

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTUDO GENÉTICO E VALIDAÇÃO DE MARCADORES
MOLECULARES ASSOCIADOS AO NEMATOIDE DE CISTO
EM POPULAÇÕES DE SOJA**

Cleber Vinicius Giaretta Azevedo

Engenheiro Agrônomo

2018

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTUDO GENÉTICO E VALIDAÇÃO DE MARCADORES
MOLECULARES ASSOCIADOS AO NEMATOIDE DE CISTO
EM POPULAÇÕES DE SOJA**

Discente: Cleber Vinicius Giaretta Azevedo

Orientadora: Prof. Dra. Sandra Helena Unêda-Trevisoli

Coorientador: Prof. Dr. Antonio Orlando Di Mauro

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

A994e Azevedo, Cleber Vinicius Giaretta
Estudo genético e validação de marcadores moleculares associados ao nematoide de cisto em populações de soja / Cleber Vinicius Giaretta Azevedo. -- Jaboticabal, 2018
x, 63 p. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2018

Orientadora: Sandra Helena Unêda-Trevisoli

Coorientador: Antonio Orlando Di Mauro

Banca examinadora: Luciana Rossini Pinto, Rinaldo Cesar di Paula, Ana Cristina Pinto Juhász, Everton Luis Finoto

Bibliografia

1. *Glycine max.* 2. *Heterodera glycines*. 3. REML/BLUP. 4. SSR, 5. Componentes de variância, 6. Parâmetros genéticos I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.52:633.34

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: ESTUDO GENÉTICO E VALIDAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES ASSOCIADOS AO NEMATOIDE DE CISTO EM POPULAÇÕES DE SOJA

AUTOR: CLEBER VINICIUS GIARETTA AZEVEDO
ORIENTADORA: SANDRA HELENA UNÊDA TREVISOLI
COORIENTADOR: ANTONIO ORLANDO DI MAURO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AGRONOMIA (GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. SANDRA HELENA UNÊDA TREVISOLI
Departamento de Produção Vegetal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Profa. Dra. ANA CRISTINA PINTO JUHASZ
Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais / EPAMIG / Uberaba / MG

Pesquisadora Dra. LUCIANA ROSSINI PINTO
Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Cana / IAC - Ribeirão Preto/SP

Pesquisador Dr. EVERTON LUIS FINOTO
APTA - Polo Regional do Centro Norte / Pindorama/SP

Prof. Dr. RINALDO CESAR DE PAULA
Departamento de Produção Vegetal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 19 de abril de 2018

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Cleber Vinicius Giaretta Azevedo, nascido em Amparo - SP em 31 de outubro de 1985, graduou-se no curso de Agronomia pela Universidade Estadual de Londrina (UEL) em dezembro de 2011. Durante a graduação realizou estágios na área de melhoramento de plantas no Instituto Agrônomo do Paraná - IAPAR. Em 2012, ingressou no curso de mestrado pelo Instituto Agrônomo – IAC, em Agricultura Tropical e Subtropical, área de concentração de Genética e Melhoramento de Plantas, realizando projetos com melhoramento de feijoeiro e obtendo o grau de mestre em abril de 2014. Em agosto de 2014 iniciou o curso de doutorado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) pela Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP/FCAV), Jaboticabal, com projetos em melhoramento de soja. Durante seu doutorado, realizou doutorado sanduíche durante 6 meses na Universidade de Modena e Reggio Emilia, na Itália.

Dedico

Aos meus pais pelo amor e pelo apoio
incondicional em todas as minhas escolhas

Ofereço

A minha esposa Leticia, pelo amor,
companheirismo e dedicação.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por guiar meus caminhos me conduzindo-me às escolhas certas.

Aos meus pais Cleber e Valéria, pelo apoio em todos os momentos e escolhas.

À minha esposa Letícia, pelo companheirismo, dedicação e carinho.

Aos meus sogros Laércio e Selma por todo o apoio.

À Universidade Estadual Paulista – FCAV/UNESP, Jaboticabal pela estrutura disponibilizada.

À Profa. Dra. Sandra Helena Unêda-Trevisoli pela oportunidade, dedicação, ensinamentos, amizade e tempo dedicado para a conclusão deste trabalho.

Ao Dr. Antonio Orlando Di Mauro, pelos conhecimentos transmitidos, pela receptividade e amizade.

Ao Dr. Enrico Francia, Dr. Marcelo Catellani e Justina Milc, pela oportunidade, receptividade, ensinamentos e auxílio na realização de parte deste trabalho.

À Dra. Ana Juhasz, pela ajuda e disponibilização das sementes e progênies.

À Dra. Lilian Cristina Andrade de Araújo Teixeira, pela ajuda e colaboração com os dados fenotípicos deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) da UNESP/FCAV.

A FAPESP, pela concessão da bolsa e reserva técnica que financiou este projeto, (Processo 2015/00407-9).

À Università Degli Studi di Modena e Reggio Emilia – UNIMORE, e a toda a equipe do Dipartimento di Scienze della Vita, que me acolheu e disponibilizou estrutura para realização de parte deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade e contribuição neste trabalho.

Aos amigos do Programa de Melhoramento Genético de Soja da FCAV/UNESP que me ajudaram e fizeram parte deste trabalho: Bruno, Eduardo, Éder, Wallace, Paulo, Elise, Antônio, Aretha, Guilherme, Paloma, Melina, Amanda, Alysson, Lilian.

Aos amigos do grupo Crop Production da UNIMORE, Luca, Marcelo, Domenico, Lavinia e Federica.

Aos funcionários do Departamento de Produção Vegetal.

Aos funcionários da Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão – FEPE, especialmente ao Marcelo e Sr. João pelo auxílio na execução dos experimentos.

A todos os amigos que fiz durante o curso.

Enfim a todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para que este trabalho fosse realizado, expresso a minha gratidão.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
CAPÍTULO 1.....	1
1. Introdução.....	1
2. Revisão de Literatura.....	2
2.1 Aspectos Gerais da Cultura.....	2
2.2 Soja na Alimentação Humana.....	3
2.3 Parâmetros Genéticos.....	4
2.4 Resistência ao Nematóide de Cisto da Soja (NCS).....	5
2.5 Marcadores Moleculares Associados ao NCS.....	7
3. Referências Bibliográficas.....	9
CAPÍTULO 2.....	16
RESUMO.....	16
ABSTRACT.....	17
1. Introdução.....	18
2. Material e Métodos.....	19
3. Resultados e Discussão.....	24
4. Conclusão.....	35
5. Referências.....	35
CAPÍTULO 3.....	38
RESUMO.....	38
ABSTRACT.....	39
1. Introdução.....	40
2. Material e Métodos.....	41
3. Resultados e Discussão.....	46
4. Conclusão.....	51
5. Referências.....	51

ESTUDO GENÉTICO E VALIDAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES ASSOCIADOS AO NEMATOIDE DE CISTO EM POPULAÇÕES DE SOJA

RESUMO – Para atender à necessidade de novas cultivares de soja tipo alimento com resistência ao nematoide de cisto da soja (NCS), este trabalho teve como objetivo selecionar progênies superiores e estimar parâmetros genéticos em duas populações de soja F_{2:3}, F_{3:4} e F_{4:5} oriundas de cruzamentos entre genótipos tipo alimento x tipo grão. As características avaliadas foram: altura de plantas na maturidade (APM), altura da inserção da primeira vagem (AIV), acamamento (AC), valor agrônômico (VA), número de vagens por planta (NV), número de dias para maturidade (NDM), número de ramos (NR), número de nós (NN), peso de 100 sementes (PCS) e produção de grãos por planta (PG). O delineamento experimental utilizado foi o de blocos aumentados e as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se a abordagem de modelos mistos (REML/BLUP). As estimativas dos parâmetros genéticos obtidos indicaram alta variância genética na população, em que a herdabilidade apresentada foi alta para a maioria dos caracteres avaliados e os coeficientes de variação ambiental, em sua maioria, foram baixos. Além destas avaliações, foi realizada a identificação de marcadores moleculares do tipo microssatélites (SSR) associados à resistência ao NCS (raça 3). Esta etapa foi realizada utilizando-se progênies F₂ dos cruzamentos entre soja tipo grão x tipo alimento, as quais foram previamente fenotipadas quanto a resistência ao NCS. Foram identificados 2 pares de primers SSR flanqueando 2 genes associados à resistência ao NCS, sendo Satt275 e Satt309 no cromossomo 18 ligados ao gene rhg1 e dois no cromossomo 8, Sat_162 e GMES6186, associados ao gene Rhg4. Em conjunto, estes marcadores podem ser utilizados de maneira eficaz na seleção assistida de progênies superiores para a resistência ao NCS.

Palavras-Chave: *Glycine max*, *Heterodera glycines*, REML/BLUP, SSR, componentes de variância, parâmetros genéticos.

GENETIC STUDY AND VALIDATION OF MOLECULAR MARKERS ASSOCIATED WITH CYST NEMATODE IN SOYBEAN POPULATIONS.

ABSTRACT – To meet the need of new food-type soybean cultivars with resistance to soybean cyst nematode (SCN), this work aimed to select superior progenies and to estimate genetic parameters in two soybean populations $F_{2:3}$, $F_{3:4}$ e $F_{4:5}$ originated from crosses between genotypes type food x grain type. The evaluated traits were: height of plants at maturity (APM), height of first pod insertion (AIV), lodging (AC), agronomic value (VA), number of pods per plant (NV), number of days to maturity ND), number of branches (NR), number of nodes (NN), weight of 100 seeds (PCS) and grain yield per plant (PG). The experimental design used was the augmented blocks and the statistical analyses were performed using mixed model REML/BLUP. The genetic parameters estimates indicated a high genetic variance in the population, the heritability presented was high for most of the evaluated traits and the coefficients of environmental variation were mostly low. In addition, the identification of molecular markers of the microsatellite type (SSR) associated with resistance to SCN (race 3). This step was performed using F_2 progenies of the crosses between grain type soybean x food type, which were previously phenotyped for resistance to NCS. Two pairs of SSR primers flanking 2 genes associated with resistance to the SCN were identified, with Satt275 and Satt309 on chromosome 18 linked to the rhg1 gene and two on chromosome 8, Sat_162 and GMES6186, associated with the Rhg4 gene. Together, these markers can be used effectively in the assisted selection of higher progenies for resistance to NCS.

Keywords: *Glycine max*, *Heterodera glycines*, mixed models, REML/BLUP, SSR, variance components, genetic parameters.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é a oleaginosa mais cultivada no mundo, sendo seu grão utilizado sob diferentes formas, dentre elas, na alimentação animal, na composição de rações, para o consumo humano, como o óleo, *in natura* ou industrializada e, também, como principal matéria prima na produção de biodiesel (YOKOMIZO et al., 2013; HADDAD et al., 2017).

O Brasil se destaca entre os principais produtores de soja do mundo e seu cultivo é de grande importância para a agricultura e economia brasileira. No ano agrícola 2016/2017, foram cultivados 33,9 milhões de ha, sendo produzidos 114,1 milhões de toneladas de soja, representando uma produtividade média de 3,36 ton.ha⁻¹. Para o ano agrícola 2017/2018 a estimativa é de uma área cultivada de 35 milhões de ha, com a produção de 111,5 milhões de toneladas de soja (CONAB, 2018).

Desta produção, cerca de 70% é exportada em forma de grão *in natura*, enquanto menos de 2% destina-se para o consumo humano (CASTOLDI et al., 2011). Em países asiáticos, a soja é considerada um alimento básico da população, entretanto, em países ocidentais a falta de tradição para consumo e o sabor característicos da soja associado a alguns genótipos comerciais, são os principais fatores de seu baixo consumo. Segundo Silva et al. (2012), este sabor indesejável é devido principalmente à presença de enzimas lipoxigenases nos grãos.

Além das características necessárias ao mercado consumidor, é necessário que os genótipos comerciais desenvolvidos para fins de alimentação humana apresentem características agrônomicas de interesse, como alta produtividade de grãos, resistência aos principais patógenos e pragas, porte adequado para colheita mecanizada, precocidade, adaptabilidade às diferentes condições de cultivo, dentre outras (CASTOLDI et al., 2011; CHARNAI et al., 2014).

Em relação ao aspecto de resistência genética a fatores bióticos, o nematoide de cisto da soja (NCS - *Heterodera glycines*) é considerado um dos principais responsáveis por prejuízos significativos na produtividade de grãos de soja em todo o mundo. Este patógeno sobrevive no solo e ataca as raízes da planta, apresentando

como sintomas a clorose foliar, necrose da raiz, crescimento reduzido da planta e perda na produção de grãos que podem chegar a 80% (ABDELMAJID et al., 2014).

Devido à importância do NCS, a base genética para a resistência a este patógeno tem sido amplamente estudada nas últimas décadas, primeiramente por meio de estudos clássicos de herança e, posteriormente, com a evolução da biotecnologia, a utilização de marcadores moleculares possibilitou a identificação, localização e caracterização de “quantitative trait loci” (QTL) associados com diversas características de interesse, entre estas, a resistência ao NCS.

Por meio de QTLs, é possível realizar a seleção assistida por marcadores moleculares (MAS), permitindo a seleção precoce de linhagens resistentes com base em marcadores genéticos ligados à resistência, reduzindo as dispendiosas e demoradas avaliações fenotípicas para o NCS (FERREIRA et al., 2011; BAO et al., 2014).

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi estimar os parâmetros genéticos em duas populações de soja provenientes de cruzamentos efetuados entre genótipos do tipo grão x tipo alimento, além de selecionar progênies com características para a alimentação humana e superiores agronomicamente. Além disso, buscou-se validar marcadores moleculares flanqueando dois genes de importância (*rhg1* e *Rhg4*), que conferem resistência ao NCS para estas populações.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos Gerais da Cultura

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill), é um dos legumes de maior importância econômica mundial, sendo uma espécie autógama da família Fabaceae, subfamília Faboideae, com número de cromossomos $2n = 40$. Sua semente é rica em proteína (em torno de 40%) e óleo (em torno de 20%), sendo desta forma amplamente utilizada na alimentação animal e humana (SINGH, 2017).

Por se tratar de uma planta de dias curtos e altamente sensível ao fotoperíodo, o cultivo da soja depende de cultivares adaptadas a diferentes latitudes e temperaturas. Esta característica limitou a produção de soja, pois, fotoperíodos curtos (noites longas) induzem o florescimento e, deste modo, até algum tempo atrás, às

regiões de latitude abaixo de 22° Sul, onde, devido à baixa adaptação das cultivares, o florescimento era antecipado com a consequente baixa produção de grãos em áreas de fotoperíodo curto, inerente de regiões tropicais como o Brasil (LU et al., 2017).

Entretanto, com a identificação do gene de período juvenil longo na década de 1970, esta barreira em relação ao cultivo em altas latitudes foi quebrada e atualmente, é possível o cultivo de soja em uma ampla diversidade de ambientes, como por exemplo, no centro-oeste do Brasil. Devido a isto, foi possível a expansão das áreas cultivadas de soja no Brasil, o qual, em um curto período de tempo se transformou no segundo maior produtor mundial da cultura (LU et al., 2017).

Na safra 2016/2017, os principais estados produtores foram Mato Grosso, Paraná, Rio Grande do Sul e Goiás, os quais representaram 69% da produção total de soja do país.

2.2 Soja na Alimentação Humana

A soja é a principal fonte de proteína vegetal utilizada no mundo, sendo a única fonte de proteína vegetal que contém todos os aminoácidos essenciais para o crescimento e manutenção do organismo (ERDAW et al., 2016; RIGO et al., 2015).

