



HELIO IVAN VIEIRA FILHO

**O EFEITO DO GENE *RHG5* NA REPRODUÇÃO DE *Heterodera*
glycines RAÇA 6**

**LAVRAS – MG
2023**

HELIO IVAN VIEIRA FILHO

**O EFEITO DO GENE *RHG5* NA REPRODUÇÃO DE *Heterodera glycines*
RAÇA 6**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação do Mestrado Profissional em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Adriano Teodoro Bruzi
Orientador

**LAVRAS – MG
2023**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Vieira Filho, Helio Ivan.

O efeito do gene *rhg5* na reprodução de *Heterodera*
glycines raça 6. / Helio Ivan Vieira Filho. - 2023.

41 p.

Orientador(a): Adriano Theodoro Bruzi.

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Federal de
Lavras, 2023.

Bibliografia.

1. Nematóide de cisto da soja. 2. Resistência genética. 3.
Marcadores moleculares. I. Bruzi, Adriano Theodoro. II. Título.

HELIO IVAN VIEIRA FILHO

**O EFEITO DO GENE *RHG5* NA REPRODUÇÃO DE *Heterodera glycines*
RAÇA 6**

**THE EFFECT OF THE *RHG5* GENE ON THE REPRODUCTION OF *Heterodera*
glycines RAÇA 6**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação do Mestrado Profissional em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 31 de março de 2023.

Dra. Adriély Alves de Almeida

Pesquisadora GDM Genética do Brasil

Dra. Viviane Yumi Baba

Pesquisadora GDM Genética do Brasil



Prof. Dr. Adriano Teodoro Bruzi
Orientador

**LAVRAS – MG
2023**

*A minha esposa Tayse, e a minha filha Maria Luiza, por todo
Amor, apoio e incentivo nesta jornada.
Dedico*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por iluminar o meu caminho e permitir a realização deste sonho.

A minha família, em especial minha esposa, minha filha, meus pais e minha irmã, por todo incentivo e suporte emocional.

A Universidade Federal de Lavras, Professores e Colaboradores.

A Coordenação do Programa de Mestrado Profissional em Genética e Melhoramento de Plantas.

Ao Professor Adriano Teodoro Bruzi, pela orientação.

A GDM Genética do Brasil, pelo apoio, incentivo, e suporte financeiro.

A minha Gestora, Dra. Neucimara Rodrigues Ribeiro, por tanto ter batalhado por este propósito, por todo suporte e incentivo.

Aos colegas do Departamento de Sanidade, Estação de Cria, e Laboratório de Marcadores Moleculares, por toda ajuda na execução deste trabalho.

Ao Amigo Joel Brollo (*in memoriam*), por toda parceria, pelas muitas horas de estudo, e por todo otimismo transmitido.

Ao colega Mateus Ribeiro Piza, por todo apoio com as análises de dados.

Aos colegas de turma pela troca de conhecimentos e experiências.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

Muito obrigado!

RESUMO

A cultura da soja possui grande representatividade para a agricultura brasileira. O Brasil é hoje o maior produtor mundial desta oleaginosa. Dentre os diversos fatores que afetam negativamente a produtividade da cultura, destaca-se o nematoide de cisto da soja (*Heterodera glycines*), devido ao seu elevado potencial de dano, grande disseminação e ampla variabilidade genética. Dentre as alternativas de controle deste patógeno, a estratégia de maior eficiência consiste no emprego de cultivares resistentes. A obtenção destas é uma atividade complexa pois pode envolver genes de ação alélica recessiva e de difícil seleção. Os genes mais utilizados são *Rhg1* e *Rhg4*. Outros genes como *Rhg2* e *Rhg5*, têm ganhado destaque, como possível fonte de resistência visando cobrir um maior espectro de raças. Assim, objetivou-se estudar o efeito do gene *Rhg5* sobre a reprodução de *H. Glycines* raça 6, em populações de segregantes de soja. Os cruzamentos foram realizados entre cultivares contrastantes. As populações foram genotipadas, através da seleção de SNPs polimórficos, e fenotipadas quanto a reação ao nematoide de cisto da soja – raça 6. O ensaio foi conduzido em casa de vegetação com delineamento de blocos aumentados. As progênies foram semeadas em tubetes, e após 7 dias foram inoculadas com 4000 ovos + J2 de *Heterodera glycines* raça 6. Aos 15 dias de emergência foram coletados discos foliares para extração de DNA e genotipagem. Transcorridos 30 dias após a inoculação, as raízes foram coletadas e fez-se a extração e contagem das fêmeas, para posterior classificação dos indivíduos. Os dados fenotípicos foram ajustados por modelo linear generalizado misto associado a distribuição de Poisson com função ativadora logarítmica, e a classificação dos grupos fenotípicos foi dado pelo valor genotípico de cada indivíduo. Foram selecionados seis primers candidatos a associação com fenótipo de resistência a raça 6. Em todos os *primers* estudados não houve associação exclusiva de um nucleotídeo com uma classe fenotípica apenas, o que não possibilitou a discriminação de grupos fenotípicos.

Palavras-chave: Nematoide de cisto da soja. Resistência genética. Marcadores moleculares.

ABSTRACT

The soybean crop has great representation for Brazilian agriculture. Brazil is now the world's largest producer of this oilseed. Among the various factors that negatively affect crop productivity, the soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*) stands out due to its high potential for damage, wide dissemination, and wide genetic variability. Among the alternatives for controlling this pathogen, the most efficient strategy is the use of resistant cultivars. Obtaining these is a complex activity as it may involve recessive allelic action genes that are difficult to select. The most used genes are *Rhg1* and *Rhg4*. Other genes such as *Rhg2* and *Rhg5* have gained prominence as a possible source of resistance to cover a greater spectrum of races. Thus, the objective was to study the effect of the *Rhg5* gene on the reproduction of *H. Glycines* race 6, in populations of soybean segregants. Crosses were performed between contrasting cultivars. Populations were genotyped, through the selection of polymorphic SNPs, and phenotyped for reaction to soybean cyst nematode – race 6. The assay was conducted in a greenhouse with an enlarged block design. The progenies were sown in tubes, and after 7 days they were inoculated with 4000 eggs + J2 of *Heterodera glycines* race 6. At 15 days after emergence, leaf discs were collected for DNA extraction and genotyping. Thirty days after inoculation, the roots were collected, and the females were extracted and counted for later classification of individuals. The phenotypic data were adjusted by a mixed generalized linear model associated with the Poisson distribution with a logarithmic activating function, and the classification of the phenotypic groups was given by the genotypic value of each individual. Six candidate primers were selected for association with race resistance phenotype 6. In all studied primers, there was no exclusive association of a nucleotide with a single phenotypic class, which did not allow the discrimination of phenotypic groups.

Key words: Soybean Cist Nematode. Genetic resistance. Molecular Markers.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Histograma de frequência de indivíduos em função do número de fêmeas de *Heterodera glycines* raça 6.....31
- Figura 2.** Distribuição dos fenótipos na população GDM18I209xNEO750..... 33
- Figura 3.** Relação fenótipo por nucleotídeo, por primer para a população DM18I209xNEO750..... 34

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1.** Reação das linhagens de soja diferenciadoras de raças de *Heterodera glycines*, como proposto por Riggs e Schmitt, 1988..... 16
- Quadro 2.** Reação das linhagens de soja diferenciadoras de raças de *Heterodera glycines*, como proposto por Dias et al.,1998.....17
- Quadro 3.** Mapas genéticos do gene *Rhg5* disponíveis na literatura, candidatos a integração com mapa físico.....26
- Quadro 4.** Primers candidatos a amplificar regiões associadas a resistência a *Heterodera glycines* raça 6..... 26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição dos tratamentos avaliados no experimento..... 28

Tabela 2. Teste de Qui-quadrado para parentais, testemunhas e populações.....32

SUMÁRIO

1	Introdução.....	10
2	Referencial teórico.....	12
2.1	A cultura da Soja.....	14
2.2	Nematoide de Cisto da Soja.....	16
2.3	Marcadores moleculares.....	21
3	Materiais e métodos.....	23
3.1	Obtenção de populações segregantes.....	26
3.2	Coleta das amostras e extração de DNA.....	26
3.3	Avaliação de <i>Heterodera glycines</i> em populações F3.....	24
3.4	Seleção de SNPS polimórficos.....	28
3.5	Delineamento experimental.....	30
3.6	Análise estatística.....	31
3.6.1	Dados fenotípicos.....	31
3.6.2	Dados genotípicos.....	32
3.7	Aspectos computacionais.....	32
4	Resultados e discussões.....	31
5	Conclusão.....	36
	REFERÊNCIAS.....	37

1 INTRODUÇÃO

O nematoide de cisto da soja (NCS) *Heterodera glycines* (Ichinohe, 1952), é uma das principais pragas da cultura, pelos prejuízos que pode causar e pela facilidade de disseminação. Este nematoide pode ser encontrado em todo o mundo, provocando grandes perdas econômicas, pois sobrevive no solo e ataca as raízes da soja, provocando clorose foliar, necrose de raízes, redução de porte e conseqüente diminuição da produção de grãos (FERREIRA et al., 2019). No Brasil, sua presença se deu pela primeira vez na safra 1991/92 nos municípios de Nova Ponte – MG, Campo Verde – MT e Chapadão do Sul – MS (Lima et al., 1992; Lordello et al., 1992; Monteiro; Morais, 1992), e desde então vem se expandindo rapidamente por todo o território nacional. Estima-se que as perdas de produtividade de grãos podem chegar a 90% dependendo do grau de infestação, raça do nematoide, suscetibilidade da cultivar, e fatores ambientais (BARBOSA, 2020). Há ocorrência de NCS em todo o território brasileiro, em especial no estado do Mato Grosso que apresenta elevado percentual de lavouras infestadas (FAVORETO et al., 2019)

Dentre as opções disponíveis para se controlar o nematóide de cisto, destaca-se a rotação de culturas com espécies não hospedeiras, por exemplo, milho que possui potencial para reduzir as populações em até 80%, e o emprego de cultivares resistentes.

