



CARLOS HENRIQUE DE SOUZA

**PIRAMIDAÇÃO DE ALELOS VISANDO RESISTÊNCIA
MÚLTIPLA AO NEMATOIDE DO CISTO DA SOJA**

**LAVRAS - MG
2025**

CARLOS HENRIQUE DE SOUZA

**PIRAMIDAÇÃO DE ALELOS VISANDO RESISTÊNCIA MÚLTIPLA AO
NEMATOIDE DO CISTO DA SOJA**

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

Prof. Dr. Adriano Teodoro Bruzi
Orientador

**LAVRAS - MG
2025**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo(a) autor(a) através do Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA.

Souza, Carlos Henrique.

Piramidação de alelos visando resistência múltipla ao nematoide do cisto da soja / Carlos Henrique Souza. 2025.

53 p. : il.

Orientador: Adriano Teodoro Bruzi

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2025.
Bibliografia.

1. Heterodera glycines. 2. PI437654. 3. Rhg4. 4. marcadores moleculares. I. Bruzi, Adriano Teodoro. II. Universidade Federal de Lavras. III. Título.

CARLOS HENRIQUE DE SOUZA

**PIRAMIDAÇÃO DE ALELOS VISANDO RESISTÊNCIA MÚLTIPLA AO
NEMATOIDE DO CISTO DA SOJA**

**ALLELE PYRAMIDING AIMING AT MULTIPLE RESISTANCE TO SOYBEAN
CYST NEMATODE**

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

APROVADO em 10/02/2025
Dr. Adriano Teodoro Bruzi - UFLA
Dra. Adriély Alves de Almeida - GDM
Dr. Cleiton Lourenço de Oliveira - UFLA

Prof. Dr. Adriano Teodoro Bruzi
Orientador

**LAVRAS - MG
2025**

*Aos meus pais Antônio Carlos de Souza e Maria de Lourdes Galdino Souza por todo apoio,
companheirismo e incentivo.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida, por me guiar ao longo de todo o caminho e por me amparar nos momentos difíceis.

Aos meus pais, Antônio Carlos de Souza e Maria de Lourdes Galdino Souza, por todos os ensinamentos, apoio e incentivo.

Às minhas irmãs Flávia e Jéssica, pelo companheirismo, carinho, conselhos e apoio.

Aos meus sobrinhos João Pedro e Luiz Otávio e minhas sobrinhas Sophia e Cecília, por todo amor e carinho.

Ao meu orientador Dr. Adriano Teodoro Bruzi pela orientação, dedicação, disponibilidade, aprendizados, confiança e por todas as oportunidades que têm me possibilitado.

Ao Grupo Dom Mario - GDM, em especial ao Dr. Murilo, Dr.a. Neucimara e Dr.a. Paola pela parceria, aprendizados e pela oportunidade em conduzir este trabalho.

A toda equipe do departamento de *nursery* e sanidade da GDM, em especial ao setor de nematologia, por terem me recebido, pelos ensinamentos compartilhados e por todos os momentos.

A Universidade Federal de Lavras pela infraestrutura, recursos, oportunidades acadêmicas e ensino de excelência proporcionadas durante o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Departamento de Biologia (DBI), e ao Programa de Pós- graduação em Genética e Melhoramento de Plantas pela oportunidade.

Aos amigos do Grupo Pesquisa Soja, em especial Taine Teotônio, Mateus Piza, Pablo Arantes e Maria Angélica pelo suporte, paciência, ensinamentos e momentos compartilhados.

Por fim. Agradeço a todos aqueles que contribuíram de forma direta ou indireta, para a minha formação e essa conquista.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Muito Obrigado!

RESUMO

A presença de alguns patógenos tem afetado o potencial produtivo das lavouras de soja, como é o caso do nematoide do cisto (*Heterodera glycines*). Embora existam diversas formas de manejo para esse patógeno, a utilização de cultivares resistentes é a prática mais efetiva. No entanto, o controle genético da resistência, por ser uma característica quantitativa, dificulta a seleção de novas cultivares, principalmente quando os alelos de resistência estão associados a características indesejáveis. Sendo assim, objetivou-se a seleção de genótipos recombinantes com ampla resistência ao nematoide do cisto da soja associado à coloração do tegumento amarelo. O trabalho foi conduzido a partir da realização de uma hibridação entre as linhagens de soja “TMG4182” e “PI437654”. A população foi conduzida pelo método de *Bulk* até a geração F₄. As sementes da geração F₄ foram então fenotipadas e genotipadas em quatro experimentos, um para cada raça de interesse (2, 4, 4+ e 14+). Os experimentos foram conduzidos na estação experimental da empresa GDM, localizada no município de Cambé - Paraná. O delineamento utilizado foi em blocos aumentados, com nove tratamentos controle mais os tratamentos regulares, plantas da população F₄, com seis e uma repetição, respectivamente. Cada parcela foi constituída por uma planta, distribuída individualmente em tubetes. A inoculação foi realizada sete dias após a semeadura com 4000 ovos e juvenis do nematoide do cisto. O material para genotipagem foi coletado no estágio vegetativo V3. Trinta dias após a inoculação foi realizada a fenotipagem das raízes, para quantificação do número de fêmeas. Após a contagem do número de fêmeas, foram estimados os índices de fêmeas. Os dados de contagem foram submetidos a uma análise de variância individual para cada experimento. Após análise individual foi realizada uma análise conjunta, a partir de um *Linear Mixed Model* - LMM. Os dados genotípicos foram apresentados por meio de gráficos de Sankey, juntamente com a reação dos tratamentos, com o objetivo de visualizar padrões e associações entre fenótipo e genótipo. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o ambiente R. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre todos os tratamentos regulares, para todos os experimentos. A partir dos gráficos de Sankey, observa-se que para as raças 2 e 4, existe um padrão entre os fenótipos e as marcas genotípicas, já para as raças 4+ e 14+ nota-se uma redução nesses padrões. A complexidade da resistência nas raças 4+ e 14+ pode estar associada a estes resultados, uma vez que a resistência nessas raças é um somatório de fatores, como número de cópias de *Rhg1* e *Rhg4* e contribuição de genes de efeitos menores. Ante aos resultados, pode-se inferir que a utilização da PI437654 como genitor em blocos de cruzamento possibilita a obtenção de genótipos recombinantes associando resistência ao nematoide do cisto e tegumento de coloração amarela. A utilização dos três marcadores não foi capaz de explicar a expressão fenotípica para a reação, devido à natureza poligênica da resistência. Genotipagens mais amplas devem ser realizadas, para uma seleção assistida por marcadores mais eficiente.

Palavras-chave: *Heterodera glycines*; PI437654; *Rhg4*; marcadores moleculares.

ABSTRACT

The presence of certain pathogens has significantly affected the yield potential of soybean crops, particularly the soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*). Although various management strategies are available to control this pathogen, the use of resistant cultivars remains the most effective approach. However, the genetic control of resistance—being a quantitative trait poses challenges for the selection of new cultivars, especially when resistance alleles are linked to undesirable agronomic characteristics. Therefore, this study aimed to select recombinant genotypes with broad resistance to soybean cyst nematode combined with yellow seed coat coloration. The research was conducted by hybridizing two soybean lines: "TMG4182" and "PI437654". The resulting population was advanced through the Bulk method up to the F4 generation. Seeds from the F4 generation were phenotyped and genotyped in four separate experiments, each corresponding to a specific nematode race of interest (races 2, 4, 4+, and 14+). The experiments were carried out at the GDM experimental station located in Cambé, Paraná, Brazil. An augmented block design was employed, consisting of nine control treatments and regular treatments (F4 plants), with six and one replication(s), respectively. Each plot was composed of a single plant, individually placed in seedling trays. Inoculation was performed seven days after sowing, using 4,000 eggs and juveniles of the cyst nematode. Genotyping material was collected at the V3 vegetative stage. Thirty days after inoculation, root phenotyping was conducted to quantify the number of females. Following the female count, female index values were calculated. Individual analysis of variance (ANOVA) was performed for each experiment. Subsequently, a joint analysis was carried out using a Linear Mixed Model (LMM). Genotypic data were visualized through Sankey diagrams, alongside phenotypic responses, to reveal patterns and associations between genotypes and phenotypes. All statistical analyses were conducted in the R environment. Significant differences ($p < 0.05$) were observed among all regular treatments across all experiments. Sankey diagram analyses revealed clear patterns between phenotypes and genotypic markers for races 2 and 4. However, reduced consistency in these patterns was observed for races 4+ and 14+, suggesting a more complex resistance mechanism. This complexity is likely associated with factors such as Rhg1 and Rhg4 copy number variation and the contribution of minor effect genes. Based on the results, it can be inferred that the use of PI437654 as a parent in breeding programs enables the development of recombinant genotypes that combine resistance to soybean cyst nematode with yellow seed coat coloration. Nonetheless, the three molecular markers employed were insufficient to fully explain the phenotypic variation in resistance, reflecting the polygenic nature of the trait. Broader genotyping efforts are necessary to enhance the efficiency of marker-assisted selection.

Keywords: *Heterodera glycines*; PI437654; Rhg4; molecular markers.

Impactos sociais, tecnológicos, econômicos e culturais

A soja destaca-se pela sua importância significativa na agricultura brasileira. Representa a cultura de maior importância econômica para o agronegócio brasileiro, estando presente em produtos destinados diretamente a alimentação humana, bem como à alimentação animal. Embora, sua importância seja incontestável a cultura é extremamente afetada por fatores bióticos e abióticos. Dentre os fatores abióticos podemos destacar a incidência de patógenos, como por exemplo, o nematoide do cisto da soja. A presença deste em áreas destinadas a sojicultura ocasionam perdas de até 100%, gerando prejuízos significativos aos produtores. O manejo deste nematoide deve ser realizado de forma integrada, utilizando técnicas como rotação de culturas, sucessão de culturas, uso de nematicidas biológicos e químicos e a utilização de cultivares resistentes. A adoção de cultivares resistentes tem sido a alternativa mais eficiente para os produtores. Contudo, a grande variabilidade genética do patógeno dificulta a obtenção de cultivares resistentes a todas as raças presentes no território brasileiro. Desta forma, pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de novas cultivares resistentes ao nematoide do cisto é essencial para uma agricultura mais sustentável. Nesse contexto, genótipos com ampla resistência devem ser desenvolvidos e disponibilizados aos produtores. A introdução de novas fontes de resistência nos programas de melhoramento genético de soja é essencial para garantir o desenvolvimento de genótipos com diferentes mecanismos de resistência. Entretanto, muitas vezes genes de resistência podem estar associados a características agronômicas indesejadas, como por exemplo, a coloração do tegumento. Desta forma, o objetivo deste estudo foi selecionar genótipos recombinantes com ampla resistência ao nematoide do cisto da soja e tegumento de coloração amarelo. Os resultados obtidos neste estudo evidenciam a possibilidade de obter genótipos resistentes oriundos de novas fontes de resistência. Além disso, a utilização de ferramentas como marcadores moleculares deve ser aprimorada e inserida nos programas de melhoramento, o que resultará em uma maior agilidade e precisão no desenvolvimento de novas linhagens de soja.

Social, Technological, Economic, and Cultural Impacts

Soybean holds a prominent position in Brazilian agriculture due to its substantial importance. It represents the most economically significant crop for the country's agribusiness sector, being utilized in products intended for both human consumption and animal feed. Despite its indisputable relevance, soybean cultivation is highly susceptible to various biotic and abiotic factors. Among the abiotic constraints, the incidence of pathogens is particularly critical, with the soybean cyst nematode (SCN) standing out as a major concern. The presence of this pathogen in soybean-growing areas can lead to yield losses of up to 100%, resulting in significant economic damage to producers. Effective management of SCN requires an integrated approach, including crop rotation, succession cropping, the application of both biological and chemical nematicides, and the deployment of resistant cultivars. Among these strategies, the use of resistant cultivars has emerged as the most effective solution for farmers. However, the high genetic variability of the pathogen poses a major challenge to developing cultivars that are resistant to all races present across the Brazilian territory. Therefore, continuous research aimed at developing new soybean cultivars with resistance to SCN is crucial for achieving more sustainable agricultural practices. In this context, genotypes with broad-spectrum resistance must be developed and made accessible to growers. The incorporation of novel sources of resistance into soybean breeding programs is essential to ensure the development of genotypes with distinct resistance mechanisms. Nonetheless, resistance genes are often linked to undesirable agronomic traits, such as seed coat color. Hence, the objective of this study was to select recombinant genotypes with broad resistance to the soybean cyst nematode and yellow seed coat color. The findings of this study demonstrate the feasibility of obtaining resistant genotypes derived from novel resistance sources. Furthermore, the refinement and integration of tools such as molecular markers into breeding programs are crucial to enhancing speed and accuracy in the development of new soybean lines.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1.	Nematoide do Cisto da Soja.....	14
2.2.	Controle genético da coloração do tegumento em soja.....	18
2.3.	Alternativas para incrementar a durabilidade da resistência ao NCS	20
2.4.	Marcadores moleculares no melhoramento de plantas	22
3	MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1.	Local	24
3.2.	Obtenção da população segregante	25
3.3.	Genótipos e raças avaliados	25
3.4.	Condução do experimento em casa de vegetação e parâmetros avaliados	26
3.5.	Coleta de amostras, extração de DNA e genotipagem.....	27
3.6.	Análises estatísticas dos dados fenotípicos	28
3.7.	Análise dos dados genotípicos	31
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5	CONCLUSÕES	43
	REFERÊNCIAS	44
	ANEXO	53

1 INTRODUÇÃO

Com a expansão da sojicultura pelo Brasil aumentou-se os desafios relacionados à incidência de pragas e doenças, como por exemplo o *Heterodera glycines*, um patógeno que tem causado grandes perdas na sojicultura (Tylka e Christopher, 2021). O *Heterodera glycines*, conhecido popularmente como nematoide do cisto da soja (NCS) é considerado um dos principais fitonematoides da cultura da soja (Dhingra; Mendonça; Macedo, 2009). Há relatos de perdas na produtividade de até 100%, dependendo da concentração de inóculo na área, suscetibilidade da cultivar, fertilidade do solo e raça patogênica (Dias, 2009; Dhingra; Mendonça; Macedo, 2009; Ferreira *et al.*, 2019).

No Brasil, já foram relatadas 11 raças do NCS, descritas como, raça 1, 2, 3, 4, 4+, 5, 6, 9, 10, 14 e 14+, distribuídas por diversos estados brasileiros (Ferreira *et al.*, 2019). Para um manejo eficiente deste patógeno deve-se realizar práticas integradas, como a rotação e sucessão de culturas, utilização de produtos químicos (nematicidas), produtos biológicos e emprego de cultivares resistentes (Meinhardt *et al.*, 2021; Tian *et al.*, 2023).

Embora a resistência genética seja a forma mais eficiente no controle do nematoide, a alta variabilidade do patógeno dificulta a obtenção de novas cultivares resistentes. Desta forma, o controle genético da resistência tem sido estudado por diversos autores (Butler *et al.*, 2021; Lian *et al.*, 2022; Tian *et al.*, 2023; Torabi *et al.*, 2023).

