅	n ₅ /VF ₃	1	0	1/4	F ₃

*V_x= variância das médias

Tais dados fornecem as equações normais utilizadas na estimativa desses parâmetros que, em forma matricial, tomam a forma $S.b = R$, em que S é a matriz de informação, b é a matriz dos parâmetros a serem estimados e R é a matriz dos resultados:

$$S = \begin{Bmatrix} 1 & 2 & 3 \\ 2 & 4 & 5 \\ 3 & 5 & 6 \end{Bmatrix} \cdot b = \begin{Bmatrix} m \\ d \\ h \end{Bmatrix} \cdot e R = \begin{Bmatrix} 7 \\ 8 \\ 9 \end{Bmatrix}$$

os elementos entre chaves são obtidos por:

- (1) - $\Sigma[(\text{coeficiente de } m)^2 \times W_i]$;
- (2) - $\Sigma(\text{coeficiente de } m \times \text{coeficiente de } [d] \times W_i)$;
- (3) - $\Sigma(\text{coeficiente de } m \times \text{coeficiente de } [h] \times W_i)$;
- (4) - $\Sigma[(\text{coeficiente de } [d])^2 \times W_i]$;
- (5) - $\Sigma(\text{coeficiente de } [d] \times \text{coeficiente de } [h])$;
- (6) - $\Sigma[(\text{coeficiente de } [h])^2 \times W_i]$;
- (7) - $\Sigma(\text{coeficiente de } m \times y_i \times W_i)$;
- (8) - $\Sigma(\text{coeficiente de } [d] \times y_i \times W_i)$;
- (9) - $\Sigma(\text{coeficiente de } [h] \times y_i \times W_i)$.

A solução dessa equação matricial é dada por $b = S^{-1} R$, em que S^{-1} é o inverso da matriz de informação e, também, uma matriz de variância e covariância de b , fornecendo, em sua diagonal principal, as variâncias de cada um dos três estimadores (Oliveira, 1994).

As médias esperadas dos parentais e de seus descendentes são obtidas por meio desses estimadores. A qualidade do ajuste desse modelo genético (*goodness of fit*) é feita por meio de um teste de Qui-quadrado que adquire a seguinte forma:

$$\chi^2 (n-p) \text{ g.l.} = \sum_{i=1}^n [O_i - E_i]^2 W_i$$

em que:

O_i = média observada da i -ésima população;

E_i = média esperada da i -ésima população;

W_i = peso da i -ésima população;

n = número de gerações;

p = número de parâmetros do modelo genético.

Quando algum parâmetro for não significativo, o mesmo é eliminado do modelo, os componentes remanescentes são novamente estimados e a qualidade do modelo, testada por um novo Qui-quadrado. Caso o teste seja não significativo ao nível de 5% de probabilidade, o modelo não pode ser rejeitado, sendo considerado suficiente para explicar a variabilidade genética encontrada. Essa seqüência foi realizada para todos os conjuntos de gerações.

Quando o modelo genético mostrar-se insatisfatório para explicar os mecanismos genéticos no controle dessas características, ou seja, apresentar um χ^2 significativo ao nível de 5% de probabilidade, é testado um novo modelo, com a presença de interação não alélica entre pares de locos, adicionando-se ao modelo genético o componente [i]. O componente [i] representa a interação dos locos em homozigose (epistasia do tipo aditivo x aditivo). Tais estimativas foram realizadas da mesma maneira para todos os conjuntos de gerações referidos. As proporções

dos componentes de m , $[d]$, $[h]$, $[i]$ presentes nas gerações utilizadas para determinar o modelo são apresentadas na Tabela 4.

TABELA 4 Componentes genéticos aditivos, dominantes e epistáticos de média dos parentais, F_1 e das gerações segregantes, segundo Mather & Jinks (1982).

Geração	M	[d]	[h]	[i]
P_1	1	1	0	1
P_2	1	-1	0	1
F_1	1	0	1	0
F_2	1	0	1/2	0
F_3	1	0	1/4	0

3.1.4.1.2 Componentes genéticos e ambientais de variância

As gerações parentais F_1 e F_2 possuem apenas variância entre indivíduos dentro de geração ou simplesmente variância dentro, pois essas gerações não têm estrutura de famílias (Oliveira, 1994). As gerações F_3 são compostas por famílias de progênies e as análises de variância realizadas com elas são constituídas por:

- a) uma variância entre famílias que possui como quadrado médio esperado (QME) a composição $\sigma^2 d + n\sigma^2 e$, em que $\sigma^2 d$ é o componente de variância dentro de famílias, n é a média harmônica do número de indivíduos dentro das famílias e $\sigma^2 e$ é o componente de variância entre famílias; e
- b) uma variância dentro de famílias, que possui como quadrado médio esperado (QMD) somente o componente $\sigma^2 d$.

Essa análise é realizada devido ao fato de o método de derivação e condução das progênies não permitir a distinção das diversas variâncias dentro de grupos de famílias, que ficam incorporadas como variância entre famílias (Tabela 5).

TABELA 5 Componentes do modelo genético simples presentes nas variâncias dos parentais, F₁ e gerações segregantes F₂ e F₃, mostrando as variâncias entre famílias (QME) e as variâncias dentro de famílias (QMD).

Var./Equações	D	H	E	Varição de amostragem
VP ₁	0	0	1	0
VP ₂	0	0	1	0
VF ₁	0	0	1	0
V ₁ F ₂	1/2	¼	1	0
V ₁ F ₃	1/2	1/16	0	(1/n ^o) V ₂ F ₃
V ₂ F ₃ = QMD	1/4	1/8	1	0

* n = número de indivíduos que compõem cada família ou sua média harmônica quando o número difere entre famílias.

Os componentes de variância foram ajustados para o caráter número de fêmeas, utilizando os quatro conjuntos de gerações. Inicialmente foi testado um modelo incorporando componentes genéticos aditivos (representados por D), de dominância (H) e ambientais aditivos (E) das variâncias dessas gerações para o modelo restrito.

Para as estimativas dos componentes de variância das gerações estudadas foi adotado o método dos quadrados mínimos ponderados, segundo o modelo proposto por Hayman (1960) e relatado por Mather & Jinks (1982). Esse método foi utilizado para todos os modelos ajustados. A exemplo das médias, os cálculos foram realizados em programa Fortran (Toledo, 1991). Quando os parâmetros estimados revelaram-se não significativos, foram eliminados. Os componentes remanescentes foram reestimados e o ajuste do modelo foi novamente testado.

Não havendo o ajuste do modelo genético envolvendo os componentes D, H e E a essas gerações, foi adaptado outro modelo envolvendo interação genótipo x micro-ambiente (Tabela 6). O termo interação genótipo x micro-ambiente

citado está relacionado à interação diferenciada de cada genótipo com o ambiente ao qual foi submetido (Mather & Jinks, 1982), não havendo conotação com macro-ambientes contrastantes (anos, locais e outros). Esse modelo foi aplicado somente depois de analisado o teste de escala para detecção de interação genótipo x micro-ambiente. Nesse caso, os componentes E_1 , E_2 e E_3 foram adaptados ao modelo, representando os erros do P_1 , P_2 e F_1 , respectivamente.

TABELA 6 Componentes de variância genética aditiva, de dominância e de interação genótipo x micro-ambiente dos parentais, F_1 e das gerações segregantes F_2 e F_3 .

Geração	D	H	E_1	E_2	E_3
VP_1	0	0	1	0	0
VP_2	0	0	0	1	0
VF_1	0	0	0	0	1
VF_2	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{2}$
VF_3e	$n/2+1/4$	$n/16+1/8$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{2}$
VF_3d	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{2}$

3.1.4.1.3 Herdabilidade

Segundo Falconer (1981), alguns métodos podem ser utilizados para estimar a herdabilidade (h^2). Essa pode apresentar sentido restrito, referindo-se à proporção da variância total constituída pela variância genética aditiva, ou sentido amplo, referindo-se à contribuição de toda a variância herdável para a variância total. A herdabilidade com sentido restrito, que é aquela com maior interesse para programas de melhoramento, pode ainda ser ao nível de planta individual ou de média das famílias. Aqui, a herdabilidade foi estimada nos sentido restrito (h^2_r) e amplo (h^2_a), ao nível de planta individual (h^2_p) e com base

na média harmônica da família F_3 (h^2_m), a partir dos componentes de variação do conjunto de gerações, utilizando as equações:

$$h^2_{r_p} = 0,5D / (0,5D + 0,25H + E);$$

$$h^2_{r_m} = 0,5D / (0,5D + 0,0625H + E/n);$$

$$h^2_{a_p} = 0,5D + 0,25H / (0,5D + 0,25H + E);$$

$$h^2_{a_m} = 0,5D + 0,0625H / (0,5D + 0,0625H + E/n).$$

D= variância aditiva; H= variância de dominância; E= variância ambiental; n= média harmônica do número de indivíduos que compõem a família F_3 .

3.2 Identificação de marcadores microssatélites ligados a locos de resistência à raça 4⁺ do NCS

Este estudo foi conduzido no laboratório de biotecnologia da Embrapa Soja, em Londrina (PR), no primeiro semestre de 2003.

A extração do DNA de 122 plantas individuais F_2 , do F_1 e dos parentais do cruzamento E96-776 (suscetível) x E97-2502-9-3-1 (resistente) seguiu o protocolo proposto por Keim et al. (1988), com algumas modificações. Assim, 1 g de folhas de cada planta foi triturado em almofariz, em presença de N_2 líquido. Cada amostra foi colocada em tubos de propileno de 1,5 mL e ressuspensa em 800 μ L de tampão de extração (2,0 mL de CTAB 5%; 2,8 mL de NaCl 5M; 0,4 mL de EDTA 0,5M; 1,0 mL de Tris-HCl 1M, pH 8,0; 0,1 mL de β mercapto-etanol 0,1% e 3,7 mL de água). Os tubos devidamente identificados foram incubados em banho Maria a 65°C, por 60 minutos. A cada 15 minutos, os mesmos eram cuidadosamente invertidos.

Após esse período, os tubos foram retirados e, já resfriados, acrescentaram-se a cada amostra 700 μ L da solução clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Os tubos foram suavemente invertidos durante cinco minutos e centrifugados (Eppendorf-5415C) a 6000 r.p.m. durante 15 minutos. O

sobrenadante (fase aquosa) foi transferido para outros tubos e novamente fez-se a adição de 700 μL da solução clorofórmio: álcool isoamílico. Procederam-se novamente as inversões, por cinco minutos, e a centrifugação, por 15 minutos, a 6000 r.p.m. Os ácidos nucleicos foram precipitados pela adição de isopropanol gelado (2/3 do volume) e suaves inversões. As amostras foram, então, deixadas durante 1 hora à temperatura de -20°C .

Na seqüência, as amostras foram centrifugadas a 14000 r.p.m. por 10 minutos, e o sobrenadante, descartado. Adicionaram-se 500 μL de etanol 70% para lavagem dos *pellets* e das paredes do tubo. Os *pellets* foram deixados secar a 37°C , durante 10 minutos, e depois ressuspensos em 400 μL de TE (10 mM de Tris-HCl, pH 8,0 e 1,0 mM de EDTA, pH 8,0). A cada amostra foi adicionada RNase na concentração final de 40 $\mu\text{L}/\text{mL}$ e os tubos foram mantidos a 37°C , por 45 minutos. Em seguida, os tubos contendo o DNA concentrado foram transferidos para a temperatura de -20°C . Finalmente, o DNA foi diluído e quantificado em espectrofotômetro (Micronal B382), por meio de leitura nas faixas de 260 e 280 nm, e a sua pureza foi verificada pela relação entre as leituras nas faixas de 260/280 nm.

As reações de PCR (Reação de Polimerase em Cadeia) foram realizadas em termociclador MJ modelo PTC 200 e eram constituídas de 3,0 μL de DNA molde (10 ng/ μL); 3,0 μL de água MilliQ; 1,0 μL de tampão de reação 10x (100 μL de Tris-HCl 1M pH 8,0, 500 μL de KCl 1M e 400 μL de água MilliQ); 0,30 μL de MgCl_2 (50 mM); 0,52 μL de desoxinucleosídeotri-fosfato (2,5 mM); 0,2 μL de Taq-polimerase (5 U/ μL) e 1,0 μL dos *primers* F e R (Research Genetics Inc.-Map Pairs TM), chegando a um volume final, para cada amostra, de 10 μL . Esses passos foram repetidos para cada combinação genótipo x marcador microssatélite. Os programas de termociclagem foram compostos de desnaturação inicial a 94°C , por sete minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94°C ,

por 1 minuto, anelamento a 50°C, por 1 minuto, e extensão a 72°C, por 2 minutos. Um ciclo a 72°C, por 7 minutos, foi realizado ao final. Terminada a amplificação, em cada tubo, foram acrescentados 2 µL de tampão de amostra (4 g de sacarose, 0,025 g de azul de bromofenol e 10 mL de água destilada)

O produto da amplificação foi resolvido em gel de poli-acrilamida 7% (12,25 mL de solução de Acrilamida-Bis 40%, 29:1; 7 mL de polímero Spreadex, Elchrom Scientific; 7 mL de TAE 10X; 43,75 mL de água destilada; 35 µL de Temed e 350 µL de persulfato de amônio 10%) e a eletroforese foi feita a uma voltagem constante de 220 volts, em tampão TAE 1X.

