

**MARCIA FLORES DA SILVA**

**MAPEAMENTO E VALIDAÇÃO DE QTLs DE RESISTÊNCIA AO  
NEMATÓIDE DE CISTO DA SOJA**

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

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2006**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**MARCIA FLORES DA SILVA**

**MAPEAMENTO E VALIDAÇÃO DE QTLs DE RESISTÊNCIA AO  
NEMATÓIDE DE CISTO DA SOJA**

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

APROVADA: 20 de fevereiro de 2006

---

Prof. Cosme Damião Cruz  
(Conselheiro)

---

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros  
(Conselheiro)

---

Dra. Cláudia Teixeira Guimarães

---

Dra. Eveline Teixeira Caixeta

---

Prof. Maurilio Alves Moreira  
(Orientador)

*A os meus pais Miguel e Maria Eunice pelo amor, exemplo e incentivo*

*A o meu marido A dácio e minha filha Glória Maria razões do meu viver*

*A os meus irmãos A dilson, Cesar, Jacira e Mônica e aos meus sobrinhos A line, Heloisa e Gustavo pela alegria.*

## AGRADECIMENTO

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade da realização do curso de Doutorado em Genética e Melhoramento.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

À Embrapa Soja por ter possibilitado o uso de sua infra-estrutura, na realização de parte deste trabalho e à COODETEC por fornecer parte das populações de estudo.

Ao Professor Maurilio Alves Moreira, pela orientação, ensinamentos, seriedade, competência e amizade.

Aos professores Cosme Damião Cruz e Everaldo Gonçalves de Barros e ao Dr. Ivan Schuster, meus conselheiros, pela cooperação, ensinamentos, apoio e amizade na realização deste trabalho.

À Rita e à Conceição pela disposição em ajudar.

Aos amigos dos laboratórios Biomol I, II e Sequenciamento: Taís, Lucinete, Gerardo, Rita, Andréia, Polyana, Marcia Regina, Cândida, Newton, Luíz, Francisco, João Paulo, Reginaldo, Demerson, Josiane, Suelen, Edgar, Klever, Thiago, Fernanda, Maria Fernanda, Fábio, Telma, Beatriz, Cassiana e Ana, pela alegria do convívio.

Aos amigos do programa de pós-graduação em genética e melhoramento, pelos momentos vividos e aprendizagem.

A meus pais Miguel e Maria Eunice, pelo amor e incentivo. À meus irmãos Adilson e Cesar pelo carinho, apoio e compreensão. À minha cunhada Jacira e minhas sobrinhas Aline, Heloisa, pela alegria. Aos meus avós maternos Armando e Nair e paternos (*in memorium*) José e Purcina, pelo exemplo. À minha nova família Glória Marlene, Sebastião, Deize e Denizia, Celso, Jonas, Gustavo e Phelipe que me receberam de braços abertos. E à Mônica e a Izana pelo carinho e amizade.

À Glória Maria, minha filha querida.

A meu esposo Adésio pelo amor, carinho, companheirismo, ensinamentos e pela disposição em me ajudar em todos os momentos.

A Deus.

## BIOGRAFIA

Marcia Flores da Silva, filha de Miguel Gonçalves da Silva e Maria Eunice Flores da Silva, nasceu em Iretama, Paraná, em 29 de outubro de 1978.

No ano de 1996, iniciou o curso de Ciências Biológicas, pela Universidade Estadual de Maringá, onde em fevereiro de 2000, graduou-se como Bióloga.

Em março de 2000, iniciou o curso de mestrado em Genética e Melhoramento na Universidade Estadual de Londrina e desenvolveu sua dissertação de mestrado no Centro Nacional de Pesquisa de Soja – Embrapa, submetendo-se aos exames finais no dia 18 de defesa de dissertação, no dia 18 de fevereiro de 2002.

Em abril de 2002, ingressou no curso de doutorado em Genética e Melhoramento na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se aos exames finais de defesa de tese para obtenção do título de *Doctor Scientiae* em Genética e Melhoramento, no dia 20 de fevereiro de 2006.