A utilização da resistência genética no controle do NCS tem sido a estratégia economicamente mais viável, e de melhor aceitação do agricultor, entretanto, mesmo com o uso de cultivares resistentes, é importante que o produtor continue a fazer a rotação de culturas, para manter as populações de NCS em equilíbrio. É recomendado um sistema de rotação que envolva culturas não hospedeiras, cultivares suscetíveis e resistentes, proporcionando redução da população do NCS no solo, garantindo a permanência dessas populações em níveis baixos. Isso evitará que ocorra a mudança da raça predominante na população do nematoide, preservando também, a resistência das cultivares (DIAS et al., 2010).

A obtenção de cultivares de soja com resistência genética ao NCS não é uma tarefa fácil, embora tenha sido um dos principais objetivos dos programas de melhoramento nos últimos 20 anos. A resistência genética está condicionada por pelo menos seis genes, alguns deles de ação recessiva e de difícil seleção. Além disso, efeitos como epistasia, codominância e aditividade, modificam o espectro de resistência em cultivares contendo um, dois, três ou mais genes de resistência. Os genes mais utilizados têm sido Rhg1 e Rhg4, que outorgam

resistência às raças 1 e 3, inicialmente as predominantes. Porém, outros genes tais como Rhg2 e Rhg5 apresentam-se atualmente como indispensáveis, pois, novas resistências genéticas são necessárias para atuar frente ao surgimento e proliferação de novas raças (CONCIBIDO et al., 2004)

De forma geral, não é tarefa simples obter uma cultivar que seja completamente resistente ao NCS, pois a interação entre número de genes, número de raças e a interação genótipos x ambientes, modifica substancialmente a manifestação da fenotípica. Nos Estados Unidos o cenário é ainda mais complexo devido a ocorrência de uma quantidade maior de raças, por exemplo, as raças 7, 8 e 15, que não ocorrem no Brasil. Além disso, o levantamento realizado em 2020, evidencia a constante disseminação do patógeno no país, sendo relatados 55 novas cidades com infestação de NCS (TILKA et al., 2021).

Assim, a estratégia dos programas de melhoramento da soja no Brasil tem sido identificar as linhagens pelos genes de resistência que elas possuem (quando devidamente identificados) utilizando marcadores moleculares e fenotipagem via inoculação, em tubetes em casa de vegetação. Posteriormente nas fases mais avançadas é realizada a fenotipagem dos genótipos em campo, e então pode-se sugerir o manejo agrônômico em função da predominância de raças no local de recomendação da cultivar lançada, a qual apresenta os alelos de resistência (SANTANA, 2008).

Com o recrudescimento do patógeno, e até mesmo o surgimento de novas raças, sugere-se que novos alelos de resistência sejam incorporados nos programas de melhoramento genético. Observa-se que há uma variação para resistência genética a NCS raça 6, em linhagens filhas de PI88788, que é fonte de resistência para raças 3, 6, 9, e 14, e analisando os resultados de marcadores moleculares para o gene Rhg1, percebe-se que há materiais que são positivos para Rhg1 e são resistentes a NCS raça 6, e há também materiais Rhg1 positivos e suscetíveis a NCS raça 6, por isso aventa-se a hipótese de que um outro gene, o Rhg5, que também é oriundo de PI88788 seja possivelmente o responsável por agregar nas cultivares a resistência ao NCS raça 6.

Sendo assim, objetivou-se estudar o efeito do gene Rhg5 na reprodução do NCS em casa de vegetação usando o método de cruzamento controlado para elucidar a expressão do mesmo na resistência à *Heterodera glycines* raça 6 em populações segregantes de soja.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A cultura da Soja

A soja (*Glycine max* L.), se originou no continente Asiático, no nordeste da China, pertencente à família das *Fabaceae* (leguminosas), é uma planta conhecida desde 3.000 anos a.c., e sua disseminação do oriente para o ocidente ocorreu através das navegações (EMBRAPA, 2022).

Em 1.765 a soja chegou ao continente americano através dos Estados Unidos da América (EUA), que foram os pioneiros no cultivo extensivo desta planta. A partir de 1.917, o país passou a extrair farelo de soja para aplicação na alimentação animal. O crescente desenvolvimento da cultura da soja em solo americano, possibilitou que em 1.970, USA tenha se tornado responsável por dois terços da produção mundial de soja (BANDARA et al., 2020).

Em 1.882, houve o primeiro relato de cultivo de soja no Brasil, ocorrido no estado da Bahia, porém com níveis de produtividade muito inferiores aos observados nos EUA (DUARTE, 2016). Passou em seguida, a ser cultivada no estado de São Paulo por imigrantes japoneses, também com baixa adaptação.

A cultura passou a apresentar maior potencial somente a partir de 1.914, quando foi introduzida no estado do Rio Grande do Sul, sendo este local, o que forneceu inicialmente as condições edafoclimáticas, especialmente de fotoperíodos, mais parecidas com aquelas em que as cultivares da época foram adaptadas nos EUA (TECCHIO, 2016).

A soja é uma planta de dias curtos, a qual cada cultivar apresenta uma característica específica. Acima de um fotoperíodo crítico, o florescimento da cultura é atrasado, fato este que levou a adaptação inicial da cultura apenas no sul do país. O avanço da cultura pelo país assim como a amplificação da faixa de recomendação das cultivares só foi possível devido a introdução do período juvenil longo, que consiste no florescimento tardio, a qual as cultivares com estas características são menos sensíveis ao fotoperíodo, vegetando por mais tempo em dias curtos (FARIAS et al., 2007).

No atual cenário agrícola mundial, a soja se figura como o quarto produto entre oleaginosas e cereais mais empregadas no consumo humano e o mais importante quanto a produção e comercialização (FAO, 2022). No Brasil, na Safra 2021/2022 a soja representou 45,6% da produção nacional de grãos, estando concentrado nas regiões Centro-Oeste e Sul, que abrangem os cinco estados maiores produtores nacionais desta cultura: Mato grosso, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás e Mato Grosso do Sul. Na última safra, 2021/2022, o Brasil

produziu mais de 123 milhões de toneladas de soja, o que corresponde a 37,3% da produção mundial de soja, se figurando como maior produtor mundial do grão, a frente dos EUA, que ficou em segundo lugar, com 121 milhões de toneladas (EMBRAPA, 2023).

A rápida expansão do cultivo da soja na região Centro-Oeste se deu principalmente pelo baixo valor da terra, subsídios do governo, bom preço do produto e pelo forte investimento em pesquisas focadas na agricultura do Cerrado, especialmente no desenvolvimento de cultivares de soja adaptadas às condições de fotoperíodo da região (CÂMARA; HEIFFIG, 2000).

O cultivo desta cultura expandiu muito e hoje abrange praticamente quase todo o território brasileiro desde o Rio grande do Sul até o Maranhão, incluindo algumas regiões do Nordeste e do Norte, onde se destacam o crescente aumento de áreas em Rondônia, Pará e Roraima (EMBRAPA, 2020).

A planta de soja é autógama, ou seja, não ocorre a troca de gametas entre indivíduos, tendo uma taxa de fecundação cruzada muito baixa, que fica, na maioria dos casos, abaixo de 1% (SANTOS, 2005). Seu ciclo, da germinação à maturação fisiológica, pode variar de 75 a 200 dias, dependendo de cultivar e do local de cultivo, e podem ser classificados em grupos de Maturidade Relativa, que se baseia principalmente na resposta ao fotoperíodo (FARIAS et al., 2007; ZANON et al., 2015).

A emergência da plântula ocorre entre quatro e dez dias após o plantio, dependendo da disponibilidade de água, da temperatura e da profundidade de plantio. O período vegetativo perdura até o início da floração. A duração do período de floração varia em função do hábito de crescimento, grupo de maturação e condições ambientais, e em sequência se dá o crescimento do fruto. A maturação fisiológica dos grãos ocorre de 40 a 70 dias após o final da floração (FARIAS, 2007). A produtividade da cultura é dependente da interação de diversos fatores ligados ao solo, planta e ambiente. E assim, muitos fatores atuam como limitantes do máximo potencial produtivo das cultivares, como pragas e doenças que incidem sobre a cultura (SILVA; MENEGHELLO, 2016).

Dentre as doenças que possuem grande potencial de diminuição de produtividade na cultura da soja, se destacam aquelas que são causadas por fitonematoides. As espécies dos nematoides formadores de galhas (*Meloidogyne* spp.), o de cisto (*Heterodera glycines*), o das lesões radiculares (*Pratylenchus brachyurus*) e o nematoide-reniforme (*Rotylenchulus reniformis*), têm se destacado no Brasil, sendo os mais comuns nas lavouras comerciais de soja. (FAVORETO et al, 2019)

O Nematóide de Cisto da Soja (*Heterodera glycines*) se destaca como uma espécie de alto potencial de dano, por conta que, além da grande expressividade das perdas que provocam, fácil disseminação e difícil controle, possuem grande diversidade genética, tendo identificadas no Brasil, onze raças, e que se apresentam no campo, na maioria das vezes, como uma mistura de diferentes raças. Por isso, os maiores desafios aos pesquisadores e técnicos são o desenvolvimento de cultivares de soja resistentes a essas diferentes raças, e o uso de estratégias adequadas para evitar a pressão de seleção sobre as populações deste patógeno (DIAS et al., 2010).

2.2 Nematóide de Cisto da Soja

O Nematóide de Cisto da Soja (*Heterodera glycines*), se destaca entre os principais patógenos da cultura da soja, em função do alto nível de dano que provoca, por sua vasta disseminação e pela ampla variabilidade genética que possui. Há relatos de que na região Central do Brasil, em situações de alta densidade populacional, este patógeno já chegou a ocasionar perdas de 100%. Porém, os níveis de dano são variáveis, e estão ligados a diversos fatores, tais como: nível de inóculo inicial, fertilidade do solo, adoção ou não de práticas de controle, rotação de cultura e o emprego de cultivares de soja resistentes (DIAS et al., 2009).

O ciclo de vida do *H. glycines* é variável, pois é dependente de uma série de fatores, tais como a presença de exsudatos radiculares, temperatura, umidade e aeração. No Brasil, em condições de temperatura média do solo em 28,7°C, o ciclo se conclui em 29 dias, o que possibilita com que ocorram de 3 a 4 gerações do nematóide em uma safra de soja (CUNHA et al, 2008).