Após ter sido colorido com brometo de etídio, o gel foi irradiado com luz ultravioleta (transluminador) e procedeu-se a aquisição das imagens utilizando o Sistema Kodak Digital DC 290. Como referencial dos pesos moleculares, foram empregados 0,7µg de DNA Ladder 100pb (GibcoBRL).

Foram testados 74 *primers* (Tabela 7), previamente escolhidos a partir de um banco de DNA de soja (Cregan et al., 1999a). Atenção maior foi dada aos grupos de ligação moleculares A2 e G, em que foram detectados, na maioria das fontes, os principais QTLs de resistência ao NCS. Inicialmente, para a detecção de polimorfismos, todos os *primers* foram amplificados com o DNA dos parentais. Na seqüência, os *primers* polimórficos foram amplificados com o DNA de 20 plantas F₂ resistentes. Feita a genotipagem das plantas, com base no padrão de bandas, aplicou-se um teste de Qui-quadrado aos dados. Foram considerados ligados a loco (s) de resistência à raça 4⁺ do NCS apenas os marcadores que apresentaram segregação significativamente ($P < 0,05$) diferente de 1:2:1 ou de 3:1, no caso das marcadores dominantes.

Finalmente, os marcadores ligados à resistência foram utilizados para amplificar o DNA de cada uma das 122 plantas F₂. Após a genotipagem das plantas, um teste de Qui-quadrado foi aplicado para verificar a segregação esperada das marcas.



Todas as análises estatísticas descritas a seguir foram realizadas com auxílio do programa de computador SAS (SAS Institute Inc., 1987).

TABELA 7 Relação dos *primers* de microssatélites e respectivos grupos de ligação molecular (GLM) testados.

Microssatélite	GLM	Microssatélite	GLM
<i>Gmenod2 B</i>	A2	<i>Satt 162</i>	I
<i>Sat-001</i>	D2	<i>Satt 163</i>	G
<i>Sat-064</i>	G	<i>Satt 177</i>	A2
<i>Sat-071</i>	L	<i>Satt 187</i>	A2
<i>Sat-076</i>	C2	<i>Satt 191</i>	G
<i>Sat-088</i>	G	<i>Satt 192</i>	H
<i>Sat-115</i>	A2	<i>Satt 199</i>	G
<i>Sat-117</i>	G	<i>Satt 207</i>	A2
<i>Sat-120</i>	F	<i>Satt 233</i>	A2
<i>Sat-129</i>	A2	<i>Satt 236</i>	A1
<i>Sat-131</i>	G	<i>Satt 276</i>	A1
<i>Sat-132</i>	O	<i>Satt 277</i>	C2
<i>Sat-133</i>	F	<i>Satt 286</i>	C2
<i>Sat-157</i>	A2	<i>Satt 288</i>	G
<i>Sat-162</i>	A2	<i>Satt 293</i>	H
<i>Sct-065</i>	J	<i>Satt 301</i>	D2
<i>Sct-187</i>	G	<i>Satt 302</i>	H
<i>Satt 012</i>	G	<i>Satt 309</i>	G
<i>Satt 038</i>	G	<i>Satt 315</i>	A2
<i>Satt 050</i>	A1	<i>Satt 317</i>	H

“.....Continua.....”

“TABELA 7, Cont.”

Microssatélite	GLM	Microssatélite	GLM
<i>Satt 071</i>	D1a + Q	<i>Satt 409</i>	A2
<i>Satt 082</i>	D2	<i>Satt 424</i>	A2
<i>Satt 114</i>	F	<i>Satt 434</i>	H
<i>Satt 141</i>	D1b + W	<i>Satt 452</i>	AE
<i>Satt 142</i>	H	<i>Satt 470</i>	A2
<i>Satt 155</i>	A1	<i>Satt 472</i>	G
<i>Satt 317</i>	H	<i>Satt 480</i>	A2
<i>Satt 329</i>	A2	<i>Satt 493</i>	A2
<i>Satt 341</i>	A2	<i>Satt 505</i>	G
<i>Satt 364</i>	A2	<i>Satt 517</i>	G
<i>Satt 377</i>	A2	<i>Satt 525</i>	A2
<i>Satt 378</i>	A2	<i>Satt 542</i>	D1b + W
<i>Satt 384</i>	E	<i>Satt 543</i>	D2
<i>Satt 385</i>	A1	<i>Satt 553</i>	E
<i>Satt 390</i>	A2	<i>Satt 574</i>	D2
<i>Satt 407</i>	D1a + Q	<i>Satt 583</i>	B1
<i>Satt 408</i>	D1a + W	<i>Satt 589</i>	A2

Análises de variância foram realizadas para o caráter número de fêmeas, utilizando como variáveis classificatórias os marcadores ligados (incluindo o loco *i*), tomados individualmente. As correlações entre os marcadores e entre estes e o caráter também foram estudadas.

Para verificar a significância do marcador em relação aos efeitos aditivos e não aditivos do caráter, foi conduzida, para todos os pares de combinações entre o loco marcador e o número de fêmeas, análise de variância com um fator.

Como os marcadores utilizados foram codominantes, os efeitos da marca puderam ser separados por meio de uma análise de regressão linear, em aditivos e dominantes. Tais efeitos também puderam ser quantificados.

Com a finalidade de verificar os efeitos das marcas combinadas sobre o número de fêmeas, foi realizada uma análise de variância com dois fatores.

A existência de ligação gênica entre o loco marcador e o caráter em estudo foi assumida quando houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre o número médio de fêmeas da família $F_{2:3}$ e o genótipo do marcador. A proporção da variação fenotípica explicada pela associação caráter-marcador foi estimada pelo coeficiente de determinação R^2 (Edwards et al., 1987).

Os marcadores foram mapeados pela análise de ligação de múltiplos pontos para um valor LOD, *likelihood of odds* (Morton, 1955), mínimo de 3,0 e uma frequência de recombinação máxima de 50%, utilizando o programa Mapmaker/EXP (Lincoln et al., 1993). A localização do QTL foi determinada pelo método de mapeamento por intervalos (Lander & Botsten, 1989), com o auxílio do programa Mapmaker/QTL (Lincoln et al., 1993). O teste de hipótese foi realizado com o método LOD. O nível de significância para a declaração da existência de um QTL foi expresso na forma de valor LOD, assumindo um valor LOD de 3,0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudo da herança da resistência à raça 4⁺ do NCS

O sucesso dos cruzamentos iniciais foi confirmado pelo marcador cor de flor. Em soja, a cor roxa apresenta dominância completa sobre a branca. Como o parental materno (E96-776) apresentava flores brancas, somente foram avançadas plantas F₁ com flores roxas, uma vez que as de flores brancas eram oriundas de autofecundações. Das 124 plantas F₂ selecionadas para os testes com marcadores, microssatélites e o loco *i* (cor da semente), 32 tinham sementes pretas, 29 eram amarelas e 63 tinham fenótipo intermediário (hilo esparramado).

A metodologia utilizada para conseguir o conjunto de gerações dos parentais F₂ e F₃ permitiu a obtenção de sementes com a mesma idade fisiológica e em quantidades suficientes para os testes. Entretanto, demandou bastante espaço em casa-de-vegetação e mão-de-obra. As sementes do parental resistente apresentaram tendência de germinar na própria vagem, mas a qualidade das mesmas não foi afetada.

4.1.1 Avaliação da reação das plantas de soja à raça 4⁺ do NCS

Para esse estudo foram conduzidos dois experimentos. No primeiro testaram-se as gerações do cruzamento E96-776 x E97-2502-9-3-1 e no segundo, as do E96-776 x E97-2502-9-3-5. Esses cruzamentos foram realizados com o objetivo de transferir a resistência à raça 4⁺ da PI 437654 (plantas E97-2502-9-3-1 e E97-2502-9-3-5) para a linhagem E96-776 (tipo 'Hartwig').

Em ambos os experimentos, as inoculações resultaram em números altos de fêmeas do nematóide nos genótipos suscetíveis, contrastando com o observado nos resistentes (Tabelas 8 e 9). Como esperado, além de vencer a

resistência das quatro diferenciadoras tradicionais ('Pickett', 'Peking', PI 88788 e PI 90763), a população do NCS empregada foi capaz de multiplicar em 'Hartwig', mas não em PI 437654 (Tabela 8), comportando-se como raça 4⁺ (Dias et al., 1998).

TABELA 8 Número médio de fêmeas (NMF), índices de fêmeas (IF) e reação dos genótipos de soja diferenciadores de raças de *Heterodera glycines*.

Diferenc.	Experimento 1 (E96-776 x E97-2502-9-3-1)			Experimento 2 (E96-776 x E97-2502-9-3-5)		
	NMF ¹	IF (%) ²	Reação ³	NMF	IF (%)	Reação
'Lee'	349,90	100,00	S	254,00	100,00	S
'Pickett'	330,60	94,48	S	303,57	134,24	S
'Peking'	347,30	99,26	S	137,00	60,58	S
PI 88788	35,70	10,20	S	27,43	12,13	S
PI 90763	253,20	72,36	S	88,58	39,17	S
'Hartwig'	326,90	93,43	S	134,29	59,38	S
PI 437654	4,80	1,37	R	9,00	3,98	R

¹médias de sete repetições; ²IF (%)= (NMF na diferenc./NMF em 'Lee') x 100;

³R= resistente (IF < 10%), S= Suscetível (IF ≥ 10%).

4.1.2 Análise genética dos dados

Não foi observado efeito de recíprocos (herança materna e/ou citoplasmática) em nenhum dos cruzamentos, uma vez que as médias dos números de fêmeas dos dois F₁s não diferiram estatisticamente. Esse fato já era amplamente conhecido para outras raças do NCS (Thomas et al., 1975; Mansur et al., 1993; Rao-Arelli et al., 1989). Na discussão dos dados, não foram incluídos os F₁s dos cruzamentos recíprocos.

Os gráficos relativos à distribuição de freqüências do número de fêmeas do nematóide, nas gerações obtidas a partir dos dois cruzamentos, estão apresentados nas Figuras 1 e 2, respectivamente. No primeiro experimento, cada parental e o F_1 ficaram em classes distintas (Figura 1). No segundo, como o parental suscetível apresentou maior variação no número de fêmeas, nota-se sobreposição dessas classes (Figura 2). Provavelmente, os baixos números de fêmeas observados em algumas das plantas do parental suscetível deveram-se ao baixo vigor das plantas (sistema radicular pobre) e não à resistência genética propriamente dita. Portanto, em ambos os experimentos, ficou evidente a existência de grande diferença genética dos parentais com relação à resistência à raça 4⁺ do NCS. A cultivar Hartwig realmente não herdou todos os alelos de resistência presentes na PI 437654. Fato semelhante ocorreu no desenvolvimento de 'Pickett' e 'Bedford', que não receberam todos os alelos de resistência ao NCS presentes em 'Peking' e na PI 88788, respectivamente (Brim & Ross, 1966; Hartwig, 1985; Young, 1984).

Nos gráficos de distribuição de freqüências das gerações segregantes, principalmente no cruzamento E96-776 x E97-2502-9-3-1, são observadas inflexões que permitem separar os indivíduos F_2 e as famílias $F_{2,3}$ em classes distintas (Figuras 1 e 2). Portanto, apesar de o número de fêmeas ser um caráter quantitativo, o mesmo não seguiu uma distribuição normal. Isso ocorreu em função da presença de genes maiores de resistência. A presença desses genes justifica o emprego de métodos qualitativos na grande maioria dos estudos de herança da resistência ao NCS (Caldwell et al., 1960; Matson & Williams, 1965; Rao-Arelli et al., 1992a; Rao-Arelli, 1994; Yue et al., 2000; Thomas et al., 1975; Hancock et al., 1987; Mauro et al., 1999; Anand, 1994; Young & Kilen, 1994; Myers & Anand, 1991; Qiu et al., 1997).