Sua utilização na alimentação humana ainda é considerada baixa, principalmente no ocidente, devido à falta de tradição e ao sabor indesejável associado a alguns genótipos comerciais. Entretanto recentes estudos demonstram as características funcionais do grão de soja e com isto nos últimos anos tem se observado o aumento da demanda por seus derivados (KITAMURA, 1993; SILVA et al., 2012).

Dentre essas substâncias funcionais, pode-se citar: as isoflavonas, responsáveis pela redução de doenças cardiovasculares, redução do câncer de mama e redução dos sintomas da menopausa; antioxidantes, que atuam na prevenção do câncer e protegem o coração; fibras, que auxiliam na redução do colesterol; níveis satisfatórios de cálcio, fósforo e, vitaminas B1 e B2 (CORREA et al., 2010; SILVA et al., 2012).

Cultivares de soja destinadas ao consumo humano, além das características agrônômicas tradicionais, devem apresentar características diferenciadas, que

melhorem o sabor do grão, como maior teor de amido, sacarose, frutose, ácido glutâmico, alanina e proteína; além de preferencialmente, ausência de enzimas lipoxigenases (L1L2L3), baixo teor do inibidor de tripsina Kunitz, que permite redução de tratamento térmico, bem como características físicas ideais como coloração de tegumento e hilo, tamanho, textura e baixo tempo de cozimento (CASTOLDI et al., 2011; CHARNAL et al., 2014; ZOLDAN et al., 2014).

2.3 Parâmetros Genéticos

A seleção precoce é utilizada no melhoramento de plantas autógamas por meio da avaliação e seleção de progênies nos estágios iniciais (F₂, F₃ e F₄). Deste modo progênies com baixo potencial para os caracteres de interesse são eliminadas e os esforços são dirigidos aos genótipos com maiores potenciais (CARVALHO et al., 2009). Este procedimento se baseia na premissa de que a performance da progênie em gerações iniciais é um bom preditor para suas linhagens derivadas (BERNARDO, 2002).

Contudo, a maior parte dos caracteres de importância agrônômica como por exemplo, ciclo da cultura e produção de grãos são de natureza quantitativa e, em geral, muito influenciados pelo ambiente. Nestes casos, é necessário avaliar o quanto da variabilidade fenotípica observada nos experimentos é herdável e quais os principais tipos de ação gênica presentes, para assim escolher o método mais adequado de melhoramento e obter maiores ganhos com a seleção. Estas informações são conhecidas como parâmetros genéticos e são obtidas a partir dos componentes de médias e de variâncias (CRUZ et al., 2004; RAMALHO et al., 2013).

De acordo com Rossmann (2001), a natureza da variabilidade fenotípica observada pode ser estimada por meio dos coeficientes de herdabilidade, correlação fenotípica, genotípica e ambiental, das variâncias genotípicas e fenotípicas, dentre outros parâmetros genéticos, que indicam a natureza da variação observada, possibilitando distinguir a ação do ambiente e o efeito genético, permitindo desta forma, a predição dos ganhos com a seleção.

A herdabilidade (h^2) indica a proporção do valor fenotípico que é de origem genética, ou seja, quantifica o que pode ser herdado. Embora apenas o valor

fenotípico de um indivíduo possa ser mensurado, apenas o valor genético influenciará na próxima geração (RAMALHO et al., 2012).

Segundo Borém (1998), a estimativa da herdabilidade refere-se a uma característica de uma população, sendo específico para o ambiente ao qual os genótipos foram avaliados. O coeficiente de herdabilidade pode variar de 0 a 1, em que, um coeficiente igual a zero indica que a variabilidade observada do caráter não é de origem genética, por outro lado, um coeficiente de herdabilidade igual a 1 indica que toda a variação observada é de origem genética, não havendo influência do ambiente na manifestação do caráter (ALLARD, 1971; RAMALHO et al., 2013).

A herdabilidade também pode ser dividida em dois tipos, sendo: herdabilidade no sentido amplo a qual é calculada por meio da razão entre a variância genotípica pela variância fenotípica e, herdabilidade no sentido restrito, estimada pela razão entre a variância genética aditiva pela variância fenotípica (FALCONER; MACKAY, 1996).

Conforme (FEHR, 1987), no melhoramento de autógamias, quando a herdabilidade é alta, a seleção é eficiente quando aplicada nas gerações iniciais. Em contrapartida, em casos de estimativas baixas de herdabilidade, a seleção deve ser realizada em gerações mais avançadas, devido ao aumento da herdabilidade no sentido restrito, em decorrência da autofecundação.

2.4 Resistência ao Nematóide de Cisto da Soja (NCS)

No Brasil, o nematóide de cisto da soja (NCS) (*Heterodera glycines*) foi detectado pela primeira vez na safra 1991/1992 e atualmente, encontra-se disseminado em praticamente todas as regiões de cultivo, causando perdas em milhões de hectares (ARRIAGADA et al., 2012). Este patógeno sobrevive no solo e ataca as raízes da planta, apresentando como sintomas a clorose foliar, necrose da raiz, crescimento reduzido da planta e perda na produção de grãos que podem chegar a 80% (ABDELMAJID et al., 2014).

Ressalta-se que, após a instalação do patógeno na área, seu controle apresenta grandes dificuldades, devendo ser realizado principalmente por meio de rotação com culturas não hospedeiras e utilização de cultivares resistentes (MATSUO et al., 2012).

Segundo Dias et al. (2009), embora existam várias fontes de resistência ao NCS, nos programas brasileiros de melhoramento genético da soja os genótipos Peking, PI 88788 e Hartwig são utilizados como as principais fontes de resistência.

O genótipo Hartwig foi o primeiro cultivar de soja relatado como resistente a todas as raças conhecidas do NCS. No Brasil, Dias et al. (2009), citam a presença de 11 raças do NCS (1, 2, 3, 4, 4+, 5, 6, 9, 10, 14 e 14+), em 10 estados do Brasil (MS, MT, GO, SP, PR, RS, BA, BA, TO, MA), sendo as raças 3 e 14 as mais disseminadas e importantes do ponto de vista agrícola.

Devido à importância do NCS, a base genética para a resistência a este patógeno tem sido amplamente estudada. Os primeiros genes de resistência foram reportados com base em estudos clássicos de herança, primeiramente por (CALDWELL et al., 1960), que estudando a cultivar Peking encontraram 3 genes recessivos, denominados rhg1, rhg2 e rhg3.

Posteriormente, Matson e Williams (1965) encontraram na cultivar Peking um quarto gene dominante de resistência, denominado Rhg4, gene este ligado ao loco *i*, responsável pela cor preta do tegumento da semente. Um quinto gene dominante oriundo de PI 88788 também foi identificado por Rao-Arelli et al. (1992), sendo este denominado Rhg5, porém as dificuldades envolvidas na realização de testes de alelismo tornava difícil a comprovação de novos genes descobertos em novos estudos com PI's (CONCIBIDO et al., 2004).

Recentemente, com auxílio da biotecnologia a natureza da resistência ao NCS vem sendo amplamente estudada, sendo que dois genes de resistência maior ao NCS, rhg1 e Rhg4 foram sistematicamente mapeados e identificados nos cromossomos 18 e 8 respectivamente, e, posteriormente clonados com sucesso (VUONG et al., 2015).

Brucker et al. (2005), classificaram a resistência do gene rhg1 em dois tipos, sendo, rhg1-A, em "Peking-type" na qual são necessários os genes rhg1-A e Rhg-4 para a resistência, e rhg1-B em PI 88788-type na qual apenas o gene rhg1-B confere a resistência ao genótipo.

2.5 Marcadores Moleculares Associados ao NCS

A seleção de genótipos resistentes ao NCS é um desafio, pois a fenotipagem para esta característica é lenta, destrutiva, muito afetada pelo ambiente e, também, pelo inóculo utilizado. Além disso, o solo utilizado necessita passar pelo processo de infecção, fato que inviabiliza a utilização do mesmo para outros trabalhos de pesquisa.

Com a evolução da biotecnologia, a utilização de marcadores moleculares facilitou a identificação, localização e caracterização de QTLs associados com diversas características de interesse, entre elas a resistência ao NCS. Deste modo, esforços têm sido feitos para desenvolver marcadores moleculares associados com a resistência ao NCS.

Dentre os marcadores moleculares, os do tipo microssatélites ou SSR “simple sequence repeats”, tem sido amplamente utilizados devido suas características desejáveis como: abundancia no genoma, fácil utilização, codominância, *loci* multialélicos, universais e apresentarem resultados confiáveis e reprodutíveis (GROVER; SHARMA, 2014).

De acordo com Mason (2015), os marcadores SSR podem ser classificados de acordo com o motivo, sendo: i) perfeito, quando composto apenas de repetições de um único motivo (ex: ATCATCATCATCATC); ii) imperfeito, se apresentar um par de bases não pertencente ao motivo (ex: CACACACATCACACA); iii) interrompido, se uma sequência com alguns pares de base é inserida no motivo (ex: GAGAGATCCTGCGC); iv) composto, quando formado por múltiplos motivos adjacentes repetitivos (ex: ATATATATCGCGCGCG).

Em relação aos marcadores moleculares associados ao NCS, Concibido et al. (2004), em uma ampla revisão sobre o assunto, citam diversos genes de resistência comuns em alguns estudos e genes inéditos em outros estudos avaliando diferentes PI's.

Segundo Kim e Diers (2013), QTLs de resistência ao nematoide do cisto foram mapeados em 18 dos 20 cromossomos da soja. Destes QTLs, seis foram mapeados e confirmados de acordo com as regras do Comitê de Genética da Soja, incluindo o gene de resistência maior rhg1, com o QTL designado cqSCN-001, o qual foi localizado no cromossomo 18.

Em seguida, foram confirmados os QTLs de resistência cqSCN-002 pertencente ao gene Rhg4 no cromossomo 8, o QTL cqSCN-003 mapeado no cromossomo 16, cqSCN-005 mapeado no cromossomo 17, posteriormente o cqSCN-006 no cromossomo 15 e cqSCN-007 no cromossomo 18 (KIM; DIERS, 2013).

Contudo, embora diversos genes tenham sido identificados, mais de 90% das cultivares comerciais possuem a resistência ao NCS derivadas das plantas introduzidas PI 88788 e PI 548402 (Peking), ou seja, os genes rhg1-(A/B) e Rhg4 (SHI et al., 2015).

Marcadores do tipo Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) foram identificados e reportados como eficientes na identificação de ambos os genes rhg1 (CONCIBIDO et al., 2004; VIERLING et al., 1996) e Rhg4 (MEKSEM et al., 2001; SUZUKI et al., 2012). Marcadores SSR foram ainda mais estudados e aplicados na seleção assistida para a resistência ao NCS (CREGAN et al., 1999; MEKSEM et al., 2001; GUO et al., 2005) e, recentemente marcadores SNP também foram descritos para ambos os loci (BAO et al., 2014; SHI et al., 2015).

Por meio destes QTLs, é possível realizar a seleção assistida por marcadores moleculares (SAM), permitindo a seleção precoce e não destrutiva de linhagens resistentes com base em marcadores genéticos ligados a resistência, reduzindo-se assim as dispendiosas e demoradas avaliações fenotípicas para o NCS (FERREIRA et al., 2011; BAO et al., 2014).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELMAJID, K. M. et al. Quantitative Trait Loci (QTL) that Underlie SCN Resistance in Soybean (*Glycine max* (L.) Merr) PI438489B by ‘ Hamilton ’ Re- combinant Inbred Line (RIL) Population. **Agronomy & Horticulture -- Faculty Publications**, v. 1, n. 3, p. 29–38, 2014.

ALLARD, R. W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. São Paulo: Edgard Blucher, 1971.

ARRIAGADA, O.; FERREIRA, M. F. S.; CERVIGNI, G. D. L.; SCHUSTER, I.; SCAPIM, C. A.; MORA, F. QTL mapping of soybean cyst nematode race 9: a generalized linear modeling approach. **Australian Journal of Crop Science**, v. 9, n. 8, p. 721–727, 2015.

ARRIAGADA, O.; MORA, F.; DELLAROSSA, J. C.; FERREIRA, M. F. S.; CERVIGNI, G. D. L.; SCHUSTER, I. Bayesian mapping of quantitative trait loci (QTL) controlling soybean cyst nematode resistant. **Euphytica**, v. 186, n. 3, p. 907–917, 2012.

BAO, Y.; VUONG, T.; MEINHARDT, C.; TIFFIN, P.; DENNY, R.; CHEN, S.; NGUYEN, H. T.; ORF, J. H.; YOUNG, N. D. Potential of Association Mapping and Genomic Selection to Explore PI 88788 Derived Soybean Cyst Nematode Resistance. **The Plant Genome**, v. 7, n. 3, p. 0, 2014.

BERNARDO, R. **Breeding for quantitative traits in plants**. Woodbury: Stemma Press, 2002.

BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. Viçosa: UFV, 1998.

BRUCKER, E.; NIBLACK, T.; KOPISCH-OBUCH, F. J.; DIERS, B. W. The effect of *rhg1* on reproduction of *Heterodera glycines* in the field and greenhouse and associated effects on agronomic traits. **Crop science**, v. 45, n. 5, p. 1721–1727, 2005.

CALDWELL, B. E.; BRIM, C. A.; ROSS, J. P. Inheritance of Resistance of Soybeans to the Cyst Nematode. **Agronomy Journal**, v. 52, n. 11, p. 635–636, 1960.

CARVALHO, A. D. F.; GERALDI, I. O.; SANTOS, V. D. S. Avaliação de progênies F_{2:4} e F_{4:6} de soja e perspectivas do uso de teste precoce para a produção de grãos. **Bragantia**, v. 68, n. 4, p. 857–861, 2009.

CASTOLDI, R.; VARGAS, P. F.; BRAZ, L. T. Agronomic characteristics, isoflavone content and Kunitz trypsin inhibitor of vegetable soybean genotypes. **Horticultura Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 222–227, 2011.

CHARNAI, K.; MAURO, A. O. Di; SANTIAGO, S. de; VIANNA, V. F.; REVOLTI, L. T. M.; COSTA, M. M. Estimates of genetic parameters in F₄ – F₅ soybean populations resistant to Asian soybean rust. **African Journal of Agricultural Research**, v. 9, n. 15, p. 1200–1206, 2014.

CONAB. **Indicadores Agropecuários: Estimativas 2018**. Disponível em: <www.conab.gov.br>. Acesso em: 20 ago. 2002.

CONCIBIDO, V. C.; DIERS, B. W.; ARELLI, P. R. A Decade of QTL Mapping for Cyst Nematode Resistance in Soybean. **Crop Science**, v. 44, n. July 2003, p. 1121–1131, 2004.

CORREA, C. R. et al. Composition and stability of phytochemicals in five varieties of black soybeans (*Glycine max*). **Food Chemistry**, v. 123, n. 4, p. 1176–1184, 2010.

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

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 3. ed. Viçosa: UFV, 2004.

DIAS, W. P.; SILVA, J. F. V; CARNEIRO, G. E. S.; GARCIA, A.; ARIAS, C. A. A. Nematóide de Cisto da Soja : Biologia e Manejo Pelo Uso da Resistência Genética. **Nematologia Brasileira**, v. 33, n. 1, p. 1–16, 2009.

ERDAW, M. M.; BHUIYAN, M. M.; IJI, P. A. Enhancing the nutritional value of soybeans for poultry through supplementation with new-generation feed enzymes. **World's Poultry Science Journal**, v. 72, n. 2, p. 307–322, 2016.

ESPINDOLA, S. M. C. G.; HAMAWAKI, O. T.; OLIVEIRA, A. P.; HAMAWAKI, C. D. L.; HAMAWAKI, R. L.; TAKAHASHI, L. M. Selecting soybean resistant to the cyst nematode heterodera glycines using simple sequence repeat (microsatellite) markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 1, p. 1–7, 2016.

FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. **Introduction to quantitative genetics**. 4. ed. [s.l.] Trends in Genetics, 1996.

FEHR, W. R. **Principles of cultivar development**. [s.l.] Macmillan publishing company, 1987.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. [s.l.] Embrapa-Cenargen, 1995.

FERREIRA, M. F. da S.; CERVIGNI, G. D. L.; FERREIRA, A.; SCHUSTER, I.; SANTANA, F. A.; PEREIRA, W. D.; BARROS, E. G. de; MOREIRA, M. A. QTLs for resistance to soybean cyst nematode, races 3, 9, and 14 in cultivar Hartwig. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, n. 5, p. 1–22, 2011.

GARDNER, M.; HEINZ, R.; WANG, J.; MITCHUM, M. G. Genetics and Adaptation of Soybean Cyst Nematode to Broad Spectrum Soybean Resistance. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 7, n. 3, p. 835–841, 2017.

GROVER, A.; SHARMA, P. C. Development and use of molecular markers: Past and present. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 290–302, 2014.

GUO, B.; SLEPER, D. A.; ARELLI, P. R.; SHANNON, J. G.; NGUYEN, H. T. Identification of QTLs associated with resistance to soybean cyst nematode races 2, 3 and 5 in soybean PI 90763. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 111, n. 5, p. 965–971, 2005.

HADDAD, P. E.; LEITE, L. G.; LUCON, C. M. M.; HAKAKAVA, R. Selection of Trichoderma spp. strains for the control of sclerotiorum in soybean. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 52, n. 12, p. 1140–1148, 2017.

KADAM, S. et al. Genomic-assisted phylogenetic analysis and marker development for next generation soybean cyst nematode resistance breeding. **Plant Science**, v. 242, p. 342–350, 2016.

- KALENDAR, R.; LEE, D.; SCHULMAN, A. H. Java web tools for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide assembly and analysis. **Development**, v. 98, n. 2, p. 137–144, 2011.
- KIM, M.; DIERS, B. W. Fine mapping of the SCN resistance QTL cqSCN-006 and cqSCN-007 from Glycine soja PI 468916. **Crop Science**, v. 53, n. 3, p. 775–785, 2013.
- KITAMURA, K. Breeding trials for improving the food-processing quality of soybeans. **Trends in Food Science and Technology**, v. 4, n. 3, p. 64–67, 1993.
- LIMA, F. S. O.; CORREA, V. R.; NOGUEIRA, R.; SANTOS, P. R. R. Nematodes Affecting Soybean and Sustainable Practices for Their Management. **Soybean - The Basis of Yield, Biomass and Productivity**, v. 3, p. 95–110, 2017.
- LIU, S. et al. The soybean GmSNAP18 gene underlies two types of resistance to soybean cyst nematode. **Nature Communications**, v. 8, 2017.
- LIU, S. et al. Soybean cyst nematode resistance gene points to a new mechanism of plant resistance to pathogens. **Nature**, v. 492, n. 7428, p. 256–260, 2012.
- LU, S. et al. Natural variation at the soybean J locus improves adaptation to the tropics and enhances yield. **Nature Genetics**, v. 49, n. 5, p. 773–779, 2017.
- MASON, A. S. **Plant Genotyping**. New York: Humana Press, 2015.
- MATSON, A. L.; WILLIAMS, L. F. Evidence of a Four Gene for Resistance to the Soybean Cyst Nematode. **Crop Science**, v. 5, n. 5, p. 477, 1965.
- MATSUO, É.; SEDIYAMA, T.; ARC, R. D.; OLIVEIRA, D. L.; CRUZ, C. D.; CÁSSIA, R. De; OLIVEIRA, T. Characterization of type and genetic diversity among soybean cyst nematode differentiators. **Scientia Agricola**, v. 69, n. 2, p. 147–151, 2012.
- MEKSEM, K.; PANTAZOPOULOS, P.; NJITI, V. N.; HYTEN, L. D.; ARELLI, P. R.; LIGHTFOOT, D. A. “Forrest” resistance to the soybean cyst nematode is bigenic: Saturation mapping of the Rhg1 and Rhg4 loci. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 103, n. 5, p. 710–717, 2001.

RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. D. F.; SANTOS, J. D.; NUNES, J. A. R. **Aplicações da genética quantitativa no melhoramento de plantas autógamas**. Lavras: UFLA, 2012.

RAMALHO, M. A.; PATTO; CARVALHO, B. L.; NUNES, J. A.; RODRIGUES. Perspectives for the use of quantitative genetics in breeding of autogamous plants. **ISRN Genetics**, v. 2013, p. 1–6, 2013.

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.

RESENDE, M. D. V. De. **Selegen-remi/blup**. Colombo: Embrapa Florestas, 2007.

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

RIGO, A. A.; DAHMER, A. M.; STEFFENS, C.; STEFFENS, J.; CARRÃO-PANIZZI, M. C. Characterization of Soybean Cultivars Genetically Improved for Human Consumption. **ETP International Journal of Food Engineering**, v. 1, n. 1, p. 1–7, 2015.

ROSSMANN, H. Estimativas de parâmetros genéticos e fenotípicos de uma população de soja avaliada em quatro anos. **Genética e Melhoramento**, v. Mestrado, p. 80, 2001.

SANTANA, F. A.; SILVA, M. F. da; GUIMARÃES, J. K. F.; FERREIRA, M. F. da S.; PEREIRA, W. D.; PIOVESAN, N. D.; BARROS, E. G. de. Marker-assisted selection strategies for developing resistant soybean plants to cyst nematode. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 14, n. 3, p. 180–186, 2014.

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

SHI, Z.; LIU, S.; NOE, J.; ARELLI, P.; MEKSEM, K.; LI, Z. SNP identification and marker assay development for high-throughput selection of soybean cyst nematode resistance. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 1–12, 2015.

SILVA, E. C.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; MANDARINO, J. M. G.; LEITE, R. S.; MÔNACO, A. P. do A. Teores de isoflavonas em grãos inteiros e nos componentes dos grãos de diferentes cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 2, p. 150–156, 2012.

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

SINGH, R. J. **The Soybean Genome**. 1. ed. [s.l.] Springer, Cham, 2017.

SUZUKI, C.; TANAKA, Y.; TAKEUCHI, T.; YUMOTO, S.; SHIRAI, S. Genetic relationships of soybean cyst nematode resistance originated in Gedenshirazu and PI84751 on Rhg1 and Rhg4 loci. **Breeding Science**, v. 61, n. 5, p. 602–607, 2012.

TEIXEIRA, L. C. A. **ESTUDO GENÉTICO DE POPULAÇÕES DE SOJA COM FONTE DE RESISTÊNCIA À *Heterodera glycines* (RAÇA 3) ORIUNDAS DE TOPOCRUZAMENTOS TIPO ALIMENTO X TIPO GRÃO**. 2016. Universidade Estadual Paulista - UNESP, 2016.

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

VUONG, T. D.; SONAH, H.; MEINHARDT, C. G.; DESHMUKH, R.; KADAM, S.; NELSON, R. L.; SHANNON, J. G.; NGUYEN, H. T. Genetic architecture of cyst nematode resistance revealed by genome-wide association study in soybean. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 1–13, 2015.

YOKOMIZO, G. K. I.; DUARTE, J. B.; VELLO, N. A.; UNFRIED, J. R. Análise AMMI da produtividade de grãos em linhagens de soja selecionadas para resistência à ferrugem asiática. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 48, n. 10, p. 1376–1384, 2013.

ZOLDAN, S. M.; BRAGA, G. de S.; FONSECA, F. J.; CARRÃO-PANIZZI, M. C. Electronic tongue system to evaluate flavor of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) genotypes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 5, p. 797–802, 2014.

CAPITULO 2 – ESTIMATIVA DE PARÂMETROS GENÉTICOS EM POPULAÇÕES ORIUNDAS DE CRUZAMENTOS ENTRE GENÓTIPOS DE SOJA TIPO GRÃO X TIPO ALIMENTO

RESUMO – Além das características agronômicas de interesse, as cultivares de soja destinadas à alimentação humana devem possuir atributos específicos que atendam às exigências do mercado consumidor. Para suprir esta demanda, este trabalho teve como objetivo selecionar progênes com características agronômicas e comerciais de interesse em populações de soja, obtidas a partir de cruzamentos entre genótipos tipo alimento x tipo grão, além de estimar os parâmetros genéticos destas populações. Progênes $F_{2:3}$, $F_{3:4}$ e $F_{4:5}$ oriundas dos dois cruzamentos foram avaliadas nos anos agrícolas 2014/15, 2015/16 e 2016/17, respectivamente, utilizando-se o método genealógico. O delineamento experimental utilizado foi de blocos aumentados e as análises estatísticas foram realizadas pela metodologia REML/BLUP. As características avaliadas foram: altura de plantas na maturidade (APM), altura da inserção da primeira vagem (AIV), acamamento (AC), valor agrônômico (VA), número de vagens por planta (NV), número de dias para maturidade (NDM), número de ramos (NR), número de nós (NN), peso de 100 sementes (PCS) e produção de grãos por planta (PG). Foram selecionadas as progênes superiores e estimados os parâmetros: variância genética, variância fenotípica, herdabilidade e acurácia seletiva. As estimativas dos parâmetros genéticos obtidos indicam elevada variância genética nas populações. A herdabilidade foi alta para a maioria dos caracteres indicando bom potencial para seleção de genótipos superiores.

Palavras-Chave: *Glycine max*, componentes de variância, REML/BLUP, método genealógico

CHAPTER 2 - GENETIC PARAMETERS ESTIMATION IN SOYBEAN POPULATIONS FROM CROSSES BETWEEN GRAIN TYPE X FOOD TYPE GENOTYPES

ABSTRACT – Besides to the agronomic characteristics of interest, soybean cultivars destined for human consumption must have specific attributes that meet the demands of the consumer market. To meet this demand, this work aimed to select progenies with agronomic and commercial traits of interest in soybean populations, obtained from crosses between genotypes type food and grain type, in addition to estimating the genetic parameters of these populations. Progenies $F_{2:3}$, $F_{3:4}$ e $F_{4:5}$ originated from the two crosses were evaluated in the agricultural years 2014/15, 2015/16 and 2016/17, respectively, using the pedigree method. The experimental design was of augmented blocks and statistical analyzes were performed by the REML / BLUP methodology. The evaluated characteristics were: height of plants at maturity (APM), height of first pod insertion (AIV), lodging (AC), agronomic value (VA), number of pods per plant (NV), number of days to maturity (NDM), number of branches (NR), number of nodes (NN), weight of 100 seeds (PCS) and grain yield per plant (PG). the best progenies were selected and the genetic parameters estimated were: genetic variance, phenotypic variance, heritability and selective accuracy. Estimates of the genetic parameters obtained indicate high genetic variance in the populations. Heritability was high for most of the traits indicating good potential for selection of superior genotypes.

Keywords: *Glycine max*, variance components, REML/BLUP, pedigree method.

1. INTRODUÇÃO

O melhoramento convencional continua sendo o método mais utilizado para seleção de genótipos com combinações específicas para caracteres agronômicos e comerciais desejáveis (JAUREGUY et al., 2011).

Em plantas autógamas como a soja, os métodos de seleção combinam os caracteres de interesse por meio de cruzamento entre linhagens elite e/ou germoplasma exótico, utilizando-se normalmente entre dois a quatro genitores. Em seguida, as progênies destas populações são selecionadas durante as gerações de endogamia, ou após atingir a homozigose, dependendo do método utilizado, identificando genótipos superiores com base em diversas características de interesse avaliadas (BORÉM, 2009).

O método genealógico, baseia-se na seleção de progênies superiores desde as gerações iniciais (F₂ a F₅) onde, neste caso, genótipos com baixo potencial agronômico são eliminados e apenas as progênies superiores são aproveitadas na próxima geração (CARVALHO et al., 2008). Este método se baseia no princípio de que o desempenho da progênie nas gerações iniciais é um bom preditor para o desempenho de suas linhagens derivadas (BERNARDO, 2003).

No caso de cultivares de soja destinadas ao consumo humano, além das características agronômicas tradicionais para a cultura, os genótipos devem apresentar características específicas para o mercado consumidor, como por exemplo, características físicas ideais de coloração do tegumento e hilo, tamanho e textura, além de atributos que melhorem o sabor do grão, como maior teor de amido, sacarose, frutose, ácido glutâmico, alanina e proteína, ausência de enzimas lipoxigenases e baixo teor do inibidor de tripsina Kunitz, que permite redução de tratamento térmico (CASTOLDI et al., 2011; ZOLDAN et al., 2014).

Entretanto, como a maioria destes caracteres são de natureza quantitativa e muito influenciados pelo ambiente, é indispensável se determinar o quanto da variabilidade fenotípica avaliada nos experimentos é herdável, ou seja, de natureza genética, para assim escolher a melhor estratégia de seleção e obter maiores ganhos.

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi selecionar progênies superiores de duas populações de soja provenientes de cruzamentos entre genótipos do tipo grão x tipo alimento, por meio do método genealógico e estimar os parâmetros genéticos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

- Material Genético

Foram avaliadas progênies $F_{2:3}$, $F_{3:4}$ e $F_{4:5}$ de soja provenientes do cruzamento entre as cultivares BRSMG 810C x BRSMG 790A (população A) e BRSMG 810C x BRSMG 800A (população B). Estas populações são uma continuidade do trabalho realizado por Teixeira (2016), e estes genitores foram selecionados visando a obtenção de novas cultivares de soja com características agrônômicas e comerciais de interesse para alimentação humana, em conjunto com a resistência ao nematoide de cisto da soja (NCS) proveniente da cultivar BRSMG 810C.

A cultivar BRSMG 810C consiste de um genótipo classificado como tipo grão, com crescimento determinado, ciclo médio (114 – 140 dias), resistência ao acamamento, tegumento amarelo e hilo preto, alto teor de proteínas e resistência ao nematoide de cisto raças 1 e 3, à mancha “olho de rã”, ao cancro da haste e a pústula bacteriana.

A cultivar BRSMG 790A possui características organolépticas, nutricionais e industriais favoráveis ao consumo humano e à indústria de alimentos. Apresenta crescimento determinado, ciclo médio (110 – 130 dias), tegumento e hilo amarelo, alta taxa de carboidratos e sabor suave. Possui resistência à mancha “olho de rã”, cancro da haste e ao nematoide das galhas (*Meloidogyne incognita*), porém apresenta suscetibilidade ao NCS.

A cultivar BRSMG 800A apresenta crescimento determinado, ciclo médio (120 – 140 dias) e resistência ao acamamento. Possui tegumento marrom e após o cozimento apresenta características físicas semelhantes ao feijão tipo “carioca”, conferindo maior aceitabilidade para o consumo humano na alimentação.

- Local de Condução do Experimento

Três experimentos foram conduzidos durante os anos agrícolas de 2014/15, 2015/16 e 2016/17, no município de Jaboticabal, localizado no norte do Estado de São Paulo, a 21°15'22" de latitude sul e 48°18'58" de longitude oeste, com altitude aproximada de 605 m. O solo predominante da área é classificado como Latossolo Vermelho Eutrófico. De acordo com a classificação de Köppen, o clima da região é do tipo Cwa, apresentando verão quente e úmido, com inverno seco, temperatura e precipitação média anual de 22,2 °C e 1.451 mm, respectivamente (VIANNA et al., 2013).

- Tratos Culturais

No ano agrícola 2014/15, a semeadura foi realizada sob o sistema de plantio convencional. Nos anos agrícolas 2015/16 e 2016/17, as semeaduras foram realizadas pelo sistema de plantio direto. A adubação de acordo com a análise química do solo e recomendação para a cultura (EMBRAPA, 2014), sendo aplicados 350 kg.ha⁻¹ do formulado NPK 00-20-20. No momento da semeadura, as sementes foram inoculadas com *Bradyrhizobium japonicum*.