No que se tange o controle genético, foram relatados mais de 200 *Quantitative Traits Locus* - *QTLs*, atuando na resistência ao NCS. Dentre estes, destacam-se os *QTLs Rhg1* e *Rhg4*, localizados nos cromossomos 18 e 8, respectivamente (Tran *et al.*, 2019). Entretanto, a utilização incessante de *Rhg1*, proveniente do genitor *PI88788*, nos programas de melhoramento em todo o mundo, resultou em uma base genética estreita, possibilitando assim, o surgimento de novas raças do NCS (Mitchum, 2016; Niblack *et al.*, 2008).

Deste modo, outros genótipos exóticos de soja foram caracterizados quanto à suas respectivas resistências. A *Plant Introduction (PI) 437654*, foi coletada na China (1979), e constatou-se sua resistência a todas as raças relatadas do NCS, incluindo às raças 4+ e 14+, porém, possui grãos de coloração escura (Shannon; Arelli; Young, 2004; Torabi *et al.*, 2023).

Assim, a seleção de novos genótipos que conferem resistência às diversas raças de nematoide oriundas de *PI437654* é dificultada pelo fato de esses alelos estarem associados a características que não são de interesse nos programas de melhoramento, o que dificulta o trabalho dos melhoristas. Como é o caso do gene *I*, responsável pela coloração do tegumento

em grãos de soja, e que está associado a *QTLs* de resistência ao NCS (Lopes Da Silva *et al.*, 2017; Teixeira, 2016).

De forma geral, não é tarefa simples obter uma cultivar que seja completamente resistente ao NCS, pois a interação entre o número de alelos, número de raças e a interação genótipos x ambientes, altera a expressão fenotípica. Além disso, a baixa variabilidade genética nos programas de melhoramento de soja visando a resistência a esse patógeno tem dificultado a seleção de genótipos que apresentem uma resistência ampla e duradoura (Tian *et al.*, 2023; Tylka e Christopher, 2021).

Neste sentido, a utilização da seleção assistida por marcadores, tem se apresentado como uma alternativa para características complexas como a resistência ao NCS (Lian *et al.*, 2022; Tian *et al.*, 2023). Devido à baixa herdabilidade da resistência, a utilização de dados genotípicos para estudos de associação entre fenótipo e genótipo são interesse também dos programas de melhoramento (Cavalcanti, 2012).

Diante do exposto, objetivou-se a seleção de genótipos que associem tegumento de coloração amarela aliado à resistência múltipla ao nematoide do cisto da soja, por meio da seleção fenotípica e seleção assistida por marcadores moleculares.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Nematóide do Cisto da Soja

O *Heterodera glycines*, popularmente conhecido como Nematóide do Cisto da Soja (NCS) é um dos patógenos mais destrutivos para a cultura da soja, causando problemas significativos na produção do grão em todo mundo. Estima-se a perda de bilhões de dólares todo o ano devido aos prejuízos causados por esse patógeno (Kim *et al.*, 2016; Lian *et al.*, 2022; Tian *et al.*, 2023).

No Brasil, o NCS foi identificado pela primeira vez na safra de 1991/1992 com rápida disseminação por diversos estados brasileiros. Há relatos em que as perdas atingiram os 100%, devido a altas densidades populacionais do patógeno e ao difícil controle (Dias *et al.*, 2009; Dhingra; Mendonça; Macedo, 2009).

O *H. glycines* é um fitoparasita que tem como uma das principais características a formação de cistos. Esses são formados a partir da calcificação do corpo das fêmeas após a morte, e seu interior é repleto de ovos (até 500). Os cistos atuam como uma forma de proteção dos ovos, podendo resistir por até sete anos nos solos, esperando por condições ideais para infectar novos hospedeiros (Dias *et al.*, 2009).

Os ovos encontrados no interior dos cistos passam por um processo de embriogênese, dando origem ao juvenil de primeiro estágio (J_1). Estes sofrem uma ecdise, que é um processo biológico no qual ocorre a troca da cutícula, passando-se assim para o segundo estágio juvenil (J_2). Quando em condições ideais o J_2 migra para o solo, infectando as raízes das plantas hospedeiras. A infecção ocorre por meio da penetração dos nematoides J_2 nas raízes, na região onde ocorre a penetração existe uma diferenciação do tecido vegetal, o sincício, que passa a fornecer a alimentação do nematóide. O J_2 sofre mais três ecdises antes de se tornar o adulto, macho ou fêmea. Os machos possuem corpo alongado e quando adulto migra das raízes para o solo, fertilizam as fêmeas e morrem. As fêmeas após serem fecundadas assumem um formato arredondado, sendo que esta parte fica no exterior das raízes e uma parte fixada no interior das raízes, por onde se dá sua alimentação (Dias *et al.*, 2009; Juliatti, 2015).

Os juvenis (J_2) são atraídos para as raízes dos hospedeiros por quimiotaxismo, apurado sistema sensorial que detecta exsudatos radiculares nas plantas hospedeiras. Até a formação do sincício o J_2 tem a capacidade de se manter a partir de reservas energéticas, disponíveis por aproximadamente duas semanas (Mitchum, 2016).

O ciclo de vida do NCS é um dos fatores que contribuem para sua rápida disseminação, isso porque em condições ideais o patógeno completa um ciclo de vida em

média com 25 dias. Dessa forma, em uma lavoura de soja com cultivar tardia é possível que ocorram até seis gerações do nematoide (Cunha *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2019). A ocorrência da reprodução sexuada acarreta a ocorrência de uma grande variabilidade genética, termo que fica evidenciado como raça fisiológica (Juliatti, 2015).

Além do ciclo de vida muito rápido o NCS possui uma ampla variabilidade genética, adotando a classificação proposta por Riggs e Schimitt (1988) que se baseia na resposta, de resistência ou suscetibilidade, dos genótipos diferenciadores sugeridos por Golden *et al.*, (1970), é possível identificar 16 raças (Tabela 1).

A resposta de suscetibilidade ou resistência é definida a partir do cálculo de índice de fêmeas (IF). Utilizando a cultivar *Lee* como padrão de suscetibilidade, o IF é a razão entre o número médio de fêmeas na diferenciadora e o número de fêmeas na cultivar *Lee*, multiplicado por 100. Se a diferenciadora apresentar IF superior a 10% é considerada suscetível (+), se o IF for inferior a 10% é considerada resistente (-) (Riggs e Schimitt, 1988).

Tabela 1: Reação das linhagens diferenciadoras às diferentes raças de *Heterodera glycines*.

Raça	<i>Pickett</i>	<i>Peking</i>	<i>PI88788</i>	<i>PI90763</i>	<i>Hartwig</i>	<i>PI437654</i>
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)

Fonte: Adaptado de Dias *et al.*, (1998).

Contudo, a classificação proposta por Riggs e Schimitt (1988) foi adaptada quando encontradas populações similares às raças 4 e 14, com capacidade de infectar o genótipo

diferenciador tido como resistente para todas as raças, a cultivar *Hartwig*. A partir de inoculações nas cultivares diferenciadoras e em genótipos utilizados em programas de melhoramento foi constatada a resistência da *Plant Introduction (PI) 437654*, genitora da cultivar *Hartwig*. Para estas populações 4 e 14 que apresentavam a capacidade de parasitar a cultivar *Hartwig* e não a *PI437654* foram atribuídos o sinal de + possibilitando a diferenciação entre essas raças, como consta na tabela 1 (Dias *et al.*, 1998).

Embora sejam classificadas 16 raças, mais as variações 4+ e 14+, de acordo com Pinheiro *et al.* (2021) no Brasil, as raças 7, 8, 11, 12, 13, 15 e 16 ainda não foram relatadas. Dentre essas, as raças 7, 8 e 15 são encontradas em outros países, entretanto as raças 11, 12, 13 e 16 são apenas hipotéticas isso porque nunca foram detectadas. Além disso são inconsistentes uma vez que para existirem deveriam se reproduzir na cultivar *Peking* e não na *Pickett*. Entretanto, como *Pickett* foi obtida a partir de um cruzamento de *Peking* é algo muito improvável de acontecer (Ferreira *et al.*, 2019; Niblack, 1992).

A classificação proposta por Riggs e Schmitt (1988), embora muito utilizada, foi questionada por Niblack *et al.* (2002). Segundo os autores a terminologia raças não seria adequada, visto que a diferenciação é realizada em hospedeiros de apenas uma espécie, variando somente as linhagens. Estes autores propuseram então uma nova classificação, baseada nos Tipos de *Heterodera glycines (HG Type)*, em que a população é nomeada com base nos números que corresponde a diferenciadora que a população de NCS se reproduziu, e foi capaz de atingir um índice de fêmeas superior a 10%.

Esta nova classificação utiliza como modelo sete linhagens indicadoras em uma ordem fixa, são os genótipos: 1 (*Peking*), 2 (*PI88788*), 3 (*PI90763*), 4 (*PI437654*), 5 (*PI209332*), 6 (*PI89772*) e 7 (*PI548316*). Para cada linhagem indicadora é calculado um IF, quando o valor é maior que 10% esta é denominada como suscetível e quando o valor é inferior a 10% como resistente. Dessa forma, toda vez que a população em estudo “quebrar” a resistência de uma linhagem indicadora, ela receberá o número da mesma. De maneira exemplificada, uma população de *H. glycines* será classificada como *HG Type 0*, quando as sete linhagens indicadoras forem resistentes. O oposto é observado quando todas as linhagens indicadoras se mostrarem suscetíveis, neste caso teremos a população classificada como *HG Type 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7* (Dias *et al.*, 2009). Embora seja muito utilizada nos EUA a terminologia *HG Type* não se adequa tão bem às condições brasileiras, visto que essa classificação não é capaz de discriminar as raças 4+ e 14+.

Os sintomas ocasionados pela incidência do NCS aparecem no formato de reboleiras, com plantas amareladas, pequenas e em casos mais severos mortas, essas características

atribuíram o termo “Nanismo Amarelo da Soja”, para referenciar essa doença. Os sintomas são ocasionados devido ao comprometimento do sistema radicular, que reduz a absorção de água e nutrientes do solo (Dhingra; Mendonça; Macedo, 2009; Ferreira *et al.*, 2019; Matsuo, *et al.*, 2011).

Para o manejo do NCS são utilizadas práticas como, controle químico, controle cultural e controle genético, no qual são empregadas as cultivares resistentes. Embora de forma geral o controle químico seja muito utilizado no controle de nematoides, para *H. glycines* esse controle não é muito eficiente, devido aos mecanismos de resistência, isto é, os cistos, que impedem a ação dos nematicidas (Zhang *et al.*, 2022).

A utilização de cultivares resistentes ao NCS tem sido a prática mais eficiente e econômica no controle dessa doença (Tian *et al.*, 2023). A eficiência na utilização de cultivares resistentes está associada ao fato de o NCS não conseguir se multiplicar, devido aos mecanismos de defesa que inibem o desenvolvimento do J₂ no sistema radicular das plantas (Holbein, Grundler, Siddique; 2016; Matsuo *et al.*, 2011).

A penetração do J₂ no sistema radicular das plantas de soja ocorre da mesma forma, seja o genótipo resistente ou suscetível. Contudo, em casos de genótipos de soja resistentes ao NCS ocorre uma reação de hipersensibilidade, por meio de reprogramação transcricional e metabólica (Holbein, Grundler, Siddique; 2016). Os tecidos que formam o sincício sofrem uma necrose e entram em colapso, impossibilitando que o nematoide se alimente e conclua seu ciclo, e finalizando assim o desenvolvimento em J₂ ou no máximo J₃ (Lian *et al.*, 2022; Mitchum, 2016).

O controle genético da característica de resistência ao NCS em genótipos de soja, ainda não está completamente elucidado, mas se trata de uma característica quantitativa, poligênica (controlada por muitos genes). De acordo com Tian *et al.*, (2023) mais de 200 *Quantitative Trait Loci (QTLs)* podem contribuir para a resistência ao NCS. Os *QTLs* são regiões específicas do genoma que estão associadas a variações das características quantitativas.

Embora muitos *QTLs* sejam relatados no controle genético da característica, dois são considerados principais, um localizado no grupo de ligação A2, *Rhg4*, e outro no grupo G, *Rhg1* (Mahalingam e Skoruspka, 1995; Webb *et al.*, 1995; Weiseman; Matthews). Estes foram comumente mapeados em germoplasmas de soja e utilizados nos diversos programas de melhoramento da cultura (Basnet *et al.*, 2022; Bayless *et al.*, 2019; Mitchum, 2016). Todavia, a utilização incessante de *PI88788* e *Peking* como genitores nos programas de melhoramento ocasionou um estreitamento na base genética das cultivares modernas, resultando na seleção

de populações de nematoides capazes de superar essa resistência (Basnet *et al.*, 2022; Tian *et al.*, 2023).

A grande variabilidade genética e capacidade do patógeno em superar a resistência, incitou a coleta e caracterização genética de novas fontes de resistência (Dias, 2009). Há relatos da utilização de genótipos como *PI437654*, *PI90763*, *Hartwig*, *ZDD2315*, *PI209332*, *Peking* e outras, como possíveis fontes de alelos de resistências para o desenvolvimento das cultivares modernas (Dias, 2009; Lian *et al.*, 2017; Mitchum, 2016).

A utilização de diferentes acessos nos programas de melhoramento de plantas muitas vezes é dificultada devido a estreita ligação entre genes de resistência, com características agronômicas consideradas indesejadas (Lian *et al.*, 2022). Um exemplo é a ligação entre genes de resistência ao NCS com alelos que conferem coloração escura no tegumento dos grãos, o que proporciona dificuldades na obtenção de novas cultivares resistentes recombinantes (Lopes Da Silva *et al.*, 2017; Teixeira, 2016).

O genótipo *PI437654* identificado e caracterizado na China, é uma linhagem resistente a todas as raças descritas do NCS, incluindo as raças 4+ e 14+. Todavia, esta linhagem possui tegumento de coloração escura, o que dificulta sua utilização como genitora nos programas de melhoramento (Anand, 1986; Dias *et al.*, 1998; Rao-Areli; Anand; Wrather, 1992).

Embora de tegumento escuro, a *PI437654*, têm sido amplamente estudada, devido sua resistência total ao NCS. A partir da hibridação entre as linhagens *PI437654* com *Forrest*, foi obtida a cultivar *Hartwig* (Anand, 1991), que possui grãos amarelos e resistência a todas as raças de NCS, exceto 4+ e 14+ (Dias *et al.*, 1998). Uma explicação para isto pode ser a proximidade do *QTL* de resistência à raça 4+ e 14+ com o gene I, confirmando que a cultivar *Hartwig* não herdou todos os genes de resistência da *PI437654* (Anand, 1991; Dias *et al.*, 1998; Dias *et al.*, 1999).

2.2. Controle genético da coloração do tegumento em soja

O tegumento do grão de soja é a camada externa originado a partir dos integumentos do óvulo. A sua estrutura é composta pela epiderme da testa, hipoderme da testa e as células parenquimatosas. Suas principais funções são proporcionar a proteção do embrião contra danos mecânicos, ataque de microrganismos, regulação das trocas gasosas entre o embrião e o ambiente externo, intercâmbio de água e a proteção durante a embebição (Mertz-Henning, 2017, Miller *et al.*, 2010).