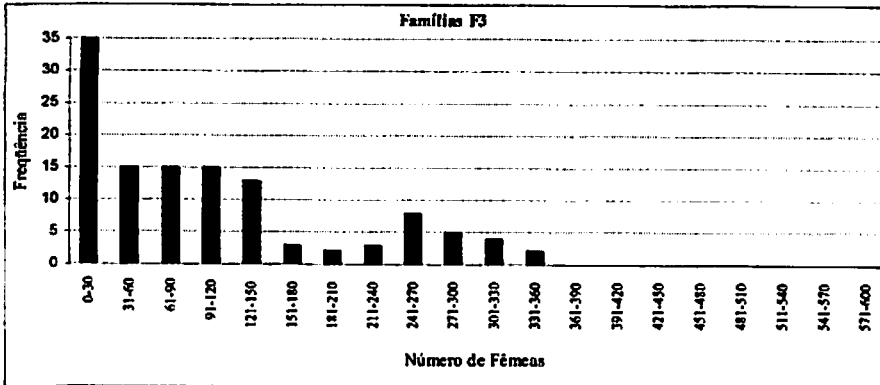
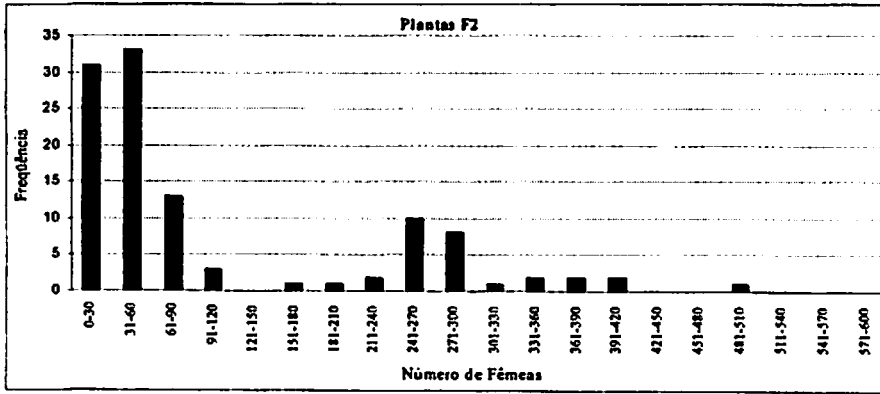
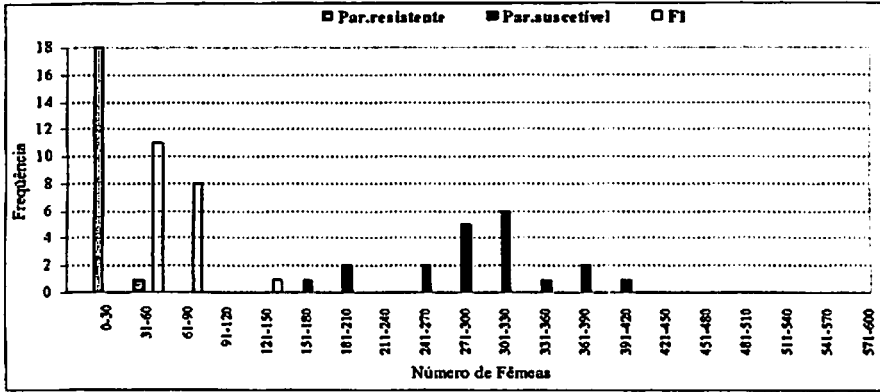


FIGURA 1. Distribuição de freqüências do número de fêmeas dos parentais e das gerações obtidas do cruzamento E96-776 x E97-2502-9-3-1.

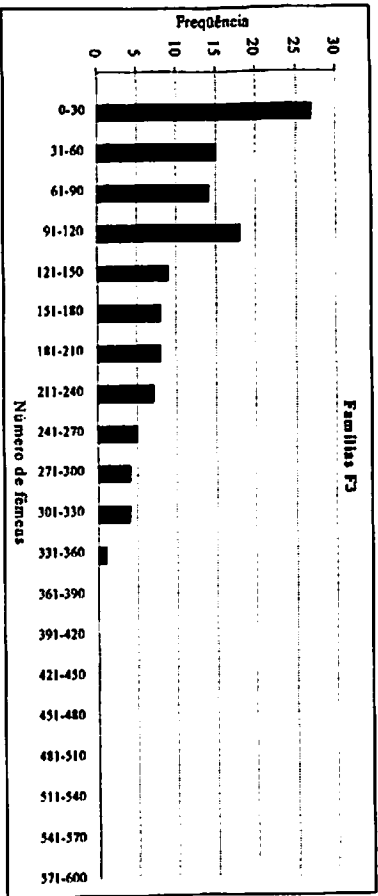
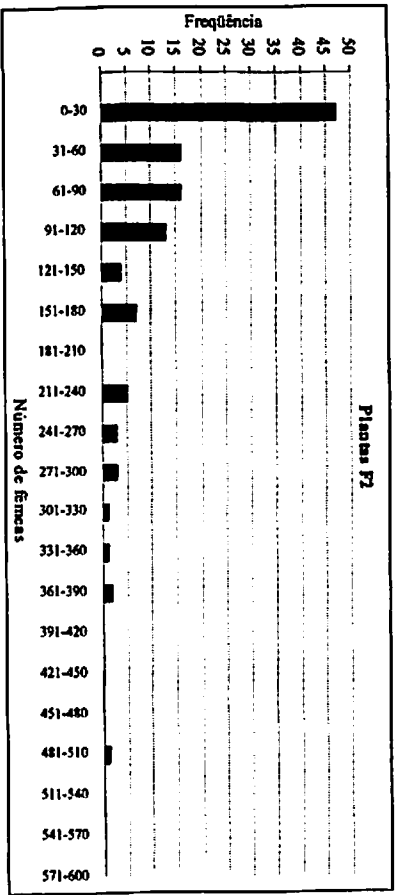
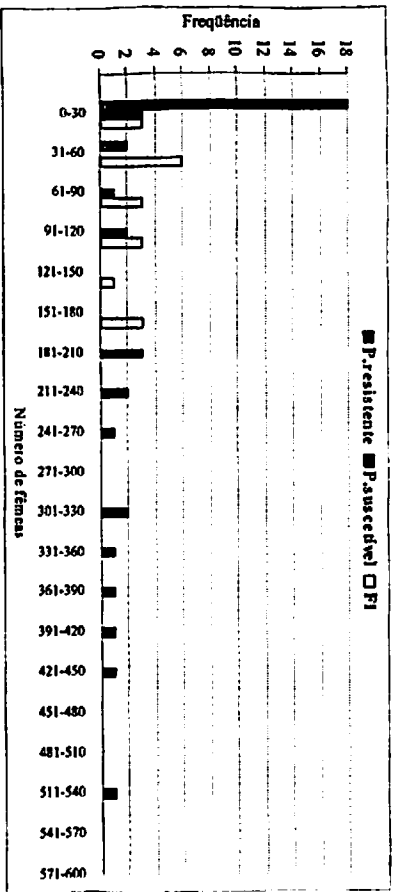


FIGURA 2. Distribuição de frequências do número de fêmeas dos parentais e das gerações obtidas do cruzamento E96-776 x E97-2502-9-3-5.

4.1.2.1 Determinação do número de genes

O estudo da herança e da variação de caracteres qualitativos baseia-se na análise de gerações segregantes, separando os indivíduos em classes e avaliando as suas proporções (Cruz et al., 2001).

No presente estudo, para a determinação do número de genes envolvidos na resistência, as famílias F_{23} foram divididas em classes de acordo com as inflexões nos gráficos de distribuição de frequências do número de fêmeas. A análise a partir das famílias F_{23} levou em consideração o fato de as mesmas, diferentemente dos indivíduos F_2 , terem repetições. As repetições diminuem as chances de erro na classificação dos fenótipos (Faghihi et al. (1995). Em ambos os cruzamentos, um modelo com um gene foi suficiente para explicar a segregação observada (Tabelas 9 e 10).

TABELA 9 Teste de Qui-quadrado, calculado como proposto por Arias et al. (1994), para o padrão de segregação com um gene com dominância parcial (1R:2MR:1S), para as médias dos números de fêmeas das famílias F_{23} obtidas do cruzamento E96-776 x E97-2502-9-3-1.

	Classes		
	Resistente (≤ 30 fêmeas)	Mod. Resistente (31-150 fêmeas)	Suscetível (> 150 fêmeas)
F_3 Esperado	28,42	61,58	30,00
F_3 Observado	35,00	58,00	27,00
N		120	
$\chi^2/2$ g.l.		2,03	
Probabilidade		0,36	
$\chi^2 = \sum (O-E)^2/E$			

TABELA 10 Teste de Qui-quadrado para o padrão de segregação com um gene com dominância completa (3R:1S), para as médias do número de fêmeas das famílias F_{2,3} obtidas do cruzamento E96-776 x E97-2502-9-3-5.

	Classes	
	Resistente (≤ 180 fêmeas)	Suscetível (> 180 fêmeas)
F ₃ Esperado	90	30
F ₃ Observado	91	29
N	120	
$\chi^2/1$ g.l.	0,04	
Probabilidade	0,83	
$\chi^2 = \sum(O-E)^2/E$		

4.1.2.2 Parâmetros genéticos obtidos pelos componentes de média e variância

Os graus de liberdade, médias e variâncias obtidos para o caráter número de fêmeas, nas gerações parentais F₁, F₂ e F₃ dos dois cruzamentos, estão apresentados na Tabela 11. Em ambos os experimentos, as médias da geração F₁ foram inferiores às médias aritméticas dos dois parentais e também diferiram das médias das gerações F₂ e F₃, sugerindo que efeitos não aditivos também estão presentes. Segregação transgressiva foi constatada nos dois cruzamentos, uma vez que nas gerações F₃ ocorreram famílias com médias (dados não mostrados) fora do limite dos parentais (Tabela 11). Esse tipo de segregação é interessante para o melhoramento, uma vez que possibilita selecionar, na descendência, indivíduos com número de alelos efetivos superior ao dos pais (Ramalho et al., 2000). Segregação transgressiva somente ocorre quando os dois parentais têm genes de resistência diferentes. No presente estudo, isso realmente era esperado, pois apesar de 'Hartwig' (parental suscetível) ser descendente da PI 437654 (parental resistente), ela também possui genes de resistência oriundos de 'Peking' (Anand, 1992).

TABELA 11 Graus de liberdade (g.l.), médias e variâncias para o número de fêmeas em plantas de soja das gerações parentais, F₁, F₂ e F₃, inoculadas com *H. glycines*, raça 4⁺.

Geração	Experimento 1 (E96-776 x E97-2502-9-3-1)			Experimento 2 (E96-776 x E97-2502-9-3-5)		
	g.l.	Média	Variância	g.l.	Média	Variância
P. suscetível	19	292,60 (176-397) ¹	3.267,90	18	238,63 (11-564)	26.944,36
P. resistente	18	10,42 (1-34)	58,48	19	9,80 (0-47)	171,85
F ₁	19	57,35 (32-121)	464,77	18	81,47 (14-179)	2.503,60
F ₂	109	105,79 (0-487)	14.603,49	118	86,02 (0-529)	10.016,51
F ₃ total	835	101,81 (0,9-353)	16.395,80	825	113,74 (3,3-371)	16.829,04
F ₃ entre	119	-	65.431,45	119	-	55.261,55
F ₃ dentro	716	-	8.170,17	706	-	10.236,02

¹variação nos números de fêmeas dos indivíduos (parentais, F₁ e F₂) ou das médias das famílias F_{2,3}.

Os parâmetros genéticos ajustados para as médias e variâncias do número de fêmeas são mostrados na Tabela 12.

No primeiro experimento, os componentes de média revelaram a presença de efeitos aditivos [d], de dominância [h] e de epistasia do tipo aditivo x aditivo [i]. Para esse cruzamento, embora o modelo com um único gene não tenha sido rejeitado pelo teste de Qui-quadrado (Tabela 9), pelo menos um gene adicional está envolvido na determinação da resistência. Com relação aos componentes de variância, foram detectados efeitos aditivos (D), de dominância (H) e de interação genótipo x microambiente (E₁, E₂ e E₃). A presença de D no modelo favorece a seleção de genótipos superiores (mais resistentes). A presença de H torna a herança mais complexa e tende a diminuir a eficiência de

seleção, uma vez que a descendência de um indivíduo pode ter comportamento inferior a ele próprio. As presenças de E_1 , E_2 e E_3 mostram que cada parental e o F_1 reagem diferentemente ao ambiente.

No segundo experimento, um modelo do tipo aditivo-dominante se ajustou perfeitamente aos dados, ou seja, as interações epistáticas estão ausentes ou não contribuíram significativamente para as diferenças entre as médias das gerações avaliadas. De fato, o modelo com um gene foi aceito pelo teste de Qui-quadrado (Tabela 10). Os componentes de variância mostraram a presença apenas de efeitos aditivos (D) e de interação genótipo x microambiente (E_1 , E_2 e E_3).