Durante todo o desenvolvimento da cultura foram realizados manejos para controle de insetos e doenças, por meio da aplicação de inseticidas e fungicidas, respectivamente. O controle de plantas daninhas foi realizado por meio de capina manual. Nos estádios de desenvolvimento inicial, quando necessário, foi realizada irrigação por meio de aspersão.

- Avaliação dos genótipos

No ano agrícola 2014/15, foram avaliadas 327 progênies F_{2:3}, selecionadas de acordo com o tegumento desejado para alimentação humana, sendo, 180 da população "A" e 147 da população "B". Neste experimento foi realizada seleção entre e dentro de progênies e, 386 plantas foram selecionadas levando-se em consideração a coloração do tegumento e hilo com características de mercado para a alimentação humana e, também, para atributos agronômicos de interesse. Destas 386 plantas, 204 pertenciam à população "A" e 182 à população "B".

Em 2015/16, as 386 progênies $F_{3:4}$ foram semeadas e novamente selecionadas, primeiramente em função dos atributos de mercado para a alimentação humana e caracteres agronômicos. Em seguida, 80 famílias $F_{3:4}$, (40 de cada população) com desempenho produtivo superior foram selecionadas, e de cada uma destas famílias 3 plantas individuais com a maior produção de grãos por planta (dentre as 6 plantas avaliadas em cada parcela) foram selecionadas, totalizando-se assim 240 plantas selecionadas, sendo 120 de cada família.

Posteriormente, no ano agrícola 2016/17, as 240 progênies $F_{4:5}$ foram semeadas e avaliadas para os mesmos caracteres acima descritos.

Os experimentos foram realizados por meio do delineamento de blocos aumentados de Federer. Foram utilizadas como testemunha os três genitores (BRSMG 810C, BRSMG 790A e BRSMG 800A) e a cultivar comercial TMG 7262. Este delineamento foi adotado devido à baixa quantidade de sementes disponíveis por progênies, impossibilitando o uso de delineamentos estatísticos com repetições. Cada parcela foi constituída por uma linha de 5 m de comprimento, espaçadas de 0,5 m entre linhas, com uma densidade de 12 a 15 plantas por metro.

- Caracteres Avaliados

Foram selecionadas e avaliadas seis plantas individuais dentro de cada parcela para os seguintes caracteres: altura de planta na maturidade (APM), em centímetros, da superfície do solo até o ápice da haste principal; altura de inserção da primeira vagem (AIV), em centímetros, da superfície do solo até a inserção da primeira vagem, acamamento (AC), escala de notas visuais, variando de 1 (planta ereta) a 5 (planta prostrada); valor agronômico (VA), escala de notas visuais, variando de 1 (planta ruim) a 5 (planta excelente); número de vagens por planta (NV), contagem do número total de vagens; número de nós (NN), contagem do número de nós da haste principal; número de ramos (NR), contagem do número de ramos derivados da haste principal, número de dias para maturidade (NDM), contagem em dias a partir da germinação até a maturidade no estágio R8; peso de 100 sementes (PCS), expresso em gramas; produção de grãos (PG), peso total dos grãos de cada planta, expresso em gramas, cor do tegumento e cor do hilo.

- Análises Estatísticas

Os três experimentos foram analisados via metodologia de modelos lineares mistos (procedimento REML/BLUP), sendo estas realizadas com auxílio do software estatístico SELEGEN (RESENDE, 2007).

Devido ao delineamento de blocos aumentados ser desbalanceado e não ortogonal por construção, optou-se por realizar a análise de deviance (ANADEV), ou teste de razão de verossimilhança (LRT). Segundo Resende (2007), esta análise deve ser preferida para substituir o teste F da ANOVA quando se utiliza a análise de modelos mistos com dados desbalanceados, para isto, a significância foi testada pelo teste de Qui-quadrado a 5% e 1% de probabilidade (MCCULLAGH, 1984). Por meio do software Selegen, as deviances podem ser obtidas utilizando o modelo com ou sem os efeitos a serem testados, zerando os coeficientes de determinação correspondentes.

Os dados de cada população na geração $F_{2:3}$ foram analisados separadamente a partir dos dados de plantas individuais. Foi utilizado o modelo genético-estatístico do Selegen (número 60), para linhagens derivadas de um cruzamento em geração F_2 .

$$y = Xr + Za + e$$

Onde: y = vetor de dados, r = vetor de repetição (assumidos como fixos) somados à média geral; a = vetor dos efeitos genéticos aditivos individuais (assumidos como aleatórios); e = vetor de erros ou resíduos (aleatórios).

As letras maiúsculas representam as matrizes de incidência para os referidos efeitos.

As progênies $F_{3:4}$ e $F_{4:5}$ foram analisadas a partir dos dados de média de parcela, utilizando-se o modelo 17 do Selegen, onde:

$$y = Xf + Zg + Wb + e$$

Onde: y = vetor de dados, f = vetor dos efeitos assumidos como fixos; g = vetor dos efeitos genotípicos (assumidos como aleatórios); b = vetor dos efeitos ambientais de blocos (assumidos como aleatórios); e = vetor de erros ou resíduos (aleatórios);

As letras maiúsculas representam as matrizes de incidência para os referidos efeitos.

- Componentes de Variância

Foram estimados os seguintes componentes de variância:

h^2 : herdabilidade a nível de parcelas individuais no sentido amplo:

$$h^2 = \frac{\sigma_g^2}{\sigma_f^2}$$

H^2_d : herdabilidade dentro de parcela, equivalendo a herdabilidade no sentido restrito, desde que ignorada a fração (1/4) da variância genética de dominância, o que não afeta a seleção de indivíduos, pois as duas herdabilidades são utilizadas no cômputo dos valores genéticos. Estando as duas estimativas inflacionadas pela mesma quantidade, a proporcionalidade entre elas não será afetada (RESENDE, 2007).

$$h_{ad}^2 = \frac{\left[\left(\frac{1}{2}\right)/n\right] \sigma_g^2}{\frac{\sigma_e^2}{n}}$$

Acgen: acurácia da seleção de genótipos, assumindo sobrevivência completa.

$$Ac = \sqrt{h^2}$$

CV_g: Coeficiente de variação genético:

$$CV_g = \frac{\sqrt{\sigma_g^2}}{\mu}$$

CV_e: Coeficiente de variação ambiental:

$$CV_e = \frac{\sqrt{\sigma_e^2}}{\mu}$$

CV_g/CV_e : Coeficiente de variação relativa:

$$CV_g/CV_e = \frac{CV_g}{CV_e}$$

Em que, os componentes n , μ , σ^2_g , σ^2_e e σ^2_f , referem-se ao número de indivíduos por parcela, média, variâncias genética, ambiental e fenotípica, respectivamente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a análise de deviance, detectou-se efeito significativo de genótipos ($p < 0,01$) para todas as características avaliadas nas progênies $F_{2:3}$ de ambas as populações (Tabela 1). Em relação às progênies $F_{3:4}$ (Tabela 2), foi observado que na população “A” apenas para o caráter VA não houve efeito significativo de genótipos. Para todos os outros caracteres avaliados nas populações $F_{2:3}$, foi detectado efeito significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Considerando as progênies $F_{4:5}$ (Tabela 3), houve efeito significativo de genótipos para todos os caracteres em ambas as populações, exceto o caráter AC na população “A”. Estes resultados indicam a presença de variabilidade genética para estas características, o que torna possível a seleção de genótipos para os mesmos.

Os coeficientes de variação ambiental observados (CV_e) nas progênies $F_{2:3}$ (Tabela 4) variaram entre 1,52% (NDM) e 40,38% (PG) na população “A” e entre 1,33% (NDM) e 39,67% (NV) para a população “B”. Considerando as progênies $F_{3:4}$ (Tabela 5) os coeficientes de variação ambiental (CV_e) ficaram entre 1,04% (NDM) e 35,00% (NV) na população “A” e entre 0,85% (NDM) e 49,58% (NR) na população “B”. Em relação as progênies $F_{4:5}$ (Tabela 6) os CV_e observados variaram entre 1,87% (NDM) e 31,13% (AC) para população “A” e entre 1,83% (NDM) e 33,44% (AC) para a população “B”.

Storck et al. (2010), avaliando diversos ensaios de competição com cultivares de soja, verificaram que o coeficiente de variação médio foi de 13,3% para a produtividade de grãos, com um valor mínimo de 3,5% e máximo de 33,9%.

Tabela 1. Análise de deviance (ANADEV) das características agrônômicas avaliadas em progênies F_{2:3} de soja, em Jaboticabal – SP, durante o ano agrícola 2014/2015.

População A - BRSMG 790A x BRSMG 810C					
PG			APM		
Efeito	Deviance	LRT	Efeito	Deviance	LRT
Genótipo	2941,0	85,8**	Genótipo	2297,8	188,8**
Modelo	3026,8		Modelo	2486,6	
PCS			AIV		
Genótipo	1059,9	123,4**	Genótipo	1764,4	36,0**
Modelo	1183,3		Modelo	1800,4	
NV			VA		
Genótipo	3709,3	87,8**	Genótipo	-366,0	168,0**
Modelo	3797,1		Modelo	-198,0	
NN			AC		
Genótipo	1147,15	104,0**	Genótipo	-202,0	31,0**
Modelo	1251,19		Modelo	-171,0	
NR			NDM		
Genótipo	861,54	47,7**	Genótipo	1039,9	29,0*
Modelo	909,2		Modelo	1068,9	
População B - BRSMG 800A x BRSMG 810C					
PG			APM		
Efeito	Deviance	LRT	Efeito	Deviance	LRT
Genótipo	2656,2	63,3**	Genótipo	2040,2	145,1**
Modelo	2719,5		Modelo	2185,3	
PCS			AIV		
Genótipo	908,4	144,6**	Genótipo	874,5	58,8**
Modelo	1053		Modelo	933,4	
NV			VA		
Genótipo	3436,9	29,2**	Genótipo	-222,2	64,9**
Modelo	3466,1		Modelo	-157,3	
NN			AC		
Genótipo	987,4	60,9**	Genótipo	-176,1	6,8**
Modelo	1048,3		Modelo	-169,3	
NR			NDM		
Genótipo	948,2	87,6**	Genótipo	853,6	32,2*
Modelo	1035,8		Modelo	885,8	

NDM: número de dias para maturidade; APM: altura de plantas na maturidade (cm); AIV: altura da inserção da primeira vagem (cm); AC: acamamento (escala de notas); VA: valor agrônômico (escala de notas); NR: número de ramos (contagem); NN: número de nós (contagem); NV: número de vagens (contagem); PCS: peso de 100 sementes; PG: peso de grãos (gramas por planta). *, **: significativo a 5% e 1% pelo teste de qui-quadrado (5%= 3,84; 1%=6,63).

Tabela 2. Análise de deviance (ANADEV) das características agrônômicas avaliadas em progênies de soja na geração F_{3:4}, em Jaboticabal – SP, durante o ano agrícola 2015/2016.

População A - BRSMG 790A x BRSMG 810C					
PG			APM		
Efeito	Deviance	LRT	Efeito	Deviance	LRT
Genótipo	1659,0	25,4**	Genótipo	1371,7	2,6**
Modelo	1684,4		Modelo	1374,3	
PCS			AIV		
Genótipo	642,0	40,1**	Genótipo	967,5	35,0**
Modelo	682,1		Modelo	1002,5	
NV			VA		
Genótipo	2148,0	14,1**	Genótipo	-200,1	3,6 ^{ns}
Modelo	2162,1		Modelo	-196,5	
NN			AC		
Genótipo	656,7	10,4**	Genótipo	-206,2	6,9**
Modelo	667,1		Modelo	-199,3	
NR			NDM		
Genótipo	478,9	13,1**	Genótipo	641,8	311,3**
Modelo	492,0		Modelo	953,1	
População B - BRSMG 800A x BRSMG 810C					
PG			APM		
Efeito	Deviance	LRT	Efeito	Deviance	LRT
Genótipo	1577,5	15,7**	Genótipo	1386,5	4,3*
Modelo	1593,2		Modelo	1390,8	
PCS			AIV		
Genótipo	652,0	40,0**	Genótipo	630,6	42,2**
Modelo	692,0		Modelo	672,8	
NV			VA		
Genótipo	2202,7	20,1**	Genótipo	494,2	101,9**
Modelo	2222,8		Modelo	596,1	
NN			AC		
Genótipo	651,3	22,6**	Genótipo	-286,0	27,3**
Modelo	673,9		Modelo	-258,7	
NR			NDM		
Genótipo	386,7	47,7**	Genótipo	513,4	401,4**
Modelo	434,4		Modelo	914,8	

NDM: número de dias para maturidade; APM: altura de plantas na maturidade (cm); AIV: altura da inserção da primeira vagem (cm); AC: acamamento (escala de notas); VA: valor agrônômico (escala de notas); NR: número de ramos (contagem); NN: número de nós (contagem); NV: número de vagens (contagem); PCS: peso de 100 sementes; PG: peso de grãos (gramas por planta).

*, **: significativo a 5% e 1% pelo teste de qui-quadrado (5%= 3,84; 1%=6,63). ns: não significativo a 5%.

Tabela 3. Análise de deviance (ANADEV) das características agrônômicas avaliadas em progênies F_{4:5} de soja, em Jaboticabal – SP, durante o ano agrícola 2016/2017.

População A - BRSMG 790A x BRSMG 810C					
PG			APM		
Efeito	Deviance	LRT	Efeito	Deviance	LRT
Genótipo	1346,9	54,8**	Genótipo	1282,13	120,1**
Modelo	1401,7		Modelo	1402,19	
PCS			AIV		
Genótipo	320,43	43,7**	Genótipo	792,69	18,5**
Modelo	364,1		Modelo	811,21	
NV			VA		
Genótipo	1792,29	49,3**	Genótipo	-33,39	113,5**
Modelo	1841,58		Modelo	80,1	
NN			AC		
Genótipo	532,14	15,3**	Genótipo	-132,3	0,0 ^{ns}
Modelo	547,47		Modelo	-132,3	
NR			NDM		
Genótipo	389,91	37,6**	Genótipo	745,3	281,5**
Modelo	427,46		Modelo	1026,8	
População B - BRSMG 800A x BRSMG 810C					
PG			APM		
Efeito	Deviance	LRT	Efeito	Deviance	LRT
Genótipo	1520	38,4**	Genótipo	1475,5	90,4**
Modelo	1559		Modelo	1565,9	
PCS			AIV		
Genótipo	365,1	41,7**	Genótipo	914,6	17,6**
Modelo	406,8		Modelo	932,1	
NV			VA		
Genótipo	2043,6	56,6**	Genótipo	-6,3	106,0**
Modelo	2100,2		Modelo	99,7	
NN			AC		
Genótipo	655,9	19,2**	Genótipo	-163,7	4,0*
Modelo	675,2		Modelo	-159,7	
NR			NDM		
Genótipo	442,7	21,0**	Genótipo	837,0	305,3**
Modelo	463,7		Modelo	1142,3	

NDM: número de dias para maturidade; APM: altura de plantas na maturidade (cm); AIV: altura da inserção da primeira vagem (cm); AC: acamamento (escala de notas); VA: valor agrônômico (escala de notas); NR: número de ramos(contagem); NN: número de nós (contagem); NV: número de vagens (contagem); PCS: peso de 100 sementes; PG: peso de grãos (gramas por planta).

*, **: significativo a 5% e 1% pelo teste de qui-quadrado (5%= 3,84; 1%=6,63). ns: não significativo a 5%.