A coloração de tegumento em soja é uma característica de certa forma complexa, pois seu controle se perfaz pela ação de cinco genes principais (I, R, T, W1 e O). Os genes I, R e T,

atuam na via de pigmentação diretamente sobre a produção dos flavonoides, já os genes W1 e O atuam na pigmentação apenas sobre os alelos recessivos *i* e *r* ou *i* e *t* (Song *et al.*, 2016). Além dos genes citados anteriormente há relatos de outros que podem influenciar na coloração do tegumento, porém são de menor importância.

O gene *I* apresenta alelismo múltiplo (*I*, *i*^{*i*}, *i*^{*k*} e *i*), os alelos *I*, *i*^{*i*}, *i*^{*k*} dão origem a tegumento de pigmentação amarelo claro, hilo pigmentado e regiões pigmentadas em formato de sela, respectivamente. O alelo recessivo *i* torna o tegumento preto, preto imperfeito, marrom ou camurça, quando apresenta as respectivas combinações (*i*, *R* e *T*), (*i*, *R* e *t*), (*i*, *r* e *T*) e (*i*, *r* e *t*) (Lopes Da Silva *et al.*, 2017; Senda *et al.*, 2017; Tuteja *et al.*, 2009) (Tabela 2).

Tabela 2: Principais genes que atuam no controle da coloração do tegumento e o fenótipo observado nas diferentes combinações genotípicas

Gene	Descrição
<i>I</i>	Alelismo múltiplo ($I > i^i > i^k > i$): atuam diretamente na inibição da pigmentação de antocianinas e proantocianidinas, alelo <i>I</i> , tegumento de coloração amarelo claro, alelo <i>i</i> ^{<i>i</i>} , hilo pigmentado, alelo <i>i</i> ^{<i>k</i>} , hilo e parte do tegumento pigmentado, assumindo formato de sela, alelo recessivo <i>i</i> , resulta em tegumento de coloração escura.
<i>R</i>	Pigmentação preta (<i>R</i> _) > pigmentação marrom com estrias pretas (<i>rm</i> _) > pigmentação marrom (<i>rr</i>).
<i>T</i>	Modifica os efeitos da série alélica <i>R</i> : (<i>R</i> _ <i>T</i> _) sementes pretas, (<i>rrT</i> _) sementes marrons e (<i>rrtt</i>) marrom claro
<i>W1</i>	Modifica os efeitos da série alélica <i>R</i> : na presença de <i>ttww</i> , os genótipos (<i>R</i> _) apresentam cor marrom-claro, e na presença de <i>ttW</i> _ , os genótipos <i>R</i> _ apresentam cor preto imperfeito.
<i>O</i>	Quando em duplo recessivo (<i>rrT</i> _oo) modifica o tegumento de coloração marrom em marrom-avermelhado e (<i>rm</i> _ <i>T</i> _oo) tegumento marrom-avermelhado com estrias pretas.

Fonte: Adaptado de Lopes Da Silva *et al.*, 2017.

Mapeamentos realizados no gene *I*, revelam que essa região é responsável por codificar a enzima *Chalcona sintases* (*CHS*), enzima que atua na via dos fenilpropanóides que leva a uma grande variedade de compostos do metabolismo secundário, incluindo as antocianinas que estão presentes em vários tecidos e conferem a coloração preta ao tegumento da semente de soja (Hernandez-Garcia, 2019; Todd e Vodkin, 1996; Tuteja *et al.*, 2009).

Cultivares com tegumento amarelo claro (alelo *I*) produzem RNA de interferência (siRNAs) de *CHS* no tegumento, enquanto sementes de tegumento pigmentado (alelo *i*) não produzem (Hernandez-Garcia, 2019; Tuteja *et al.*, 2009). Estes siRNAs transcritos são processados por um complexo composto por uma enzima, chamada de DICER, um RNA maduro *CHS7-8* (*AGO5*) e uma RNA polimerase (*RdRP*). Este complexo uma vez formado

origina o *RNA-induced silencing complex (RISC)*, que irá produzir *siRNAs* secundários que são capazes de amplificar o sinal dos *siRNAs* e silenciar os mRNA de todos os nove genes da família CHS, impedindo assim a pigmentação do tegumento (Kurauchi *et al.*, 2011; Senda *et al.*, 2017; Tuteja *et al.*, 2009).

Com base no mapa genético integrado junto ao *SoyBase*, no grupo de ligação A2 estão presentes o *QTL Rhg4* e o gene I. A proximidade entre esses genes dificulta a seleção de genótipos recombinantes a partir da *PI437654*, que combine tegumento de coloração amarela e resistência múltipla ao NCS (Matson e Williams 1965; Lopes Da Silva *et al.*, 2017, SOYBASE, 2024)

2.3. Alternativas para incrementar a durabilidade da resistência ao NCS

A resistência de plantas a patógenos pode ser monogênica ou poligênica. Quando controlada por apenas um gene é denominada de resistência vertical ou qualitativa, nesse tipo de resistência não é possível quantificar graus intermediários, ocorre apenas reação de resistência ou suscetibilidade. Entretanto, quando controlada por muitos genes é possível quantificar níveis intermediários de reação, neste caso a resistência é denominada resistência horizontal, quantitativa ou parcial (Santos, 2022).

Por ser a resistência ao NCS uma característica quantitativa é necessária empregar métodos que possibilitem o desenvolvimento de linhagens que agrupem o maior número de alelos favoráveis (Lian *et al.*, 2022; Tian *et al.*, 2023). Além disso, a quebra de resistência observada por algumas raças do patógeno sugerem a necessidade de uma resistência mais duradoura, como a resistência horizontal.

O desenvolvimento de linhagens que apresentem a resistência do tipo horizontal, pode ser realizada por meio da piramidação de alelos (Mikel *et al.*, 2010; Thurow; Castro; Pereira, 2018). A piramidação é uma técnica que consiste na associação de diversos alelos de resistência em uma única linhagem. Essa estratégia figura-se promissora no desenvolvimento de cultivares resistentes a patógenos cujo controle genético é quantitativo (Mundt, 2014).

A técnica de piramidação tem sido relatada por diversos autores como uma das estratégias mais eficazes para a durabilidade da resistência (Meira *et al.*, 2022; Mundt, 2014; Parhe *et al.*, 2017; Santos, 2022; Tian *et al.*, 2023; Yamanaka e Hossain, 2019). Os genes utilizados na piramidação podem ser de efeito maiores ou menores, genes específicos ou não específicos (Borém e Miranda, 2013).

Em cultivares elite a piramidação de alelos muitas vezes se dá pela utilização de fontes exóticas, não adaptadas (Alzate-Marin *et al.*, 2005). Neste âmbito, técnicas de melhoramento

como retrocruzamentos, cruzamentos biparentais, seleção recorrente e a utilização da seleção assistida por marcadores moleculares, são relatadas em trabalhos visando a piramidação (Alzate-Marin *et al.*, 2005; Santos 2022).

Santos (2022), com o objetivo de avaliar e caracterizar o efeito da piramidação de alelos, na reação de resistência ou suscetibilidade em genótipos e populações segregantes de soja, obtidas a partir de hibridações, concluiu que esta é uma promissora ferramenta para o incremento da resistência contra *Phytophthora sojae*, agente causal da podridão radicular de fitóftora.

Viganó *et al.*, (2018), objetivando demonstrar as etapas envolvidas na piramidação de alelos relacionadas à ferrugem asiática da soja, a partir de técnicas de seleção assistida por marcadores de microssatélites, obteve genótipos com até quatro alelos relacionados a resistência. Como conclusões os autores destacam que as plantas obtidas com o processo de piramidação denotam potencial para serem utilizadas nos programas de melhoramento genético.

Na cultura do feijoeiro a utilização da piramidação de alelos como estratégia para incremento da resistência tem sido relatada por diversos autores (Alzate-Marin *et al.*, 2005; Sanglard, 2006; Sanglard, 2009). A técnica de seleção recorrente tem se destacado entre as metodologias de piramidação e demonstrado grande potencial na obtenção de genótipos com resistência duradoura (Amaro; Abreu; Ramalho, 2007; Arantes; Abreu; Ramalho, 2010; Rezende *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2015).

A técnica de seleção recorrente objetivando o acúmulo de alelos favoráveis, para a resistência a *Sclerotinia sclerotiorum* também tem sido relatada na literatura. Lima (2022), avaliando progênies de feijão obtidas da técnica de seleção recorrente, constatou que a técnica visando genótipos mais tolerantes ao mofo branco é uma alternativa eficiente dentro dos programas de melhoramento.

Na cultura da soja a utilização da piramidação de alelos objetivando a resistência ao NCS, foi proposta como alternativa para uma resistência mais duradoura, devido seu caráter quantitativo (Alzate-Marin, *et al.*, 2005). Os autores destacam que devido a quantidade de genes associados a resistência, a seleção assistida por marcadores moleculares, torna-se a melhor forma para aumentar a eficiência de seleção.

De acordo com Thurow, Castro e Pereira (2018), a piramidação de alelos de resistência através do melhoramento convencional é possível, porém extremamente difícil. A maior dificuldade está em distinguir de forma precisa o efeito de cada alelo introduzido, a partir da

fenotipagem convencional. Sendo, portanto, o uso da genotipagem uma importante ferramenta na obtenção de genótipos com o maior número de alelos favoráveis, sobretudo para o NCS.

2.4. Marcadores moleculares no melhoramento de plantas

A utilização de marcadores no melhoramento genético de plantas tem contribuído de forma significativa para com o desenvolvimento de novas cultivares (Borém; Miranda; Fritsche-Neto, 2021). Desde o surgimento até agora, a técnica de marcadores moleculares tem passado por grandes evoluções. A técnica de *Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP* foi a primeira desenvolvida para a finalidade de marcador molecular (Botstein *et al.*, 1980). Ao longo dos anos outros métodos foram surgindo, devido ao desenvolvimento da técnica de *Polymerase Chain Reaction - PCR*. Técnicas de marcadores moleculares que amplificam fragmentos polimórficos como o *Random Amplified Polymorphism - RAPD*, técnica que amplifica de forma seletiva grupos de fragmentos genômicos o *Amplified Fragment Length Polymorphism - AFLP*, e os microssatélites, *Single Sequence Repeats - SSRs*.

Os microssatélites são caracterizados pela amplificação de fragmentos de DNA contendo sequências repetidas em tandem de um a sete pares de bases, encontrados frequentemente no genoma vegetal. Além disso, os microssatélites destacam-se entre os demais marcadores por serem altamente informativos, multi-alélicos, codominantes, altamente repetíveis e transferíveis entre espécies (Gwinner *et al.*, 2017).

Atualmente, sistemas de marcadores de alta densidade baseados em chips de *Single Nucleotide Polimorphism - SNPs* e plataformas de sequenciamento de alto rendimento são amplamente utilizados para analisar a diversidade, visto que os *SNPs* estão distribuídos em todo genoma (Yu *et al.*, 2021; Zimmerman; Albridge; Oyler-McCance, 2020).

Os *SNPs* são marcadores sequenciados, baseados no polimorfismo de nucleotídeo único, que possuem diferença em uma única posição no genoma, e em um único nucleotídeo, seja por deleção, inserção ou substituição de bases. A primeira tecnologia de sequenciamento, a de Sanger, surgiu em 1977 (Mardis, 2017).

Hoje, com o sequenciamento de nova geração, a genômica passou por uma revolução, permitindo a produção de sequências em larga escala. Na cultura da soja, um re-sequenciamento de 31 genótipos identificou um conjunto de 205614 *SNPs*, resultando em um recurso genético de grande importância (Lam *et al.*, 2010).

Objetivando reduzir os custos com os marcadores moleculares, foram desenvolvidos métodos que envolvem o sequenciamento de apenas uma pequena fração do genoma. São três

as principais abordagens descritas na literatura: Bibliotecas de Representação Reduzida - RRL, sequenciamento de DNA associado a locais de restrição - RAD e Genotipagem por Sequenciamento - GBS (Boyle *et al.*, 2012).

A metodologia GBS surgiu como uma abordagem de sequenciamento de representação reduzida para amostras multiplexadas. O baixo custo e a versatilidade dessa técnica a tornam uma versátil ferramenta para o estudo da genética e o melhoramento de plantas (Poland e Rife, 2012).

O GBS identifica principalmente *SNPs*, os marcadores mais abundantes em todo genoma. Os *SNPs* têm sido utilizados para diversos fins, como na construção de mapas haplótipos, no estudo da diversidade, na descoberta de marcadores moleculares, em análises de ligação genômica, seleção genômica e em estudos de associação do genoma ampla - GWAS (He *et al.*, 2014).

Na cultura da soja, foi encontrando em média um *SNP* a cada 2000 pares de bases nas regiões codificantes, já nas regiões não-codificantes foi encontrado em média um *SNP* para cada 191 pares de bases (Weber *et al.*, 2012). Esses valores denotam a importância de estudos voltados para o sequenciamento genético, identificação de *SNPs* associados a genes de interesse e estudos de associação genômica.

Com os GWAS é possível identificar associações entre genótipos e fenótipos, testando diferenças nas frequências alélicas de variantes genéticas entre indivíduos com diferentes fenótipos (Cantor; Lange; Sinsheimer, 2010; Korte e Farlow, 2013; Uffelmann *et al.*, 2021). A identificação de marcadores moleculares associados a *QTLs* a partir de análises de GWAS possibilita a criação de mapas genótipo-fenótipo para as características de interesse.

A compreensão das associações entre genótipos e fenótipos possibilita a utilização da seleção assistida por marcadores - SAM. Este, tem como premissa a seleção de genótipos com as características desejáveis de forma indireta, utilizando apenas os dados obtidos com os marcadores moleculares (Cavalcanti, 2012).

A SAM tem grande potencial no melhoramento de plantas, principalmente para características quantitativas, como é o caso da resistência ao NCS. A eficiência da seleção assistida com base na informação dos marcadores moleculares está muito associada à proximidade entre a marca e o alelo de interesse (Santana, 2008).