TABELA 12 Parâmetros genéticos ajustados para médias e variâncias do conjunto restrito de gerações, com relação ao caráter número de fêmeas.

	Experimento 1 (E96-776 x E97-2502-9-3-1)	Experimento 2 (E96-776 x E97-2502-9-3-5)
M	118,57 +/- 5,99	123,98 +/- 6,67
[d]	141,09 +/- 6,45	114,19 +/- 7,20
[h]	-60,20 +/- 8,71	-49,45 +/- 15,25
[i]	32,94 +/- 8,81	-
$\chi^2/g.l.$	2,45/1 ^{ns}	2,67/2 ^{ns}
Probabilidade	0,12	0,26
D	12.770,2 +/- 3.216,64	12.014,90 +/- 1.821,49
H	30.832,22 +/- 8.121,20	-
E1	3.306,34 +/- 1.065,05	23.122,98 +/- 3.116,69
E2	58,49 +/- 19,49	171,65 +/- 55,69
E3	466,30 +/- 151,20	2.419,87 +/- 791,73
$\chi^2/g.l.$	0,089/1 ^{ns}	3,97/2 ^{ns}
Probabilidade	0,76	0,14

Em ambos os cruzamentos, os graus médios de dominância (h/d), calculados pelos componentes de média nas gerações estudadas (Tabela 12), foram estimados em -0,43 e indicam dominância parcial no sentido de promover

redução do número de fêmeas, relativamente à média dos pais. Efeitos de dominância também foram verificados ser importantes, em várias fontes, na determinação da resistência às raças 1 (Yue et al., 2000; Qiu et al., 1997), 2 (Yue et al., 2000), 3 (Matson & Williams, 1965; Rao-Arelli et al., 1992b; Rao-Arelli, 1994; Qiu et al., 1997; Mauro et al., 1999; Yue et al., 2000), 5 (Anand, 1994; Myers & Anand, 1991; Qiu et al., 1997; Yue et al., 2000) e 14 (Thomas et al., 1975; Yue et al., 2000) do NCS.

4.1.2.2.1 Herdabilidade

A herdabilidade quantifica, na população, a proporção da variação fenotípica atribuída à causa genética. Será igual a um quando toda a variação expressa é de natureza genética e zero, quando a variação entre indivíduos é unicamente de natureza ambiental (Cruz et al., 2001).

Aqui, as herdabilidades (h^2) foram estimadas nos sentidos restrito (h^2_r), proporção da variância total constituída pela variância genética aditiva, e amplo (h^2_a), contribuição de toda a variância herdável para a variância total, aos níveis de planta individual (h^2_p) e de média (h^2_m) da família F₃. Em ambos os experimentos, foram obtidas estimativas de herdabilidade de médias ($0,30 < h^2 < 0,60$) a altas ($h^2 > 0,60$) magnitudes (Tabela 13). Estimativas de herdabilidade relativamente altas são comuns em estudos de herança da resistência ao NCS (Hancock et al., 1987; Mansur et al., 1993; Mauro et al., 1999). Ao nível de planta individual, as estimativas de h^2 foram menores, indicando que a seleção de plantas individuais não é tão efetiva na obtenção da resistência quanto a seleção baseada em média de família F₃.

TABELA 13 Estimativas de herdabilidade da resistência à raça 4⁺ do NCS nos cruzamentos E96-776 x E97-2502-9-3-1 e E96-776 x E97-2502-9-3-5.

Cruzamento	Herdabilidade			
	Sentido restrito		Sentido amplo	
	Planta ¹ (h^2r_p)	Média ² (h^2r_m)	Planta ³ (h^2a_p)	Média ⁴ (h^2a_m)
E96-776 x E97-2502-9-3-1 (Experimento 1)	0,42	0,75	0,93	0,98
E96-776 x E97-2502-9-3-5 (Experimento 2)	0,46	0,85	0,46	0,85

¹ $h^2r_p = 0,5D / (0,5D + 0,25H + E)$; ² $h^2r_m = 0,5D / (0,5D + 0,0625H + E/n)$;

³ $h^2a_p = 0,5D + 0,25H / (0,5D + 0,25H + E)$;

⁴ $h^2a_m = 0,5D + 0,0625H / (0,5D + 0,0625H + E/n)$.

No cruzamento E96-776 x E97-2502-9-3-1, foram constatadas grandes diferenças entre as estimativas de herdabilidade, nos sentidos amplo e restrito, sugerindo que os efeitos de dominância tiveram grande importância na ação gênica para a resistência à raça 4⁺ do NCS. A herdabilidade no sentido amplo envolve toda a variância genética (dominância e aditiva), enquanto a herdabilidade no sentido restrito considera apenas a variância genética aditiva, aquela que é fixada pela seleção (Ramalho et al., 1993). Assim, a diferença entre os valores de herdabilidade, nos sentidos amplo e restrito, é proporcional à contribuição da variância de dominância para o caráter em estudo. Para esse cruzamento, a seleção realizada em gerações mais avançadas é vantajosa, pois com o aumento da homozigose, os efeitos aditivos, que são os herdáveis, vão aumentando em detrimento dos de dominância.

Para o cruzamento E96-776 x E97-2502-9-3-5, como os efeitos de dominância não estavam presentes, as estimativas de herdabilidade, nos sentidos restrito e amplo, foram iguais. Contudo, foi constatada uma enorme diferença entre os valores de herdabilidade aos níveis de planta individual (0,46) e de média de família (0,85). Essa diferença deve ser atribuída à grande contribuição

da variância ambiental (Tabela 12). Quando se trabalha com a média de família, os efeitos do ambiente são minimizados e a herdabilidade aumenta. Segundo Ramalho et al. (2000), embora cada caráter apresente uma amplitude de valores de herdabilidade que lhe é peculiar, a mesma pode ser aumentada pela melhoria das condições experimentais, de modo a reduzir a contribuição da variância ambiental para a variação fenotípica total. Herdabilidade alta e controle genético aditivo, como verificado para este cruzamento, indica a possibilidade de seleção de cultivares com níveis altos de resistência.

4.2 Identificação de marcadores SSR ligados a locos de resistência à raça 4⁺ do NCS

A extração de DNA das 122 plantas individuais F₂, dos F₁s e dos parentais do cruzamento E96-776 (suscetível) x E97-2502-9-3-1 (resistente) seguiu o protocolo proposto por Keim et al. (1988), com algumas modificações. Os DNA obtidos apresentaram concentrações variando de 81-808 ng/μL e grau de pureza, estimados pela razão entre as leituras espectrofotométricas a 260 e 280 nm, de 1,49 a 1,72. Praticamente todas as preparações apresentaram, quando submetidas a um teste de integridade, padrões de bandas semelhantes aos das amostras do DNA controle. Portanto, embora trabalhosa, a metodologia de extração utilizada permitiu a obtenção, para a grande maioria das amostras, de DNA de boa qualidade e em quantidades suficientes para as amplificações.

Para verificar a existência de polimorfismos, os 74 *primers* de microssatélites (Tabela 7) foram testados com o DNA dos parentais. Vinte e três desses (*Sat-001, Sat-064, Sat-071, Sat-115, Sat-120, Sat-133, Sat-157, Sat-162, Satt 012, Satt 155, Satt 162, Satt 187, Satt 207, Satt 286, Satt 288, Satt 329, Satt 377, Satt 384, Satt 407, Satt 452, Satt 517, Satt 553 e Satt 589*) não amplificaram. As causas da não amplificação são desconhecidas, devem estar

relacionadas com as condições de PCR ou com a falta de homologia entre as sequências de bases dos *primers* com as dos DNAs testados.

Apenas 10 *primers* (*Sat-076*, *Sat-129*, *Sat-132*, *Satt 142*, *Satt 177*, *Satt 199*, *Satt 277*, *Satt 315*, *Satt 341* e *Satt 472*) foram polimórficos. Esse baixo número de seqüências polimórficas já era esperado, em função da baixa variabilidade genética do genoma da soja (Keim et al., 1990), e principalmente devido ao alto grau de parentesco entre os dois parentais.

Para verificar se os polimorfismos gerados estavam ligados com a resistência à raça 4⁺ do NCS, inicialmente os *primers* polimórficos foram testados em apenas 20 plantas F₂ resistentes. Como as bandas polimórficas obtidas com os *Sat-076*, *Sat-129*, *Sat-132*, *Satt 315* e *Satt 472* geraram muitas incertezas e o *primer Satt 191* estava contaminado, uma genotipagem segura das plantas somente foi possível para os *Satt 142*, *Satt 177*, *Satt 199* e *Satt 341*. Desses quatro *primers*, os *Satt 177* e *Satt 341*, localizados no grupo A2 (Cregan et al., 1999a) próximos dos loco *i* (cor da semente) e *RHg₄* (resistência ao NCS), apresentaram padrões de segregação para as bandas significativamente diferentes do esperado para um gene (Tabela 14) e foram considerados ligados.

Na seqüência, os *Satt 177* e *Satt 341* foram testados com todas as plantas F₂. Um teste de Qui-quadrado, aplicado aos dados resultantes da genotipagem de toda a população F₂ com esses marcadores e também com o loco *i*, mostrou que as três marcas apresentaram segregação mendeliana 1:2:1, como esperado por tratar-se de marcadores codominantes (Tabela 15).

TABELA 14 Testes de Qui-quadrado para os padrões de segregação de bandas das 20 plantas F₂ resistentes, genotipadas com quatro *primers* codominantes (1:2:1) e um dominante (3:1).

	<i>Satt 142</i>			<i>Satt 177</i>			<i>Satt 199</i>			<i>Satt 341</i>			<i>Satt 277</i>	
Padrões de Segregação														
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2
F ₂ Esp.	5	10	5	5	10	5	4,75	9,50	4,75	4,75	9,50	4,75	4,5	13,5
F ₂ Obs.	8	9	3	13	6	1	8	6	5	12	7	0	7	11
N	20			20			19			19			18	
$\chi^2/2$ g.l.	2,70 ^{ns}			17,60			3,53 ^{ns}			16,47			1,85 ^{ns} (1 g.l.)	
Probabil.	0,26			0,00			0,17			0,00			0,17	

$\chi^2 = \sum(O - E)^2/E$; 1=presença da banda do parental resistente; 2= presença das duas bandas; 3=presença da banda do parental suscetível.

TABELA 15 Testes de Qui-quadrado para os padrões de segregação de bandas ou da cor do tegumento das sementes da população F₂, genotipada com três marcadores codominantes (1:2:1).

	<i>Satt 177</i>			<i>Satt 341</i>			<i>Loco i</i>		
Padrões de segregação									
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
F ₂ esperado	29,75	59,5	29,75	22,75	45,5	22,75	31	62	31
F ₂ observado	40	50	29	28	46	17	32	63	29
N	119			91			124		
$\chi^2/2$ g.l.	5,07 ^{ns}			2,67 ^{ns}			0,18 ^{ns}		
Probabilidade	0,08			0,26			0,92		

$\chi^2 = \sum(O - E)^2/E$;

1=presença da banda do parental resistente ou sementes com tegumento preto; 2= presença das duas bandas ou sementes com tegumento de cor intermediária (hilo esparramado); 3=presença da banda do parental suscetível ou sementes com tegumento amarelo.

Para medir os efeitos e mapear os QTLs de resistência, foram realizadas análises de variância, regressão, correlação e de LOD (Morton, 1955) por meio do mapeamento por intervalo.

As análises de variância foram realizadas para o caráter número médio de fêmeas das famílias $F_{2,3}$, utilizando cada uma dos marcadores individualmente (Tabela 16) ou combinados dois a dois (Tabela 17). Como tais marcadores são codominantes, também foi possível separar, por meio de análises de regressão linear, os efeitos aditivos e dominantes relacionados a cada um deles (Tabela 16). Todos os três marcadores mostraram forte ligação ($P < 0,01$) com resistência à raça 4⁺ do NCS. Embora tenham sido detectados efeitos de dominância, no sentido da resistência, para todos os marcadores, os efeitos aditivos predominaram sempre (Tabela 16). A maior dominância (14,4%) foi verificada para o marcador *Satt 341*. As variações no número de fêmeas que puderam ser explicadas pelos loco *i*, *Satt 341* e *Satt 177*, individualmente, foram de 64,1%, 55,1% e 30,7%, respectivamente. Quando os marcadores foram analisados em conjunto, verificou-se que ambos, *Satt 177* e *Satt 341*, interagem significativamente com o loco *i*, aumentando a porcentagem da variação fenotípica explicada. Embora a associação entre os dois microssatélites tenha sido não significativa, a utilização conjunta dos dois é vantajosa, uma vez que a variação fenotípica explicada aumenta de 55,1% (*Satt 341*) e 30,7% (*Satt 177*) para 65,0%.