Uma das principais características desta espécie é a capacidade de formar cisto, que é o corpo da fêmea morta, contendo no seu interior até 500 ovos, sendo muito resistente às adversidades do ambiente, constituindo assim uma estrutura de resistência que protege os ovos (TAYLOR, 1971). No interior do cisto, os ovos passam por embriogênese, formando juvenis de primeiro estágio (J1), e estas passam por uma ecdise ainda dentro do ovo, se tornando um juvenil de segundo estágio, que em seguida eclode e migra para o solo, onde através de sinalizações químicas se move em direção das raízes de plantas hospedeiras para infectá-las. Ao penetrar às raízes, o J2, promove algumas modificações em um grupo de células que circundam o local de penetração, e assim estabelece um sítio de alimentação, que também é chamado de síncito (ARAÚJO, 2013).

O J2 segue se alimentando da planta e dos seus fotossintatos, e seu desenvolvimento passa por mais três ecdises, até se tornar adulto, macho ou fêmea. (SCHMITT; BARKER,

1985; TAYLOR, 1971). As fêmeas aumentam de volume, apresentando um formato semelhante ao de limão 'Taiti', com cor branca-amarelada, e continuam aderidas a raiz, com uma parte do corpo no interior da planta e parte do lado de fora permanecem fixadas à raiz, com o corpo do lado de fora e a parte anterior internamente nos tecidos radiculares. Já os machos, não apresentam este formato volumoso, são alongados, migram para o solo, fecundam as fêmeas e depois morrem (TAYLOR, 1971).

As fêmeas produzem uma matriz gelatinosa que é expelida pelo ânus, na qual depositam cerca de um terço dos seus ovos, e retém o restante no interior de seu corpo. Após a morte o corpo da fêmea dá origem ao cisto, de coloração marrom escura e muito resistente à deterioração e à dessecação (SCHMITT; NOEL, 1984; TAYLOR, 1971).

O cisto protege os ovos, que conseguem sobreviver por até oito anos sem a presença de plantas hospedeiras, fato este que contribui para tornar praticamente impossível a erradicação deste patógeno nas áreas infestadas. (MOORE et al., 1984). O cisto além de resistente é também muito leve, o que faz com que sua disseminação seja muito fácil, podendo ser alastrado pelo vento, água, de chuva ou de irrigação, máquinas agrícolas, torrões (misturados às sementes), animais, e até mesmo através de solo incrustado em calçados (MOORE et al., 1984; RIGGS; SCHMITT, 1989).

O *H. glycines* apresenta elevada variabilidade genética, e para fazer a diferenciação dos isolados, convencionou-se a caracterização destes em raças, com base na capacidade de cada população em se reproduzir sobre uma série de cultivares diferenciadoras. Para tanto, se avalia a reprodução relativa ao padrão de suscetibilidade, que é a cultivar Lee, assim, se calcula um índice de fêmeas (IF%), que é feito da seguinte forma:

$$\text{IF}\% = (\text{número de fêmeas na diferenciadora} / \text{número de fêmeas na Lee}) \times 100.$$

Se a diferenciadora apresentar $\text{IF} < 10\%$, é considerada resistente (-), e se $\text{IF} > 10\%$, é então considerada suscetível (+). Assim, foi desenvolvido um esquema que permitiu a caracterização de 16 raças (Quadro 1), em que há quatro raças (11, 12, 13 e 16) que são hipotéticas, por conta que a cultivar Pickett é derivada de Peking, e não herdou toda sua resistência (RIGGS; SCHMITT, 1988).

Após a classificação ter sido proposta por Riggs e Schmitt (1988), ao incluir nos testes de raças duas cultivares resistentes Hartwig e PI437654, pesquisadores da Embrapa Soja detectaram duas raças que são capazes de vencer a resistência de Hartwig (Quadro 2). Uma destas raças tinha comportamento semelhante a raça 4 e a outra semelhante a raça 14, por isso foram denominadas, respectivamente, 4+ e 14+ (DIAS et al., 1998).

Quadro 1. Reação das linhagens de soja diferenciadoras de raças de *Heterodera glycines*, como proposto por Riggs e Schmitt, 1988.

Raça	Pickett	Peking	PI88788	PI90763	PI437654
1	-	-	+	-	-
2	+	+	+	-	-
3	-	-	-	-	-
4	+	+	+	+	-
5	+	-	+	-	-
6	+	-	-	-	-
7	-	-	+	+	-
8	-	-	-	+	-
9	+	+	-	-	-
10	+	-	-	+	-
11	-	+	+	-	-
12	-	+	-	+	-
13	-	+	-	-	-
14	+	+	-	+	-
15	+	-	+	+	-
16	-	+	+	+	-

+ = n° de fêmeas e cistos é igual a 10% ou mais, do que o número observado em Lee. (Suscetível)
 - = n° de fêmeas e cistos é menor que 10% do número observado em Lee. (Resistente)

Quadro 2. Reação das linhagens de soja diferenciadoras de raças de *Heterodera glycines*, como proposto por Dias et al.,1998.

Raça	Pickett	Peking	PI88788	PI90763	Hartwig	PI437654
1	-	-	+	-	-	-
2	+	+	+	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
4	+	+	+	+	-	-
4+	+	+	+	+	+	-
5	+	-	+	-	-	-
6	+	-	-	-	-	-
7	-	-	+	+	-	-
8	-	-	-	+	-	-
9	+	+	-	-	-	-
10	+	-	-	+	-	-
11	-	+	+	-	-	-
12	-	+	-	+	-	-
13	-	+	-	-	-	-
14	+	+	-	+	-	-
14+	+	+	-	+	+	-
15	+	-	+	+	-	-
16	-	+	+	+	-	-

+ = nº de fêmeas e cistos é igual a 10% ou mais, do que o número observado em Lee. (Suscetível)

- = nº de fêmeas e cistos é menor que 10% do número observado em Lee. (Resistente)

Até o momento, não há relatos da presença de populações de raças 7, 8 e 15 no território brasileiro (PINHEIRO et al., 2021). As raças 11, 12, 13 e 16 são hipotéticas, não havendo de fato sua ocorrência, e um tanto quanto ilógicas, tendo em vista que para existirem, deveria haver populações que reproduzem em Peking, mas não em Pickett. Sabendo-se que Pickett foi selecionada de um cruzamento de Peking, a ocorrência desta situação é muito improvável (NIBLACK, 1992).

Em 2.002, um grupo composto pelos principais nematologistas e melhoristas dos EUA, se manifestaram contrários a classificação da diversidade genética de *H. glycines* em raças, especialmente por acreditarem que não é abrangente o suficiente, e também por acreditarem que o termo raça não é condizente, visto que a diferenciação é feita em

hospedeiros de mesma espécie, variando apenas a linhagem. E propuseram outro modelo, que é amplamente empregado no país, o HG Type, no qual se retirou a diferenciadora Pickett, e incluiu-se outras quatro linhagens diferenciadoras, totalizando sete. Nesta classificação, a população recebe uma denominação como uma lista de números que corresponde às diferenciadores em que a população se reproduziu, atingindo um índice de fêmeas superior a 10%, relativo ao padrão de suscetibilidade, que é a cultivar Lee (NIBLACK et al., 2002).

Exemplificando: “Essas linhas indicadoras são sempre listadas numa ordem fixa, como segue: 1 (‘Peking’), 2 (PI 88788), 3 (PI 90763), 4 (PI 437654), 5 (PI 209332), 6 (PI 89772) e 7 (PI 548316). Para cada linha indicadora é calculado um índice de fêmeas (IF) e a mesma é taxada como resistente (-) ou suscetível (+), conforme o valor de IF seja, respectivamente, $< 10\%$ ou $\geq 10\%$. Toda vez que a população do NCS em estudo “quebrar” a resistência de uma determinada linha indicadora, ela recebe o número da mesma. Por exemplo, quando as sete linhas indicadoras são resistentes, a população é classificada com HG tipo 0 (zero). Ao contrário, se todas as linhas são suscetíveis, trata-se de HG tipo 1.2.3.4.5.6.7. Se apenas ‘Peking’ e a PI 90763 são suscetíveis, a população é denominada HG tipo 1.3 e assim por diante” (DIAS, et al., 2009).

Contudo deve se deixar claro, que para as condições brasileiras a classificação de DIAS, (1998) é mais condizente pois permite a distinção entre populações que possuem a capacidade de quebrar a resistência da cultivar Hartwig, que são as raças 4+ e 14+.

Deve-se evitar ao máximo a disseminação do *H. glycines*, buscando restringir as diferentes formas de disseminação do patógeno. Mas quando a área já está infestada a melhor forma de manejar é através da associação da rotação de culturas com o uso de cultivares resistentes (DIAS et al., 2009).

A obtenção de cultivares com resistência ao NCS é ainda uma atividade que desafia os melhoristas, devido à complexidade da base genética e da herança que não estão completamente elucidadas. Existem mais de 30 QTLs (*Quantitative Trait Loci*) que controlam tal resistência, contudo a maioria deles são tidos como QTLs de efeito menor (CONCIBIDO et al., 2004). Por isso até dois alelos de resistência têm tido ampla utilização nos programas de melhoramento, visando o desenvolvimento de cultivares resistentes, são estes, Rhg1 e Rhg4, identificados em PI 88788 (*Rhg1*) e Peking (*Rhg1 / Rhg4*), que se localizam nos cromossomos 18 e 8, respectivamente. (TRAN et al., 2019).

Em todo o mundo, verifica-se que o uso repetido da mesma fonte de resistência, ainda que se rotacione a cultivar, especialmente no caso da fonte PI88788, têm provocado alterações nas populações de NCS, que têm se tornado adaptadas a esta fonte de resistência, e

conseguindo se multiplicar em cultivares que até então eram resistentes (NIBLACK et al., 2008). A ocorrência de populações adaptadas a cultivares com resistência oriunda de PI88788, tem aumentado a cada ano, bem como o índice de fêmeas destas populações (MITCHUM, 2016).

Estudos citológicos mostram que os alelos de resistência Rhg1 e Rhg4, tem modos de ação muito parecidos, atuando na degeneração do síncito, e que diferem apenas nas organelas celulares em que atuam. E as cultivares disponíveis no mercado se distinguem apenas na questão combinação de alelos, se há a presença dos dois ou de apenas um deles, e na combinação do número de cópias de cada alelo. Sendo assim, a única forma de mudar a conjuntura do crescente aumento de população de nematoides resistentes, é a inclusão de novos genes de resistência nos programas de melhoramento, e que atuem em rotas metabólicas diferentes das já conhecidas (MITCHUM, 2016).