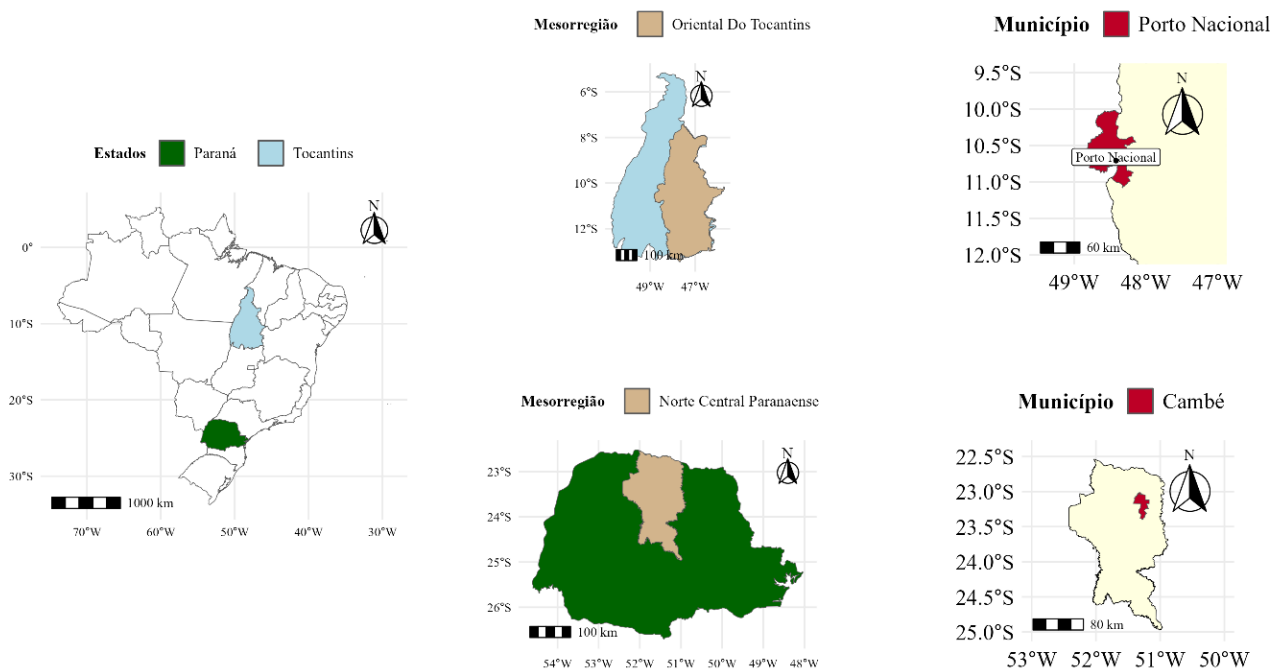
3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local

Os experimentos foram conduzidos em parceria com a empresa Grupo Dom Mario – GDM, sede localizada em Campinas - SP, Brasil. A obtenção e condução da população segregante foi realizada na estação experimental da GDM localizada no município de Porto Nacional - Tocantins (Figura 1). O município possui uma altitude média de 280 metros, com temperatura e precipitação média de, 27,4 °C e 1.664 mm, respectivamente. De acordo, com a classificação de Köppen o clima da região é classificado como Aw clima tropical, com inverno seco e verão chuvoso (Roldão e Ferreira, 2019).

A experimentação para realização de fenotipagem e genotipagem foi realizada na estação experimental da GDM localizada no município de Cambé - Paraná (Figura 1). O município possui uma altitude de 670 metros, com temperatura e precipitação média de, 20 °C e 1.300 mm, respectivamente. O clima é classificado como subtropical úmido, com verões quentes e chuvosos e invernos gélidos (Nitsche *et al.*, 2019).

Figura 1: Localização das estações experimentais Porto Nacional - TO e Cambé - PR.



Fonte: Do autor (2025).

3.2. Obtenção da população segregante

Para a obtenção da população segregante foi realizado cruzamento biparental entre os genitores TMG4182 e PI437654. A TMG4182 é uma cultivar comercial convencional cuja principais características são ampla resistência ao nematoide do cisto (raças 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10 e 14), tegumento de coloração amarela, hilo marrom claro, maturação relativa de 8.2 e alta produtividade.

A PI437654 é uma *plant introduction*, coletada na China em 1979. Possui como principal característica a resistência a todas as raças do nematoide do cisto, ciclo precoce, porte baixo, baixa produtividade e tegumento de coloração escura.

Para obtenção das sementes F₁ foi realizado o cruzamento artificial entre os genitores em casa de vegetação em setembro de 2022. As sementes da geração F₁ foram semeadas em janeiro de 2023 em vasos e em abril de 2023 foram obtidas as sementes F₂.

As sementes da geração F₂ foram separadas a partir da coloração do tegumento, em dois grupos, sementes amarelas e sementes escuras. Essas foram multiplicadas no inverno de 2023, originando as sementes da geração F₃, que foram colhidas em agosto de 2023. Ao todo foram obtidas 28280 sementes, 3990 sementes de tegumento amarelo e 24290 sementes provenientes do grupo de tegumento escuro, apresentando segregação.

Em abril de 2024, realizou-se análise de *FingerPrint* para comprovação da hibridação, e foram semeadas as sementes F₃. Em julho de 2024 as plantas de soja foram colhidas e trilhadas. Foi obtido um bulk das sementes F₄ (apenas tegumento amarelo), originando assim a população que foi utilizada para fenotipagem e genotipagem.

3.3. Genótipos e raças avaliados

Foram avaliados nove tratamentos comuns, isto é, os dois genitores, e sete linhagens diferenciadoras, padrões de resistência e suscetibilidade ao nematoide do cisto, além das plantas F₄ (tratamentos regulares). A discriminação de todos os tratamentos está apresentada na Tabela 3. As plantas F₄ foram avaliadas para quatro raças do nematoide do cisto. Foram avaliadas as raças 2, 4, 4+ e 14+, cada qual em um experimento individual.

Tabela 3: Descrição dos tratamentos avaliados nos experimentos para fenotipagem e genotipagem.

Tratamentos			
Genótipo	Padrão	Nº Repetições	Nº Tratamentos
<i>PI437654</i>	Genitor	6	1
TMG4182	Genitor	6	1
<i>Peking</i>	Linha diferenciadora	6	1
<i>PI88788</i>	Linha diferenciadora	6	1
<i>Pickett</i>	Linha diferenciadora	6	1
<i>PI90763</i>	Linha diferenciadora	6	1
<i>Hartwig</i>	Linha diferenciadora	6	1
<i>Lee</i>	Linha diferenciadora	6	1
Valiosa	Linha diferenciadora	6	1
População	X	1	680

Fonte: Do autor (2025).

3.4. Condução do experimento em casa de vegetação e parâmetros avaliados

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, sob condições climáticas controladas, no delineamento em blocos aumentados (Federer e Raghavarao, 1975), em que as testemunhas comuns continham seis repetições enquanto os tratamentos regulares apenas uma. Cada repetição foi representada por uma única planta, constituindo desta forma uma parcela experimental.

Para os tratamentos regulares foi semeada apenas uma semente por tubete, já para os tratamentos comuns foram semeadas três sementes. Após a germinação foi realizado um desbaste, deixando apenas uma planta por tubete. Adotou-se tubete com volume aproximado de 290 cm³. O solo utilizado foi previamente preparado, na proporção de 25% de terra e 75% de areia. Em seguida, foi esterilizado em autoclave com temperatura de 120°C por duas horas. Após o processo de autoclavagem o solo permaneceu em repouso e, após análise química, foi corrigido de acordo com as necessidades.

Sete dias após a semeadura foi realizada a inoculação, utilizando inóculo puro obtido da coleção de nematoides da GDM, com confirmação da raça utilizada por meio 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 3,0 centímetros (cm), e diâmetro de 1,0 cm. Dentro deste furo foi aplicado com auxílio de uma pipeta, uma suspensão contendo cerca de 4.000 ovos + J₂ de *H. glycines*, de acordo com a raça avaliada no experimento. Em seguida o orifício foi fechado com solo.

Transcorrido o período de 30 dias após a inoculação, foi realizada a avaliação, descartando a parte aérea das plantas. As raízes foram separadas do solo, de forma manual, acondicionadas individualmente em sacos plásticos e levadas ao laboratório para extração das fêmeas. Este processo consiste na tripla lavagem das raízes em água corrente com esfregação manual, sobre um béquer de dois litros. Na sequência, todo conteúdo é vertido em um conjunto de duas peneiras acopladas com granulometrias de 25 e 60 mesh. Neste processo, as fêmeas ficam retidas na peneira mais fina (60 mesh). Estas são recolhidas em copos de 100 mL e, posteriormente, quantificadas em lupas, com até 40 x de aumento.

Além dos experimentos realizados para as quatro raças do nematoide do cisto, foram instalados experimentos com as linhagens diferenciadoras para comprovar se a raça inoculada era realmente a de interesse.

A classificação dos genótipos antes da modelagem estatística foi realizada pelo critério de índice de fêmeas (IF), de acordo com o estabelecido por Schmitt e Shannon (1992), que é estimado de acordo com a expressão:

$$\text{IF}\% = \frac{\text{Número de fêmeas no tratamento}}{\text{Número de fêmeas na } Lee} \times 100$$

Considerando o índice de fêmeas os tratamentos foram classificados em:

- Resistentes (IF) = menor ou igual 10%,
- Moderadamente Resistente (IF) = de 10,1% a 30% e
- Suscetível (IF) = acima de 30%.

3.5. Coleta de amostras, extração de DNA e genotipagem

Discos foliares de cada planta F₄ 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*.

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, agitados, 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, foi utilizada uma placa filtro em que 100 µL do lisado, obtido na etapa anterior, foram transferidos para cada poço individual desta nova placa, onde foram incubados em temperatura ambiente por dois minutos, seguido por duas etapas de lavagem com buffers específicos, e uma terceira lavagem com etanol, sendo então realizada uma centrifugação a 3000 rpm por dois minutos em cada uma dessas etapas.

Por fim, realizou-se uma etapa de secagem e eluição, em que a placa filtro foi incubada por dez minutos a 55°C, em seguida adicionou o *buffer* E1, com uma nova incubação por cinco minutos a 55°C, e centrifugação a 3.000 rpm por dois minutos.

As amostras foram então submetidas a uma análise de genotipagem. Foram testados três marcadores moleculares do tipo *SNP* (*Single Nucleotide Polimorphism*). Os marcadores testados foram para os *QTLs* *Rhg1-a* (*Peking*), *Rhg1-b* (*PI88788*) e *Rhg4*.

3.6. Análises estatísticas dos dados fenotípicos

Após estimar as reações de R (Resistência), MR (Moderada Resistência) e S (Suscetibilidade) para todos os tratamentos os dados de frequência para a característica número de fêmeas foram plotados em histogramas, para uma melhor visualização da variação fenotípica. Nos histogramas estão plotados apenas a distribuição dos tratamentos regulares. Os valores associados a limite inferior, limite superior e média para a característica número de fêmeas, bem como a quantidade final de tratamentos avaliados em cada um dos experimentos estão apresentados nos histogramas. Além disso, foi realizada uma análise de correspondência para a reação em função das raças (Infantosi; Costa; Almeida, 2014).

Os testes realizados para avaliar a normalidade dos dados indicaram que estes não seguiam uma distribuição normal. Portanto, visando a necessidade de homogeneizar a dispersão dos dados e minimizar a amplitude de variação em relação à média, os dados originais foram transformados, sendo a função logarítmica mais um, o método utilizado.

Com os dados normalizados foi realizada uma análise de variância a 5% de significância, para cada um dos experimentos. Foi utilizado o pacote *augmentedRCBD* e *lme4* desenvolvidos por Aravind *et al.*, (2023) e Bates *et al.*, (2015), respectivamente. Adotando o modelo estatístico descrito a seguir.

$$y_{ij} = \mu + G_i + B_j + e_{ij} \quad (1)$$

em que:

y_{ij} : variável resposta para o tratamento i repetido j vezes;

μ : constante associada a todas as observações;

G_i : efeito do genótipo i , assumido como aleatório;

B_j : efeito do bloco j , assumido como fixo;

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

Além da análise individual para cada experimento foi realizada uma análise de variância conjunta a 5% de significância. O objetivo da análise conjunta foi identificar a existência de variabilidade para a característica número de fêmeas entre os diferentes experimentos. Para esta análise foi desenvolvido um *Linear Mixed Model - LMM*, utilizando o pacote *lme4* (Bates *et al.*, 2015). O modelo utilizado está descrito a seguir.

$$y_{il} = \mu + G_i + A_l + GA_{il} + e_{il} \quad (2)$$

em que:

y_{il} : variável resposta para o tratamento i no experimento l ;

μ : constante associada a todas as observações;

G_i : efeito do tratamento i , assumido como aleatório;

A_l : efeito do experimento l , assumido como fixo;

GA_{il} : interação entre o tratamento i e o experimento l , assumido como aleatório;

e_{il} : efeito do erro associado a observação do tratamento i no experimento l , assumido como aleatório.

O coeficiente de variação experimental (CVe) foi obtido para todos os experimentos (Pimentel Gomes, 2009), de acordo com o estimador a seguir.

$$CVe (\%) = \frac{\sqrt{QME}}{X} \times 100 \quad (3)$$

em que:

CVe : coeficiente de variação experimental;

QME : é o quadrado médio do resíduo;

X : é a média amostral transformada.

A variância fenotípica (σ_f^2), genotípica (σ_g^2) e ambiental (σ_e^2) foram obtidas a partir da tabela de análise de variâncias (ANOVA), de acordo com os valores dos quadrados médios descrito por Federer (1976), utilizando o seguinte modelo.

$$\sigma_f^2 = \sigma_g^2 + \sigma_e^2 \quad (4)$$

Após obtenção das variâncias fenotípica (σ_f^2), genotípica (σ_g^2) e ambiental (σ_e^2) foram estimadas as herdabilidades no sentido amplo (h^2) para todos os experimentos. Esta estimativa foi obtida a partir do método proposto por Ramalho *et al.* (2024), utilizando o seguinte modelo.

$$h^2 = \frac{\sigma_g^2}{\sigma_f^2} \times 100 \quad (5)$$

em que:

h^2 : herdabilidade no sentido amplo;

σ_g^2 : variância genotípica;

σ_f^2 : variância fenotípica;

Visando compreender a variação da herdabilidade, estimou-se, o intervalo de confiança associado a esta estimativa, com nível de significância a 5%. O modelo para estimação, sugerido por Knapp *et al.*, (1985), é apresentado a seguir.

$$IC_{[h^2, (1-\alpha)]} = \left\{ 1 - \left[\left(\frac{QMT}{QME} \right) F_{(1-\frac{\alpha}{2}; GLE; GLT)} \right]^{-1} ; 1 - \left[\left(\frac{QMT}{QME} \right) F_{(\frac{\alpha}{2}; GLE; GLT)} \right]^{-1} \right\} \quad (6)$$

em que:

IC : intervalo de confiança da herdabilidade;

QMT : quadrado médio tratamentos regulares;

QME : quadrado médio erro;

GLT : grau de liberdade do tratamento;

GLE : grau de liberdade do erro.

Para compreensão da eficiência de melhoramento, foi estimado o ganho genético esperado, obtido com a seleção de 15% dos melhores tratamentos. O ganho esperado com a seleção foi obtido por meio da metodologia apresentada por Ramalho *et al.*, (2024), com o estimador apresentado a seguir.

$$GS = h^2 x ds \quad (7)$$

em que:

GS : ganho com a seleção;

h^2 : herdabilidade no sentido amplo;

ds : diferencial de seleção.

$$ds = ms - mo \quad (8)$$

em que:

ms : média dos selecionados (15% melhores);

mo : média original.

Além do coeficiente de variação experimental, foi estimada a acurácia seletiva r_{gg} parâmetro associado a precisão experimental. Este parâmetro foi calculado utilizando a metodologia proposta por Resende e Duarte (2007), o modelo é apresentado a seguir.

$$r_{gg} = \sqrt{h^2} \quad (9)$$

em que:

r_{gg} : acurácia seletiva;

h^2 : herdabilidade no sentido amplo.