Na análise conjunta dos três marcadores, utilizando regressão com vários fatores (*stepwise*), o modelo final incluiu apenas o *Satt 341* e o loco *i*, cujos efeitos foram significativos ($P < 0,15$). O modelo com esses dois marcadores explicou 72,0% da variação fenotípica, valor muito próximo dos 71,2% explicados pelo loco *i* sozinho.

TABELA 16 Médias do número de fêmeas das famílias F₃, derivadas das plantas F₂ genotipadas, estimativas dos efeitos genéticos aditivos (d) e dominantes (h), coeficientes de determinação (R²) e significância (p) dos efeitos, totais, aditivos e dominantes, obtidos para cada um dos marcadores SSR e loco *i*.

Marcador	Médias do número de fêmeas ¹			Efeitos genéticos		
	AA ²	Aa	aa	Total	Aditivo	Dominante
<i>Loco i</i>	4,25a	91,84b	222,02c	-	108,89	-21,30
P (%)	-	-	-	<0,01	<0,01	4,40
R ² (%)	-	-	-	64,10	62,80	1,30
<i>Satt 341</i>	47,87a	71,69a	242,96b	-	97,55	-73,73
P (%)	-	-	-	<0,01	<0,01	<0,01
R ² (%)	-	-	-	55,10	40,70	14,40
<i>Satt 177</i>	51,48a	86,59a	191,21b	-	69,85	-34,76
P (%)	-	-	-	<0,01	<0,01	2,50
R ² (%)	-	-	-	30,70	27,60	3,10

¹médias seguidas pela mesma letra, na linha, não diferem significativamente pelo teste de Tukey (P=0,05); ²AA= plantas F₂ com a banda do parental resistente; Aa= plantas F₂ com as duas bandas (heterozigotas); aa= plantas F₂ com a banda do parental suscetível.

TABELA 17 Resumo das análises de variâncias para o caráter número médio de fêmeas das famílias F_{2,3}, utilizando os marcadores combinados dois a dois.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrados Médios	Probabilidades (%)
<i>Satt 177</i>	2	149.275,85	<0,1
<i>Satt 341</i>	2	103.935,32	<0,1
<i>Satt 177 * Satt 341</i>	4	6.593,88	13,92
<i>Satt 177</i>	2	172.220,71	<0,1
<i>Loco i</i>	2	206.021,88	<0,1
<i>Satt 177 * Loco i</i>	4	13.049,93	0,19
<i>Satt 341</i>	2	229.593,92	<0,1
<i>Loco i</i>	2	101.068,73	<0,1
<i>Satt 341 * Loco i</i>	4	11.393,19	0,03

Com o auxílio do programa Mapmaker/Exp e utilizando a técnica do mapeamento por intervalos, os marcadores *Satt 177*, *Satt 341* e o loco *i* foram empregados para a construção do mapa genético de ligação para a população F_2 estudada (Figura 3). Para um LOD mínimo de 3,0 e uma frequência de recombinação máxima de 50%, os três marcadores puderam ser incluídos num mesmo grupo de ligação, estendendo-se por uma distância de 46,7 cM. O loco *i* localizou-se entre os dois microssatélites, a 28,2 cM do *Satt 177* e a 18,4 cM do *Satt 341*. A ordem dos marcadores no mapa gerado foi equivalente àquela do grupo A2 do mapa genético da soja (Figura 4). A presença dos três marcadores e do(s) loco(s) envolvidos na resistência, num mesmo grupo de ligação, também foi confirmada ($P < 0,0001$) pelas análises de correlação (Tabela 18).

TABELA 18. Coeficientes de correlação (%) observados entre os marcadores e entre estes e o caráter número de fêmeas.

	<i>Satt 341</i>	Loco <i>i</i>	N. de fêmeas
<i>Satt 177</i>	46,8	54,9	52,3
<i>Satt 341</i>	-	66,9	63,8
Loco <i>i</i>	-	-	79,3

Para a localização de QTLs de resistência foi realizada, com o auxílio do programa MAPMAKER/QTL, uma análise sobre os três marcadores (Figura 3). Verificou-se presença de pelo menos um alelo de resistência, situado a cerca de 4 cM do loco *i*, 24 cM do *Satt 177* (LOD= 45,59) e 14,4 cM do *Satt 341* (LOD= 46,90). A região genômica identificada foi capaz de explicar mais de 87% da variação fenotípica. Essa região inclui também o *Satt 187* (Figura 4), para o qual os estudos de Carvalho (1999) e Arias et al. (2001) explicaram grande parte da variação fenotípica para a resistência às raças 3 e 4⁺ do NCS, respectivamente. No presente trabalho, diferentemente do observado por Arias et al. (2001), no cruzamento 'Hartwig' x PI 437654, o *Satt 187* não pôde ser associado com a resistência à raça 4⁺. As amplificações com o mesmo não

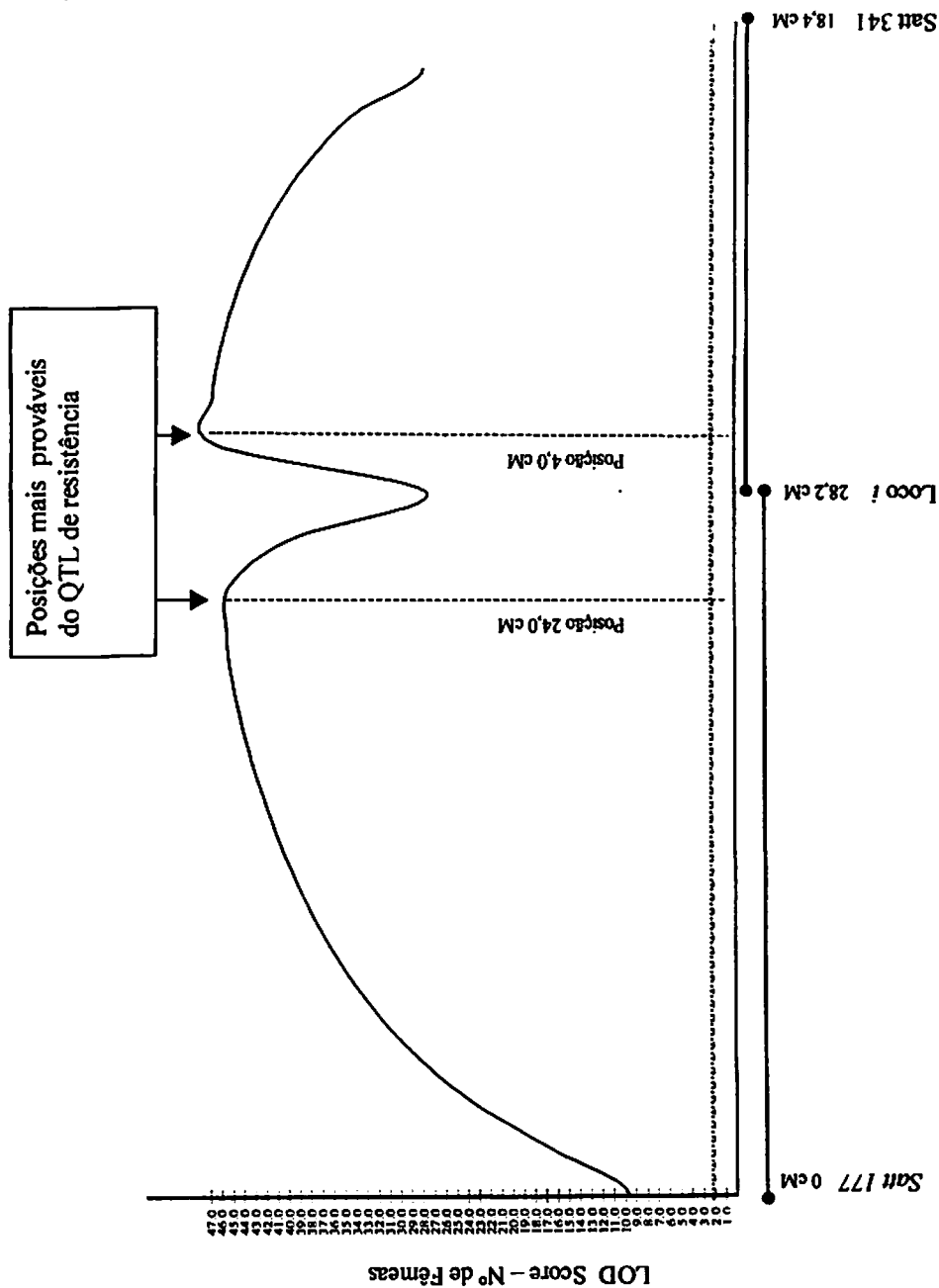


FIGURA 3 Análise de QTL indicando LODs para os marcadores Sat1 177, Loco i e Sat1 341, do grupo de ligação A2.

USDA/Iowa St.

Univ. of Utah

Univ. of Nebraska

Classical

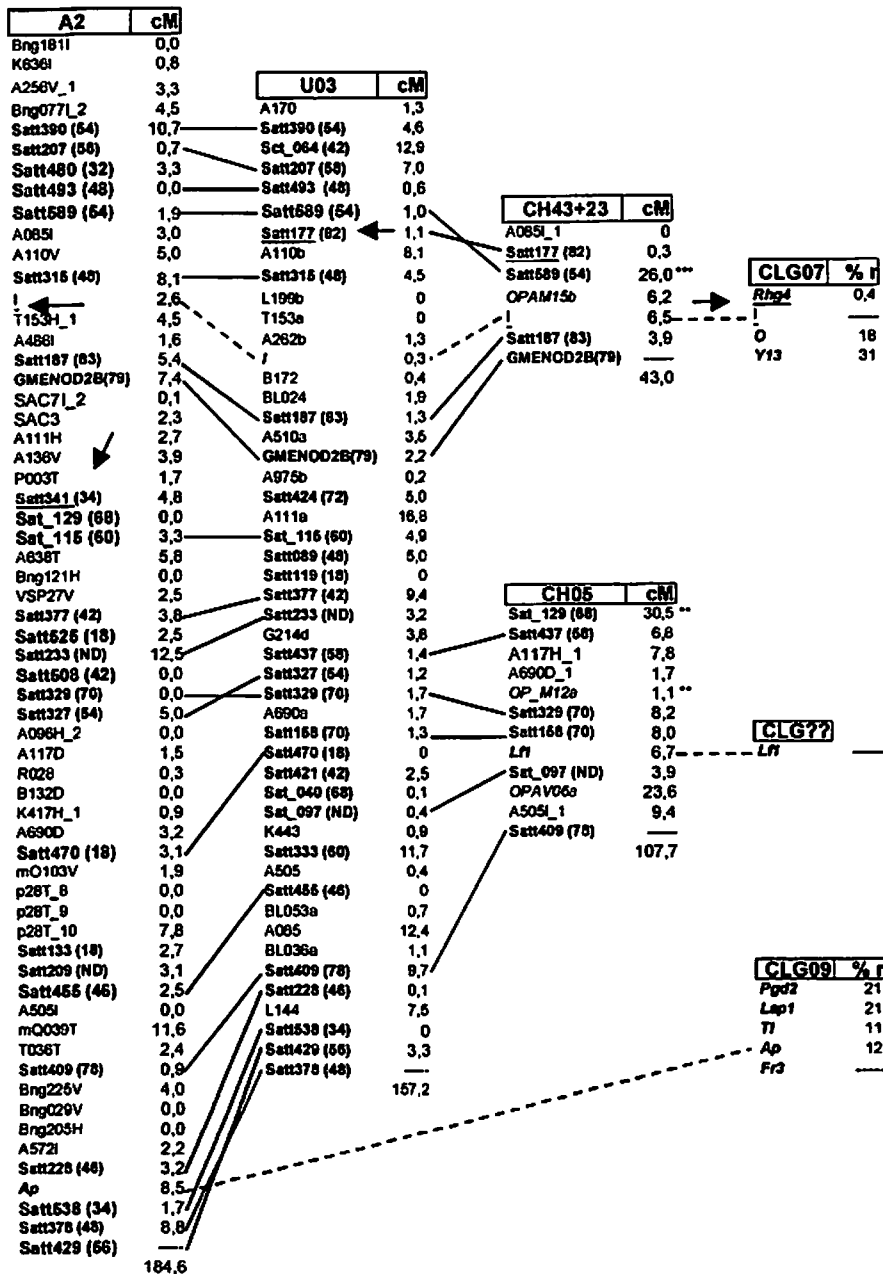



FIGURA 4 Grupo de ligação A2 do mapa genético da soja (Cregan et al., 1999a).



tiveram sucesso. Possivelmente, os vários retrocruzamentos a que foram submetidas as PI 437654 e 'Hartwig' resultaram em mudanças nas seqüências de bases que flanqueiam o *Satt 187*.