Entretanto, os autores mencionados avaliaram experimentos com cultivares comerciais, ou seja, em homozigose e em delineamento de blocos ao acaso. Pinheiro et al. (2013) relataram CVe para produtividade de grãos de 27,8% e 20,0% para progênies F_{4:6} e F_{4:7}, respectivamente. Não obstante, Bhat et al. (2012) citam CVe

superiores aos observados neste experimento, com 50,41% para produtividade de grãos em progênies F_{2:3}. Em relação as outras características, os coeficientes de variação obtidos foram semelhantes aos obtidos por Andrade et al. (2016) e Bhat et al. (2012).

Tabela 4. Estimativas de parâmetros genéticos estimados para os caracteres agrônômicos avaliados em progênies F_{2:3} de soja, em Jaboticabal – SP, durante o ano agrícola 2014/2015.

População A - BRSMG 790A x BRSMG 810C										
Parâmetro	PG	PCS	NV	NN	NR	VA	AC	APM	AIV	NDM
	gr/planta	gramas	contagem			escala de notas		cm		dias
σ^2_g	189,90	2,69	1236,81	2,89	0,82	0,11	0,05	78,18	6,02	0,91
σ^2_e	327,90	3,33	2091,50	4,21	2,29	0,11	0,18	62,26	20,74	3,66
σ^2_f	517,80	6,03	3328,40	7,10	3,11	0,21	0,23	140,44	26,77	4,57
h^2	0,37	0,44	0,37	0,41	0,26	0,52	0,21	0,56	0,23	0,20
h^2_{mp}	0,77	0,83	0,78	0,80	0,68	0,87	0,61	0,88	0,64	0,60
h^2_{ad}	0,29	0,40	0,29	0,34	0,18	0,55	0,13	0,63	0,15	0,12
Acclon	0,88	0,91	0,88	0,89	0,82	0,93	0,78	0,94	0,80	0,77
CVg%	30,70	9,51	30,67	11,92	21,68	9,92	16,82	11,75	19,52	0,76
CVe%	40,38	10,58	39,90	14,36	36,20	9,46	32,80	10,40	36,21	1,52
CVg/CVe	0,76	0,90	0,77	0,83	0,60	1,05	0,51	1,13	0,54	0,50
Média	44,84	17,24	114,64	14,28	4,18	3,37	1,30	75,22	12,58	126,25
População B - BRSMG 800A x BRSMG 810C										
Parâmetro	PG	PCS	NV	NN	NR	VA	AC	APM	AIV	NDM
	gr/planta	gramas	contagem			escala de notas		cm		dias
σ^2_g	169,24	3,00	814,63	1,85	2,19	0,75	0,02	62,99	1,34	0,84
σ^2_e	345,52	2,84	3015,29	3,91	3,38	0,15	0,20	59,44	2,89	2,89
σ^2_f	514,76	5,83	3829,92	5,76	5,57	0,23	0,22	122,44	4,23	3,72
h^2	0,33	0,51	0,21	0,32	0,39	0,33	0,09	0,51	0,32	0,22
h^2_{mp}	0,75	0,86	0,62	0,74	0,79	0,75	0,38	0,86	0,73	0,63
h^2_{ad}	0,25	0,53	0,14	0,24	0,32	0,25	0,05	0,53	0,23	0,14
Acclon	0,86	0,86	0,78	0,86	0,89	0,87	0,62	0,93	0,86	0,80
CVg%	24,84	10,03	20,62	9,82	30,92	8,20	11,42	11,59	10,73	0,72
CVe%	35,49	9,76	39,67	13,82	38,38	11,60	35,32	11,26	15,80	1,33
CVg/CVe	0,70	1,03	0,52	0,71	0,81	0,71	0,32	1,03	0,68	0,54
Média	52,38	17,26	138,00	14,30	4,78	3,34	1,26	68,46	10,76	127,82

σ^2_g : variância genética, equivalendo a variância genética aditiva mais (1/4) variância de dominância, ignorando-se os componentes D1 e D2; σ^2_e : variância ambiental; σ^2_f : variância fenotípica; h^2 : herdabilidade individual no sentido amplo entre famílias, equivalente à herdabilidade no sentido restrito desde que ignorada a fração (1/4) da variância de dominância; h^2_{mp} : herdabilidade da média de progênie, assumindo sobrevivência completa; h^2_{ad} : herdabilidade aditiva dentro de parcela, desde que ignorada a fração (1/4) da variância genética de dominância; CVg: coeficiente de variação genético; CVe: coeficiente de variação ambiental; CVg/CVe: razão entre o coeficiente de variação genético e o coeficiente de variação ambiental.

NDM: número de dias para maturidade; APM: altura da planta na maturidade; AIV: altura da inserção da primeira vagem; AC: acamamento; VA: valor agrônômico; NR: número de ramos; NN: número de nós; NV: número de vagens; PCS: peso de 100 sementes; PG: produtividade de grãos

Tabela 5. Parâmetros genéticos estimados para os caracteres agrônômicos avaliados em progênies F_{3:4} de soja, em Jaboticabal – SP, durante o ano agrícola 2015/2016.

População A - BRSMG 790A x BRSMG 810C										
Parâmetro	PG	PCS	NV	NN	NR	VA	AC	APM	AIV	NDM
	gr/planta	gramas	----- contagem -----			escala de notas		----- cm -----		dias
σ^2_g	315.89	1.72	1735.46	3.13	0.63	0.02	0.05	21.11	22.32	4.99
σ^2_b	6.09	0.00	89.31	0.01	0.09	0.00	0.01	0.04	0.01	0.12
σ^2_e	128.09	3.79	1415.00	3.06	2.05	0.14	0.10	92.84	4.88	1.51
σ^2_f	450.07	5.52	3240.15	6.20	2.77	0.16	0.16	113.98	27.21	6.62
h^2	0.70	0.31	0.54	0.50	0.23	0.14	0.31	0.19	0.82	0.75
Acclon	0.84	0.56	0.74	0.71	0.48	0.38	0.56	0.43	0.91	0.88
CVg%	46.93	8.04	38.75	12.12	18.63	4.57	17.95	5.82	35.56	1.89
CVe%	29.88	11.93	35.00	11.98	33.74	11.26	26.41	12.21	16.63	1.04
CVg/CVe	1.57	0.67	1.11	1.01	0.55	0.41	0.68	0.48	2.14	1.82
Média	37.87	16.31	107.48	14.60	4.24	3.27	1.23	78.87	13.29	118.16
População B - BRSMG 790A x BRSMG 810C										
Parâmetro	PG	PCS	NV	NN	NR	VA	AC	APM	AIV	NDM
	gr/planta	gramas	----- contagem -----			escala de notas		----- cm -----		dias
σ^2_g	167.92	1.86	2916.17	3.09	0.76	5.14	0.03	31.43	1.79	2.59
σ^2_b	0.23	0.00	5.31	0.11	0.00	0.00	0.01	0.05	0.25	0.10
σ^2_e	130.05	3.90	1382.22	2.87	1.23	0.14	0.08	91.39	3.34	1.04
σ^2_f	298.21	5.77	4303.71	6.09	2.00	5.29	0.11	122.88	5.38	3.74
h^2	0.56	0.32	0.68	0.51	0.38	0.97	0.26	0.26	0.33	0.69
Acclon	0.75	0.57	0.82	0.72	0.62	0.99	0.53	0.51	0.59	0.84
CVg%	32.66	7.75	43.32	11.48	39.02	64.99	12.00	7.38	13.79	1.34
CVe%	28.74	11.21	29.82	11.07	49.58	10.91	19.17	12.58	18.79	0.85
CVg/CVe	1.14	0.69	1.45	1.04	0.79	5.96	0.63	0.59	0.73	1.58
Média	39.67	17.60	124.63	15.32	2.23	3.49	1.45	75.24	9.72	119.92

σ^2_g : variância genética; σ^2_e : variância ambiental entre blocos; σ^2_b : variância ambiental; σ^2_f : variância fenotípica; h^2 : herdabilidade de parcelas individuais no sentido amplo; H^2_m : herdabilidade ajustada da média da progênie, assumindo sobrevivência completa; Ac: acurácia da seleção de genótipos, assumindo sobrevivência completa; CVg: coeficiente de variação genético; CVe: coeficiente de variação ambiental; CVg/CVe: razão entre o coeficiente de variação genético e o coeficiente de variação ambiental. NDM: número de dias para maturidade; APM: altura da planta na maturidade; AIV: altura da inserção da primeira vagem; AC: acamamento; VA: valor agrônômico; NR: número de ramos; NN: número de nós; NV: número de vagens; PCS: peso de 100 sementes; PG: produtividade de grãos.

Tabela 6. Parâmetros genéticos estimados para os caracteres agrônômicos avaliados em progênies F_{4:5} de soja, em Jaboticabal – SP, durante o ano agrícola 2016/2017.

População A - BRSMG 790A x BRSMG 810C										
Parâmetro	PG	PCS	NV	NN	NR	VA	AC	APM	AIV	NDM
	gr/planta	gramas	----- contagem -----				escala de notas	----- cm -----		dias
σ^2_g	150.58	0.40	1138.36	1.76	1.92	0.20	0.01	79.70	8.74	6.16
σ^2_b	0.10	0.05	2.09	0.01	0.01	0.00	0.00	1.02	0.01	0.05
σ^2_e	49.09	1.14	340.44	2.51	0.95	0.16	0.19	52.30	6.11	5.43
σ^2_f	199.76	1.58	1480.89	4.27	2.88	0.36	0.20	133.02	14.86	11.65
h^2g	0.75	0.25	0.77	0.41	0.67	0.55	0.02	0.60	0.59	0.53
Acclon	0.87	0.51	0.88	0.64	0.82	0.74	0,15	0.78	0.77	0.73
CVg%	31.66	4.15	33.84	8.42	39.09	14.78	4.64	9.27	23.99	1.99
CVe%	18.09	7.02	18.51	10.04	27.53	13.35	31.13	7.51	20.06	1.87
CVg/CVe	1.75	0.59	1.83	0.84	1.42	1.11	0.15	1.23	1.20	1.06
Média	38.76	15.19	99.70	15.76	3.55	3.03	1.41	96.28	12.32	124.99
População B - BRSMG 790A x BRSMG 810C										
Parâmetro	PG	PCS	NV	NN	NR	VA	AC	APM	AIV	NDM
	gr/planta	gramas	----- contagem -----				escala de notas	----- cm -----		dias
σ^2_g	133.87	0.37	1175.83	2.96	1.91	0.24	0.42	85.91	9.53	5.81
σ^2_b	2.18	0.00	27.68	0.00	0.01	0.00	0.00	0.41	0.01	0.02
σ^2_e	48.08	1.20	311.32	2.51	0.98	0.17	0.15	55.91	6.12	5.26
σ^2_f	184.13	1.57	1514.83	5.47	2.91	0.41	0.20	142.23	15.66	11.08
h^2g	0.73	0.23	0.78	0.54	0.66	0.58	0.22	0.60	0.61	0.52
Acclon	0.86	0.48	0.89	0.74	0.81	0.76	0.47	0.78	0.78	0.72
CVg%	32.98	3.79	33.50	11.59	46.70	15.94	13.56	9.22	23.99	1.93
CVe%	19.77	6.85	17.23	10.68	33.44	13.59	25.56	7.44	19.22	1.83
CVg/CVe	1.67	0.55	1.94	1.09	1.40	1.17	0.53	1.24	1.25	1.05
Média	35.08	16.01	102.36	14.84	2.96	3.05	1.52	100.45	12.86	123.97

σ^2_g : variância genética; σ^2_e : variância ambiental entre blocos; σ^2_b : variância ambiental; σ^2_f : variância fenotípica; h^2 : herdabilidade de parcelas individuais no sentido amplo; H^2_m : herdabilidade ajustada da média da progênie, assumindo sobrevivência completa; Ac: acurácia da seleção de genótipos, assumindo sobrevivência completa; CVg: coeficiente de variação genético; CVe: coeficiente de variação ambiental; CVg/CVe: razão entre o coeficiente de variação genético e o coeficiente de variação ambiental. NDM: número de dias para maturidade; APM: altura da planta na maturidade; AIV: altura da inserção da primeira vagem; AC: acamamento; VA: valor agrônômico; NR: número de ramos; NN: número de nós; NV: número de vagens; PCS: peso de 100 sementes; PG: produtividade de grãos.

De acordo com Brogin et al. (2003), valores de herdabilidade no sentido amplo são considerados baixos quando inferiores à 0,30, intermediários entre 0,30 e 0,60 e altos quando superiores a 0,60. Estes autores, também, citam que herdabilidades superiores a 30% permitem ganhos genéticos por meio da seleção em gerações iniciais de endogamia, como em progênies F₃ ou F₄.

Com exceção do caráter AC na população 2, as estimativas de herdabilidade da média de progênie observadas na geração F_{2:3} (Tabela 4), foram consideradas

altas ($>0,60$), indicando que a maior parte da variação observada é decorrente dos efeitos genéticos, o que propicia alta precisão na seleção.

O caráter produção de grãos apresentou herdabilidade média de progênies de 0,77 e 0,75 para a população “A e B” respectivamente. Estes valores são próximos dos obtidos por Bhat et al. (2012), que avaliando duas populações de progênies $F_{2:3}$ relatam valores de herdabilidade no sentido amplo de 67,95% e 84,04% para produção de grãos por planta, 79,54% e 91,25% para PCS e de 94,18% e 92,97% para número de vagens por planta.

Entretanto, os mesmos autores citados acima observaram baixos valores de herdabilidade no sentido amplo para o caráter NDM, sendo de 20,54% e 29,79%. Ressalta-se ainda, que a estimativa da herdabilidade refere-se a uma característica de uma população, sendo específico para o ambiente ao qual os genótipos foram avaliados (BORÉM et al., 1999).

A acurácia da seleção de progênies indica a qualidade das informações e nos métodos utilizados na predição dos valores genéticos. De maneira geral, os valores observados de acurácia foram de alta magnitude variando entre 0,77 e 0,94, com exceção da variável AC, na população 2, com a acurácia de 0,62. De acordo com Pimentel et al. (2014), esta medida está associada à precisão da seleção e refere-se à correlação entre os valores genéticos preditos e os valores genéticos verdadeiros.

As herdabilidades dentro de parcela, ou herdabilidades individual no sentido restrito (RESENDE, 2007), para as progênies $F_{2:3}$ (Tabela 4) foram, de maneira geral, baixas para todos os caracteres avaliados. De acordo com Pimentel et al. (2014), valores baixos de herdabilidade individual indicam que não há condições favoráveis para a seleção de plantas individuais.

O coeficiente de variação genética (CVg) indica a proporção da variação genética existente, sendo, desta forma, desejados os valores altos. Para as progênies $F_{2:3}$ (Tabela 4), os CVg obtidos foram moderados para todos os caracteres avaliados, com exceção ao NDM, o qual foi considerado muito baixo, entretanto, isto pode ser explicado devido aos genitores apresentarem ciclo semelhante, ou seja, baixa variabilidade para esta característica.

A razão CVg/CVe ou coeficiente de variação relativa indica situação favorável à seleção quando possuem valores superiores a 1,0 (VENCOVSKY e BARRIGA, 1992). No caso das progênies F_{2:3}, valores acima de 1,0 foram observados apenas para os caracteres APM, em ambas as populações, e VA, na população “A”.

Considerando as progênies F_{3:4} (Tabela 5), observou-se que os valores de herdabilidade de parcela e da média do genótipo apresentaram alta variação dentro de populações e entre populações. As herdabilidades da média de genótipos para produção de grãos foram de 0,71 e 0,56, para as populações “A e B”, respectivamente, onde esses valores possibilitam boa precisão na seleção de genótipos, com acurácia seletiva de genótipos de 0,84 e 0,75, respectivamente nas populações “A e B”.