Todas as análises estatísticas foram desenvolvidas utilizando o ambiente R (R Core Team, 2020), versão 4.1.3.

3.7. Análise dos dados genotípicos

Os resultados obtidos pela genotipagem foram plotados em um diagrama de Sankey (Kennedy e Sankey, 1898). Nesta metodologia foram utilizados os resultados para as três marcas moleculares e a informação de reação obtida a partir do cálculo do índice de fêmeas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A precisão experimental está associada a confiabilidade e a qualidade de um experimento. Neste contexto, o uso de estimativas como o coeficiente de variação experimental é amplamente utilizado para categorizar um determinado experimento, quanto a precisão experimental. Neste estudo, para a característica número de fêmeas os valores de CVe foram de 17,42%, 19,71%, 7,92 e 7,26%, para os experimentos raça 2, 4, 4+ e 14+, respectivamente (Tabela 1A). De acordo com Pimentel Gomes (2009), os experimentos raça 2 e 4 são considerados de boa precisão (CVe entre 10% e 20%) e os experimentos raça 4+ e 14+ são considerados de alta precisão (CVe < 10%).

Matsuo (2012), ao avaliar a estabilidade de raças de nematoide do cisto mantidas em casas de vegetação, encontrou coeficientes de variação experimental (CVe) semelhantes aos observados no presente estudo. No estudo conduzido pelo autor, que analisou o número de fêmeas em genótipos de soja, foi relatado um CVe de 19,74%, valor considerado satisfatório. Os coeficientes de variação experimental obtidos em nosso estudo reforçam a importância de um controle local rigoroso, alinhado aos princípios fundamentais da experimentação.

Embora o CVe seja muito utilizado em experimentos, quando o objetivo é avaliação de genótipos para fins de seleção a melhor estratégia é a adoção de estimativas que considere também a variação de natureza genética. Neste contexto, a acurácia seletiva figura-se como um parâmetro mais adequado (Resende e Duarte, 2007). Neste estudo, os valores de acurácia seletiva foram superiores a 0,9 em todos os experimentos conduzidos (Tabela 1A).

De forma geral, de acordo com Resende e Duarte (2007), experimentos com valores de acurácia seletiva superiores a 0,9 são considerados de alta precisão, denotando uma ótima qualidade experimental para o presente estudo.

Embora tenham sido instalados 680 tratamentos regulares (plantas F₄) para cada experimento, por motivos de germinação houve uma redução nesta quantidade. Assim, as avaliações de genotipagem e fenotipagem foram realizadas em 568, 629, 585 e 636 plantas nos experimentos raça 2, 4, 4+ e 14+, respectivamente. Para os tratamentos comuns, foram avaliadas todas as nove testemunhas nos quatro experimentos (Figura 2). Os testes de raça realizados para testar a autenticidade das raças, comprovou que a inoculação foi realizada de forma assertiva para cada um dos experimentos.

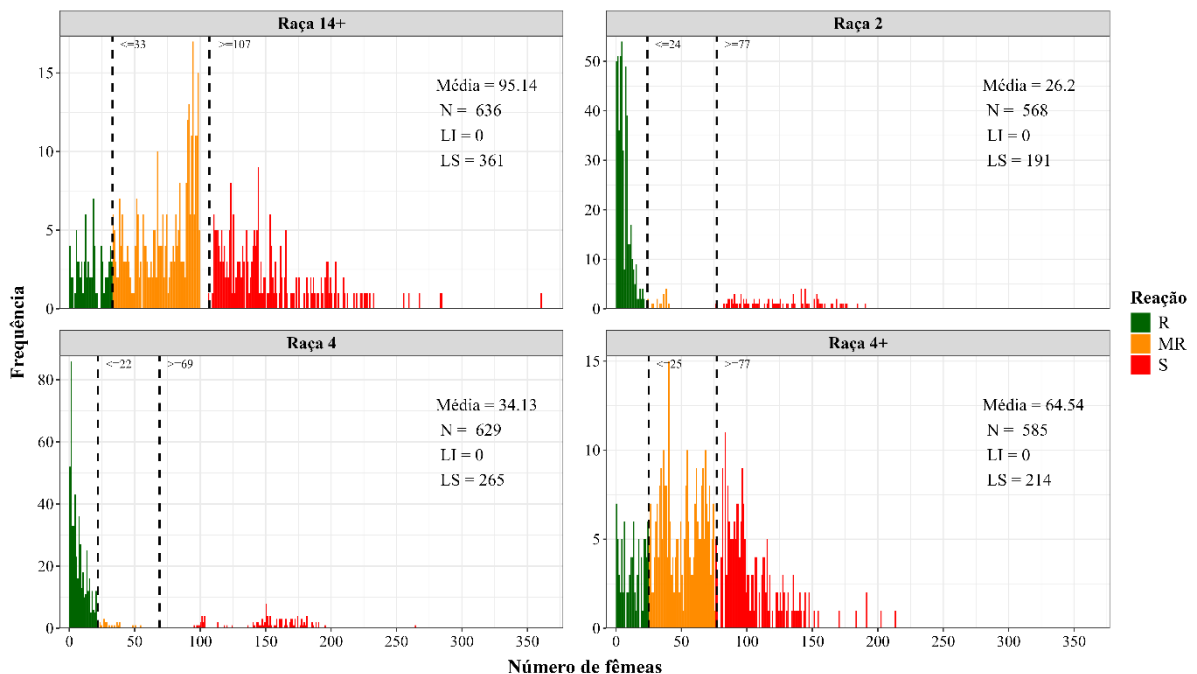
Silva *et al.* (2014), em um estudo conduzido para avaliar o efeito da amostragem em populações de plantas autógamas, chegaram a importantes conclusões. Os autores destacaram que o tamanho da amostragem em estudos de melhoramento genético depende diretamente de

fatores como o controle genético da característica, expresso pelo número de genes envolvidos, e sua herdabilidade. Embora suas conclusões indiquem uma amostragem ideal de 2.000 plantas, os resultados demonstram que, a partir de 500 plantas, o número de alelos favoráveis presentes na amostra já é representativo da população. Nesse contexto, o número de plantas avaliadas em cada experimento do presente estudo pode ser considerado satisfatório.

Na figura 2 é possível visualizar a distribuição de frequência do número de fêmeas para todas as raças, para os tratamentos regulares. Nota-se que nos experimentos um e dois a maior parte dos tratamentos avaliados resultaram em múltiplos valores iguais ou próximos de zero. Nos experimentos raça 4+ e raça 14+, observou-se uma maior frequência de tratamentos com valores diferentes de zero, ou seja, a maior parte dos tratamentos resultou em um aumento no número de fêmeas.

No experimento raça 2, 81,3% dos tratamentos foram classificados como resistentes, 2,8% moderadamente resistente e 15,84% como suscetíveis. Para o experimento raça 4 os tratamentos foram classificados da seguinte forma 78,8% resistentes, 3,34% moderadamente resistentes e 17,83% suscetíveis (Figura 2).

Figura 2: Histogramas de frequência para a característica número de fêmeas observada nos tratamentos regulares, para todos os experimentos.



N: Número de tratamentos regulares fenotipados ao final do ciclo; LI: Limite inferior para a característica número de fêmeas e LS: Limite superior para a característica número de fêmeas.

Fonte: Do autor (2025).

Embora a frequência de tratamentos suscetíveis tenha sido menor nos experimentos raça 2 e 4, este resultado não era esperado. Isso porque estas raças não apresentam a

capacidade de parasitar nenhum dos genitores. Desta forma, esperava-se que os tratamentos se comportassem exclusivamente resistentes quando testados para essas raças.

A presença de tratamentos suscetíveis às raças 2 e 4 pode ser explicada por alguns fenômenos como, por exemplo a segregação transgressiva para suscetibilidade. A segregação transgressiva se refere ao fenômeno em que na descendência é possível observar fenótipos extremos aos observados em qualquer um dos genitores (Koide *et al.*, 2019; Mackay *et al.*, 2021; Rieseberg, Archer e Wayne, 1999). Para que esse fenômeno ocorra, é preciso que a resistência nos genitores seja ocasionada por combinações de alelos diferentes (Dias *et al.*, 2005). Desta forma, durante o processo de recombinação alélica, alguns descendentes vão carregar combinações que resultem em suscetibilidade (Mackay *et al.*, 2021).

A segregação transgressiva pode ser encontrada em diversas características, como produtividade, resistência a fatores abióticos e resistência a pragas e doenças (Silva, 2021; Wesp *et al.*, 2008). As características quantitativas são as mais afetadas, isso porque, quanto maior o número de genes envolvidos para expressão de um fenótipo, mais difícil será a obtenção de indivíduos que contenham a combinação necessária para expressar o fenótipo de interesse (Ramalho *et al.*, 2024).

A ocorrência de segregação transgressiva para a suscetibilidade tem sido relatada em diversos estudos associados ao nematoide do cisto em soja (Moura *et al.*, 2008; Teixeira, 2016; Cervigni *et al.*, 2007, Dias *et al.*, 2005). Moura *et al.*, (2008), avaliando a reação de linhagens de soja (geração F₆) ao NCS (raça 1) identificaram genótipos com segregação transgressiva para a característica número de fêmeas. Estes resultados corroboram com o do presente estudo, indicando que este fenômeno pode ser frequente para esta característica.

Teixeira (2016), visando compreender o comportamento de populações de soja destinadas a alimentação humana inoculadas com NCS (raça 3), avaliou seis gerações de interesse. A autora relata em seu estudo a presença de indivíduos com segregação transgressiva para a suscetibilidade na geração F₂. Além disso, a autora relata que este fenômeno, quando associado a suscetibilidade, pode dificultar os trabalhos dos melhoristas.

Embora tenham sido encontrados tratamentos com segregação transgressiva para a característica número de fêmeas nestes experimentos raça 2 e 4, a grande maioria figura-se como resistente, indicando que a população de soja estudada apresenta alto potencial para seleção de genótipos resistentes para tais raças.

Para o experimento raça 4+, 14,8% dos tratamentos foram considerados como resistentes, 49,4% moderadamente resistentes e 35,7% suscetíveis. E para o experimento raça

14+ os tratamentos foram classificados em 13,1% como resistentes, 50,5% como moderadamente resistentes e 36,4% como suscetíveis (Figura 2).

Diferente dos experimentos raça 2 e 4 nos experimentos raça 4+ e 14+ o resultado obtido era algo esperado. A menor frequência de tratamentos resistentes nestes experimentos era um resultado esperado. Isso porque, o cruzamento foi realizado entre um genitor resistente e outro suscetível para a característica. Além disso, foram selecionadas ao longo das gerações de autofecundação apenas as sementes de tegumento amarelo, o que pode ter resultado em uma seleção indireta para a característica de resistência.

A seleção indireta ocorre quando ao selecionar genótipos para uma característica, de forma indireta, seleciona-se para outra, indesejada ou não. Para que esse fenômeno ocorra é necessário que estas características estejam correlacionadas, evento este que ocorre entre as características coloração de tegumento e resistência ao NCS (Lopes Da Silva et al., 2017; Teixeira, 2016).

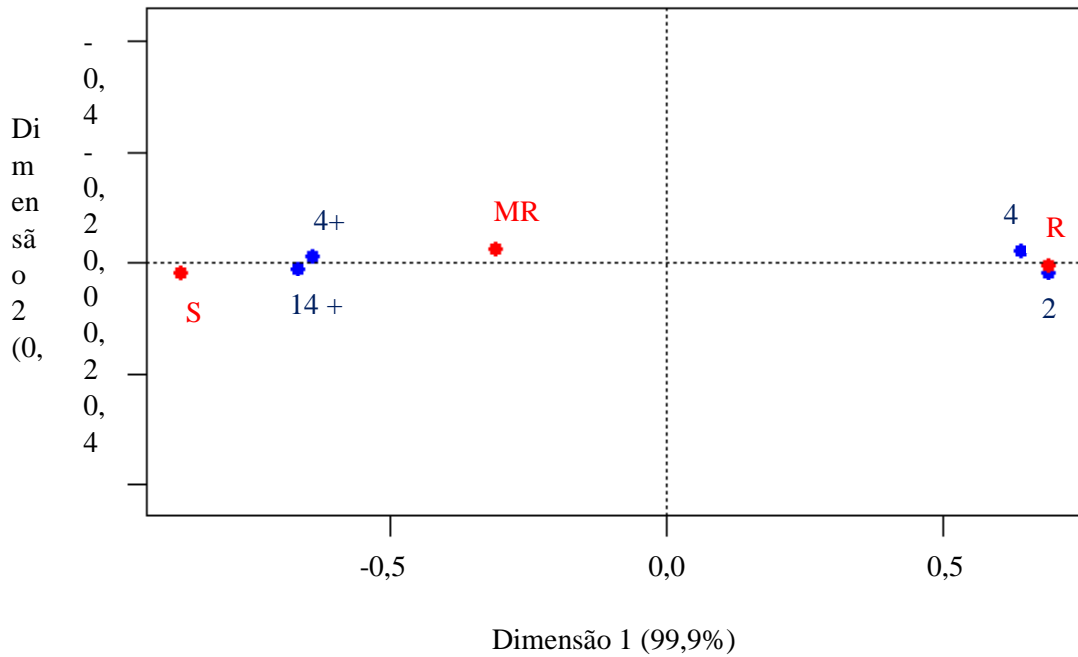
De acordo com Dias (2009), a obtenção de linhagens elites de soja resistentes às raças 4+ e 14+ do NCS, é dificultada devido à proximidade entre genes de resistência e genes que conferem tegumento de coloração escura. Quando dois genes estão próximos, a uma distância menor de 50 cM, pode-se inferir que esses genes são ligados. Neste caso, a segregação alélica ocorre em menor frequência, dificultando assim, a obtenção de genótipos recombinantes (Ramalho *et al.*, 2021).

Neste estudo, a obtenção de genótipos resistentes ao nematoide do cisto raças 4+ e 14+ e de tegumento amarelo, podem estar associados ao grande número de tratamentos avaliados. De acordo com Ramalho *et al.* (2021), para obtenção de genótipos recombinantes, quando se tem genes ligados torna-se necessário a avaliação de muitos indivíduos. Além disso, por ser a resistência uma característica de herança poligênica, por si só, já é necessária a avaliação de uma grande quantidade de tratamentos.

Na figura 3 é possível visualizar um gráfico de correspondência, para as informações de reação e raças. Nota-se que, como discutido anteriormente, para as raças 2 e 4 a maior parte dos tratamentos regulares se comportaram como resistentes. E para as raças 4+ e 14+ houve uma tendência de classificações entre suscetíveis e moderadamente resistentes.

Na análise de correspondência (Figura 3), é possível visualizar também que apenas uma dimensão foi capaz de explicar mais de 99,9% da variação fenotípica dos dados, enquanto a dimensão dois representa uma variação mínima de 0,1%. O fato de a dimensão um ter explicado a maior parte dos dados, sugere uma forte estruturação na relação entre as variáveis.

Figura 3: Análise de correspondência considerando associação de raças e reação fenotípica.