A região mapeada coincide com aquela do grupo A2 do mapa genético da soja, no qual foi localizado, em 'Peking' (Mahalingan & Skoruska, 1995; Chang et al., 1997; Mathews et al., 1998; Meksen et al., 2001) e na PI 437654 (Webb et al., 1995; Prabhu et al., 1999), o alelo *Rhg4*. No mapa genético da soja (Cregan et al., 1999), o *Rhg4* foi mapeado mais próximo do loco *i* (0,35% de recombinação) do que no cruzamento aqui analisado (4 cM). Para o melhoramento, o fato de essa ligação não ser muito forte é desejável, pois aumenta a chance do aparecimento nas populações segregantes de genótipos resistentes à raça 4⁺ e com sementes amarelas. A cor preta do tegumento da semente, conferida pelo loco *i*, é uma característica indesejável.

O fato de a região mapeada não ter explicado toda a variação no número de fêmeas sugere que outros genes menores também podem estar envolvidos na resistência. Na PI 437654, além do *Rhg4*, também já foi relatada a presença de um loco de resistência (*rhg1*) no grupo G (Webb et al., 1995). Esse loco controla mais de 50% da variação total para a resistência a várias raças do NCS e também está presente em 'Peking' (Mahalingam & Skorupska, 1995; Chang et al., 1997; Mathews et al., 1998; Meksem et al., 2001), PI 209332 (Concibido et al., 1996), PI 88788 (Concibido et al., 1997; Bell-Johnson et al., 1998; Cregan et al., 1999a,b,c) e PI 90763 (Concibido et al., 1997). Arias et al. (2001) também encontraram no grupo G, próximo ao *Satt 191*, um QTL de efeito menor para resistência à raça 4⁺. No cruzamento aqui analisado o *Satt 191*, embora polimórfico, não pôde ser testado na população F₂, pois estava contaminado. O *Satt 199*, também localizado no grupo G, mostrou-se polimórfico entre os dois parentais, mas não mostrou ligação com a resistência (Tabela 15). É possível que a não detecção da ligação tenha ocorrido em função de o teste ter incluído

somente plantas com altos níveis de resistência. Talvez a melhor estratégia fosse priorizar as plantas com níveis intermediários de resistência ou uma amostra de plantas suscetíveis.

Embora o gene detectado no grupo A2 proporcione um nível adequado de resistência à raça 4⁺ do NCS, a incorporação de um único gene não é desejável. Dada a grande variabilidade do NCS no Brasil (Dias et al., 1999b), existe a possibilidade de uma nova raça ser selecionada e comprometer a vida útil da cultivar. Na presença de genes menores, mesmo que o efeito do gene maior seja vencido, a cultivar ainda ficará com níveis razoáveis de resistência.

Considerando apenas as plantas resistentes (IF<10%), a utilização dos *Satt 177*, *Satt 341* e loco *i* resultou em eficiências de seleção de 62,5%, 67,8% e 100%, respectivamente. Com a utilização dos dois marcadores SSR combinados, esta eficiência subiu para 81,2%.

Como constatado no presente estudo, os marcadores *Satt 177* e *Satt 341* apresentam potencial para utilização na identificação de genótipos de soja resistentes à raça 4⁺ do NCS. Entretanto, como a técnica é bastante trabalhosa e tem um custo relativamente elevado, a utilização rotineira dos mesmos depende de análise custo/benefício, comparativamente às avaliações em casa-de-vegetação.

Apesar de o loco *i*, a princípio, não ser um marcador útil, uma vez identificados os genótipos resistentes com semente amarela, a utilização do mesmo passará a ser muito interessante. Para isso, as plantas resistentes e de semente amarela deverão ser cruzadas com plantas de semente preta, observadas com certa frequência dentro das cultivares comerciais de soja. Como agora a ligação da resistência é com a cor amarela (loco *i*⁺), todas as plantas com semente preta serão eliminadas e as de semente amarela, avançadas. Nas gerações avançadas, a resistência seria apenas confirmada.

5 CONCLUSÕES

A análise conjunta dos resultados obtidos nos estudos de genética mendeliana, genética quantitativa e de marcadores moleculares permitiu tirar, com relação à raça 4⁺ do NCS, as seguintes conclusões:

Efeitos de recíprocos (herança materna e citoplasmática) não influenciam a herança da resistência.

Efeitos aditivos (predominantemente), de dominância parcial no sentido da resistência e de epistasia do tipo aditivo x aditivo, estão envolvidos na resistência.

As estimativas de herdabilidade indicam a possibilidade de ganhos com seleção para resistência. Apesar dos efeitos de dominância, a seleção pode ser efetuada em gerações precoces, preferencialmente com médias de famílias.

Dois genes, um maior, localizado no grupo A2 e fortemente ligado ao loco *i*, e outro menor, hipostático ao anterior, explicam a resistência; o segundo gene é desejável para o desenvolvimento de cultivares com níveis variados de resistência.

Os marcadores, loco *i*, *Satt 341* e *Satt 177*, sozinhos ou combinados, apresentam potencial para utilização na identificação de genótipos de soja resistentes.

6 CONSIDERAÇÕES FUTURAS

Esclarecida a herança e mapeado, próximo ao loco *i* (cor do tegumento da semente), um QTL principal de resistência à raça 4⁺ do NCS, o desafio agora é obter o recombinante resistente e com sementes amarelas. Uma vez rompida a ligação da resistência com a cor preta da semente, esforços serão concentrados na transferência da resistência para cultivares elites de soja. Para melhorar a eficiência da seleção assistida, outros grupos de ligação e marcadores SSR serão investigados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELNOOR, R. V.; ALMEIDA, A. M. R. Uso de marcadores moleculares nos estudos do nematóide de cisto da soja. In: SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEMATOLOGIA. **O nematóide de cisto da soja: a experiência brasileira**. Jaboticabal: Artsigner Editores, 1999. p. 119-130.
- ABDELNOOR, R. V.; DIAS, W. P.; SILVA, J. F. V.; MARIN, S. R. R.; KIIHL, R. A. S. Caracterização molecular de populações do nematóide-de-cisto-da-soja com diferentes índices de parasitismo na cultivar Hartwig. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 2, p. 331-337, fev. 2001.
- ANAND, S. C. Sources of resistance to the soybean cyst nematode. In: LAMBERTI, F.; TAYLOR, C. E. (Ed.). **Cyst nematodes**. New York: Plenum Press, 1985. p. 269-276.
- ANAND, S. C. Registration of soybean germplasm line S88-2036 having multiple-race soybean cyst nematode resistance. **Crop Science**, Madison, v. 31, n. 3, p. 856, May/June 1991.
- ANAND, S. C. Registration of 'Hartwig' soybean. **Crop Science**, Madison, v. 32, n. 4, p. 1069-1070, July 1992.
- ANAND, S. C. Genetic diversity for resistance to *Heterodera glycines* race 5 in soybean. **Journal of Nematology**, Hanover, v. 26, n. 1, p. 76-79, Mar. 1994.

ANAND, S. C.; GALLO, K. M. Identification of additional soybean germplasm with resistance to race 3 of soybean cyst nematode. **Plant Disease**, St. Paul, v. 68, n. 7, p. 593-595, July 1984.

ANAND, S. C.; RAO-ARELLI, A. P. Genetic analyses of soybean genotypes resistant to soybean cyst nematode race 5. **Crop Science**, Madison, v. 29, n. 5, p. 1181-1184, Sept./Oct. 1989.

ANAND, S. C.; MYERS, G. O.; RAO-ARELLI, A. P. Resistance to race 3 of soybean cyst nematode in PI 437654. **Crop Science**, Madison, v. 28, n. 3, p. 563-564, May/June 1988.

ARIAS, C. A. A.; TOLEDO, J. F. F. de; YORINORI, J. T. An improved procedure for testing theoretical segregation models in quantitative genetic studies of soybeans. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 17, n. 3, p. 291-297, Sept. 1994.

ARIAS, C. A. A.; ALMEIDA, A. M. R.; ABDELNOOR, R. V.; SILVA, J. F. V.; MARTINS, M. K.; MARIN, S. R. R.; JUNG, R.; BROGIN, R. L.; DIAS, W. P.; KIIHL, R. A. S. Identificação de marcadores moleculares ligados a genes de resistência a doenças: resultados de pesquisa da Embrapa Soja-2000: ecofisiologia e biologia molecular. Londrina: Embrapa Soja, 2001. p. 28-31. (Documentos. Embrapa Soja, 164).

ASSUNÇÃO, M. S. da. Soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*, resistance genes in PI 89772 and PI 209332 soybean. 2000. 52p. Thesis (PHD in Plant Pathology) - University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, Illinois.

BELL-JOHNSON, B. B.; GARGEY, G.; JOHNSON, J.; MEKSEM, K.; LIGHTFOOT, D. A. Methods for high-throughput marker assisted selection for soybean. **Soybean Genetics Newsletter**, Ames, v. 25, p. 115-118, May 1998.

BOERMA, H. R.; HUSSEY, R. S. Breeding plants for resistance to nematodes. **Journal of Nematology**, Hanover, v. 24, n. 2, p. 242-252, June 1992.

BRIM, C. A.; ROSS, J. P. Registration of Pickett soybeans. **Crop Science**, Madison, v. 6, n. 3, p. 305, May/June 1966.

CALDWELL, B. E.; BRIM, C. A.; ROSS, J. P. Inheritance of resistance to soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*. **Agronomy Journal**, Madison, v. 52, n. 10, p. 635-636, Oct. 1960.

CARNEIRO, N. P. Tipos de marcadores utilizados no melhoramento de plantas. In: SIMPÓSIO DE ATUALIZAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, 6., 2002, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2002. p. 1-13.

CARVALHO, V. P. Identificação de marcadores moleculares para resistência ao nematóide de cisto da soja (*Heterodera glycines* Ichinohe, raça 3). 1999. 75 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

CAVALI, J. L. An analysis of linkage in quantitative inheritance. In: REEVE, E. C. R.; WADDIGTON, C. H. (Ed.). **Quantitative inheritance**. London: HMSO, 1952. p. 135-144.

CAVINESS, C. E. Breeding for resistance to soybean cyst nematode. In: RIGGS, R. D.; WRATHER, J. A. (Ed.). **Biology and management of the soybean cyst nematode**. St. Paul: APS Press, 1992. p. 143-156.

CERVIGNI, G. D. L. Mapeamento de genes de resistência à raça 3 do nematóide de cisto da soja (*Heterodera glycines* Ichinohe). 1999. 52 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

CHANG, S. J. C.; DOUBLER, T. W.; KILO, V. Y.; ABU-THEDEIH, J.; PRABHU, R.; FREIRE, V.; SUTTNER, R.; KLEIN, J.; CHMIDT, M. E.; GIBSON, P. T.; LIGHTFOOT, D. A. Association of loci underlying field resistance to soybean sudden death syndrome (SDS) and cyst nematode (SCN) race 3. **Crop Science**, Madison, v. 37, n. 3, p. 965-971, May/June 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**, Madison, v. 34, n. 1, p. 240-246, Jan./Feb. 1994.

CONCIBIDO, V. C.; DENNY, R. L.; LANGE, D. A.; DANESH, D.; ORF, J. H.; YOUNG, N. D. The soybean cyst nematode resistance gene on linkage group G is common among sources of resistance. **Soybean Genetics Newsletter**, Ames, v. 22, p. 269-272, 1995.

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*, Madison, v. 37, n. 6, p. 1643-1650, Nov./Dec. 1996a.

CONCIBIDO, V. C.; BOUTIN, S.; DENNY, R. L.; HAUTEA, R.; ORF, J. H.; YOUNG, N. D. Targeted comparative genome analysis and qualitative mapping of a major partial resistance gene to the soybean cyst nematode resistance. *Theoretical Applied Genetics*, Berlin, v. 93, n. 1/2, p. 234-241, July 1996b.

CONCIBIDO, V. C.; LANGE, D. A.; 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*, Madison, v. 37, n. 1, p. 258-264, Jan./Feb. 1997.

CREGAN, P.; JARVIK, T.; BUSH, A. L.; SHOEMAKER, R. C.; LARK, K. G.; KAHLER, A. L.; VanTOAL, T. T.; LOHNES, D. G.; CHUNG, J.; SPECHT, J. E. An integrated genetic linkage map of the soybean. *Crop Science*, Madison, v. 39, p. 1464-1490, Sept./Oct. 1999a.