## CONTEÚDO

	Página
<b>RESUMO</b> .....	x
<b>ABSTRACT</b> .....	xii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	05
<b>2.1. SOJA IMPORTÂNCIA E ASPECTOS GERAIS</b> .....	05
2.1.1 <i>Centro de origem e importância econômica</i> .....	05
2.1.2 <i>Aspectos taxinômicos, genéticos e genômicos da soja</i> .....	06
<b>2.2 NEMATÓIDE DE CISTO DA SOJA</b> .....	07
2.2.1 <i>Caracterização e danos à cultura da soja</i> .....	07
2.2.2 <i>Etiologia, sintomatologia e controle</i> .....	08
2.3. <i>Variabilidade genética e identificação de raças do NCS</i> .....	09
<b>2.3. RESISTÊNCIA DA SOJA AO NCS E DIVERSIDADE GENÉTICA</b> .....	11
2.3.1 <i>Estudos de herança clássica para a resistência ao NCS</i> .....	11
2.3.2 <i>Estudos de QTLs para a resistência ao NCS</i> .....	14
<b>2.4. SITUAÇÃO ATUAL NOS PROGRAMAS DE MELHORAMENTO</b> .....	17
2.4.1 <i>Fontes de resistência utilizadas</i> .....	17
2.4.2 <i>Seleção assistida por marcadores moleculares</i> .....	17
2.4.3 <i>Validação de marcadores moleculares associados a QTLs</i> .....	19
<b>3. BIBLIOGRAFIA</b> .....	21

## CAPÍTULO 1

### HERANÇA DA RESISTÊNCIA DA SOJA AO NEMATÓIDE DE CISTO, RAÇAS 3, 9 E 14, EM POPULAÇÕES DE RILs E F<sub>2</sub>

<b>RESUMO</b> .....	30
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	31
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	34
2.1 <i>Material Genético</i> .....	34
2.2 <i>Avaliação Fenotípica</i> .....	34
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	36
<b>4. BIBLIOGRAFIA</b> .....	42

## CAPÍTULO 2

### MAPEAMENTO DE QTLs COM MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA AS RAÇAS 3, 9 E 14 DO NEMATÓIDE DE CISTO DA SOJA

<b>RESUMO</b> .....	45
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	46
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	47
2.1 <i>Material Genético</i> .....	47
2.2 <i>Avaliação Fenotípica</i> .....	47
2.3 <i>Extração do DNA e genotipagem dos SSR</i> .....	49
2.4 <i>Análise Estatística, Mapa de Ligação e Detecção de QTLs</i> .....	50
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	53
3.1 <i>Dados fenotípicos</i> .....	53
3.2 <i>Análise de ligação e mapeamento de QTLs</i> .....	55
3.3 <i>QTLs associados ao NCS</i> .....	57

<b>4. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>63</b>
------------------------------	-----------

### **CAPÍTULO 3**

#### **VALIDAÇÃO DE MICROSSATÉLITES PARA A SELEÇÃO ASSISTIDA A RESISTÊNCIA AS RAÇAS 3 E 14 DO NEMATÓIDE DE CISTO DA SOJA EM DUAS POPULAÇÕES**

<b>RESUMO.....</b>	<b>68</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>69</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>71</b>
2.1. <i>Material Genético .....</i>	71
2.2. <i>Avaliação fenotípica .....</i>	71
2.3. <i>Extração do DNA e genotipagem dos SSR .....</i>	72
2.4. <i>Análise de ligação e mapeamento de QTLs .....</i>	74
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>75</b>
3.1. <i>Dados fenotípicos .....</i>	76
3.2. <i>Dados genotípicos.....</i>	77
<b>4. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>83</b>

### **CAPÍTULO 4**

#### **MAPEAMENTO DE QTLs PARA CARACTERES AGRONÔMICOS EM SOJA USANDO LINHAGENS ENDOGÂMICAS RECOMBINANTES**

<b>RESUMO.....</b>	<b>87</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>88</b>