Entretanto, os caracteres PCS, NR, AC e APM (Tabela 5) apresentaram baixos valores de herdabilidade. É interessante notar que o caráter VA apresentou valores de herdabilidade bem distintos entre as populações, sendo que a herdabilidade de VA foi de 0,14 para a população “A” e, 0,97 para a população “B”. Isto pode ser explicado devido a diferença na variância genética para esta característica entre estas populações, onde na população “A”, a variância genética observada foi muito baixa, e o inverso ocorreu na população “B” com uma variância genética para esta característica muito alta. Isto, também, pode ser observado pelo coeficiente de variação genotípica, de 4,57% e 64,99% para as populações “A e B”, respectivamente.

Os coeficientes de variação relativa para as progênies F_{3:4}, foram superiores a 1 para os caracteres PG, NV, NN e NDM de ambas as populações, AIV na população “A”, e, VA na população “B”, indicando possibilidade de sucesso na seleção entre progênies.

Em relação as progênies F_{4:5} (Tabela 6) foram observados altos valores de herdabilidade média da parcela (>0,60) para os caracteres PG, NV, NR e APM em ambas as populações e, AIV na população “B”. Estes valores possibilitam boa precisão na seleção, o que pode ser comprovado com os valores da acurácia seletiva destes caracteres, que variaram entre 0,78 e 0,89. Situação favorável à seleção, também, foi confirmada para essas características pelos valores do coeficiente de variação relativa, os quais foram todos acima de 1.

De acordo com Resende (2004), quando se considera o efeito de tratamentos como aleatórios na análise, não se deve utilizar os testes de comparações múltiplas entre as médias, uma vez que estes testes são provenientes de uma suposição de efeitos fixos de tratamentos e produzem inferências sobre as médias fenotípicas e não genótípicas. Na análise de modelos mistos, se obtém estimativas dos valores genéticos, os quais são corrigidos e penalizados para ocorrência de efeitos ambientais, e por meio destes valores, os genótipos são ordenados de maneira decrescente.

Os valores genéticos preditos para PG entre as progêneses $F_{2:3}$ (Tabela 7), indicaram um ganho genético acumulado de 12,62% e 10,50% na seleção, para as plantas selecionadas (PS) das populações “A e B” respectivamente.

Tabela 7. Efeito genético (a), valor genético (u+a) e ganho genético acumulado (GA), preditos para plantas individuais em populações $F_{2:3}$ de soja para o caráter produção de grãos por planta.

Ordem	População A					População B				
	Família	Planta	a	u+a	GA(%)	Família	Planta	a	u+a	GA(%)
1	98	4	13,51	58,35	30,12	122	6	13,91	66,29	26,56
2	47	5	13,29	58,13	29,34	122	4	13,75	66,13	25,86
3	69	1	13,02	57,86	29,60	88	1	13,34	65,72	26,19
4	181	2	12,88	57,72	29,38	7	2	13,11	65,49	25,90
5	47	3	12,87	57,71	29,25	18	6	13,07	65,45	25,71
6	42	5	12,84	57,68	29,14	199	6	12,94	65,32	25,54
7	69	6	12,76	57,60	29,05	9	5	12,88	65,26	25,40
8	201	1	12,61	57,45	28,93	11	4	12,84	65,22	25,29
9	98	2	12,38	57,22	28,78	52	6	12,73	65,11	25,18
10	7	5	12,18	57,02	28,62	18	2	12,61	64,99	25,07
PS ¹			3,64	48,48	12,62			4,16	56,54	10,50
Média				44,84					52,38	

¹ Progêneses Selecionadas

Entre as progêneses $F_{3:4}$ (Tabela 8) o ganho de seleção acumulado com todas as progêneses selecionadas (PS) foi de 10,09% na população “A” e 11,06% na população “B”. E considerando as progêneses $F_{4:5}$ (Tabela 9), o ganho de seleção predito foi de 8,76% e 11,31% para as populações “A e B” respectivamente.

Esses valores foram semelhantes aos obtidos por Costa et al. (2004), que observaram ganhos entre 9,81% e 15,50%, entretanto foram inferiores aos obtidos

por Pinheiro et al. (2013), que comparando os métodos dos quadrados mínimos e REML/BLUP, obtiveram ganhos entre 16,20% e 18,60% pelas estimativas REML/BLUP. Os autores também relataram que os maiores ganhos preditos foram obtidos pelo método REML/BLUP.

Tabela 8. Efeito genético (a), valor genético (u+a) e ganho genético acumulado (GA), preditos para média de famílias em populações F_{3:4} de soja para o caráter produção de grãos por planta em gramas.

Ordem	População A				População B			
	Família	a	u+a	GA(%)	Família	a	u+a	GA(%)
1	120	8,09	45,96	21,37	32	9,27	48,94	24,48
2	228	6,88	44,75	19,77	39	8,23	47,90	23,10
3	13	6,67	44,54	19,05	179	8,00	47,67	22,44
4	144	6,20	44,07	18,38	79	7,23	46,90	21,61
5	130	6,01	43,88	17,87	54	6,61	46,28	20,78
6	100	5,98	43,85	17,53	185	6,29	45,96	20,08
7	175	5,35	43,22	17,04	85	6,05	45,72	19,49
8	57	5,18	43,05	16,62	121	5,95	45,62	19,02
9	138	5,09	42,96	16,27	49	5,76	45,43	18,60
10	108	5,02	42,89	15,97	191	5,53	45,20	18,20
PS ¹		1,21	39,08	10,09		1,97	41,64	11,06
Média			37,87				39,67	

¹ Progênes Seleccionadas

Tabela 9. Efeito genético (a), valor genético (u+a) e ganho genético acumulado (GA), preditos para média de famílias em populações F_{4:5} de soja para o caráter produção de grãos por planta em gramas.

Ordem	População A				População B			
	Progênie	a	u+a	GA(%)	Progênie	a	u+a	GA(%)
1	67	10,19	48,95	26,30	57	8,94	44,02	25,48
2	20	8,71	47,47	24,38	89	8,21	43,29	24,44
3	133	7,34	46,10	22,56	188	7,86	42,94	23,76
4	123	6,95	45,71	21,41	18	7,75	42,83	23,34
5	147	6,20	44,96	20,32	140	6,92	42,00	22,62
6	101	5,77	44,53	19,42	39	6,67	41,75	22,02
7	11	5,25	44,01	18,58	75	6,05	41,13	21,33
8	50	4,26	43,02	17,63	23	5,65	40,73	20,68
9	77	4,10	42,86	16,84	86	5,32	40,40	20,07
10	6	3,78	42,54	16,14	50	4,79	39,87	19,43
PS ¹		0,65	39,41	8,76		1,07	36,15	11,31
Média			38,76				35,08	

¹ Progênes Seleccionadas

4. CONCLUSÃO

1. As estimativas obtidas indicaram alta variância genética nas populações avaliadas, para os caracteres PG, NV, NR e VA.
2. As herdabilidades da média de progênies foram altas para a maioria dos caracteres avaliados o que indica que a maior parte da variância fenotípica foi devida aos efeitos genotípicos, configurando uma boa condição para a seleção de progênies superiores.
3. As acurácias observadas permitem a eficiência do ganho com a seleção.

5. REFERÊNCIAS

- ANDRADE, A. E. C. B.; SILVA, A. J.; FERRAUDO, A. S. E.; UNÊDA-TREVISOLI, S. H.; DI MAURO, A. O. Strategies for selecting soybean genotypes using mixed models and multivariate approach. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 1, p. 23–31, 2016.
- BERNARDO, R. On the effectiveness of early generation selection in self-pollinated crops. **Crop Science**, v. 43, n. 4, p. 1558–1560, 2003.
- BHAT, S.; BASAVARAJA, G. T.; SALIMATH, P. M. Analysis of variability in segregating generation of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). **Karnataka Journal of Agricultural Sciences**, v. 25, n. 2, p. 176–178, 2012.
- BORÉM, A. M. **GV Melhoramento de Plantas. rev. ampl.** 2. ed. Viçosa: UFV, 2009.
- BROGIN, R. L.; ALBERTO, C.; ARIAS, A.; FRANCISCO, J.; TOLEDO, F. De. Genetic control of soybean resistance to brown spot (*Septoria glycines*): first studies. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 35–44, 2003.
- CARVALHO, A. D. F.; NETO, R. F.; GERALDI, I. O. Estimation and prediction of parameters and breeding values in soybean using REML/BLUP and Least Squares. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 8, n. 3, p. 230–235, 2008.
- CASTOLDI, R.; VARGAS, P. F.; BRAZ, L. T. Agronomic characteristics, isoflavone content and Kunitz trypsin inhibitor of vegetable soybean genotypes. **Horticultura Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 222–227, 2011.

COSTA, M. M.; DI MAURO, A. O.; UNÊDA-TREVISOLI, S. H.; CASTRO ARRIEL, N. H.; BÁRBARO, I. M.; SILVA MUNIZ, F. R. Ganho genético por diferentes critérios de seleção em populações segregantes de soja. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 39, n. 11, p. 1095–1102, 2004.

EMBRAPA. **Indicações Técnicas para a cultura da soja no Rio Grande do Sul e Santa Catarina.** Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1011192/1/IndicacoesTecnicasEmbrapa003.pdf>>.

JAUREGUY, L. M.; CHEN, P.; SCABOO, A. M. Heritability and correlations among food-grade traits in soybean. **Plant Breeding**, v. 130, n. 6, p. 647–652, 2011.

MCCULLAGH, P. Generalized linear models. **European Journal of Operational Research**, v. 16, n. 3, p. 285–292, 1984.

PIMENTEL, A. J. B.; GUIMARÃES, J. F. R.; DE SOUZA, M. A.; DE RESENDE, M. D. V.; MOURA, L. M.; DE CARVALHO ROCHA, J. R. do A. S.; RIBEIRO, G. Estimação de parâmetros genéticos e predição de valor genético aditivo de trigo utilizando modelos mistos. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 49, n. 11, p. 882–890, 2014.

PINHEIRO, L. C. de M.; GOD, P. I. V. G.; FARIA, V. R.; OLIVEIRA, A. G.; HASUI, A. A.; PINTO, E. H. G.; ARRUDA, K. M. A.; PIOVESAN, N. D.; MOREIRA, M. A. Parentesco na seleção para produtividade e teores de óleo e proteína em soja via modelos mistos. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 48, n. 9, p. 1246–1253, 2013.

RESENDE, M. D. V. De. Métodos estatísticos ótimos na análise de experimentos de campo. **Documentos (Embrapa)**, v. 100, n. Outubro, p. 57, 2004.

RESENDE, M. D. V. De. **Selegen-rem/ blup**. Colombo: Embrapa Florestas, 2007.

STORCK, L.; CARGNELUTTI FILHO, A.; LÚCIO, A. D.; MISSIO, E. L.; RUBIN, S. Avaliação da precisão experimental em ensaios de competição de cultivares de soja. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 3, p. 572–578, 2010.

TEIXEIRA, L. C. A. **ESTUDO GENÉTICO DE POPULAÇÕES DE SOJA COM FONTE DE RESISTÊNCIA À *Heterodera glycines* (RAÇA 3) ORIUNDAS DE TOPOCRUZAMENTOS TIPO ALIMENTO X TIPO GRÃO**. 2016. Tese de doutorado - Universidade Estadual Paulista - UNESP, 2016.

VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. **Genética biométrica no fitomelhoramento**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992.

VIANNA, V. F.; UNÊDA-TREVISOLI, S. H.; DESIDÉRIO, J. A.; SANTIAGO, S. De; CHARNAI, K.; JÚNIOR, J. A. F.; SERGIO, A.; MAURO, A. O. Di. The multivariate approach and influence of characters in selecting superior soybean genotypes. **African Journal of Agricultural Research**, v. 8, n. 30, p. 4162–4169, 2013.

ZOLDAN, S. M.; BRAGA, G. de S.; FONSECA, F. J.; CARRÃO-PANIZZI, M. C. Electronic tongue system to evaluate flavor of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) genotypes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 5, p. 797–802, 2014.

CAPÍTULO 3 – IDENTIFICAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA AO NEMATOIDE DE CISTO DA SOJA

RESUMO – A seleção assistida por marcadores moleculares é uma ferramenta útil no melhoramento genético de plantas, pois pode ajudar na identificação de genótipos com características desejáveis de maneira rápida e segura. Assim, o objetivo deste trabalho foi identificar marcadores associados com a resistência à raça 3 do nematoide de cisto da soja (NCS), em populações de soja oriundas de cruzamentos entre genótipos do tipo grão x tipo alimento, além de caracterizar a resistência destas populações. Para este estudo, progênies F₂ obtidas de dois cruzamentos, foram fenotipadas quanto à resistência ao NCS raça 3. Foram realizadas coletas de amostras foliares e na sequência, realizada a extração de DNA de cada uma das progênies avaliadas. As progênies avaliadas foram genotipadas com marcadores moleculares SSR, sendo que quatro pares de primers foram identificados para a resistência ao NCS, raça 3, sendo, Satt_275 e Satt_309 ligados ao cromossomo 18 e Satt_632 e GMES6186 ligados ao cromossomo 8. A partir destes marcadores, foi possível identificar os genótipos resistentes ao NCS, com grande eficiência no processo, podendo assim, estes marcadores serem utilizados para seleção assistida ao NCS, raça 3. Em seguida, os genes de resistência ao NCS também foram re-sequenciados e indicaram que a fonte de resistência destes genótipos é de origem da cultivar Peking, com isto foi possível encontrar SNPs nos genes, os quais também podem ser utilizados para a seleção assistida para resistência ao NCS.

Palavras-chave: SSR, *Heterodera glycines*, soja alimento

CHAPTER 3 - IDENTIFICATION AND VALIDATION OF MOLECULAR MARKERS ASSOCIATED TO SOYBEAN CIST NEMATOD RESISTANCE

ABSTRACT – Molecular markers assisted selection is a useful tool in plant breeding as it can assist the genotype identification with desirable traits quickly and safely. In this way the objective of this work was to identify markers associated with soybean cyst nematode (NCS) race 3 resistance in soybean populations from grain type x food type crosses and characterize the resistance of these populations . F₂ progenies obtained from the crossing of the BRSMG 810c grain type cultivar between the BRSMG 790a and BRSMG 800a food type cultivars. F₂ progenies were phenotyped for resistance to NCS race 3 and DNA samples were extracted from each of the evaluated progenies. These genotypes were genotyped with SSR molecular markers, and four pair of primers were identified for resistance to NCS race 3, with Satt_275 and Satt_309 linked to chromosome 18 and Satt_632 and GMES6186 linked to chromosome 8. From these markers it was possible to identify the NCS resistant genotypes, and these markers can thus be used for NCS race 3 assisted selection. Then, the NCS resistance genes were also re-sequenced and indicated that the source of resistance of these genotypes is of Peking origin, with this it was possible to find SNPs in genes which can also be used for assisted selection for resistance to the NCS.

Keywords: SSR, *Heterodera glycines*, food soybean

1. INTRODUÇÃO

O nematoide de cisto da soja (NCS, *Heterodera glycines* Ichinohe) é um dos patógenos de maior importância econômica para a cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merr.), sendo disseminado em, praticamente, todas as áreas de cultivo ao redor do mundo (GARDNER et al., 2017).

No Brasil, o NCS foi relatado pela primeira vez em 1991 na região do cerrado e, atualmente, encontra-se presente em, praticamente, todas as regiões produtoras, ocasionando perdas na produção que podem chegar a 90%, dependendo do grau de infestação, suscetibilidade do cultivar, tipo e fertilidade do solo (ARRIAGADA et al., 2015).