Para o desenvolvimento de cultivares resistentes, têm se aplicado o uso da seleção assistida por marcadores moleculares, buscando a introgressão de alelos favoráveis, através de retrocruzamentos. Esta ferramenta é muito importante, ainda mais quando se objetiva a inserção de dois ou mais genes, e/ou quando o fenótipo é de difícil determinação (LANZA et al., 2000). Este recurso possibilita a eliminação antecipada dos biótipos indesejados, economizando recursos, tais como, mão de obra, espaço em casa de vegetação e insumos, e permite uma diminuição no número de linhagens a serem selecionadas (ABDELNOOR; ALMEIDA, 1999).

2.3 Marcadores moleculares

Marcador molecular pode ser definido como fenótipo molecular originado a partir de um gene expresso, podendo ser, por exemplo, um seguimento específico de DNA, ou Isoenzimas. Podendo ou não ter conhecidas a sua sequência de nucleotídeos e/ou sua função. Atualmente estão disponíveis muitas técnicas de biologia molecular que possibilitam a detecção de variabilidade genética, chegando a nível de sequência de DNA, permitindo identificar polimorfismo genético. Desta forma é possível obter um número ilimitado de marcadores moleculares, abrangendo todo o genoma do organismo em estudo. Os marcadores possuem uma grande diversidade de possibilidades de aplicações, nas quais se destacam o estudo da genética e o seu uso como ferramenta no melhoramento genético de plantas. (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Existem três categorias principais de marcadores de DNAs marcadores de DNA são divididos em três categorias principais: aqueles que se baseiam em hibridização, os baseados em PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e os marcadores que são baseados em sequenciamento. Contudo, há também uma outra característica importante ao se classificar os diferentes tipos de marcadores disponíveis, que é o tipo de herança alélica, na qual são divididos em Dominantes e Codominantes (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017).

Os marcadores dominantes são capazes apenas de detectar a presença ou ausência de um alelo específico, não identificando se o indivíduo é heterozigoto ou homozigoto. Já os marcadores codominantes possuem essa capacidade de separar indivíduos quanto a homozigose ou heterozigose. Dependendo do objetivo que se deseja alcançar, esta capacidade se faz muito importante, por exemplo, o caso de testes de paternidades, nos quais não podem ser aplicados o uso de marcadores dominantes. (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017).

Os marcadores genéticos que se baseiam em hibridização são fundamentados na propriedade de pareamento de bases complementares. Este sistema permitiu a elaboração de metodologias que empregam pequenos fragmentos de DNA como sondas para mostrar polimorfismos apenas nas sequências correspondentes a esta sonda. Um marcador genético que derivou desta perspectiva é a técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) que foi o primeiro marcador baseado em DNA desenvolvido (BOTSTEIN et al., 1980).

O polimorfismo deste marcador se baseia nos diferentes tamanhos de fragmentos que são gerados por enzimas de restrição. Este marcador é informativo e tem a capacidade de distinguir genótipos individuais, especialmente devido ao fato de ser codominante e identificar um locus específico. (GEBHARDT et al., 1989). Todavia, este marcador possui algumas limitações, como a demanda de grandes quantidades de DNA, o fato de que indivíduos da mesma espécie podem apresentar os mesmos alelos, o uso de radioatividade ou outras técnicas de coloração e além de ser uma técnica que requer trabalho intenso e tempo considerável para execução. Desta forma, estes fatores, fizeram com que em muitos casos, este marcador fosse substituído por outros. Embora a utilização desta técnica tenha diminuído muito, esta serviu de base para avanços, gerando outros marcadores como os CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequences*), que também são conhecidos como marcadores PCR-RFLP, utilizados para detecção rápida de polimorfismos em sequências conhecidas (CHAMBERS et al., 2014). Com o surgimento da PCR, foram desenvolvidas várias técnicas para análises de marcadores de DNA, possibilitando a amplificação de uma grande quantidade de uma sequência específica de DNA, sem necessitar de clonagem, e iniciando a partir de

apenas algumas moléculas da sequência de interesse, configurando assim uma vantagem muito significativa em relação aos marcadores baseados em hibridização. Entre os marcadores baseados em PCR, podemos citar: RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*), SSR (*Simple Sequence Repeats*) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017).

Os Marcadores RAPD foram os primeiros desenvolvidos com baseados em PCR. Nesta técnica é utilizado um primer de geralmente 10 bases de uma sequência arbitrária, e amplificação acontece quando o sítio do primers está presente no DNA alvo em orientação oposta. A partir da variação da sequência nos locais de anelamento do primer são gerados os polimorfismos RAPD. Esta técnica não é radioativa, requer uma pequena quantidade de DNA, podendo ser realizada em poucas horas, e com grande número de marcas obtidas ao longo do genoma.

Entretanto, existem muitos fatores limitantes no uso deste marcador, como o aparecimento de bandas não parentais na progênie, o que inviabiliza sua utilização em mapeamentos molecular; o fato deste marcador se comportar como dominante e por possuir baixa reprodutibilidade, que é associada a baixa temperatura de anelamento, está por sua vez resulta em baixa especificidade e também pelo fato de ser influenciado pelas diferenças entre reagentes e qualidade do DNA extraído. (SCHIERWATER; ENDER, 1993; SKROCH; NIENHUIS, 1995).

Os marcadores AFLP são oriundos da combinação entre as técnicas utilizadas nos marcadores tipo RFLP e RAPD, em que enzimas de restrição e amplificação por PCR são as bases da técnica. AFLP se fundamenta na amplificação seletiva por PCR de fragmentos de restrição gerados por enzimas de restrição específicas e ligados a adaptadores oligonucleotídicos (VOS et al., 1995). Assim como no RAPD, as marcas de AFLP. Também estão distribuídas ao longo do genoma e, por isso, podem ser empregadas no desenvolvimento de mapas de ligação genética, e ainda apresentam uma maior reprodutibilidade que os RAPDs, o que os torna mais confiáveis. Em contrapartida, possuem uma herança dominante, sendo genotipados pela presença ou ausência das bandas, e é considerada relativamente cara, requer intenso trabalho e conhecimento técnico (SAVELKOUL et al., 1999).

Microssatélites, também chamados de Simple Sequence Repeats (SSR), são repetições de 1 a 6 nucleotídeos que podem ser classificados de acordo com seu tamanho e o tipo de unidade de repetição. O número de unidades de repetição costuma variar entre genótipos, e isto faz com que os SSRs sejam considerados marcadores altamente polimórficos, sendo adequados para diversos tipos de aplicações genéticas.

Geralmente, as sequências de DNA que se combinam com as unidades de repetição de SSR são conservadas entre indivíduos de uma mesma espécie, o que permite a projeção de primers específicos para essas sequências. Desta forma, através da PCR é possível amplificar um determinado loci e identificar os polimorfismos individuais relacionados ao número de repetições do SSR para aquele indivíduo. Portanto, cada loci de SSR tem grande conteúdo informativo, pois é multialélico, e é codominante. Ainda que tenha muitas vantagens, este método apresenta uma limitação muito relevante, que é a necessidade do isolamento e desenvolvimento de primers específicos para cada espécie. (BUTLER et al., 2004).

Com o avanço das técnicas de sequenciamento de genomas, foi viabilizado o desenvolvimento de novas modalidades de marcadores, como é o caso do Polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs) que possuem diferenças em uma única posição no genoma, e em um único nucleotídeo, seja por substituição, deleção ou inserção. A maioria dos SNPs ocorre em regiões não codantes do genoma, e tem como principal vantagem o seu elevado potencial para uma análise automatizada de alto rendimento a custo moderado, o que possibilitou nos últimos anos a descoberta de grande número de SNPs revolucionando projetos de associação genômica (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017).

As principais vantagens deste método são: a baixa taxa de mutação; alta abundância de marcas (a maior entre todos os marcadores); grande quantidade de abordagens analíticas; e a fácil comparação entre estudos. E como limitação apresenta grande heterogeneidade entre sítios e baixo conteúdo informativo para um único SNP. (KAHL et al., 2005; KIM et al., 2014; NIELSEN et al., 2011; PERKEL, 2008).

Todos os marcadores possuem vantagens e limitações, que devem ser analisadas e ponderadas ao se fazer a escolha do marcador a ser utilizado em um programa de melhoramento, devendo se levar em conta primeiramente as características biológicas que serão investigadas, por exemplo, a complexidade do genoma do organismo alvo; em seguida deve-se verificar a disponibilidade de material biológico, ou seja, a quantidade de DNA que se consegue extrair; e a disponibilidade de recursos financeiros e de estrutura; além de questões ligadas ao tempo e quantidade de pessoas que cada método demanda. (TURCHETTO- ZOLET et al., 2017).

No melhoramento convencional, a seleção de genótipos com características de interesse se baseia na coleta de informações fenotípicas dos indivíduos, que podem ser altamente influenciadas pelo ambiente e além disso, podem possuir baixa herdabilidade. Por isso há a necessidade de incorporação de procedimentos complementares ao processo, como é o caso da aplicação dos marcadores moleculares. Estes têm a vantagem de não sofrerem

influências ambientais e possuírem herança mendeliana. O uso das informações obtidas dos marcadores de DNA na seleção de plantas é comumente chamado de seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) e tem proporcionado ganhos significativos em programas de melhoramento.

A SAM tem como premissa básica a integração entre a genética molecular e a seleção fenotípica, que proporciona com que se faça a busca de alelos desejáveis indiretamente utilizando marcadores ligados. A eficiência do processo está muito ligada à proximidade física que a marca possui em relação ao gene que expressa a característica em questão. Uma das principais aplicações da SAM é a seleção de alelos de resistência a doenças para desenvolver cultivares, efetuando assim, uma seleção indireta (CAVALCANTI, 2012).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção das populações segregantes

Para obtenção das populações segregantes foram realizados os cruzamentos manuais utilizando os genitores:

- 1) NEO 750 (resistente)
- 2) VORAZ (suscetível)
- 3) GDM 19I445 (resistente)
- 4) GDM18I209 (suscetível)

Os cruzamentos foram realizados na estação de Cria da empresa GDM Genética em Porto Nacional, Tocantins. As gerações F1 e F2 resultantes destes cruzamentos foram obtidas a campo ainda na estação de Cria. As plantas F2 foram colhidas individualmente para obtenção das progênes F2:3. As plantas F2:3 foram cultivadas em casa de vegetação para coleta de amostras foliares para genotipagem e avaliações fenotípicas, nas quais foram analisadas a reação genética de cada genótipo ao nematóide *Heterodera glycines* raça 6, conforme será descrito adiante.