Reação fenotípica dos tratamentos regulares, R (Resistentes), MR (Moderadamente Resistentes) e Suscetíveis (S) associadas às raças avaliadas (2, 4, 4+ e 14+).

Fonte: Do autor (2025).

Além da análise gráfica, foi realizado um teste de qui-quadrado para testar a dependência entre as variáveis reação e raça. O valor de p associado ao teste obtido foi muito próximo de zero ($2,2 \times 10^{-16}$). Este resultado, indica a rejeição da hipótese nula, ou seja, existe uma dependência entre reação e raça, resultados estes que são observados de forma precisa na análise de correspondência (Figura 3).

A fim de comprovar a existência de diferença entre os tratamentos regulares, foram realizadas análises de variância para todos os experimentos. Foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre tratamentos para a característica número de fêmeas em todos os experimentos (Tabela 4).

A existência de diferença significativa entre os diferentes tratamentos evidencia, a princípio, a existência de variabilidade entre os tratamentos e, conseqüentemente, maiores chances de se explorar a seleção de genótipos superiores. Por ser esta característica o que determina a reação de resistência, moderada resistência ou suscetibilidade, sua significância era esperada principalmente para os experimentos raça 4+ e 14+, uma vez que os genitores são contrastantes entre si. Embora o uso de genitores contrastantes, por si só, não garanta a

obtenção de genótipos significativamente contrastantes na descendência, essa estratégia amplia a variabilidade genética e, conseqüentemente, a fenotípica. Essa maior variabilidade pode contribuir para a obtenção de significância nas análises de variância da característica em estudo (Borém; Miranda; Fritsche-Neto, 2021).

Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os diferentes blocos para todos os experimentos analisados (Tabela 1A). Em experimentos conduzidos em delineamento de blocos aumentados o erro experimental é estimado considerando as testemunhas repetidas entre os diferentes blocos. Este fato, associado à não significância entre os diferentes blocos sugerem um bom controle ambiental (Duarte, 2000).

Peternelli *et al.* (2009), com o objetivo de avaliar o desempenho da seleção, avaliaram três delineamentos normalmente utilizados quando se tem muitos genótipos e pouco material propagativo. Na ocasião, foram testados três delineamentos, delineamento em blocos aumentados (DBA), delineamento com blocos aumentados duplicados (DBAD) e grupos de experimentos em blocos casualizados com tratamentos em comum (EBCTC). No estudo em questão os autores concluíram que dentre os delineamentos estudados o DBA foi o que apresentou a maior eficiência. Além disso, no estudo conduzido pelos autores, os tratamentos comuns foram repetidos seis vezes, como no presente estudo, o que sugere uma alta precisão em ambos os cenários.

Tabela 4: Resumo da análise de variância (ANOVA) individual e conjunta para os quatro experimentos, conduzidos em Delineamento de Blocos Aumentados (DBA).

Fonte de variação	GL	F value	Pr(>F)
Análise individual			
Entre plantas/Raça 2	567	9,024	0 *
Entre plantas/Raça 4	627	7,408	0 *
Entre plantas/Raça 4+	584	7,465	0 *
Entre plantas/Raça 14+	633	6,93	0 *
Análise conjunta			
Entre raças	3	478,29	0 *

GL: Graus de liberdade; *Significativo pelo teste F ($p < 0,05$).

Fonte: Do autor (2025).

É possível observar que há diferença significativa ($p < 0,05$), para a característica número de fêmeas em função da raça inoculada (Tabela 4). A existência de significância na análise conjunta era algo esperado, isso porque existe diferença no grau de patogenicidade entre as raças utilizadas. A presença de alelos de virulência associados a uma determinada raça faz com que ocorra uma expressão fenotípica diferenciada (número e tamanho de

fêmeas), quando uma determinada população de soja é submetida a diferentes raças do nematoide (Arjoune *et al.*, 2022). Fato este observado no presente estudo.

Os parâmetros genéticos e fenotípicos associados aos quatro experimentos estão apresentados na tabela 5. Nota-se que para os experimentos raça 2 e 4 os valores de variância genética foram de maior magnitude. A existência de variância genética é fundamental nos programas de melhoramento genético, pois permite a obtenção de ganhos com a seleção com incremento de alelos favoráveis nos genótipos de interesse.

Tabela 5: Parâmetros genéticos e fenotípicos para a característica número de fêmeas nos diferentes experimentos, obtidos a partir na análise individual.

Parâmetro	Raça 2	Raça 4	Raça 4+	Raça 14+
σ_f^2	1,6	1,92	0,74	0,69
σ_g^2	1,42	1,66	0,64	0,59
σ_e^2	0,18	0,26	0,1	0,1
h^2 (%)	88,92	86,50	86,60	85,57
	[80,65 - 92,73]	[76,71 - 92,25]	[76,76 - 91,27]	[75,07 - 90,63]
GS	-22,08	-28,36	-44,61	-64,85

σ_f^2 = variância fenotípica; σ_g^2 = variância genética; σ_e^2 = variância ambiental; h^2 = herdabilidade no sentido amplo [intervalo de confiança] e GS = ganho esperado com a seleção.

Fonte: Do autor (2025).

Embora os valores de variância genética tenham sido de menor magnitude para os experimentos raça 4+ e 14+, a variância residual também foi baixa, indicando potencial na seleção de genótipos superiores. A existência de variabilidade para a características número de fêmeas para estes experimentos, denota potencial para seleção de genótipos resistentes às raças 4+ e 14+, na população estudada.

A partir das estimativas dos parâmetros genéticos e fenotípicos associados aos tratamentos e ao erro experimental, foi possível obter as estimativas de herdabilidade para a característica número de fêmeas. De acordo com Barry *et al.*, (2023), a herdabilidade refere-se à proporção da variância fenotípica que é de origem genética. Dentro dos programas de melhoramento a herdabilidade é uma estimativa que reflete a confiabilidade em realizar a seleção dentre os genótipos.

Neste estudo, os valores de herdabilidade para a característica número de fêmeas variaram de 85,57% a 88,92% (Tabela 5). Estes valores indicam que a maior parte da variância fenotípica observada entre os tratamentos é de origem genética, sendo, portanto, uma parte minoritária oriunda da variação ambiental. Valores de herdabilidade superiores a 80% são considerados de alta magnitude, portanto, experimentos com valores superiores são considerados de precisão experimental muito alta (Cargnelutti Filho; Storck; Ribeiro, 2009).

O intervalo de confiança associado a estimativa de herdabilidade para os diferentes experimentos também são apresentados na tabela 5. O maior intervalo foi observado no experimento para a raça 4, ou seja, o real valor neste experimento pode assumir qualquer número entre 76,71 e 92,25. De forma geral, observa-se a 5% de significância, que a amplitude associada ao limite inferior e ao limite superior dos intervalos foi de pequena magnitude, resultado este, que indica uma alta confiabilidade para tal estimativa.

Cervigni *et al.*, (2007), avaliando linhagens de soja submetidas às raças 3 e 9, para a característica número de fêmeas encontram valores de herdabilidade de 80,67% e 77,97%, respectivamente. De acordo com os mesmos autores, os altos índices encontrados para a herdabilidade indicam segregação para os alelos de resistência na população e cenário favorável para seleção fenotípica para resistência. Neste estudo, os valores para herdabilidade associados aos de coeficiente de variação experimental e acurácia seletiva (Tabela 1A), sugerem um excelente controle ambiental e cenário propício para seleção de genótipos superiores na população.

Com o objetivo de se estimar o impacto propiciado com a seleção de genótipos superiores, foram estimados o ganho esperado com a seleção adotando proporção de seleção de 15%. O ganho com seleção foi de -22,08 e -28,36 número de fêmeas para as raças 2 e 4, respectivamente (Tabela 5). Os valores negativos para a estimativa do ganho com a seleção indicam a natureza da característica. Em programas de melhoramento visando à resistência fenotípica busca-se a obtenção de genótipos mais resistentes, conseqüentemente, com menor média fenotípica para a característica número de fêmeas.

Para o experimento raça 4+, com uma intensidade de seleção de 15% o ganho esperado foi de -44,61. Desta forma, ao selecionar os melhores tratamentos espera-se uma redução em média de 44,61 para o número de fêmeas na nova população. Para o experimento raça 14+, considerando a intensidade de seleção de 15% o ganho esperado obtido foi de -64,85. Este resultado indica uma redução média de 64,85 para a característica número de fêmeas na nova população. Diante de todos os experimentos, a raça 14+ apresentou o maior ganho esperado. Esse resultado deve-se ao elevado diferencial de seleção obtido para essa raça, considerando que os valores de herdabilidade foram altos em todos os experimentos. Destaca-se que o ganho esperado por meio da seleção é determinado, entre outros fatores, pelo diferencial de seleção e pela herdabilidade.

A piramidação de alelos, a partir de cruzamento biparental entre *PI437654* e *TMG4182* figura-se de forma eficaz para obtenção de genótipos resistentes às raças 4+ e 14+, com tegumento de coloração amarela. A obtenção de linhagens resistentes ao nematoide do

cisto a partir de fontes diferentes de *PI88788*, tem sido sugerida por diversos autores (Kim *et al.*, 2016; Niblack *et al.*, 2008; Tylka *et al.*, 2021). Isso porque, a utilização de apenas uma fonte de resistência resulta em uma pressão de seleção, e possivelmente surgimento de novas raças (Lu *et al.*, 2022). A existência de variabilidade genética na população para a característica de resistência sugere que no presente estudo a estratégia de pré-melhoramento utilizada denota-se como uma boa ferramenta na incorporação de novas fontes de resistência ao NCS.

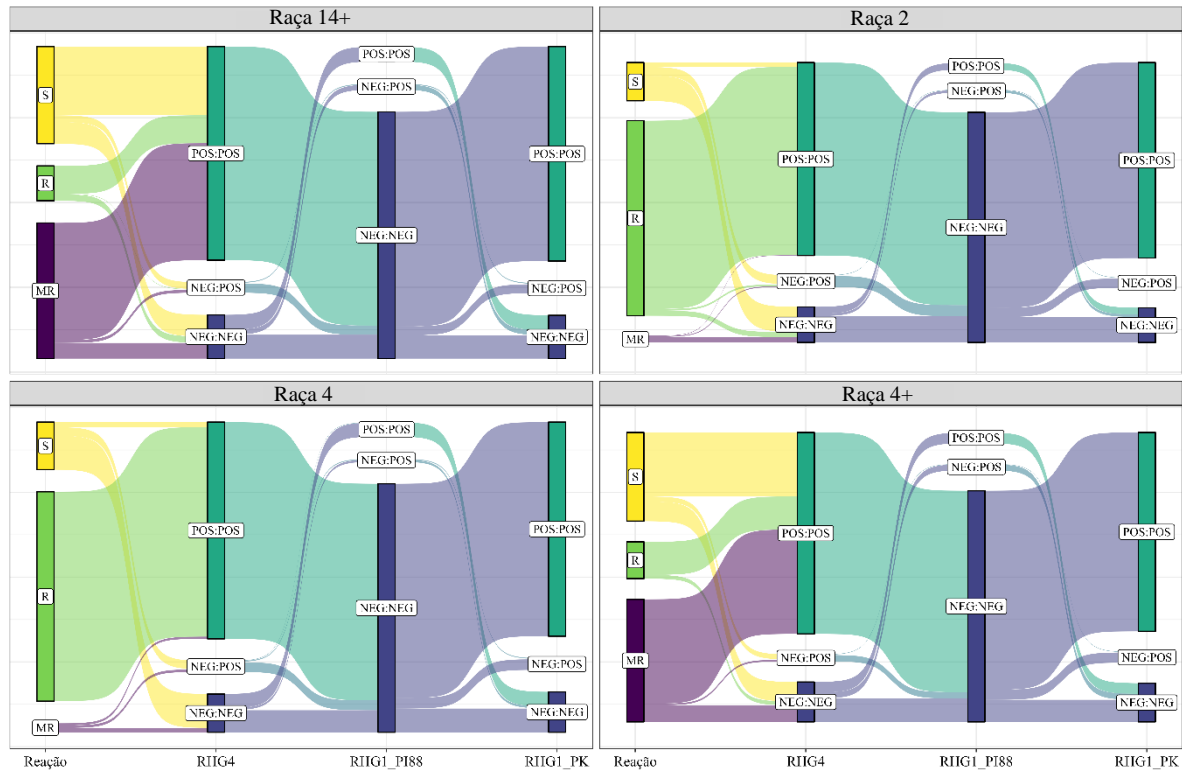
Embora tenham sido obtidos genótipos resistentes, o processo de fenotipagem de uma grande quantidade de tratamentos pode ser algo inviável em programas de melhoramento genético e deve ser facilitado por técnicas como a seleção assistida por marcadores moleculares (Lu *et al.*, 2022). Neste âmbito, na figura 4, pode-se visualizar os gráficos de Sankey (Kennedy e Sankey, 1898), para os diferentes experimentos. Estes gráficos permitem compreender a existência de relações entre os fenótipos e os marcadores moleculares utilizados.

Pode-se observar que, para as raças 2 e 4, existe associação entre o fenótipo e as marcas moleculares. Para essas duas raças é possível observar que a maior parte dos tratamentos caracterizados como resistentes foram positivos para o marcador *Rhg4*, negativos para o marcador *Rhg1-b* (*PI88788*) e positivos para o marcador *Rhg1-a* (*Peking*) (Figura 4). Pode-se inferir que este comportamento era esperado, uma vez que a reação de resistência para as raças 2 e 4 são relativamente mais simples.

Para as raças 4+ e 14+, pode-se observar que ao contrário das raças 2 e 4 não existe um padrão definido entre tipo de reação e a marca molecular. Isto porque ao analisar por exemplo para a raça 4+, tem-se que a maior parte dos fenótipos R, MR e S foram positivos para o marcador *Rhg4*, sugerindo que não existe uma relação exclusiva entre fenótipo e presença da marca *Rhg4* (Figura 4). Contudo, um fato que chama a atenção é que a maior parte dos tratamentos caracterizados como resistentes para as raças 4+ e 14+, foram positivos para o marcador *Rhg4*, negativos para o *Rhg1-b* e positivos para o *Rhg1-a*.

O *QTL Rhg4* é citado em diversos trabalhos relacionados a resistência ao NCS (Brucker *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2022; Meksem *et al.*, 2001; Torabi *et al.*, 2023). Este *QTL* está localizado em uma região do cromossomo 8 e estudos de mapeamento revelaram que um único gene (*Glyma08g11490*) é o responsável pela resistência (Liu *et al.*, 2012; NCBI, 2025). De forma geral, diversos trabalhos atribuem a resistência ao nematoide do cisto à interação entre os *QTLs Rhg1-a* e *Rhg4*, ou à presença isolada de *Rhg1-b* (Brucker *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2012).

Figura 4: Relação entre o fenótipo e os marcadores moleculares para as quatro raças avaliadas em diferentes experimentos, plotadas em gráficos de Sankey (Kennedy e Sankey, 1898).



Reação de resistência (R), moderada resistência (MR) e suscetibilidade (S). Marcadores moleculares *Rhg4*, *Rhg1-a* (Peking) e *Rhg1-b* (PI88788). Presença do marcador em homocigose (POS:POS), presença do marcador em um dos locos - heterocigoto (NEG:POS) e ausência do marcador em homocigose (NEG:NEG).