Uma vez que a área é infectada pelo NCS, seu controle é limitado, pois o cisto pode sobreviver no solo por períodos superiores a 8 anos. Desta forma, o manejo deste patógeno é feito por meio da rotação de culturas e utilização de cultivares resistentes (KADAM et al., 2016; LIMA et al., 2017).

Entretanto, a identificação e seleção de genótipos resistentes por meio do melhoramento tradicional é um desafio, devido às dificuldades na fenotipagem, a qual é destrutiva e trabalhosa e, além disso o NCS possui uma variedade de raças que devem ser testadas. Por este motivo, a identificação de marcadores moleculares associados a resistência ao NCS tem sido amplamente estudada e se tornou uma ferramenta importante na identificação de genótipos resistentes por meio da seleção assistida por marcadores (SAM) (SHI et al., 2015).

Segundo Kim; Diers (2013), QTLs (“quantitative trait loci”) de resistência ao nematoide do cisto foram mapeados em 18 dos 20 cromossomos da soja. Contudo, embora diversos genes tenham sido identificados, mais de 90% das cultivares comerciais possuem como fonte de resistência ao NCS, os genótipos PI 88788 e PI 548402 (Peking).

Estes dois genótipos se constituem em fonte dos dois principais genes que conferem resistência ao NCS nas cultivares atuais, sendo o *rhg1*, no cromossomo 18 e *Rhg4*, no cromossomo 8 (LIU et al., 2012). De acordo com Brucker et al. (2005), a

resistência do gene *rhg1* é classificada em 2 tipos: *rhg1-a* (Peking-type) e em *rhg1-b* (PI 88788-type).

Em genótipos que possuem a resistência derivada da PI 88788, apenas o gene *rhg1* é suficiente para conferir a resistência ao NCS. Em outros casos, quando a fonte de resistência é o genótipo Peking, são necessários ambos os genes (*rhg1* e *Rhg4*) para se obter a resistência (LIU et al., 2017).

Recentemente, estes dois genes foram identificados, sequenciados e tiveram sua funcionalidade na resistência ao NCS validada por técnicas como: clonagem, TILLING (targeting-induced local lesions in genomes) e silenciamento gênico (vírus induced gene silencing “VIGS” e RNA interference) (LIU et al., 2012, 2017). Com isto, a utilização de marcadores para estes genes foi simplificada, pois deste modo, é possível identificar os marcadores mais próximos à posição física do gene, bem como desenvolver marcadores específicos.

Diversos estudos demonstram a eficiência no uso de marcadores moleculares na seleção de genótipos com resistência ao NCS. Espindola et al. (2016), relatam sucesso na identificação de genótipos resistentes com a utilização de marcadores SSR. Recentemente, marcadores do tipo SNP (“single nucleotide polymorphism”) também foram identificados e possibilitam a seleção assistida para o NCS (SHI et al., 2015).

Partindo do pressuposto de que não existem no mercado cultivares comerciais com atributos para alimentação humana, em conjunto com a resistência ao NCS, o objetivo do presente trabalho consiste em validar marcadores moleculares associados à resistência ao nematoide de cisto da soja (raça 3) para utilização na seleção assistida de genótipos de soja com características destinadas à alimentação humana e portadores da referida resistência.

2. MATERIAL E MÉTODOS

- Material Genético

Foram avaliadas 186 progênies F₂ sendo, 94 progênies oriundas do cruzamento artificial entre as cultivares BRSMG 810C (resistente ao NCS) x BRSMG

790A (suscetível ao NCS) e 94 progênies do cruzamento entre BRSMG 810C x BRSMG 800A (suscetível ao NCS). Estes genótipos foram selecionados visando-se a obtenção de progênies com características necessárias para a alimentação humana, em conjunto com a resistência ao NCS (raça 3), sendo esta pesquisa uma continuidade do trabalho realizado por (TEIXEIRA, 2016).

A cultivar BRSMG 810C é genótipo classificado como tipo grão, de ciclo médio entre 114 a 140 dias e, com crescimento determinado. Por possuir resistência ao nematoide de cisto raças 1 e 3, foi escolhida como genitor comum para os cruzamentos.

A cultivar BRSMG 790A possui características necessárias ao consumo humano e à indústria de alimentos, como tegumento e hilo amarelo, alta taxa de carboidratos e sabor suave. Seu ciclo médio varia entre 110 a 130 dias, apresentando o crescimento determinado.

A cultivar BRSMG 800A é um genótipo de tegumento marrom e após o cozimento apresenta características físicas semelhantes ao feijão tipo “carioca”, conferindo maior aceitabilidade para o consumo humano na alimentação. Seu ciclo médio varia entre 120 a 140 dias, sendo de habito de crescimento determinado.

- Fenotipagem

Para a avaliação da resistência, a inoculação foi realizada com o isolado do NCS raça 3, o qual foi obtido no município de Londrina – PR pela empresa GDM Seeds Inc. A identificação da raça foi realizada por meio da utilização de cultivares diferenciadoras, conforme descrito por (RIGGS; SCHMITT, 1988).

Sementes das progênies F₂ foram semeadas em vasos de 300 ml de capacidade e sete dias após a emergência foi realizada a inoculação conforme detalhado por (DIAS et al., 2009), onde cada vaso com 1 planta foi inoculado com 1 ml da suspensão do NCS raça 3 ajustado à concentração de 4.000 ovos e juvenis ml⁻¹.

O experimento foi conduzido na Epamig Oeste, Uberaba – MG, em casa de vegetação, com temperatura, umidade e luz controlada. A avaliação da reação dos genótipos para a resistência ao NCS foi realizada 30 dias após a inoculação.

A classificação dos genótipos foi realizada pelo critério de índice de fêmeas (IF), de acordo com o estabelecido por Schmitt; Shannon (1992), sendo os genótipos classificados como resistentes com $IF < 10\%$, moderadamente resistentes $10\% \leq IF \leq 30\%$ e suscetíveis, $IF \geq 31\%$.

- Extração de DNA

Amostras foliares das 186 progênies F₂ fenotipadas, foram coletadas e utilizadas para extração do DNA. O método de extração utilizado foi o CTAB, conforme descrito por (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995). Em seguida, foi realizada a quantificação do DNA extraído, mediante leitura da densidade ótica a 260 e 280 nm, em equipamento Nano Drop. De acordo com as concentrações obtidas, foi feita a leitura em gel de agarose, com padrões, para confirmação das concentrações e qualidade do DNA. Posteriormente à quantificação, parte das amostras de DNA foi diluída para a concentração de 30 ng/μl.

- Análises Genotípicas

Por meio do site SoyBase (<https://www.soybase.org/>), marcadores moleculares microssatélites (SSR) próximos aos genes rhg1 (cromossomo 18) e Rhg4 (cromossomo 8) foram identificados de acordo com a sequência e posição física dos genes relatadas por (LIU et al., 2012, 2017). Foram selecionados 5 pares de primers SSR flanqueando cada gene (Tabela 1), os quais foram testados primeiramente nos três genitores quanto à qualidade da amplificação e polimorfismo.

Em seguida, para cada gene foram selecionados os 2 pares de primers mais próximos ao gene e que apresentaram polimorfismo. Estes 4 primers foram utilizados para a genotipagem das duas populações F₂.

Tabela 1. Lista de primers SSR utilizados para identificação dos genes de resistência ao nematoide de cisto da soja.

Primer	GL	Motivo	Forward	Reverse	PB
Satt632*	A2	(AAT)17	GGGCTATGAAGGGAATGGAAAGGA	CCCATATTGAAGATTTGAAGTAAT	263
Sat_162	A2	(AT)34	GCGTGGTTTTTCGCTGGATATA	GCGCATTCGTAACATATTTTTCAC	173
GMES3044	A2	-	GCAATTCAGAGCAATCAGCA	GATGATGGGTTTGACTGGCT	277
GMES6186*	A2	(TA)4A(AT)5(AG)5	AGCGGGAATTGAAGGTTTTT	GGAATCTCATCTGAAAATAATGGA	224
Satt275*	G	(AAT)11	GCGGGATAATTGGTTTTACGAAAATGC	GCGCCTAATCACCTAAAAAACGTTTA	207
Satt038	G	(TAA)17	GGGAATCTTTTTTCTTTCTATTAAGTT	GGGCATTGAAATGGTTTTAGTCA	177
Sat_210	G	(AT)23	GCGCCAGCAACAAAGTTCCTGACAAA	GCGCATGCAAATGAAAATAATAA	254
Satt309*	G	(TAA)13	GCGCCTTCAAATTGGCGTCTT	GCGCCTTAAATAAAACCCGAAACT	147
GMES2956	G	(GA)7	TCTTGCTGGCATCCTATCATT	CAGCAAAAAGGCACAAAACA	352

* Marcadores selecionados para avaliação das duas populações; GL: Grupo de ligação; PB: Tamanho do fragmento em pares de base

As reações de amplificação foram realizadas por meio do termociclador Applied Biosystems 2720, com um volume total de 15 µL, contendo 45 ng de DNA, 1X DreamTaq® Green Buffer com 2 mM MgCl₂ (Thermo Scientific), 0,4 mM de dNTPs, 0,75 U de DreamTaq® DNA polimerase (Thermo Scientific), 0,04 µM de primer *forward* com cauda M13 (5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3'), 0,4 µM de primer *reverse*, e 0,4 µM de primer M13 marcado com fluorescência (FAM, NED e VIC, sintetizadas por MWG, Ebersburg, Alemanha).

O protocolo térmico utilizado para amplificação consistiu em 5 minutos a 95 °C para desnaturação, seguidos de 35 ciclos: 95 °C (45 segundos), 50 °C (45 segundos), 72 °C (1 minuto), e extensão final a 72 °C por 10 minutos.

A separação dos fragmentos foi realizada por meio de eletroforese capilar multiplex, com o equipamento ABI PRISM 310 (Applied Biosystems). Para tanto, 1 µL de cada um dos 4 produtos da PCR marcados com fluorescência foram adicionados a um mix contendo 0,4 µL de GeneScan 500 LIZ size standard (Applied Biosystems) e 10,6 µL de formamida.

Todas estas etapas foram realizadas no “Dipartimento di Scienze della Vita”, na Università Degli Studi di Modena e Reggio Emilia – UNIMORE, Itália.

- Sequenciamento dos Genes *rhg1* e *Rhg4*

Para detecção e validação dos marcadores SNP (single nucleotide polymorphism) foi realizado o re-sequenciamento dos genes *rhg1* e *Rhg4* nos 3

parentais (BRSMG 810C, BRSMG 790A e BRSMG 800A). Dois *primers* adjacentes a estes genes foram desenhados (Tabela 2) de acordo com o genoma de referência para a soja sequenciado a partir da cultivar Willians 82, disponível no site SoyBase (<https://www.soybase.org/>). A amplificação dos fragmentos e especificidade dos primers foi primeiramente testada por meio de *in silico* PCR com auxílio do programa FastPCR (KALENDAR et al., 2011).

Tabela 2. Primers desenhados para amplificação dos genes de resistência ao nematoide de cisto da soja

Primer	GL	Gene	Forward	Reverse	PB
SNAP18	G	rhg1	ACATTTATGAAGAGATAGCTCG	CATAGTAGTACAATGTAAATCATC	1929
SHMT	A2	Rhg4	CTCACGAACAAATACTCCGAG	CTATCACCAAAAACAGCGTTC	1071

GL: Grupo de ligação; PB: Tamanho do fragmento em pares de base

As reações de amplificação foram realizadas com um volume total de 15 µL, contendo 45 ng de DNA, 1X DreamTaq® Green Buffer com 2 mM MgCl₂ (Thermo Scientific), 0,4 mM de dNTPs, 0,75 U de DreamTaq® DNA polimerase (Thermo Scientific), 0,4 µM de primer *forward*, e 0,4 µM de primer *reverse*.

O protocolo térmico utilizado para amplificação consistiu em 5 minutos a 95 °C para desnaturação, seguidos de 35 ciclos: 95 °C (45 segundos), 50 °C (45 segundos), 72 °C (2 minutos) e extensão final a 72 °C por 10 minutos.

Em seguida, os produtos da PCR foram purificados por meio de precipitação com etanol/sódio acetato (NaOAc) da seguinte forma: foram adicionados 3 µL de NaOAc 3M, pH 5.5, 62,5 µL de EtOH 95%, o qual foi incubado a -80 °C por 30 minutos, centrifugado a 15.000 g por 15 minutos, sendo o sobrenadante descartado e o *pellet* lavado com 150 µL de EtOH 70%, centrifugado novamente a 15.000 g por 15 minutos, seco e finalmente ressuspenso em 15 µL de H₂O.

O sequenciamento foi realizado com o equipamento ABI PRISM 310 (Applied Biosystems), utilizando-se o Kit de sequenciamento ANI Prism™ BigDye v3.1 Terminator, de acordo com o protocolo do fabricante. A sequência das análises foi feita pelo software Sequence Scanner v1.0 (Applied Biosystems).

- Análises dos Dados

Primeiramente, os dados genotípicos foram divididos em haplótipos por grupo de ligação, de acordo com o padrão observado na genotipagem dos genitores, sendo

atribuída a letra “R” a genótipos com alelo marcador do parental resistente BRSMG 810C e, “S” aos genótipos semelhantes aos parentais suscetíveis BRSMG 790A e BRSMG 800A. Desta forma foram formados 9 grupos de haplótipos: R/R, R/H, H/R, H/H, R/S, S/H, H/S, S/R e S/S. Em que, a primeira letra identifica os marcadores ligados ao loco *rhg1* e a segunda letra ao loco *Rhg4*. R, H e S, correspondem a resistente, heterozigoto e suscetível, respectivamente.

Em seguida os efeitos de haplótipos foram testados por meio de modelo linear, sendo que a estimação de componentes de variâncias foi realizada pela máxima verossimilhança restrita (REML).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 188 progênies F₂ foram avaliadas quanto a reação de resistência ao NCS, sendo 94 progênies de cada uma das duas populações estudadas. Foram observados grandes contrastes para o IF entre as progênies, bem como entre os parentais suscetíveis e o resistente (Tabela 1). O menor e o maior porcentagem de IF foram encontradas na População “A”, de 1% e 329%.

Tabela 1. Número médio, mínimo e máximo do índice de fêmeas avaliado nas populações F₂ e parentais.

População*	Média	Mínimo	Máximo
A	76	1	329
B	61	4	254
Total	69	1	329
BRSMG 810C	3		
BRSMG 790A	109		
BRSMG 800A	91		

* População A e B referem-se aos cruzamentos entre as cultivares BRSMG 810C x BRSMG 790A e BRSMG 810C x BRSMG 800A, respectivamente.

A distribuição das progênies com base no IF (Figura 1) demonstrou que no total 15 progênies foram consideradas resistentes, sendo 10 pertencentes à população “A” e 5 à população “B”, o que representou uma porcentagem de 8% de progênies resistentes do total das 188 avaliadas.

Trinta e sete progênies no total foram consideradas moderadamente resistentes (Figura 1), 17 da população “A” e 20 da população “B”. A maioria das

progênies avaliadas (72%) foram identificadas como suscetíveis, ou seja, 67 progênies da população “A” e 69 progênies da população “B”.