3.2 Coleta das amostras e extração de DNA

Discos foliares de cada planta F3 foram coletados individualmente para extração do DNA. A coleta foi conduzida nas folhas do último trifólio expandido no estágio vegetativo

V3. A extração do DNA foi realizada utilizando o kit Kleargene (LGC Genomics), conforme recomendações do fabricante, no laboratório de biotecnologia da GDM, visando à genotipagem de SNPs via ensaios KASP e target GBS.

Neste processo, as amostras coletadas foram acondicionadas em poços das placas, que compõe o Kit, e em cada poço foi adicionado uma pequena esfera metálica para maceração, e agitadas em “paintshaker” por seis minutos para macerar. Em seguida foram adicionados dois Buffers L1 e C1, houve agitação, e as amostras foram incubadas por 10 minutos a 55°C, e depois centrifugadas a 3.000 rpm por dois minutos, concluindo assim a etapa de quebra de parede celular.

Na sequência se utiliza uma placa filtro em que 100 µL do lisado, obtido na etapa anterior, foi transferido para cada poço individual desta nova placa, e foram incubados em temperatura ambiente por dois minutos, e depois passou por duas etapas de lavagem com buffers específicos, e uma terceira lavagem com etanol, sendo realizada uma centrifugação a 3.000 rpm por dois minutos em cada uma dessas etapas.

Por fim foi realizada uma etapa de secagem e eluição, em que a placa filtro foi incubada por 10 minutos a 55°C, em seguida foi adicionado o buffer E1, uma nova incubação por cinco minutos a 55°C, e centrifugação a 3.000 rpm por dois minutos.

3.3 Avaliação de *Heterodera glycines* nas plantas F3

O solo que foi utilizado no ensaio de fenotipagem teve o seu preparo iniciado cerca de 90 dias antes da semeadura. Foi coletado na estação de pesquisa da GDM em Cambé-Paraná, foi destorroado, peneirado, e recebeu adição de areia até atingir a proporção de 75% de areia. Depois foi esterilizado em autoclave com temperatura de 120°C por duas horas, e após este processo permaneceu em repouso por 30 dias, e na sequência foi amostrado para análise química, e com base nos resultados obtidos foi devidamente corrigido, com adição de calcário, superfosfato simples, e cloreto de potássio, e permaneceu em repouso por mais 40 dias.

As sementes das progênies avaliadas foram semeadas em tubetes com volume aproximado de 290 cm³, em casa de vegetação, em delineamento de blocos aumentados, com temperatura de 28 a 30°C, umidade do solo próxima a 70% da capacidade de campo e fotoperíodo por volta de 14 horas de luz, condições estas mantidas durante todo o período do ensaio.

A inoculação ocorreu aos sete dias após a semeadura, utilizando inóculo puro de *Heterodera glycines* raça 6 obtido da coleção de nematoides da GDM, com confirmação da raça utilizada através de cultivares diferenciadoras conforme descrito por DIAS et al. (1998). Neste procedimento foi realizado um furo no solo, próximo ao colo das plantas, com auxílio de um bastão, com profundidade aproximada de dois centímetros (cm), e diâmetro de um cm, e dentro deste furo foi aplicado com pipeta quatro mililitros (mL) de suspensão contendo cerca de 4.000 ovos + J2 de *H. glycines* raça 6, e em seguida o orifício foi fechado.

Transcorrido o período de 30 dias após a inoculação, ocorreu a avaliação, em que se descartou a parte aérea das plantas, e as raízes foram cuidadosamente separadas do solo, de forma manual, acondicionadas individualmente em sacos plásticos e levadas ao laboratório para extração das fêmeas. Este processo consistiu na tripla lavagem das raízes em água corrente com esfregação manual, sobre um becker de 2 litros, e na sequência todo conteúdo foi vertido em um conjunto de duas peneiras acopladas com granulometrias de 25 e 60 mesh. As fêmeas ficam retidas na peneira mais fina, e foram recolhidas e posteriormente quantificadas em microscópio estereoscópico, com até 40x de aumento.

A classificação dos genótipos antes da modelagem estatística foi realizada pelo critério de índice de fêmeas (IF), de acordo com o estabelecido por Schmitt; Shannon (1992), que é calculado da seguinte forma: $IF\% = (\text{número de fêmeas na diferenciadora} / \text{número de fêmeas na Lee}) \times 100$ sendo os genótipos classificados como resistentes (IF) = menor ou igual 10%, Moderadamente Resistente (IF) = de 10,1% a 30% e suscetível (IF) = acima de 30%.

3.4 Seleção de SNPS polimórficos

Para definir a região física de interesse para a seleção dos polimorfismos, os mapas genéticos do locus Rhg5 disponíveis na literatura foram integrados ao mapa físico, conforme quadro 3. Os marcadores SSR flanqueando as regiões de interesse de acordo com cada mapeamento, foram utilizados para definir a região alvo. A região de interesse foi comparada entre os parentais de cada cruzamento e os SNPs polimórficos identificados com base em dados internos de genotipagem da empresa GDM utilizando a tecnologia de genotipagem por sequenciamento (GBS).

Quadro 3. Mapas genéticos do gene Rhg5 disponíveis na literatura, candidatos a integração com mapa físico.

Artigo	Raça	QTL	Intervalo	Início do QTL	Fim do QTL	Genoma base para gene	Cromossomo	Marcador
Concibido, 1994	3	B032		33522390	37517727	Glyma 2.0	16	
Chang, 2011	3	Qscn3-3	Satt350	36833446	36833701	Glyma 2.0	16	Satt 244
			Satt244	33818897	33819094	Glyma 2.0		
Chang, 2011	14	Qscn14-4	Satt350	36833446	36833701	Glyma 2.0	16	Satt 244
			Satt244	33818897	33819094	Glyma 2.0		
50K	6	SCN6-g7	ss715624650	3378101	3378222	Wm82.a2	16	3378162

Para cada região gênica foi utilizado um intervalo para seleção dos SNPs que ficou em torno de dois Mb, sendo um Mb de cada lado da possível região onde o gene está localizado. Após a escolha dos SNPs, as sequências que flanqueiam os marcadores (aproximadamente 100 pares de bases para cada lado do SNPs) foram obtidas. Consequentemente, após a finalização deste processo, as sequências foram encaminhadas para a empresa LGC Genomics para a síntese dos *primers*.

Visando estreitar a região entre o gene e os marcadores, uma outra estratégia adotada foi a análise de um banco de dados da GDM, composto por 160 genótipos com reações conhecidas para *Heterodera glycines* raça 6 que foram previamente sequenciados com SoyChip 50k (Song et al, 2013), e que possuíam a genotipagem para marcador interno da GDM para o gene Rhg1, que é conhecido por agregar resistência a algumas raças de NCS.

De posse dessas informações, selecionou-se um grupo de genótipos Rhg1 positivo e suscetível a SCN raça 6, e outros Rhg1 positivo e resistente a raça 6. Foram analisadas as diferenças moleculares entre esses grupos, nas regiões obtidas na literatura, e com isso foram desenhados seis pares de primers visando amplificar regiões candidatas a se correlacionar com o fenótipo avaliado, conforme quadro quatro.

Quadro 4. Primers candidatos a amplificar regiões associadas a resistência a *Heterodera glycines* raça 6.

Primer 1	Rhg5-ss715624601
Primer 2	Rhg5-ss715624607
Primer 3	Rhg5-ss715624540
Primer 4	Rhg5-ss715624523
Primer 5	Rhg5-ss715623941
Primer 6	Rhg5-ss715623940

A genotipagem foi conduzida via metodologia target-GBS pela empresa Agriplex (US), que conduz o sequenciamento de amplicons utilizando sequenciamento de nova geração. As reações foram conduzidas, conforme recomendações do fabricante, em um volume final de 5 uL, sendo compostas mix de reação 1x, dois primers forward e um primer reverso na concentração final de 0,2 µM cada um, 0,4 u/µl de Taq Polimerase e 2,5 ng/ul de DNA de cada amostra. As reações de amplificação consistiram em 43 ciclos, onde os mesmos são: 9 ciclos de desnaturação a 95° C por 5 s, 61° C por 1 min e 72° C por 30 s; 34 ciclos de 94° C por 30 s, 57° C por 1 min e 72° C por 30s, além de uma etapa final de 72° C por 1 minuto. As amplificações e leitura foram conduzidas nos equipamentos da LGC e após a leitura os polimorfismos presentes em cada amostra foram identificados pelo KRAKEN Software.

3.5 Delineamento experimental

O experimento foi conduzido sob o delineamento em blocos aumentados (FEDERER; RAGHAVARAO, 1975), em que as testemunhas comuns tiveram cinco repetições de uma planta, enquanto os tratamentos regulares apresentaram apenas uma repetição, constituída por uma planta F2:3.

Foram avaliados 12 tratamentos comuns, constituídos pelos quatro parentais das populações e pelas cultivares padrões de resistência e suscetibilidade a *H. glycines* raça 6, além de 3.880 tratamentos regulares para todas as populações, totalizando 3.892 tratamentos, conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Descrição dos tratamentos avaliados no experimento.

TRATAMENTOS COMUNS			
Tipo	ID	Rep	Trat
Parental	GDM18I209	5	1
	GDM19I445	5	1
	NEO750	5	1
	VORAZ	5	1
Padrão de resistência	PEKING	5	1
	PI88788	5	1
	PI90763	5	1
	HARTWIG (PI 543795)	5	1
Padrão de susceptibilidade	PICKETT	5	1
	LEE (PI 548656)	5	1
	POTÊNCIA	5	1
	BRS VALIOSA	5	1
TRATAMENTOS REGULARES			
População 1	VORAZxNEO750	1	1050
População 2	VORAZxGDM19I445	1	935
População 3	GDM18I209xNEO750	1	520
População 4	GDM18I209xGDM19I445	1	1375
TOTAL			3892

Número de repetições (N Rep); Número de tratamentos (N Trat).