Fonte: Do autor (2025).

Embora as contribuições de *Rhg1-a/b* e *Rhg4* sobre os mecanismos de resistência ao NCS sejam incontestáveis, alguns fatores podem influenciar o nível de resistência de um genótipo, mesmo quando este apresenta estas marcas moleculares. O número de cópias para os *QTLs* *Rhg1-a/b* e *Rhg4* têm sido objeto de estudo para diversos pesquisadores, bem como seu impacto na expressão fenotípica de genótipos de soja submetidos ao NCS (Cook *et al.*, 2014; Cook *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2015; Torabi *et al.*, 2023).

Torabi *et al.* (2023), com o objetivo de compreender os mecanismos de resistência planta/patógeno realizaram análises para elucidar o número de cópias para os *QTLs* *Rhg1* e *Rhg4* nos principais genótipos utilizados como fonte de resistência ao NCS. Os números de cópias variaram dentre os genótipos e dentre os *QTLs*. Para o genótipo PI437654, avaliado

pelos autores e utilizado como genitor resistente neste estudo foram identificadas três cópias para *Rhg1-a* e três cópias para *Rhg4*.

Os resultados encontrados pelos autores (Torabi *et al.*, 2023), podem ser associados aos obtidos no presente trabalho. Isso porque, embora foi identificado genótipos resistentes associados a presença dos marcadores *Rhg1-a* e *Rhg4*, também observou-se genótipos suscetíveis. A reação de suscetibilidade observada para estes tratamentos pode estar atribuída então, ao número de cópias destes *QTLs*, que pode ter sido reduzida durante o processo de recombinação, fato que deverá ser elucidado em investigações futuras.

Além do número de cópias a presença ou ausência de outros *QTLs* de efeito menor podem ter contribuído para os resultados observados (Figura 4). Por ser a reação de resistência ou suscetibilidade uma característica quantitativa (Grant *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2022), a presença de *Rhg1-a* e *Rhg4* por si só não garante à resistência. Portanto, para uma melhor compreensão dos genes associados a resistência ao NCS recomenda-se a realização de uma genotipagem mais ampla, que possa explorar mais regiões do genoma e possibilitar a realização da associação genômica.

5 CONCLUSÕES

É possível obter genótipos de soja recombinantes a partir da utilização da *PI437654* como genitor, que associe tegumento amarelo e resistência a múltiplas raças do nematoide do cisto.

A presença de genótipos suscetíveis, associados com a presença de marcadores *Rhg1-a* e *Rhg4*, sugere que fatores adicionais, como o número de cópias de *QTLs*, bem como a presença de outros *QTLs* de efeito menor, desempenham papel significativo na resistência ao NCS.

É fundamental o emprego de uma abordagem mais abrangente de genotipagem, incluindo outras regiões genômicas, visando aprimorar a compreensão dos mecanismos de resistência ao NCS e aprimorar o emprego da seleção assistida por marcadores moleculares.

REFERÊNCIAS

- ALZATE-MARIN, A. L. *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, n. 4, p. 333–342, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/s0100-41582005000400001>>.
- AMARO, G. B.; ABREU, A.; RAMALHO, F. B. **Phenotypic recurrent selection in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with cariocatype grains for 22 resistance to the fungi *Phaeoisariopsis griseola*.** *Genetics and Molecular Biology* v, v. 30, p. 584–588, 2007.
- ANAND, S. C. **Registration of soybean germplasm line S88-2036 having multiple-race soybean cyst nematode resistance.** *Crop science*, v. 31, n. 3, p. 856–856, 1991. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2135/cropsci1991.0011183x003100030077x>>.
- ANAND, SATISH C. **Sources of resistance to the soybean cyst nematode.** *Cyst Nematodes*. Boston, MA: Springer US, 1986. p. 269–276.
- ARANTES, L. DE O.; ABREU, Â. DE F. B.; RAMALHO, M. A. P. **Eight cycles of recurrent selection for resistance to angular leaf spot in common bean.** *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v. 10, n. 3, p. 232–237, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/s1984-70332010000300008>>.
- ARAVIND, J., SANKAR, S. M., WANKHEDE, D. P., and KAUR, V. (2023). **augmentedRCBD: Analysis of Augmented Randomised Complete Block Designs.** R package version 0.1.7, <https://aravindj.github.io/augmentedRCBD/><https://cran.rproject.org/package=augmentedRCBD>.
- ARJOUNE, Y. *et al.* **Soybean cyst nematode detection and management: a review.** *Plant methods*, v. 18, n. 1, p. 110, 2022. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13007-022-00933-8>>.
- BARRY, C.-J. S. *et al.* **How to estimate heritability: a guide for genetic epidemiologists.** *International journal of epidemiology*, v. 52, n. 2, p. 624–632, 2023. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/ije/dyac224>>.
- BASNET, P. *et al.* **Epistatic interaction between *Rhg1-a* and *Rhg2* in PI 90763 confers resistance to virulent soybean cyst nematode populations.** *Theoretical and applied genetics*, v. 135, n. 6, p. 2025–2039, 2022. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00122-022-04091-2>>.
- BATES, D. *et al.* **Fitting linear mixed-effects models Usinglme4.** *Journal of statistical software*, v. 67, n. 1, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.18637/jss.v067.i01>>.
- BAYLESS, A. M.; ZAPOTOCNY, R. W.; HAN, S. **A fonte de resistência ao nematóide *rhg1-a* (*Rhg1* low-copy) abriga um retrotransposon da família *Copia* dentro do gene α -SNAP codificado por *Rhg1*.** *Planta Direta* p, p. 1–19, 2019.

BORÉM, ALUIZIO; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de plantas**. rev. e ampl. Viçosa: UFV, 2013.

BORÉM, Aluízio; MIRANDA, Glauco V.; FRITSCHÉ-NETO, Roberto. **Melhoramento de plantas**. Oficina de Textos. [S.l: s.n.], 2021.

BOTSTEIN, D. *et al.* **Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms**. *The American Journal of Human Genetics*, v. 32, n. 3, p. 314–331, 1980.

BOYLE, P. *et al.* **Gel-free multiplexed reduced representation bisulfite sequencing for large-scale DNA methylation profiling**. *Genome biology*, v. 13, n. 10, p. R92, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/gb-2012-13-10-r92>>.

BRUCKER, E. *et al.* **Rhg1 alleles from soybean PI 437654 and PI 88788 respond differentially to isolates of *Heterodera glycines* in the greenhouse**. *Theoretical and applied genetics*, v. 111, n. 1, p. 44–49, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00122-005-1970-3>>.

BUTLER, K. J. *et al.* **Soybean cyst nematode resistance quantitative trait locus cqSCN-006 alters the expression of a γ -SNAP protein**. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI*, v. 34, n. 12, p. 1433–1445, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-07-21-0163-R>>.

CANTOR, R. M.; LANGE, K.; SINSHEIMER, J. S. **Prioritizing GWAS results: A review of statistical methods and recommendations for their application**. *The American Journal of Human Genetics*, v. 86, n. 1, p. 6–22, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.11.017>>.

CARGNELUTTI FILHO, A.; STORCK, L.; RIBEIRO, N. D. **Medidas da precisão experimental em ensaios com genótipos de feijão e de soja**. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 44, n. 10, p. 1225–1231, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/s0100-204x2009001000003>>.

CAVALCANTI, J. J. V. *et al.* **Predição simultânea dos efeitos de marcadores moleculares e seleção genômica ampla em cajueiro**. *Revista brasileira de fruticultura*, v. 34, n. 3, p. 840–846, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/s0100-29452012000300025>>.

CERVIGNI, G. D. L. *et al.* **Inheritance pattern and selection criteria for resistance to soybean cyst nematode races 3 and 9**. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 42, n. 10, p. 1413–1419, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/s0100-204x2007001000007>>.

COOK, D. E. *et al.* **Copy number variation of multiple genes at Rhg1 mediates nematode resistance in soybean**. *Science (New York, N.Y.)*, v. 338, n. 6111, p. 1206–1209, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1126/science.1228746>>.

COOK, D. E. *et al.* **Distinct copy number, coding sequence, and locus methylation patterns underlie Rhg1-mediated soybean resistance to soybean cyst nematode**. *Plant physiology*, v. 165, n. 2, p. 630–647, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1104/pp.114.235952>>.

CUNHA, R. P. **Ciclo de vida de *H. glycines* raça 9 em soja no Estado do Maranhão.** *Summa Phytopathol v*, v. 34, p. 262–264, 2008.

DHINGRA, O. D.; MENDONÇA, H. L.; MACEDO, D. M. **Tecnologias de produção e usos da soja: Doenças e seu controle** [S.l.]: Editora UFV, 2009.

DIAS, W. P. *et al.* **Ocorrência de uma segunda população do nematoide de cisto da soja (NCS) “quebrando” a resistência da cv. Hartwig no Brasil.** [S.l.: s.n.], 1999.

DIAS, W. P. *et al.* **Quebra da resistência da cv. Hartwig por população de campo do nematoide de cisto da soja (*Heterodera glycines*).** *Pesquisa Agropecuária Brasileira v. 33*, p. 971–973, 1998.

DIAS, Waldir P. **Nematoide de cisto da soja: biologia e manejo pelo uso da resistência genética.** *Nematologia Brasileira v. 33*, p. 1–16, 2009.

DIAS, WALDIR P. *et al.* **Genetic control in soybean resistance to soybean cyst nematode race 4+.** *Euphytica; Netherlands journal of plant breeding*, v. 145, n. 3, p. 321–329, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10681-005-1944-1>>.

DUARTE, J. B. **Sobre o emprego e a análise estatística do delineamento em blocos aumentados no melhoramento genético vegetal.** 2000. Universidade de Sao Paulo, Agência USP de Gestao da Informacao Academica (AGUIA), 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.11606/t.11.2000.tde-28022002-100846>>.

FEDERER, W. T. **Model considerations and variance component estimation in augmented completely randomized and randomized complete blocks designs-Preliminary Version.** [S.l.: s.n.], 1976.

FEDERER, W. T.; RAGHAVARAO, D. **On Augmented Designs.** *Biometrics v. 31*, n. 1, p. 29, 1975. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2307/2529707>>.

FERREIRA, L. *et al.* **Nematoide do cisto da soja e princípios de controle.** *Multidisciplinary Reviews*, v. 2, n. 1, p. e2019012, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.29327/multi.2019012>>.

GOLDEN, A. M. **Terminology and identity of infraspecific forms of the soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*).** *Plant Disease Reporter*, v. 54, p. 544–546, 1970.

GRANT, D. *et al.* **SoyBase, the USDA-ARS soybean genetics and genomics database.** *Nucleic acids research*, v. 38, n. Database issue, p. D843–6, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkp798>>.

GWINNER, R. *et al.* **Genetic diversity in Brazilian soybean germplasm.** *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v. 17, n. 4, p. 373–381, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/1984-70332017v17n4a56>>.

HE, C.; HOLME, J.; ANTHONY, J. **SNP genotyping: the KASP assay.** *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, v. 1145, p. 75–86, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-0446-4_7>.

HERNANDEZ-GARCIA, Carlos M. **Pigmentação da semente em soja: uma característica mediada por silenciamento de RNA.** *Plant breeding and genomic*. [S.l.: s.n.], 2013.

HOLBEIN, J.; GRUNDLER, F. M. W.; SIDDIQUE, S. **Plant basal resistance to nematodes: an update.** *Journal of experimental botany*, v. 67, n. 7, p. 2049–2061, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erw005>>.

INFANTOSI, A. F. C.; COSTA, J. C. DA G. D.; ALMEIDA, R. M. V. R. DE. **Análise de Correspondência: bases teóricas na interpretação de dados categóricos em Ciências da Saúde.** *Cadernos de saude publica*, v. 30, n. 3, p. 473–486, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/0102-311x00128513>>.

JULIATTI, Breno. **Análise de genótipos de soja quanto à resistência ao nematoide do cisto.** EDUFU - Editora da Universidade Federal de Uberlandia, 2015.

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.** *Minutes of the Proceedings of the Institution of Civil Engineers*, v. 134, n. 1898, p. 278–312, 1898. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1680/imotp.1898.19100>>.

KIM, K.-S. *et al.* **Advancements in breeding, genetics, and genomics for resistance to three nematode species in soybean.** *Theoretical and applied genetics*, v. 129, n. 12, p. 2295–2311, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00122-016-2816-x>>.

KNAPP, S. J.; STROUP, W. W.; ROSS, W. M. **Exact confidence intervals for heritability on a progeny mean basis 1.** *Crop science*, v. 25, n. 1, p. 192–194, 1985. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2135/cropsci1985.0011183x002500010046x>>.

KOIDE, Y. *et al.* **Genetic properties responsible for the transgressive segregation of days to heading in rice.** *G3 (Bethesda, Md.)*, v. 9, n. 5, p. 1655–1662, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1534/g3.119.201011>>.

KORTE, A.; FARLOW, A. **The advantages and limitations of trait analysis with GWAS: a review.** *Plant methods*, v. 9, n. 1, p. 29, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1746-4811-9-29>>.

KURAUCHI, T. *et al.* **Endogenous RNA interference of chalcone synthase genes in soybean: formation of double-stranded RNA of GmIRCHS transcripts and structure of the 5' and 3' ends of short interfering RNAs.** *Journal of plant physiology*, v. 168, n. 11, p. 1264–1270, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2011.01.003>>.

LAM, H.-M. *et al.* **Resequencing of 31 wild and cultivated soybean genomes identifies patterns of genetic diversity and selection.** *Nature genetics*, v. 42, n. 12, p. 1053–1059, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ng.715>>.

LEE, T. G. *et al.* **Evolution and selection of Rhg1, a copy-number variant nematode-resistance locus.** *Molecular ecology*, v. 24, n. 8, p. 1774–1791, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/mec.13138>>.

LIAN, Y. *et al.* **A new race (X12) of soybean cyst nematode in China.** *Journal of nematology*, v. 49, n. 3, p. 168–176, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.21307/jofnem-2017-079>>.

LIAN, Y. *et al.* **The spatial distribution and genetic diversity of the soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*, in China: It is time to take measures to control soybean cyst nematode.** *Frontiers in Plant Science*, v. 13, p. 927773, 2022. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2022.927773>>.

LIMA, G. A.; DE, S. **Progresso genético com a seleção recorrente visando resistência ao mofo branco no feijoeiro.** 2022. 58 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Genético). Lavras: [s.n.], [S.d.].

LIU, S. *et al.* **A soybean cyst nematode resistance gene points to a new mechanism of plant resistance to pathogens.** *Nature*, v. 492, n. 7428, p. 256–260, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature11651>>.

LIU, S. *et al.* **The soybean GmSNAP18 gene underlies two types of resistance to soybean cyst nematode.** *Nature communications*, v. 8, n. 1, p. 14822, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ncomms14822>>.

LOPES DA SILVA, Felipe *et al.* (Orgs.). **Soybean Breeding.** Cham: Springer International Publishing, 2017. .9783319574325.