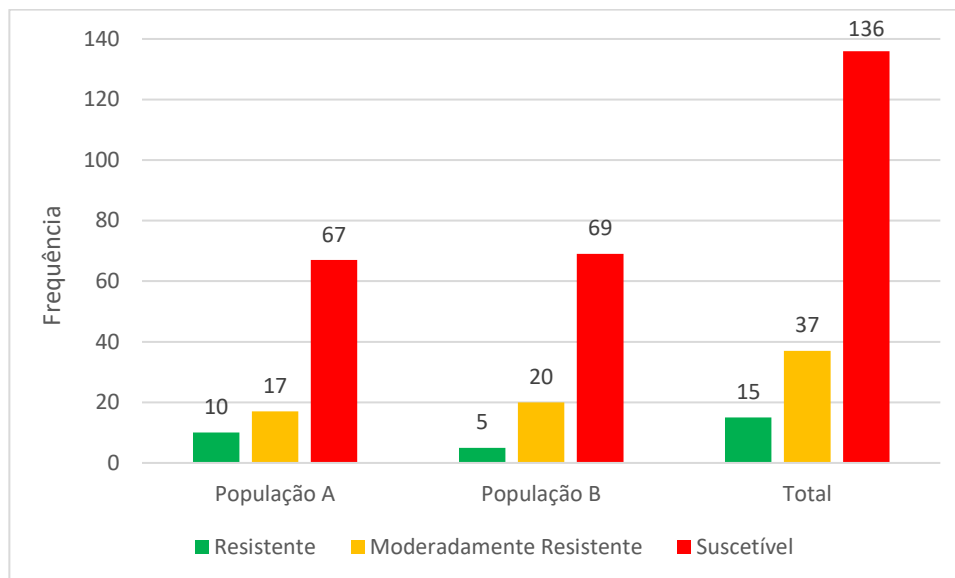


Figura 1. Frequência das progênies F_2 fenotipadas para reação de resistência ao nematoide de cisto da soja (NCS) raça 3 com base no índice de fêmeas.

Em relação às análises genóticas, dentre os 10 pares de primers SSR testados, foi possível obter produto de amplificação em 7 (Tabela 2), sendo quatro para o gene rhg1 e quatro para o gene Rhg4, porém neste último, apenas três amplificaram em todos os genitores, sendo possível obter amplificação com o marcador Sat_162 apenas para o genitor resistente BRSMG 810C. Dentre os primers que amplificaram, quatro apresentaram polimorfismo, sendo dois flanqueando cada gene.

Tabela 2. Primers utilizados na genotipagem para avaliação da associação com a resistência ao nematoide de cisto da soja (raça 3).

Primer ¹	Gene	Genótipo ²	Amplificação	Fragmento ³	Polimorfismo
Sat_210	rhg1	P1R	sim	209	não
		P2a	sim	209	
		P2b	sim	209	
Satt275	rhg1	P1R	sim	194	sim
		P2a	sim	197	
		P2b	sim	203	
Satt309	rhg1	P1R	sim	132	sim
		P2a	sim	129	
		P2b	sim	129	
GMES2956	rhg1	P1R	sim	350	não
		P2a	sim	350	
		P2b	sim	350	
Satt 038	rhg1	P1R	não	-	
		P2a	não	-	
		P2b	não	-	
Satt 632	Rhg4	P1R	sim	246	sim
		P2a	sim	258	
		P2b	sim	258	
Sat_162	Rhg4	P1R	sim	132	presença / ausência
		P2a	não	-	
		P2b	não	-	
Sat_212	Rhg4	P1R	não	-	
		P2a	não	-	
		P2b	não	-	
GMES3044	Rhg4	P1R	sim	202	não
		P2a	sim	202	não
		P2b	sim	202	não
GMES6186	Rhg4	P1R	sim	221	sim
		P2a	sim	219	
		P2b	sim	219	

¹ Marcador molecular SSR; ² P1R: BRSMG 810C, P2a: BRSMG 790A, P2b: BRSMG 800A; ³ Tamanho do fragmento em pares de base.

Para realização da análise dos dados, foram removidos todos os genótipos que possuíam recombinação, isto é, os haplótipos que apresentaram divergência entre os marcadores que flanqueiam o loco. Deste modo, 161 genótipos foram considerados nas análises.

Foi observado que houve efeito significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F para os haplótipos (Tabela 3). Como os dados de IF não eram contínuos, a análise de variância foi realizada com os dados de IF transformados por $2\sqrt{IF}$.

Tabela 3. Resumo da análise de variância para índice de fêmeas de nematoide de cisto (raça 3) em progênies F₂ de soja.

FV	GL	SQ	QM	F
Haplótipo	8	867,0	108,4	20,58**
Resíduo	152	800,3	5,3	
Total	160	1667,3		
CV%	20,5			
Média ¹	11,19			

¹ Média transformada pela $2\sqrt{IF}$

As médias preditas pelo modelo de regressão (Tabela 4), indicam que existe diferença entre os haplótipos, sendo possível identificar que os haplótipos semelhantes ao do parental resistente (R/R) apresentaram menor valor para IF. De maneira contrária, os haplótipos S/S foram os que apresentaram maiores valores estimados para IF.

Isto pode ser visualizado de forma mais clara a partir dos dados não transformados (Figura 2), onde se observa que 13 genótipos apresentaram o haplótipo R/R, 40 genótipos foram classificados como heterozigotos para ambos os locos (H/H) e 13 genótipos classificados como suscetíveis (S/S).

Tabela 4. Médias preditas para o índice de fêmeas de nematoide de cisto da soja por meio do modelo de regressão.

Haplótipo	Média ¹	Erro Padrão
R/R	2,60	0,63
R/H	4,71	0,52
H/R	6,27	0,46
H/H	7,78	0,36
R/S	8,84	0,72
S/H	9,11	0,58
S/R	9,31	0,68
H/S	9,45	0,57
S/S	11,17	0,63
DMS	2,64	

¹ Média transformada pela $2\sqrt{IF}$

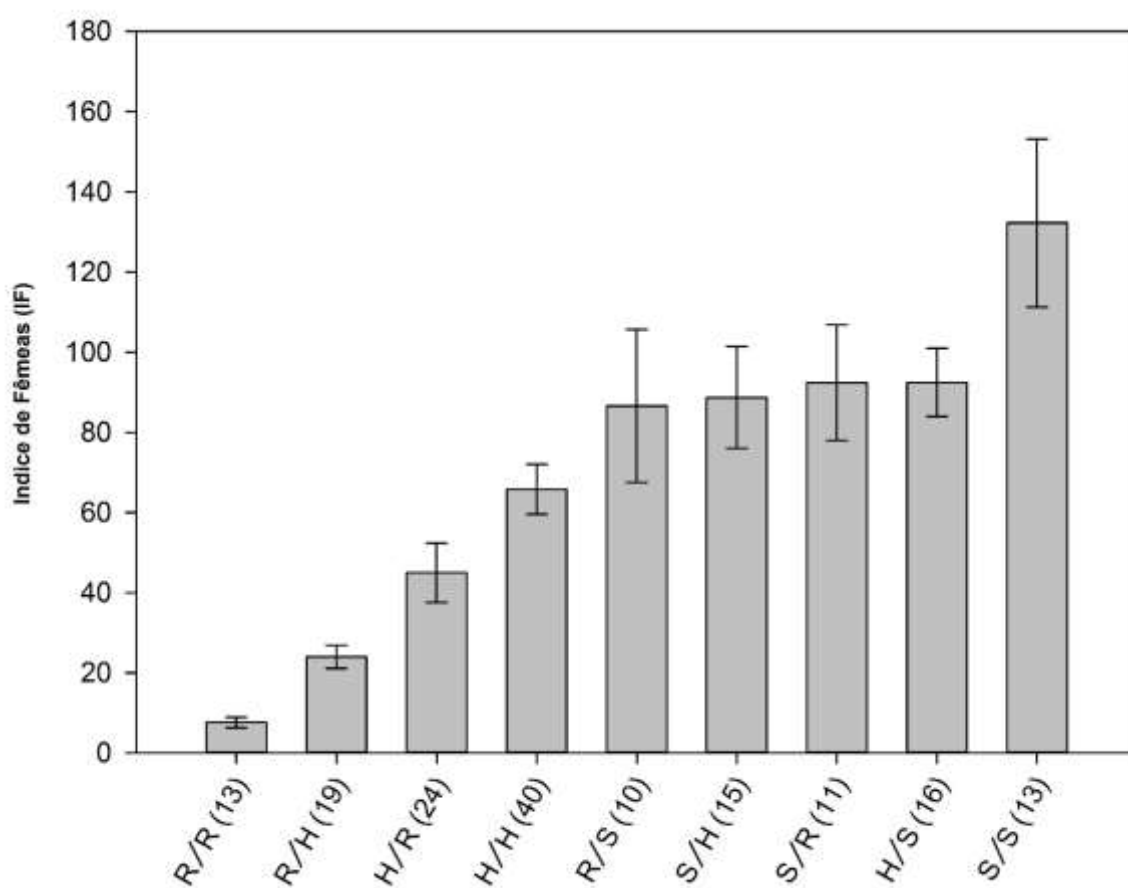


Figura 2. Histograma de frequência dos haplótipos pelo índice de fêmeas de nematoide de cisto da soja.

Por meio do histograma (Figura 2), é possível observar a alta relação que os marcadores possuem com a resistência ao NCS. Nota-se também que possivelmente, a fonte de resistência é derivada do genótipo Peking, pois conforme Liu et al. (2017), para este genótipo são necessários os dois genes (*rhg1-a* e *Rhg4*) para se conferir a resistência completa ao NCS.

Diversos outros autores relatam a eficiência do Satt309 na identificação de genótipos resistentes à raça 3 do NCS (SILVA et al., 2007; FERREIRA et al., 2011).

Foi calculada a eficiência de seleção com todos os marcadores combinados (Satt275 + Satt 309 para o gene *rhg1* e Satt632 + GMES 6186 para o gene *Rhg4*), obtendo-se uma eficiência de 95,65% na seleção de genótipos, indicando alta eficiência na seleção assistida por meio destes marcadores. Outros autores também relatam alta eficiência na seleção assistida por marcadores para o nematoide de cisto

raça 3. Santana et al. (2014), relatam eficiência de 100% na seleção com a combinação dos marcadores Satt309 + Sat_141, e, Sat_168 + Satt309. Ao utilizar a combinação dos marcadores Satt309 + Satt 187, Silva et al. (2007), também, relatam eficiência de 100% na seleção do NCS raça 3, porém os mesmos autores relatam eficiência de 78% ao se utilizar a combinação dos marcadores Satt309 + Sat_168.

Para confirmar a fonte da resistência do NCS nestas populações e obter informações sobre SNP dentro dos genes de resistência desta populações, foi realizado o re-sequenciamento dos genes rhg1 e Rhg4. De acordo com os resultados do sequenciamento, confirmou-se que a resistência apresentada por estes genótipos é de origem da cultivar Peking. As sequencias obtidas são semelhantes às relatadas por Liu et al. (2012), para gene Rhg4, e por Liu et al. (2017), para o gene rhg1.

A partir destes resultados, foi possível também, confirmar três SNPs para estas populações, os quais foram descritos por (SHI et al., 2015), sendo 2 no gene rhg1, (GSM383 e GSM381) e, 1 SNP no gene Rhg4 (GSM191).

4. CONCLUSÃO

- A resistência ao NCS das populações é derivada da cultivar Peking
- São necessários os genes rhg1 e Rhg4 para conferir a resistência ao NCS nas populações estudadas.
- A combinação dos marcadores SSR, Satt275, Satt 309, Satt632 e GMES 6186 tem alta eficiência na seleção assistida para resistência ao NCS.

5. REFERÊNCIAS

ARRIAGADA, O.; FERREIRA, M. F. S.; CERVIGNI, G. D. L.; SCHUSTER, I.; SCAPIM, C. A.; MORA, F. QTL mapping of soybean cyst nematode race 9: a generalized linear modeling approach. **Australian Journal of Crop Science**, v. 9, n. 8, p. 721–727, 2015.

BRUCKER, E.; NIBLACK, T.; KOPISCH-OBUCH, F. J.; DIERS, B. W. The effect of rhg1 on reproduction of *Heterodera glycines* in the field and greenhouse and associated effects on agronomic traits. **Crop science**, v. 45, n. 5, p. 1721–1727, 2005.

DIAS, W. P.; SILVA, J. F. V.; CARNEIRO, G. E. S.; GARCIA, A.; ARIAS, C. A. A. Nematóide de Cisto da Soja : Biologia e Manejo Pelo Uso da Resistência Genética. **Nematologia Brasileira**, v. 33, n. 1, p. 1–16, 2009.

ESPINDOLA, S. M. C. G.; HAMAWAKI, O. T.; OLIVEIRA, A. P.; HAMAWAKI, C. D. L.; HAMAWAKI, R. L.; TAKAHASHI, L. M. Selecting soybean resistant to the cyst nematode *Heterodera glycines* using simple sequence repeat (microsatellite) markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 1, p. 1–7, 2016.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. [s.l.] Embrapa-Cenargen, 1995.

FERREIRA, M. F. da S.; CERVIGNI, G. D. L.; FERREIRA, A.; SCHUSTER, I.; SANTANA, F. A.; PEREIRA, W. D.; BARROS, E. G. de; MOREIRA, M. A. QTLs for resistance to soybean cyst nematode, races 3, 9, and 14 in cultivar Hartwig. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, n. 5, p. 1–22, 2011.

GARDNER, M.; HEINZ, R.; WANG, J.; MITCHUM, M. G. Genetics and Adaptation of Soybean Cyst Nematode to Broad Spectrum Soybean Resistance. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 7, n. 3, p. 835–841, 2017.

KADAM, S. et al. Genomic-assisted phylogenetic analysis and marker development for next generation soybean cyst nematode resistance breeding. **Plant Science**, v. 242, p. 342–350, 2016.

KALENDAR, R.; LEE, D.; SCHULMAN, A. H. Java web tools for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide assembly and analysis. **Development**, v. 98, n. 2, p. 137–144, 2011.

KIM, M.; DIERS, B. W. Fine mapping of the SCN resistance QTL cqSCN-006 and cqSCN-007 from Glycine soja PI 468916. **Crop Science**, v. 53, n. 3, p. 775–785, 2013.

LIMA, F. S. O.; CORREA, V. R.; NOGUEIRA, R.; SANTOS, P. R. R. Nematodes Affecting Soybean and Sustainable Practices for Their Management. **Soybean - The Basis of Yield, Biomass and Productivity**, v. 3, p. 95–110, 2017.

LIU, S.; KANDOTH, P. K.; LAKHSSASSI, N.; KANG, J.; COLANTONIO, V.; HEINZ, R.; YECKEL, G.; ZHOU, Z.; BEKAL, S.; DAPPRICH, J.; ROTTER, B.; CIANZIO, S.; MITCHUM, M. G.; MEKSEM, K. The soybean GmSNAP18 gene underlies two types of resistance to soybean cyst nematode. **Nature Communications**, v. 8, 2017.

LIU, S. et al. soybean cyst nematode resistance gene points to a new mechanism of plant resistance to pathogens. **Nature**, v. 492, n. 7428, p. 256–260, 2012.

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

SANTANA, F. A.; SILVA, M. F. da; GUIMARÃES, J. K. F.; FERREIRA, M. F. da S.; PEREIRA, W. D.; PIOVESAN, N. D.; BARROS, E. G. de. Marker-assisted selection strategies for developing resistant soybean plants to cyst nematode. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 14, n. 3, p. 180–186, 2014.

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

SHI, Z.; LIU, S.; NOE, J.; ARELLI, P.; MEKSEM, K.; LI, Z. SNP identification and marker assay development for high-throughput selection of soybean cyst nematode resistance. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 1–12, 2015.

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

TEIXEIRA, L. C. A. **ESTUDO GENÉTICO DE POPULAÇÕES DE SOJA COM FONTE DE RESISTÊNCIA À *Heterodera glycines* (RAÇA 3) ORIUNDAS DE TOPOCRUZAMENTOS TIPO ALIMENTO X TIPO GRÃO**. 2016. Tese de doutorado - Universidade Estadual Paulista - UNESP, 2016.