3.6 Análise estatística

3.6.1 Dados fenotípicos

Inicialmente, a função de densidade de probabilidade (FDP) adequada aos dados foi verificada pela análise gráfica pelo método de densidade de Kernel. De posse da simetria do gráfico, a FDP de *Poisson* foi a que melhor se aproximou, sendo então realizada a comparação com a simetria esperada, adotando como parâmetro para lambda, a média dos dados. Um modelo linear generalizado misto (MLGM) foi ajustado para a análise dos dados, conforme descrito abaixo, em que a família de densidade de probabilidade adotada foi a Poisson e a função de ativação sendo a logarítmica para manter uma relação exponencial entre o modelo e o intercepto (BOLKER et al., 2009).

O modelo linear misto utilizado de acordo com o delineamento experimental foi:

$$y_{ij} = \mu + G_i + e_{ij}$$

em que:

y_i : variável resposta para o genótipo i repetido k vezes;

μ : constante associada a todas as observações;

G_i : efeito do genótipo i , assumido como aleatório;

e_i : efeito do erro associado a observação do genótipo i no bloco j , assumido como aleatório.

O modelo que define sua extensão do modelo um para MLGM pode ser descrito como (PIEPHO, 2019):

$$\eta = \mu + G_i + e_{ik}$$

em que:

η : é o predito linear do modelo.

O vetor de observações y_{ij} possui a seguinte expectativa relacionada a FDP Poisson:

$$E(\eta) = \mu = g^{-1}(\eta)$$

em que:

$g^{-1}(\eta)$: função de ligação inversa entre a expectativa de y ao preditor η .

De posse dos resultados dos modelos, foram então preditos os BLUPs (*Best Linear Unbiased Predictions*) para MLGM e os genótipos ranqueados conforme o ideótipo da característica avaliada.

A classificação dos genótipos após a modelagem estatística foi realizada com base no tratamento controle LEE (PI 548656), sendo classificados como resistentes (R) aqueles que apresentaram um valor genotípico predito de até 10% do valor genotípico predito para LEE (PI 548656), moderadamente resistente (MR) com valor genotípico predito entre 10 e 30% do valor de LEE (PI 548656) e suscetíveis (S) para valores genotípicos preditos acima de 30% do valor genotípico predito para LEE (PI 548656)

3.6.2 Dados Genotípicos

Os resultados obtidos pela genotipagem foram plotados em um diagrama de Sankey (KENNEDY; SANKEY, 1898) para a compreensão da relação entre o fenótipo e as possíveis formas do polimorfismo identificado pelos SNPs escolhidos.

3.7 Aspectos computacionais

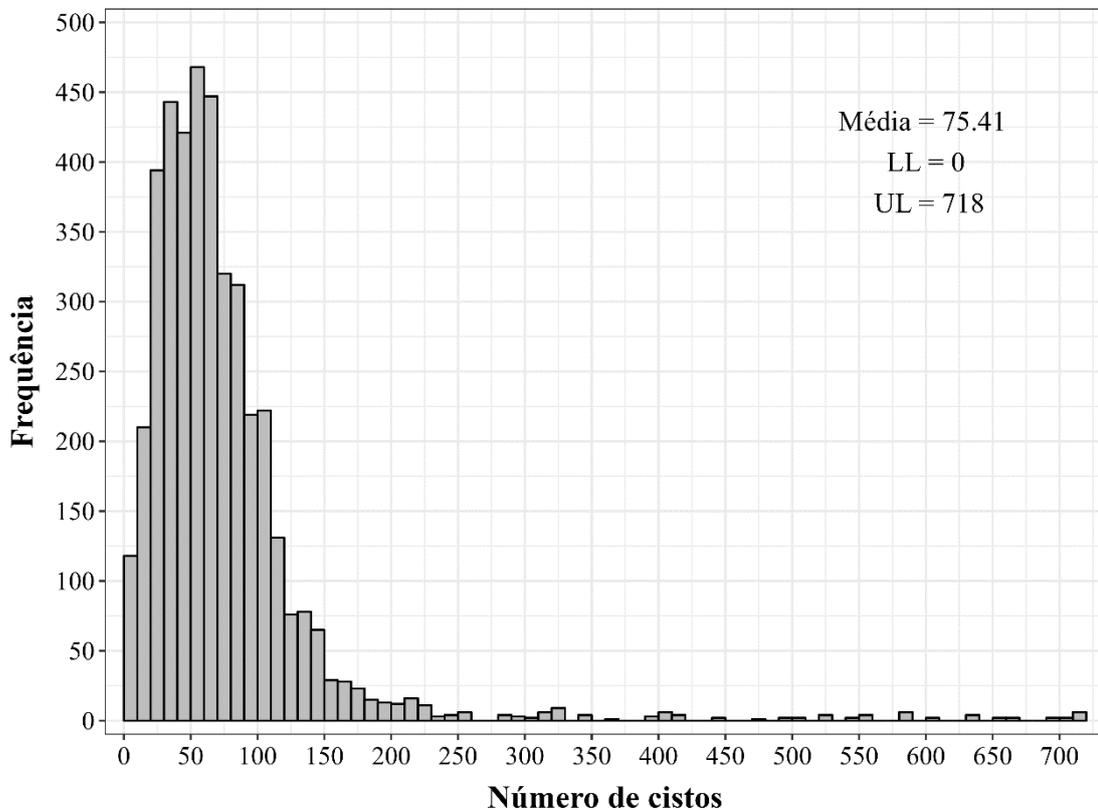
O software R (R Core Team, 2020) versão 4.1.3 foi utilizado para o tratamento dos dados e para o ajuste dos modelos utilizados. Utilizou-se o pacote lme4 (BATES et al., 2015) para o ajuste do modelo linear generalizado misto. As ferramentas disponíveis no pacote Tidyverse (WICKHAM et al., 2019) foram utilizadas para a manipulação dos dados e para a elaboração dos gráficos apresentados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

No ensaio de fenotipagem foram avaliadas 3920 plantas, dentre as quais 40 eram linhagens com reações fenotípicas ao SCN raça 6 conhecidas, sendo utilizadas como testemunhas, e outras 3880 plantas, progênies F3, das quatro populações em estudo.

Os dados de contagem de fêmeas de SCN raça 6, não apresentaram distribuição normal e por isso adotou-se com curva de distribuição de Poisson. A fim de discriminar os erros associados aos dados, sendo eles de caráter ambiental, ou ligado ao processo extração, contagem, adotou-se um Modelo linear generalizado misto associado a distribuição de Poisson com função ativadora logarítmica, e com isto determinou-se o valor genotípico de cada indivíduo, que foi utilizado para submetê-los a separação por classes fenotípicas, de forma ajustada, excluindo-se os erros associados estimados. Na figura 1, temos a distribuição dos dados de contagem.

Figura 1. Histograma de frequência de indivíduos em função do número de fêmeas de *Heterodera glycines* raça 6.



Ao se considerar a hipótese de que a resistência ao SCN raça 6 seja condicionada por um gene, com dois alelos e dominância completa, e a geração em que as plantas foram

avaliadas, com base na herança mendeliana, há uma frequência esperada de classes fenotípicas, que para este caso é de $\frac{5}{8}$ de indivíduos com fenótipo resistente e $\frac{3}{8}$ de indivíduos com fenótipo suscetível, e uma hipótese H₀ de que as diferenças entre a frequência esperada e a frequência observada sejam devido ao acaso. Assim, procedeu o teste de Qui-quadrado, para os parentais, testemunhas resistentes, testemunhas suscetíveis e para cada população em separado (Tabela 2)

Tabela 2. Teste de Qui-quadrado para parentais, testemunhas e populações.

População	QQ-Calculado	QQ-Tabelado	Conclusão
BRS VALIOSA	0	6,63	Aceita a hipótese H ₀
GDM18I209	1	6,63	Aceita a hipótese H ₀
GDM19I445	0	6,63	Aceita a hipótese H ₀
HARTWIG (PI 543795)	0	6,63	Aceita a hipótese H ₀
LEE (PI 548656)	0	6,63	Aceita a hipótese H ₀
NEO750	0	6,63	Aceita a hipótese H ₀
PEKING	0	6,63	Aceita a hipótese H ₀
PI88788	0	6,63	Aceita a hipótese H ₀
PI90763	0	6,63	Aceita a hipótese H ₀
PICKETT	0	6,63	Aceita a hipótese H ₀
POTÊNCIA	0	6,63	Aceita a hipótese H ₀
VORAZ	1	6,63	Aceita a hipótese H ₀
GDM18I209xGDM19I445	159,02	6,63	Rejeita a hipótese H ₀
GDM18I209xNEO750	5,55	6,63	Aceita a hipótese H ₀
VORAZxGDM19I445	150,12	6,63	Rejeita a hipótese H ₀
VORAZxNEO750	32,73	6,63	Rejeita a hipótese H ₀

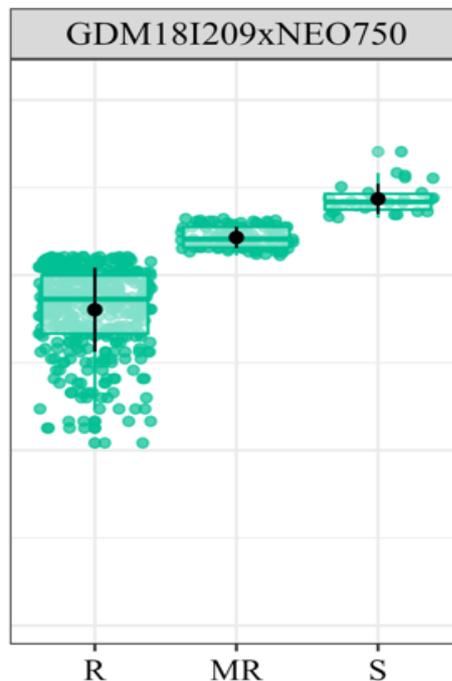
Pode-se observar que para os Parentais e Testemunhas, a conclusão do teste é a aceitação da hipótese H₀, o que permite inferir que os desvios observados são devidos ao acaso com 99% de probabilidade.