CREGAN, P. B.; MUDGE, J.; FICKUS, E. W.; DANEH, D.; DENNY, R.; YOUNG, N. D. Two simple sequence repeat markers to select for soybean cyst nematode resistance conditioned by the *rhg1* locus. *Theoretical Applied Genetics*, Berlin, v. 99, n. 5, p. 811-818, Sept. 1999b.

CREGAN, P. B.; MUDGE, J.; FICKUS, E. W.; DENNY, R.; DANEH, D.; YOUNG, N. D. Target isolation of simple sequence repeat markers through the use of bacterial artificial chromosomes. *Theoretical Applied Genetics*, Berlin, v. 99, n. 6/7, p. 918-928, May 1999c.

CRUZ, C. D.; VIANA, J. M. S.; CARNEIRO, P. C. S. *Genética volume II GBOL- Software para ensino e aprendizagem de genética*. Viçosa: Editora UFV, 2001. 476 p.

DIERS, B. W.; SKORUPSKA, H. T.; RAO-ARELLI, A. P.; CIANZIO, S. R. Genetic relationships among soybean plant introductions with resistance to soybean cyst nematode. *Crop Science*, Madison, v. 37, n. 6, p. 1966-1972, Nov./Dec. 1997.

- DIAS, W. P.; SILVA, J. F. V.; KIIHL, R. A. S.; HIROMOTO, D. M.; ABDELNOOR, R. V. Quebra da resistência da cv. Hartwig por população de campo do nematóide de cisto da soja (*Heterodera glycines*). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 6, p. 971-973, jun. 1998.
- DIAS, W. P.; SILVA, J. F. V.; HIROMOTO, D. M.; KIIHL, R. A. S. Ocorrência de uma segunda população do nematóide de cisto da soja (NCS) "quebrando" a resistência da cv. Hartwig no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 1999, Londrina, PR. **Anais...** Londrina: Embrapa Soja, 1999a. p. 462.
- DIAS, W. P.; SILVA, J. F. V.; WAIN, A. L.; PEREIRA J. E. Distribuição de raças de *Heterodera glycines* no Brasil. In: SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEMATOLOGIA. **O nematóide de cisto da soja: a experiência brasileira**. Jaboticabal: Artsigner Editores, 1999b. p. 95-103.
- DIERS, B. W.; SKORUPSKA, H. T.; RAO-ARELLI, A. P.; CIANZIO, S. R. Genetic relationships among soybean plant introductions with resistance to soybean cyst nematode. **Crop Science**, Madison, v. 37, n. 6, p. 1966-1972, Nov./Dec. 1997.
- DOUBLER, T. W.; SUTTNER, B.; CHANG, S. J. C.; GIBSON, P. T.; LIGHTFOOT, D. A. Qualitative inheritance of quantitative trait loci. **Soybean Genetics Newsletter**, Ames, v. 24, p. 139-141, May 1997.
- EPPS, J. M.; HARTWIG, E. E. Reaction of soybean varieties and strain to race 4 of the soybean cyst nematode. **Journal of Nematology**, Beltsville, v. 4, n. 4, p. 222, Oct. 1972. (Abstract).
- EDWARDS, M. D.; STUBER, C. W.; WENDEL, J. F. Molecular-marker-facilitated investigations of quantitative-trait loci in maize. I- Numbers, genomic distribution and types of gene action. **Genetics**, Baltimore, v. 116, n. 1, p. 113-125, May 1987.
- FAGHIHU, J.; VIERLING, R. A.; HALBRENDT, J. M.; FERRIS, V. R.; FERRIS, J. M. Resistance genes in a 'Williams 82' x 'Hartwig' soybean cross to an inbred line of *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology**, Hanover, v. 27, n. 3, p. 418-421, Sept. 1995.
- FALCONER, D. S. **Introduction to quantitative genetics**. Tradução de M. A. Silva e J. C. Silva. Viçosa, MG: UFV. Imprensa Universitária, 1981. 279 p.

FERRAZ, L. C. C. B. As Meloidoginoses da soja: passado, presente e futuro. In: SILVA, J. F. V. (Org.). *Relações parasito-hospedeiro nas Meloidoginoses da soja*. Londrina: Sociedade Brasileira de Nematologia & Embrapa Soja, 2002. p. 15-38.

GOLDEN, A. M.; EPPS, J. M.; RIGGS, R. D.; DUCLOS, L. A.; FOX, J. M.; BERNARD, R. L. Terminology na identity of infraspecific forms of the soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*). *Plant Disease Reporter*, St. Paul, v. 54, n. 6, p. 544-546, June 1970.

GUILLIN, E. A.; GILLI, J. R.; BAIGORRI, H. E. J. Frecuencia de alelos de resistencia a *Heterodera glycines* (raza 3) en germoplasma argentino de soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA E MERCOSOJA, 2., 2002, Foz do Iguaçu, PR. *Resumos...* Londrina: Embrapa Soja, 2002. p. 154. (Embrapa Soja. Documentos, 181).

HANCOCK, J. A.; HANCOCK, F. G.; CAVINESS, C. E.; RIGGS, R. D. Genetics of resistance in soybean to "race x" of soybean cyst nematode. *Crop Science*, Madison, v. 27, n. 4, p. 704-707, July/Aug. 1987.

HARTWIG, E. E. Breeding productive soybeans with resistance to the soybean cyst nematode. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 3., 1985, Boulder. *Proceedings...* Boulder: Westview Press, 1985. p. 394-399.

HARTWIG, E. E.; EPPS, J. M. Dyer soybeans. *Crop Science*, Madison, v. 8, n. 3, p. 402, May/June 1972.

HARTWIG, E. E.; YOUNG, L. D. Registration of Cordell soybeans. *Crop Science*, Madison, v. 30, n. 1, p. 231-232, Jan./Feb. 1990.

HARTWIG, E. E.; YOUNG, L. D. Registration of soybean germplasm line J81-116. *Crop Science*, Madison, v. 26, n. 1, p. 209, Jan./Feb. 1986.

HEER, J. A.; KNAP, H. T.; MAHALINGAM, R.; SHIPE, E. R.; RAO-ARELLI, A. P.; MATTHEWS, B. F. Molecular markers for resistance to *Heterodera glycines* in advanced soybean germplasm. *Molecular Breeding*, Dordrecht, v. 4, n. 4, p. 359-367, 1998.

KEIM, P.; OLSON, T. C.; SHOEMAKER, R. C. A rapid protocol for isolating soybean DNA. *Soybean Genetics Newsletter*, Ames, v. 15, p. 150-152, Apr. 1988.

KEIM, P.; OLSON, T. C.; SHOEMAKER, R. C. RFLP mapping in soybean: association between marker loci and variation in quantitative traits. *Genetics*, Baltimore, v. 126, n. 3, p. 735-742, Nov. 1990

KIIHL, R. A. S.; ALMEIDA, L. A.; SOUZA, P. I. M.; HIROMOTO, D. M.; ARANTES, N. E.; FARIAS, L. C.; MIRANDA, M. A. C.; MORCELI, A.; TAKEDA, C.; BONATO, E. R.; BERTAGNOLLI, P. F.; PRADO, E. E. **Desenvolvimento de germoplasma de soja adaptados às várias regiões ecológicas e aos vários sistemas de produção: resultados de pesquisa da Embrapa Soja-1999.** Londrina: Embrapa Soja, 2000. p. 144-145. (Embrapa Soja. Documentos, 142).

KILO, V. Y.; ABU-THREDEIH, J.; CHANG, S. J. C.; GIBSON, P. T.; LIGHTFOOT, D. A. Coinheritance of resistance to SCN and SDS in Pyramid x Douglas. *Soybean Genetics Newsletter*, Ames, v. 24, p. 126-127, May 1997.

KOENNING, S. R.; BARKER, K. R. Survey of *Heterodera glycines* races and other plant-parasitic nematodes on soybean in North Carolina and race status of *Heterodera glycines* populations. *Journal of Nematology*, Hanover, v. 30, n. 4, p. 569-576, Dec. 1998. Supplement.

LANDER, E. S.; BOTSTEIN, D. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics*, Baltimore, v. 121, n. 1, p. 185-199, Jan. 1989.

LANZA, M. A.; GUIMARÃES, C. T.; SHUSTER, I. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v. 21, n. 204, p. 97-108, maio/jun. 2000.

LIMA, R. D.; FERRAZ, S.; SANTOS, J. M. Ocorrência de *Heterodera* sp., em soja, no Triângulo Mineiro. *Nematologia Brasileira*, Piracicaba, v. 16, p. 101-102, 1992. Resumo.

LINCOLN, D. M. J.; LANDER, E. S. Constructing genetic linkage maps with Mapmaker/Exp version 3. 0, mapping genes controlling quantitative traits using Mapmaker/QTL, version 1. 1. In: LANDER, E. S. (Ed.). **A tutorial and reference manual.** Cambridge: Whitehead Institute for Biomedical Research, 1993. 73 p.

LORDELLO, A. I. L.; LORDELLO, R. R. A.; QUAGGIO, J. A. *Heterodera* sp. reduz a produção de soja no Brasil. *Nematologia Brasileira*, Piracicaba, v. 16, p. 101, 1992. Resumo.

- LUEDDERS, V. D.; ANAND, S. C. Attempt to select a cyst nematode population on soybean plant introduction 437654. **Journal of Nematology**, Lawrence, v. 21, n. 2, p. 264-267, Apr. 1989.
- LUEDDERS, V. D.; WILLIAMS, L. F.; MATSON, A. Registration of Custer soybeans. **Crop Science**, Madison, v. 8, n. 3, p. 402, May/June 1968.
- MAHALINGAM, R.; SKORUPSKA, H. T. DNA markers for resistance to *Heterodera glycines* race 3 in the soybean cultivar 'Peking'. **Breeding Science**, Tokyo, v. 45, n. 4, p. 435-445, Dec. 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**, Madison, v. 33, n. 6, p. 249-1253, Nov/Dec. 1993.
- MATHER, K.; JINKS, J. L. **Biometrical genetics**. 3. ed. London: Chapman and Hall, 1982. 369 p.
- MATHEWS, B. F.; MaC DONALD, M. H.; GEBHART, J. S.; DEVINE, T. E. PCR markers residing close to the *Rhg4* locus conferring resistance to the soybean cyst nematode race 3 on linkage group A2 of soybean . **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 97, n. 7, p. 1047-1052, Nov. 1998.
- MATSON, A. L.; WILLIAMS, L. F. Evidence of a fourth gene for resistance to the soybean cyst nematode. **Crop Science**, Madison, v. 5, n. 5, p. 477, Sept./Oct. 1965.
- MAURO, A. O.; OLIVEIRA, A. L. de; MAURO, S. M. Z. Genetics of resistance to soybean cyst nematode, *Heterodera glycines* Ichinohe (race 3), in a Brazilian soybean population. **Genetic Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 22, n. 2, p. 1415-1422, June 1999.
- MAURO, A. O.; TREVISOLI, S. H. U.; LEMOS, E. G. M.; OLIVEIRA, R. C.; DI MAURO, S. M. Z.; GONÇALVES, E. C. P.; BÁRBARO, I. M.; MUNIZ, F. R. S. Assisted selection for resistance to soybean cyst nematode (race 3). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA E MERCOSOJA, 2., 2002, Foz do Iguaçu, PR. **Resumos...** Londrina: Embrapa Soja, 2002. p. 25. (Embrapa Soja. Documentos, 181).

MEKSEM, K.; PANTAZOPOULOS, P.; NJIT, V. N.; HYTEN, L. D.; RAO-ARELLI, A. P.; LIGHTFOOT, D. A. 'Forrest' resistance to the soybean cyst nematode is bigenic: saturation mapping of the *Rhg1* and *Rhg4* loci. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 103, n. 5, p. 710-717, Oct. 2001.

MENDES, M. L.; MACHADO, C. C. Levantamento preliminar da ocorrência do nematóide de cisto da soja, (*Heterodera glycines* Ichinohe), no Brasil. Londrina: Embrapa Soja, 1992. 5 p. (Embrapa Soja. Comunicado Técnico, 53).

MICHELMORE, R. W.; PARAN, J.; KESSELI, R. V. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregation populations. **Proceedings of National Academy Science of the United States of America**, Washington, v. 88, n. 21, p. 9828-9832, Nov. 1991.

MILLER, L. I. Physiologic variation of five isolates of the soybean cyst nematode. **Virginia Journal Science**, Virginia, v. 29, p. 99, 1969b. Abstract.

MILLER, L. I. Physiologic variation of six isolates of the soybean cyst nematode. **Phytopathology**, St. Paul, v. 59, p. 1558, 1969a. Abstract.

MILLER, L. I. Physiologic variation within the Virginia- 2 population on *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology**, Lawrence, v. 3, n. 4, p. 318, Oct. 1971. Abstract.