LU, X. *et al.* **Quantitative trait loci and gene-specific markers associated with resistance to soybean cyst nematode HG type 2.5.7.** *Molecular breeding: new strategies in plant improvement*, v. 42, n. 10, p. 62, 2022. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11032-022-01330-8>>.

MACKAY, I. J. *et al.* **Understanding the classics: the unifying concepts of transgressive segregation, inbreeding depression and heterosis and their central relevance for crop breeding.** *Plant biotechnology journal*, v. 19, n. 1, p. 26–34, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/pbi.13481>>.

MAHALINGAM, R.; SKORUPSKA, H. T. **DNA markers for resistance to *Heterodera glycines* Race 3 in soybean cultivar Peking.** *Breeding Science* v. 45, p. 435–443, 1995.

MARDIS, E. R. **DNA sequencing technologies: 2006-2016.** *Nature protocols*, v. 12, n. 2, p. 213–218, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2016.182>>.

MATSON, A. L.; WILLIAMS, L. F. **Evidence of four genes for resistance to the soybean cyst nematode.** *Crop Science* v. 22, p. 588–590, 1965.

MATSUO, É. *et al.* **Genetic diversity in soybean genotypes with resistance to *Heterodera glycines*.** *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v. 11, n. 4, p. 304–312, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/s1984-70332011000400003>>.

- MEINHARDT, C. *et al.* **Resistance gene pyramiding and rotation to combat widespread soybean cyst nematode virulence.** *Plant disease*, v. 105, n. 10, p. 3238–3243, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-12-20-2556-RE>>.
- MEIRA, D. *et al.* **Gene pyramiding combinations confer resistance of Asian soybean rust.** *Crop science*, v. 62, n. 2, p. 792–801, 2022. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/csc2.20700>>.
- MEKSEM, K. *et al.* **'Forrest' resistance to the soybean cyst nematode is bigenic: saturation mapping of the Rhg1 and Rhg4 loci.** *Theoretical and applied genetics*, v. 103, n. 5, p. 710–717, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s001220100597>>.
- MERTZ-HENNING, L. *et al.* **Effect of water deficit-induced at vegetative and reproductive stages on protein and oil content in soybean grains.** *Agronomy (Basel, Switzerland)*, v. 8, n. 1, p. 3, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/agronomy8010003>>.
- MIKEL, M. A. *et al.* **Genetic diversity and agronomic improvement of North American soybean germplasm.** *Crop science*, v. 50, n. 4, p. 1219–1229, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2135/cropsci2009.08.0456>>.
- MILLER, S. S. *et al.* **Hourglass cell development in the soybean seed coat.** *Annals of botany*, v. 106, n. 2, p. 235–242, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcq101>>.
- MITCHUM, M. G. **Soybean resistance to the soybean cyst nematode *Heterodera glycines*: An update.** *Phytopathology*, v. 106, n. 12, p. 1444–1450, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-06-16-0227-RVW>>.
- MOURA, M. F. *et al.* **Parâmetros genéticos da resistência da soja ao nematóide de cisto Raça 1.** *Bragantia: boletim tecnico do Instituto Agronomico do Estado de Sao Paulo*, v. 67, n. 1, p. 119–125, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/s0006-87052008000100014>>.
- MUNDT, C. C. **Durable resistance: a key to sustainable management of pathogens and pests.** *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, v. 27, p. 446–455, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2014.01.011>>.
- NCBI, 2025. ***RHG4* receptor-like kinase *RHG4* [*Glycine max* (soybean)].** Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/547710>>. Acesso em: 18 jan. 2025.
- NIBLACK, T. L. **Biology and management of the soybean cyst nematode.** St. Paul, MN: APS Press, 1992.
- NIBLACK, T. L. *et al.* **A revised classification scheme for genetically diverse populations of *Heterodera glycines*.** *Journal of nematology* v. 34, n. 4, p. 279–288, 2002.
- NIBLACK, T. L. *et al.* **Shift in virulence of soybean cyst nematode is associated with use of resistance from PI 88788.** *Plant Health Prog.* [S.l.: s.n.], 2008.
- NITSCHKE, Pablo. **Atlas climático do estado do Paraná.** Londrina: [s.n.], 2019.
- PARHE, S. D. *et al.* **Marker-assisted pyramiding of four QTL/genes for Asian rust (*Phakopsora pachyrhizi*) resistance in soybean.** *Journal of crop improvement*, v. 31, n. 5, p. 689–711, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/15427528.2017.1347593>>.

PETERNELLI, L. A. *et al.* **Delineamentos aumentados no melhoramento de plantas em condições de restrições de recursos.** *Ciencia rural*, v. 39, n. 9, p. 2425–2430, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84782009005000209>>.

PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental.** 15. ed. Piracicaba: ESALQ, 2009. 451 p.

PINHEIRO, J. B. *et al.* **Population dynamics of the nematodes *Heterodera glycines* and *Pratylenchus brachyurus* in a succession crop of soybean and chickpea.** *Agronomia colombiana*, v. 39, n. 3, p. 337–342, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.15446/agron.colomb.v39n3.96469>>.

POLAND, J. A.; RIFE, T. W. **Genotyping-by-sequencing for plant breeding and genetics.** *The plant genome*, v. 5, n. 3, p. 92–102, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3835/plantgenome2012.05.0005>>.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R Development Core Team. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, 2020.

RAMALHO, M. A. P. *et al.* **Aplicações da genética quantitativa no melhoramento de plantas.** [S.l.]: Editora UFLA, 2024.

RAMALHO, M. A. P. *et al.* **Genética na agropecuária.** [S.l.]: Editora UFLA, 6ª edição, 2021.

RAO-ARELLI, A. P.; ANAND, S. C.; WRATHER, A. J. **Soybean resistance to soybean cyst nematode Race 3 is conditioned by an additional dominant gene.** *Crop science*, v. 32, n. 4, p. 862–864, 1992. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2135/cropsci1992.0011183x003200040005x>>.

RESENDE, M. D.; DUARTE, J. **Precisão e controle de qualidade em experimentos de avaliação de cultivares.** *Pesquisa Agropecuária Tropical*, p. 182–194, 2007.

REZENDE, B. A. *et al.* **Severity evaluation methods in common bean recurrent selection programme for resistance to angular leaf spot.** *Journal of phytopathology (1986)*, v. 162, n. 10, p. 643–649, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/jph.12238>>.

RIESEBERG, L. H.; ARCHER, M. A.; WAYNE, R. K. **Transgressive segregation, adaptation and speciation.** *Heredity*, v. 83 (Pt 4), p. 363–372, 1999. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/sj.hdy.6886170>>.

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

ROLDÃO, A. DE F.; FERREIRA, V. DE O. **Climatologia do Estado do Tocantins - Brasil.** *Caderno de Geografia*, v. 29, n. 59, p. 1161–1181, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5752/p.2318-2962.2019v29n59p1161>>.

SANGLARD, D. A. **Melhoramento genético do feijoeiro com ênfase na piramidação de resistência à mancha-angular.** Viçosa: [s.n.], 2006. 84 v.

SANGLARD, D. **An efficient protocol for isolation, sporulation and maintenance of *pseudocercospora griseola*.** *Annual Report of Bean Cooperative* v. 52, p. 62–63, 2009.

SANTANA, Fernanda Abreu. **Seleção assistida e diversidade genética de fontes de resistência ao nematoide de cisto da soja.** <https://www.locus.ufv.br/>: UFV, 2008.

SANTOS, Guilherme. **Caracterização de genótipos de soja e piramidação de genes rps para resistência à fitóftora**. <https://repositorio.ufsm.br/handle/1/27575?show=full>, 2022.

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

SENDA, M. *et al.* **Accumulation of proanthocyanidins and/or lignin deposition in buff-pigmented soybean seed coats may lead to frequent defective cracking**. *Planta*, v. 245, n. 3, p. 659–670, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00425-016-2638-8>>.

SHANNON, J. G.; ARELLI, P. R.; YOUNG, L. D. **Breeding for soybean cyst nematode resistance**. *Biology and Management of Soybean Cyst Nematode*, p. 155–180, 2004.

SILVA, A. C. **Recurrent selection program for angular leaf spot resistance in carioca seeded common bean**. Bean Improvement Cooperative Annual Report, Oxford, 2015.

SILVA, B. F. M. *Seleção de progênies de soja visando à resistência ao nematoide de cisto*. 2021. UFLA, 2021.

SILVA, J. W. *et al.* **Simulação do número ideal de indivíduos no método bulk em autógamias**. v. 20, n. 2, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.30969/8pksnt64>>.

SONG, J. *et al.* **Identification and validation of loci governing seed coat color by combining association mapping and bulk segregation analysis in soybean**. *PloS one*, v. 11, n. 7, p. e0159064, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0159064>>.

SOYBASE, 2025. Disponível em: <<https://soybase.org/>>. Acesso em: 18 fev. 2024.

TEIXEIRA, L. C. A. *Estudo genético de populações de soja co fonte de resistência à h oriundas de topocruzamentos tipo aliment tipo grão*. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/20f29c71-323d-4f4a-9abd-278893c9e437/content>>. Acesso em: 15 jan. 2025.

THUROW, L. B.; CASTRO, C. M.; PEREIRA, A. **Melhoramento de plantas visando à resistência a patógenos**. Pelotas: Editora da UFPel, 2018.

TIAN, Y. *et al.* **Deciphering the genetic basis of resistance to soybean cyst nematode combining IBD and association mapping**. *Theoretical and applied genetics*, v. 136, n. 3, p. 50, 2023. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00122-023-04268-3>>.

TODD, J. J.; VODKIN, L. O. **Duplications that suppress and deletions that restore expression from a chalcone synthase multigene family**. *The plant cell*, v. 8, n. 4, p. 687, 1996. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2307/3870344>>.

TORABI, S. *et al.* **Soybean-SCN battle: Novel insight into soybean's defense strategies against *Heterodera glycines***. *International journal of molecular sciences*, v. 24, n. 22, p. 16232, 2023. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/ijms242216232>>.

TRAN, D. T. *et al.* **Genome-wide association analysis pinpoints additional major genomic regions conferring resistance to soybean cyst nematode (*Heterodera glycines* Ichinohe)**. *Frontiers in Plant Science*, v. 10, p. 401, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2019.00401>>.

TUTEJA, J. H. *et al.* **Endogenous, tissue-specific short interfering RNAs silence the chalcone synthase gene family in glycine max seed coats.** *The plant cell*, v. 21, n. 10, p. 3063–3077, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1105/tpc.109.069856>>.

TYLKA, G. L.; MARETT, C. 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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1094/php-10-20-0094-br>>.

UFFELMANN, E. *et al.* **Genome-wide association studies.** *Nature reviews. Methods primers*, v. 1, n. 1, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s43586-021-00056-9>>.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS. Biblioteca Universitária. **Manual de normalização e estrutura de trabalhos acadêmicos:** TCCs, monografias, dissertações e teses. 4. ed. rev., atual. e ampl. Lavras, 2024. Disponível em: <http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/58728>. Acesso em: fev. 2024.

VIGANÓ, J. *et al.* **Microsatellite molecular marker-assisted gene pyramiding for resistance to Asian soybean rust (ASR).** *Acta Scientiarum Agronomy*, v. 40, n. 1, p. 39619, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v40i1.39619>>.

WEBB, D. M. *et al.* **Genetics mapping of soybean cyst nematode race-3 resistance loci in the soybean PI 437.654.** *Theoretical and Applied Genetics* v. 91, p. 574–581, 1995.

WEBER, N. *et al.* **Editor's choice: Crop genome plasticity and its relevance to food and feed safety of genetically engineered breeding stacks.** *Plant physiology*, v. 160, n. 4, p. 1842–1853, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1104/pp.112.204271>>.

WEISEMANN, J. M.; MATTHEWS, B. F.; DEVINE, T. E. **Molecular markers located proximal to the soybean cyst nematode resistance gene, *Rhg4*.** *Theoretical and applied genetics*, v. 85–85, n. 2–3, p. 136–138, 1992. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/bf00222850>>.

WESP, C. L. *et al.* **Herança da resistência quantitativa à ferrugem da folha em linhagens recombinantes de aveia branca.** *Tropical plant pathology*, v. 33, n. 2, p. 138–147, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1982-56762008000200008>>.

YAMANAKA, N.; HOSSAIN, M. M. **Pyramiding three rust-resistance genes confers a high level of resistance in soybean (*Glycine max*).** *Plant breeding*, v. 138, n. 6, p. 686–695, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/pbr.12720>>.

YU, K. *et al.* **Quantitative trait locus mapping combined with RNA sequencing reveals the molecular basis of seed germination in Oilseed rape.** *Biomolecules*, v. 11, n. 12, p. 1780, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/biom11121780>>.

ZHANG, Y. *et al.* **Enhanced resistance to soybean cyst nematode in transgenic soybean via host-induced silencing of vital *Heterodera glycines* genes.** *Transgenic research*, v. 31, n. 2, p. 239–248, 2022. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11248-022-00298-7>>.

ZIMMERMAN, S. J.; ALDRIDGE, C. L.; OYLER-MCCANCE, S. J. **An empirical comparison of population genetic analyses using microsatellite and SNP data for a species of conservation concern.** *BMC genomics*, v. 21, n. 1, p. 382, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12864-020-06783-9>>.

ANEXO

Tabela 1A: Análise de variância (ANOVA) para os quatro experimentos, conduzidos em Delineamento de Blocos Aumentados (DBA).

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F value	Pr(>F)
Experimento raça 2					
Bloco	5	1,36	0,27	1,532	0,205 ^{ns}
Tratamentos: regulares	567	908,28	1,6	9,024	0 *
Regulares vs. comuns	1	42,73	42,73	241,233	0 *
Resíduos	35	6,2	0,18		
CVe (%) = 17,42		r_{gg} : 0,94			
Experimento raça 4					
Bloco	5	1,16	0,23	0,895	0,495 ^{ns}
Tratamentos: regulares	627	1206,6	1,92	7,408	0 *
Regulares vs. comuns	1	91,05	91,05	350,491	0 *
Resíduos	35	9,09	0,26		
CVe (%) = 19,71		r_{gg} : 0,93			
Experimento raça 4+					
Bloco	5	0,36	0,07	0,722	0,612 ^{ns}
Tratamentos: regulares	584	434,16	0,74	7,465	0 *
Regulares vs. comuns	1	18,48	18,48	185,598	0 *
Resíduos	35	3,49	0,1		
CVe (%) = 7,92		r_{gg} : 0,93			
Experimento raça 14+					
Bloco	5	0,6	0,12	1,198	0,33 ^{ns}
Tratamentos: regulares	633	439,3	0,69	6,93	0 *
Regulares vs. comuns	1	8,19	8,19	81,813	0 *
Resíduos	35	3,5	0,1		
CVe (%) = 7,26		r_{gg} : 0,92			

GL: Graus de liberdade; SQ: Soma de quadrados; QM: Quadrado médio; *Significativo pelo teste F ($p < 0,05$);

^{ns} Não significativo pelo teste F ($p > 0,05$); CVe (%): Coeficiente de variação experimental e r_{gg} : Acurácia seletiva.

Fonte: Do autor (2025).