Para as populações GDM18I209xGDM19I445, VORAZxGDM19I445 e VORAZxNEO750, houve a rejeição da hipótese H₀, assumindo-se que as diferenças entre as frequências esperada e observada não se deram devido ao acaso. Algumas razões para este fato podem ser aventadas. A primeira, refere-se ao fato de que os genitores não são puros e contrastantes para o caráter em estudo. A segunda hipótese pode estar relacionada a estratégia de fenotipagem utilizada (ALZATE-MARIN et al., 2005).

Por seu turno, para a população GDM18I209xNEO750, aceita-se a hipótese de nulidade (Tabela 2). Isto é, pode-se inferir que os genitores são divergentes entre si e também que um modelo de um gene com dois alelos pode ser utilizado para se explicar a segregação observada (BATISTA, 2012).

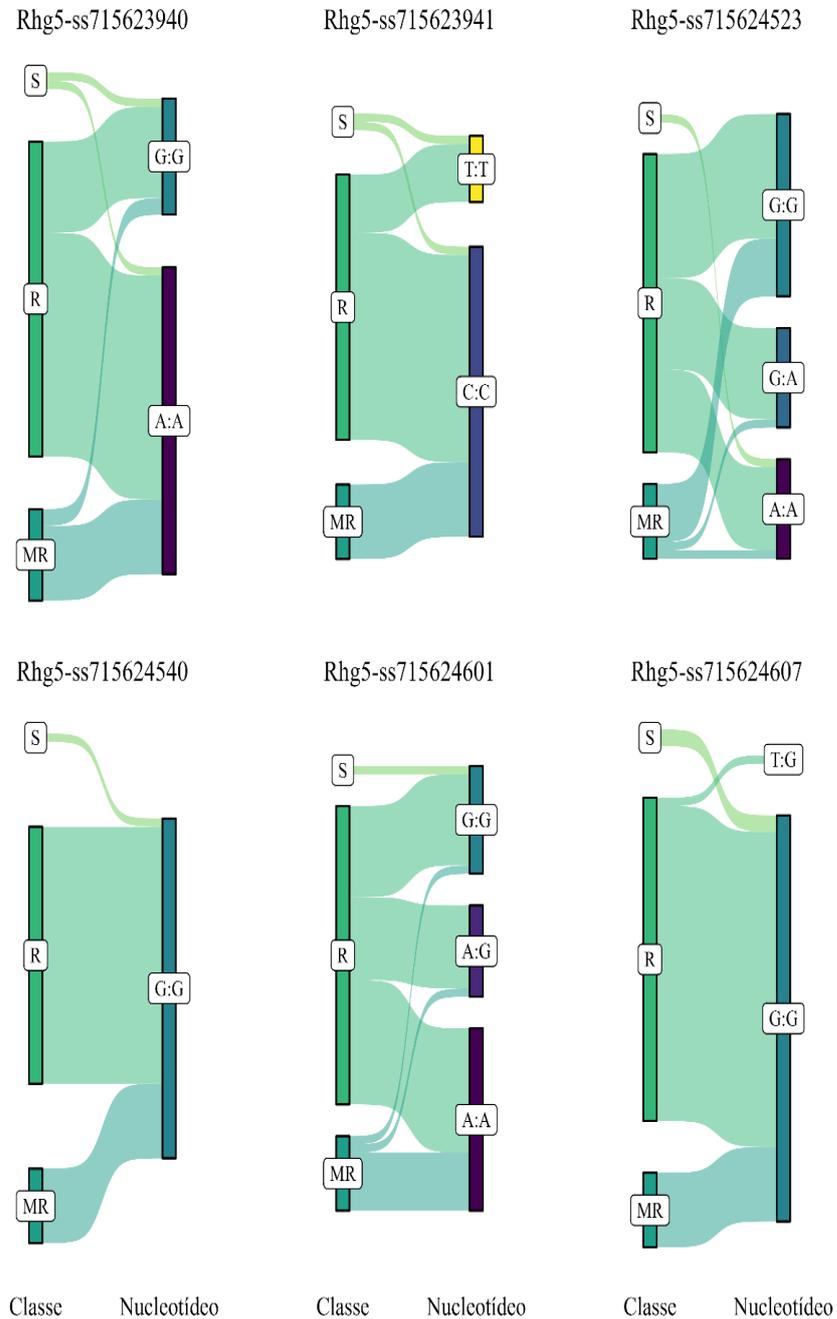
Na figura 2, estão plotadas as distribuições dos fenótipos na população mencionada anteriormente. Veja que, conforme esperado, uma maior proporção de plantas está agrupada nas classes (R e MR). Por meio dos valores genotípicos ajustados, pode-se observar as classes fenotípicas, condição que corrobora para a proposição de que esta população apresenta as condições necessárias para que seus dados fenotípicos sejam empregados no estudo de associação entre fenótipos e as marcas genotípicas (UNÊDA TREVISOLI, 2018).

Figura 2. Distribuição dos fenótipos na população GDM18I209xNEO750.



Na figura três um conjunto de diagramas de Sankey (KENNEDY; SANKEY, 1898), em que a largura das setas é proporcional a taxa de fluxo, relacionando a ocorrência dos fenótipos com os nucleotídeos observados na genotipagem para cada primer em separado.

Figura 3. Relação fenótipo por nucleotídeo, por *primer* para a população DM18I209xNEO750.



Está evidente que para nenhuma das marcas utilizadas, para a população em que se ajustou o modelo de segregação mendeliana, denota potencial de uso em seleção assistida, devido ao fato que não há uma clara separação entre grupos com ligação direta entre fenótipo e o nucleotídeo. Por exemplo, em todos os seis *primers*, o fenótipo suscetível está associado a um nucleotídeo, que por sua vez também está associado a um grande número de indivíduos com fenótipo resistente, característica esta que impossibilita a seleção.

Algumas razões podem ser utilizadas para se explicar este resultado. O primeiro, se deve ao fato do número de plantas genotipadas em proporção das que foram fenotipadas. Na referida população, avaliou-se 520 plantas, contudo, apenas 59 destas foram genotipadas. Como não existe uma correlação perfeita entre a marca versus o fenótipo, pode existir um erro amostral associado. Outro ponto que merece destaque, refere-se a fenotipagem. Sabe-se que para obtenção de marcas intimamente ligadas aos fenótipos, é mandatório que os dados fenotípicos sejam os mais acurados possíveis. Como as avaliações são realizadas pela contagem manual, pode existir grande proporção do erro experimental na expressão fenotípica (GOULART, 2010). Bem como a efeitos ambientais relacionados condução do experimento (ARAÚJO, 2013).

Por exemplo, em Rhg5-ss715624523, os indivíduos suscetíveis estão ligados ao nucleotídeo A:A juntamente com parte dos indivíduos resistentes, porém os nucleotídeos G:G e G:A, juntos estão ligados a quase dois terços dos indivíduos resistentes, e sem associação com indivíduos suscetíveis. Situação parecida também ocorre em Rhg5-ss71562460, em que os nucleotídeos A:A e A:G, que juntos estão associados a quase dois terços dos indivíduos resistentes, sem que haja associação com indivíduos suscetíveis. Muito embora estas marcas não sejam suficientemente eficientes para a discriminação de grupos com classes fenotípicas diferentes, podem fornecer subsídios para que trabalhos futuros possam ser aprimorados e novas pesquisas realizadas no intuito de se identificar novos marcadores moleculares.

5 CONCLUSÃO

Para as populações GDM18I209xGDM19I445, VORAZxGDM19I445 e VORAZxNEO750, rejeita-se a hipótese H_0 , assumindo-se que as diferenças entre as frequências esperadas e observadas nas classes fenotípicas não são devido ao acaso.

Para a população GDM18I209xNEO750, pode-se inferir que os genitores são divergentes entre si e também que um modelo de um gene com dois alelos pode ser utilizado para se explicar a segregação observada para o gene *Rhg5* em nematoide de cisto em soja.

Nenhuma das marcas utilizadas, para a população em que se ajustou o modelo de segregação mendeliana, denota potencial de uso em seleção assistida, devido ao fato que não há uma clara separação entre grupos com ligação direta entre fenótipo e o nucleotídeo.

REFERÊNCIAS

- ABDELNOOR, R.V.; ALMEIDA, A.M.R. Uso de marcadores moleculares nos estudos do nematoide de cisto da soja. In: Sociedade Brasileira de Nematologia (ed). **O Nematoide de Cisto da Soja: A Experiência Brasileira**. Artsigner Editores, Jaboticabal (SP), p. 119-130. 1999.
- ALZATE-MARIN, Ana Lilia et al. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia brasileira**, v. 30, p. 333-342, 2005.
- ARAÚJO, Fernando Godinho de et al. Aspectos da biologia e manejo do nematoide de cisto da soja. 2013.
- BANDARA, Ananda Y. et al. Dissecting the economic impact of soybean diseases in the United States over two decades. **PloS One**, v. 15, n. 4, p. e0231141, 2020.
- BARBOSA, Thimóteo Paes et al. MANEJO BIOLÓGICO DO NEMATOIDE DE CISTO (*Heterodera glycines*) NA CULTURA DA SOJA. 2020.
- BATES, D.; MÄCHLER, M.; BOLKER, B.; WALKER, S. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. **Journal Of Statistical Software**, v. 67, n. 1, p. 1-48, out. 2015. Foundation for Open Access Statistic.
- BATISTA, Renata Oliveira. Diversidade genética de linhagens elites de soja quanto a resistência a doenças. 2012.
- BOLKER, B. M.; BROOKS, M. E.; CLARK, C. J.; GEANGE, S. W.; POULSEN, J. R.; STEVENS, M. H. H.; WHITE, J. S. Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. **Trends In Ecology & Evolution**, v. 24, n. 3, p. 127-135, mar. 2009.
- BOTSTEIN D, White RL, SKOLNICK M, DAVIS RW. Construction of genetic linkage map using restriction fragment length polymorphisms. **Am J Hum Genet** 32:314–31. 1980.
- BUTLER JM, BUEL E, CRIVELLENTI F, MCCORD BR Forensic DNA typing by capillary electrophoresis using the ABI Prism 310 and 3100 genetic analyzers for STR analysis. **Electrophoresis**. 25 1397–1412. 2004.
- CÂMARA, G. M. S.; HEIFFIG, L. S. Fisiologia, ambiente e rendimento da cultura da soja. In: CÂMARA, G. M. S. **Soja tecnologia da produção II**. Piracicaba FEALQ, 2000. p. 81-119.
- CAVALCANTI, J. J. V., et al. Predição simultânea dos efeitos de marcadores moleculares e seleção genômica ampla em cajueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura** 34: 840-846. 2012.
- CHAMBERS GK, CURTIS C, Millar CD, et al. DNA fingerprinting in zoology: past, present, future. **Investig Genet** 5: 3. 2014.
- CONCIBIDO, V. C.; DIERS, B. W.; ARELLI, P. A decade of QTL mapping for cyst nematode resistance in soybean. **Crop Science**, v. 44, p.1121–1131, 2004.