MONTEIRO, A. R.; MORAIS, S. R. A. C. Ocorrência do nematóide de cistos da soja, *Heterodera glycines* Ichinohe, 1952, prejudicando a cultura no Mato Grosso do Sul. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 16, p. 101-102, 1992. Resumo.

MOORE, W. F.; BOST, S. C.; BREWER, F. L.; DUN, R. A.; ENDO, B. Y.; GRAU, C. R.; HARDMAN, L. L.; JACOBSEN, B. J.; LEFFEL, R.; NEWMAN, M. A.; NYVALL, R. F.; OVERSTREET, C.; PARKS, C. L. **Soybean cyst nematode**. Washington: Soybean Industry Resource Committee, 1984. 23 p.

MORTON, N.E. Sequential test for detection of linkage. **American Journal Human Genetics**, Chicago, v.7, n.5, p. 277-318, 1955.

MUDGE, J.; GREGAN, P. B.; KENWORTHY, J. P.; KENWORTHY, W. J.; ORF, J. H.; YOUNG, N. D. Two microsatellite markers that flank the major soybean cyst nematode resistance locus. **Crop Science**, Madison, v. 37, n. 5, p. 1611-1615, Sept./Oct. 1997.

MYERS, G. O.; ANAND, S. C. Inheritance of resistance and genetic relationships among soybean plant introductions to races of soybean cyst nematode. **Euphytica**, Wageningen, v. 55, n. 3, p. 197-201, June 1991.

OLIVEIRA, M. F. **Análise e previsão do potencial genético de um cruzamento de soja usando vários delineamentos em três épocas de semeadura**. 1994. 114 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

PALM, E. W.; BALDWIN, C. H.; SCOTT, J. T.; LUEDDERS, V. D.; SHANON, G. The soybean cyst nematode. **Science and Technology Guide**. Missouri: University of Missouri/ Columbia Science and Technology Guide Division, 1978. 4 p.

PRABHU, R. R.; NJITI, V. N.; BELL-JOHNSON, B.; JOHNSON, J. E.; SCHMIDT, M. E.; KLEIN, J. H.; LIGHTFOOT, D. A. Selecting soybeans cultivars for dual resistance to soybean cyst nematode and sudden death syndrome using two DNA markers. **Crop Science**, Madison, v. 39, n. 4, p. 982-987, July/Aug. 1999.

QIU, B. X.; RAO-ARELLI, P. R.; SLEPER, D. A. RFLP markers associated with soybean nematode resistance and seed composition in a 'Peking' x 'Essex' population. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 98, n. 3/4, p. 356-364, Mar. 1999.

QIU, B. X.; SLEPER, D. A.; RAO-ARELLI, A. P. Genetic and molecular characterization of resistance to *Heterodera glycines* race isolates 1, 3, and 5 in Peking. **Euphytica**, Wageningen, v. 96, p. 225-231, 1997.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B. dos; PINTO, C. A. B. P. **Genética na agropecuária**. Lavras: Editora UFLA, 2000. 472 p.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B. dos; ZIMMERMANN, M. J. **Genética quantitativa em plantas autógamas: aplicações no melhoramento do feijoeiro**. Goiânia: UFG, 1993. 271 p.

RAO-ARELLI, A. P. Inheritance of resistance to *Heterodera glycines* race 3 in soybean accessions. **Plant Disease**, St. Paul, v. 78, n. 9, p. 898-900, Sept. 1994.

- RAO-ARELLI, A. P.; ANAND, S. C. Genetic relationships among soybean plant introduction for resistance to race 3 of soybean cyst nematode. **Crop Science**, Madison, v. 28, n. 4, p. 650-652, July/Aug. 1988.
- RAO-ARELLI, A. P.; ANAND, S. C.; MYERS, G. O. Partial dominance of susceptibility in soybean to soybean cyst nematode races 3, 4 e 5. **Crop Science**, Madison, v. 29, n. 6, p. 1562-1564, Nov./Dec. 1989.
- RAO-ARELLI, A. P.; ANAND, S. C.; WRATHER, J. A. Soybean resistance to soybean cyst nematode race 3 is conditioned by na additional dominant gene. **Crop Science**, Madison, v. 32, n. 4, p. 862-864, July/Aug. 1992a.
- RAO-ARELLI, A. P.; WRATHER, J. A.; ANAND, S. C. Genetic diversity among isolates of *Heterodera glycines* and sources of resistance in soybeans. **Plant Disease**, St. Paul, v. 76, n. 9, p. 894-896, Sept. 1992b.
- VIERLING, R. A.; FAGHIHL, J.; FERRIS, V. R.; FERRIS, J. M. Association of RIGGS, R. D.; HAMBLEN, M. L.; RAKES, L. Development of *Heterodera glycines* pathotypes as affected by soybean cultivars. **Journal of Nematology**, Lawrence, v. 9, n. 4, p. 312-318, Oct. 1977.
- RIGGS, R. D.; HAMBLEN, M. L.; SLACK, D. A. Infra-species variation in reaction to hosts in *Heterodera glycines* populations. **Journal of Nematology**, Lawrence, v. 13, n. 2, p. 171-179, Apr. 1981.
- RIGGS, R. D.; SCHMITT, D. P. Complete characterization of the race scheme for *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology**, Lawrence, v. 20, n. 3, p. 392-395, July 1988.
- RIGGS, R. D.; SCHMITT, D. P. Soybean cyst nematode. In: SINCLAIR, J. B.; BACKMAN, P. A. (Ed.). **Compendium of soybean diseases**. 3. ed. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1989. p. 65-67.
- RIGGS, R. D.; SLACK, D. A.; HAMBLEN, M. L. New biotype of soybean cyst nematode. **Arkansas Farm Research**, Arkansas, v. 17, n. 1, p. 11, 1968.
- ROSS, J. P. Physiological strains of *Heterodera glycines*. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v. 46, p. 766-769, 1962.

ROSS, J. P.; BRIM, C. A. Resistance of soybeans to the soybean cyst nematode as determined by a double-row method. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v. 41, n. 11, p. 923-924, Nov. 1957.

SAS INSTITUTE. SAS/STAT Guide for personal computers. Version 6 edition Cary: SAS Institute, 1987. 1028 p.

SCHMTT, R. D.; BARKER, K. R. **Plant-parasitic nematodes on soybean in North Carolina**. The North Carolina Agricultural Extension Service. 1985. 8 p.

SCHMTT, R. D.; NOEL, G. R. Nematodes parasites of soybean. In: NICKLE, W. R. (Ed.). **Plant and insect nematodes**. New York: Marcel Dekker, 1984. p. 13-43.

SCHMTT, R. D.; RIGGS, R. D. Populations dynamics of *Heterodera glycines* in the southeastern United States. In: **Variability and population dynamics or root-knot and cyst nematodes in the southern region of the United States**. The Texas A & M University-System, 1989. p. 1-7 (Southern Cooperative Series Bulletin, 336).

SCHMITT, D. P.; SHANON, G. Differentiating soybean responses to *Heterodera glycines* races. **Crop Science**, Madison, v. 32, n. 1, p. 275-277, Jan./Feb. 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**, Berlin, v. 102, n. 1, p. 91-96, Jan. 2001.

SILVA, J. F. V. **Genética quantitativa associada ao uso de marcadores moleculares para a seleção de genótipos de soja com resistência a *Meloidogyne javanica***. 2000. 73 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

SILVA, J. F. V.; GARCIA, A.; ALMEIDA, A. M. R.; PEREIRA, J. E. **Ecologia e controle do nematóide de cisto da soja: resultados de pesquisa da Embrapa Soja-2001: doenças e nematóides**. Londrina: Embrapa Soja, 2002. p. 8-9. (Embrapa Soja. Documentos, 194).

SKORUPSKA, H. T.; CHOI, I. S.; RAO-ARELLI, A. P.; BRIDGES, W. C. Resistance to soybean cyst nematode and molecular polymorphism in various sources of Peking soybean. *Euphytica*, Dordrecht, v. 75, n. 1-2, p. 63-70, Jan. 1994.

SOUZA, R. F. *Análise genética da soja (Glycine max (L.) Merrill) sob infestação de percevejos*. 1992. 80 p. Tese (Mestrado) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

TAYLOR, A. L. *Introductions to research on plant nematology*. Rome: FAO, 1971. 133 p.

THOMAS, J. D.; CAVINESS, C. E.; RIGGS, R. D.; HARTWIG, E. E. Inheritance of reaction to race 4 of soybean cyst nematode. *Crop Science*, Madison, v. 15, n. 2, p. 208-210, Mar./Apr. 1975.

TOLEDO, J. F. F. de. Programa de computador para estimar parâmetros genéticos, componentes de média e variâncias, pelo método dos quadrados mínimos ponderados. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 26, n. 7, p. 1023-1039, jul. 1991.

VAN Der VEEN, J. H. Tests of non-allelic interaction and linkage for quantitative characters in generations derived from two diploid pure lines. *Genetics*, Baltimore, v. 30, n. 3, p. 201-232, 1959.

VIERLING, R. A.; FAGHIHI, J.; FERRIS, V. R.; FERRIS, J. M. Association of RFLP markers with loci conferring broad-based resistance to the soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*). *Theoretical Applied Genetics*, Berlin, v. 92, n. 1, p. 83-86, Jan. 1996.

WEBB, D. M.; BALTAZAR, B. M.; RAO-ARELLI, A. P.; SCUPP, J.; CLAYTON, K.; KEIM, P.; BEAVIS, W. D. Genetic mapping of soybean cyst nematode race-3 resistance loci in the soybean PI 347654. *Theoretical Applied Genetic*, Berlin, v. 91, n. 4, p. 574-581, Sept. 1995.

WEISEMANN, J. M.; MATTHEWS, B. F.; DEVINE, T. E. Molecular markers located proximal to the soybean cyst nematode resistance gene, *Rhg4*. *Theoretical Applied Genetics*, Berlin, v. 85, p. 136-138, 1992.

WINSTEAD, N. N.; SKOTLAND, C. B.; SASSER, J. N. Soybean cyst nematodes in North Carolina. *Plant Disease Reporter*, St. Paul, v. 39, n. 1, p. 9-11, 1955.

YOUNG, L. D. Changes in the reproduction of *Heterodera glycines* on different lines of *Glycine max*. *Journal of Nematology*, Lawrence, v. 16, n. 3, p. 304-309, July 1984.

YOUNG, L. D. Reproduction of differentially selected soybean cyst nematode populations on soybeans. *Crop Science*, Madison, v. 22, n. 2, p. 385-388, Mar./Apr. 1982a.

YOUNG, L. D. Reproduction of Tennessee soybean cyst nematode population on cultivars resistant to race 4. *Plant Disease*, St. Paul, v. 66, n. 3, p. 251-252, Mar./Apr. 1982b.

YOUNG, L. D. Soybean germplasm evaluated for resistance to races 3, 5, and 14 of soybean cyst nematode. *Crop Science*, Madison, v. 30, n. 3, p. 735-736, May/June 1990.

YOUNG, L. D.; KILLEN, T. C. Genetic relationships among introductions for resistance to soybean cyst nematode race 5. *Crop Science*, Madison, v. 34, n. 4, p. 936-939, July/Aug. 1994.

YORINORI, J. T. Riscos de surgimento de novas doenças na cultura da soja. In: CONGRESSO DE TECNOLOGIA E COMPETITIVIDADE DA SOJA NO MERCADO GLOBAL, 2000, Cuiabá. *Anais...* Cuiabá: Fundação MT, 2000. p. 165-169.

YORINORI, J. T. Situação atual das doenças potenciais no cone sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA E MERCOSOJA, 2., 2002, Fóz do Iguaçu, PR. *Resumos...* Londrina: Embrapa Soja, 2002. p. 171-186. (Embrapa Soja. Documentos, 181).

YUE, P.; SLEPER, D. A.; RAO-ARELLI, P. Genetic analysis of soybean cyst nematode resistance in PI 438489B. *Soybean Genetics Newsletter*, Ames, v. 25, p. 155-156, May 1998.

YUE, P.; SLEPER, D. A.; RAO-ARELLI, A. P. Genetic analysis of resistance to soybean cyst nematode in PI 438489B. *Euphytica*, Dordrecht, v. 116, n. 2, p. 181-186, 2000.

YUE, P.; RAO-ARELLI, P. R.; SLEPER, D. A. Molecular characterization of resistance to *Heterodera glycines* in soybean PI 438489B. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 102, n. 6/7, p. 921-928, 2001a.

YUE, P.; SLEPER, D. A.; RAO-ARELLI, P. Mapping resistance to multiples races of *Heterodera glycines* in soybean PI 89772. **Crop Science**, Madison, v. 41, n. 5, p. 1589-1595, Sept./Oct. 2001b.