CUNHA, R.P.; MAIA, G.L.; RODACKI, M.E.P.; SILVA, G.S.; MEYER, M.C. Ciclo de vida de *Heterodera glycines* raça 9 em soja no Estado do Maranhão. **Summa Phytopathol.**, Botucatu, v. 34, n. 3, p. 262-264, 2008.

DIAS, W.P. et al. **Nematoídes em soja: identificação e controle**. Londrina: Embrapa Soja, 2010b. 8p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 76).

DUARTE, Vilmar Nogueira. Panorama da produção de soja no estado de mato grosso do Sul no período de 1993 a 2013. **Anais-Encontro Científico De Administração, Economia e Contabilidade**, v. 1, n. 1, 2016.

EMBRAPA. História da soja. Disponível em: www.embrapa.br/web/portal/soja/cultivos/soja1/historia Acesso em: 16 jan. de 2022.

EMBRAPA. Soja em números (Safrá 2021/2022). Disponível em: <https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos> Acesso em: 18. Fevereiro. 2023

FAO - FOOD EN AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Disponível em: <http://www.fao.org/countryprofiles/index/en/?lang=es&iso3=PRY> Acesso em: 10 jan. 2022.

FARIAS, J. R. B.; NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER, N. **Ecofisiologia da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 1ª ed., 2007, 9 p. (Circular Técnica, nº 48).

FAVORETO, L. et al. Diagnose e manejo de fitonematoídes na cultura da soja. **Informe Agropecuário**, v. 40, n. 306, p. 18-29, 2019.

FEDERER, W. T.; RAGHAVARAO, D. On Augmented Designs. **Biometrics**, v. 31, n. 1, p. 29, mar. 1975.

FERREIRA, L.; SILVA, L. L.; SILVA, E. H. da; PEREIRA, I. S. Nematóide do cisto da soja e princípios de controle. **Multidisciplinary Reviews**, v. 2, p. e2019012, 2019.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. 1998. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ªed. Brasília: Embrapa- Cenargen. 220 p.

GEBHARDT C, RITTER E, DEBENER T, et al. RFLP analysis and linkage mapping in *Solanum tuberosum*. **Theor Appl Genet** 78: 65–75. 1989.

GOULART, Alexandre Moura Cintra. Análise nematológica: importância e princípios gerais. Planaltina: **Embrapa Cerrados**, 2010.

HARDMAN, B.J. JACOBSEN, R. LEFFEL, M.A. NEWMAN, R.F. NYVALL, KAHL G, MAST A, TOOKE N, SHEN R, BOOM D. Single nucleotide Polymorphisms: Detection Techniques and Their Potential for Genotyping and Genome Mapping. In: The Handbook of Plant Genome Mapping: **Genetic and Physical Mapping**. 2005.

KENNEDY, A B W; SANKEY, H R. THE THERMAL EFFICIENCY OF STEAM ENGINES. REPORT OF THE COMMITTEE APPOINTED TO THE COUNCIL UPON THE SUBJECT OF THE DEFINITION OF A STANDARD OR STANDARDS OF THERMAL EFFICIENCY FOR STEAM ENGINES: with an introductory note. (including appendixes and plate at back of volume). **Minutes Of The Proceedings Of The Institution Of Civil Engineers**, v. 134, n. 1898, p. 278-312, jan. 1898.

KIM JE, OH SK, LEE JH, LEE BM; JO SH. Genome-wide SNP calling using next Generation sequencing data in tomato. **Mol Cells** 37, 36-42. 2014.

LANZA, M.A., C.T. GUIMARÃES & I. SHUSTER. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**, 21: 97-108. 2000.

LIMA, R.D.; FERRAZ, S. SANTOS, J.M. Ocorrência de *Heterodera* sp. em soja no Triângulo Mineiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 16.,

LORDELLO, A.I.; LORODELLO, R.R.A.; QUAGGIO, J.A. 1992. *Heterodera* sp. e sua produção de soja no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 16., Lavras. **Resumo**. Lavras: Sociedade Brasileira de Nematologia/ Escola Superior de Agricultura de Lavras.

MITCHUM, Melissa G. Soybean resistance to the soybean cyst nematode *Heterodera glycines*: an update. **Phytopathology**, v. 106, n. 12, p. 1444-1450, 2016.

MONTEIRO, A.R.; MORAIS, S.R.A.C. Ocorrência de nematoide de cisto, *Heterodera glycines*, Ichinohe, 1952, prejudicando a cultura da soja no Mato Grosso do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 16., Lavras. **Resumo**. 1992.

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

NIBLACK, T. L. 1992. The race concept. Pp. 73–86 in R. D. Riggs and J. A. Wrather, eds. Biology and management of the soybean cyst nematode. St. Paul, MN: **APS Press**.

NIBLACK, T. L. et al. A revised classification scheme for genetically diverse populations of *Heterodera glycines*. **Journal of nematology**, v. 34, n. 4, p. 279, 2002.

NIBLACK, T. L., COLGROVE, A. L., COLGROVE, K., AND BOND, J. P. 2008. Shift in virulence of soybean cyst nematode is associated with use of resistance from PI 88788. **Plant Health Prog**. Published online.

NIELSEN R, PAUL JS, ALBRECHTSEN A and Song YS Genotype and SNP calling from next-generation sequencing data. **Nat Rev Genet** 12:443–51.

OVERSTREET, C.; C.L. PARKS. Soybean cyst nematode. **Soybean Industry Resource Committee**, Washington, 23 p. 1984.

PERKEL, J. S.N.P. Genotyping: Six technologies that keyed a revolution. **Nat Methods** 5:575–575. 2008.

PIEPHO, H. A coefficient of determination (R^2) for generalized linear mixed models. **Biometrical Journal**, p. 1-13, 8 abr. 2019.

PINHEIRO, J. B. et. al. Population dynamics of the nematodes *Heterodera glycines* and *Pratylenchus brachyurus* in a succession crop of soybean and chickpea. **Agronomía Colombiana**, v. 39, n. 3, p. 337-342, 2021.

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria, 2020. URL <https://www.R-project.org/>.

RIBEIRO, N.R.; FAVORETO, L.; MIRANDA, M.D. Nematoides um desafio constante. In: **Boletim de pesquisa de soja fundação MT**. Mato Grosso, n.15, 201, p.400-414. 2011.

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

SANTANA, Fernanda Abreu. Seleção assistida e diversidade genética de fontes de resistência ao nematóide de cisto da soja. 2008.

SANTOS, V. da S. **Seleção de pré-cultivares de soja baseada em índices**. 2005. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

SAVELKOUL, P. H. M., AARTS, H. J. M., HAAS, J. et al. Amplified-fragment Length polymorphism analysis: the state of an art. **J Clin Microbiol** 37: 3083–91. 1999.

SCHIERWATER B, ENDER A (1993) Different thermostable DNA polymerases may amplify different RAPD products. **Nucleic Acids Res** 19: 4647–8.

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

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

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

SEIXA, C. D. S. Tecnologias de Produção de Soja. Londrina: Embrapa Soja, 347 p. **Sistemas de Produção / Embrapa Soja**, ISSN 2176-2902; n. 17). 2020.

SILVA, R. N. O. da; MENEGHELLO, G. E. O cultivo da soja na região Matopiba: grandeza, desafios e oportunidades para a produção de grãos e sementes. **Revista SEED News**, v. 20, n. 4, 2016.

SKROCH P, NEINHUIS, J. Impact of scoring error and reproducibility of RAPD data on RAPD based estimates of genetic distance. **Theor Appl Genet** 91: 1086– 91. 1995.

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

TECCHIO, L. F. **Diagnostico da utilização de sementes de soja na região de Mormaço-RS**. 2016. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas.

TRAN, D.T.; STEKETEE, C.J.; BOEHM, J.D.; NOE, J.; LI, Z. Genome-wide association analysis pinpoints additional major genomic regions conferring resistance to soybean cyst nematode (*Heterodera glycines* Ichinohe). **Frontier in Plant Science**, v.10, p.1-13, 2019.

TURCHETTO-ZOLET, A. C.; TURCHETTO, C.; ZANELLA, C. M.; PASSAIA, G. Marcadores Moleculares na Era genômica: Metodologias e Aplicações. Ribeirão Preto: **Sociedade Brasileira de Genética**, 2017.181 p.

TYLKA, G. L.; MARETT, Christopher C. Known distribution of the soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*, in the United States and Canada in 2020. **Plant Health Progress**, v. 22, n. 1, p. 72-74, 2021.

UNÊDA TREVISOLI, Sandra Helena et al. Estudo genético e validação de marcadores moleculares associados ao nematoide de cisto em populações de soja.

VOS P, HOGERS R, BLEEKER M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Res**, 23, 4407–14. 1995.

WICKHAM, H. et al. Welcome to the Tidyverse. **Journal Of Open Source Software**, v. 4, n. 43, p. 1686, 21 nov. 2019.

WINSTEAD, N.N.; SKOTLAND, C.B.; SASSER, J.N. 1955. Soybean cyst nematode in North Carolina. **Plant Disease Report**, v. 39, n.9, p.574-581.

ZANON, A.J. et al. Desenvolvimento de cultivares de soja em função do grupo de maturação e tipo de crescimento em terras altas e terras baixas. **Bragantia**, 2.