<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	90
2.1. <i>Material Genético</i> .....	90
2.2. <i>Avaliação Fenotípica</i> .....	90
2.3. <i>Extração do DNA e amplificação de marcadores microssatélites</i> .....	91
2.4. <i>Análise de ligação e associação marcadores-QTLs</i> .....	93
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	94
3.1. <i>Dados Fenotípicos</i> .....	94
3.2. <i>Mapa genético e mapeamento de QTLs</i> .....	98
<b>4. BIBLIOGRAFIA</b> .....	105
<b>CONCLUSÕES</b> .....	109

## RESUMO

SILVA, Marcia Flores da, D.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2006.  
**Mapeamento e validação de QTLs de resistência ao nematóide de cisto da soja.** Orientador: Maurilio Alves Moreira. Conselheiros: Cosme Damião Cruz, Everaldo Gonçalves de Barros e Ivan Schuster.

Visando estudar a resistência da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) ao nematóide de cisto - NCS (*Heterodera glycines* Ichinohe) e auxiliar a implantação da seleção assistida por marcadores moleculares nos programas de melhoramento, o presente trabalho teve como objetivos: (a) estudar a herança da resistência às raças 3, 9 e 14 do NCS em diferentes populações; (b) identificar e mapear microssatélites ligados ao(s) gene(s) de resistência à estas raças, em uma população de linhagens endogâmicas recombinantes (RILs); (c) validar os marcadores microssatélites identificados, em populações F<sub>2</sub> originadas de diferentes fontes de resistência daquelas onde os marcadores foram mapeados; e (d) mapear QTLs para diversas características agrônômicas de soja. No estudo de herança foram detectados quatro genes epistáticos para a resistência à raça 14 e três genes epistáticos para as raças 3 e 9 na população de RILs do cruzamento entre Hartwig x Y23. Na população F<sub>2</sub> do cruzamento Msoy 8001 x Conquista, foi identificado um gene recessivo que condiciona resistência moderada e dois genes recessivos conferindo resistência completa à raça 3. Para a raça 14, na população F<sub>2</sub> do cruzamento S5995 x Renascença, foram identificados dois genes recessivos para a resistência moderada. No mapeamento de QTLs nas RILs foram identificados quatro QTLs para a resistência a raça 3 nos grupos de ligação (GL) G, A2, J e M, explicando de 12,9% a 34,8% da variação fenotípica, um QTL para a resistência à raça 9 no GL G,

explicando 22% da resistência, e apenas associações significativas entre marcadores e a raça 14, principalmente nos GL G e C2. Para a resistência à raça 3, a seleção assistida realizada com os marcadores mais significativos dos GL G e A2 apresentou resultado similar à seleção fenotípica. Na validação de microssatélites para a seleção assistida de plantas com resistência à 3, confirmou-se a associação de marcadores do GL A2 e G, sendo que juntos os marcadores Satt309 no GL G e GMENOD2B no GL A2 apresentaram 100% de eficiência de seleção (ES). Para a resistência a raça 14, avaliada na população S5995 x Renascença, somente marcadores no GL G apresentaram associação significativa. O Satt309, explicou a maior proporção da variância fenotípica e a melhor combinação de marcadores para a seleção de plantas resistentes a esta raça foi do Satt309 com o Satt356, que juntos proporcionaram 100% de ES. Ganhos similares foram obtidos na seleção assistida e na seleção fenotípica. No estudo de mapeamento de QTLs para características agrônômicas, foram mapeados cinco QTLs no GL D1a para as características: dias para o florescimento - R1; altura da planta no florescimento - APF; altura da primeira vagem - APV; número de vagem por planta - NVP; e número de semente por planta - NSP; quatro QTLs no GL N para as características: APF; R1; número de nós na maturação - NNM; e dias para maturação - R8; e dois QTLs no GL F para NNM e NSP, todos no ano de 2001. Para as avaliações de 2002 foram identificados QTLs nos GL A2 (NNM), C2 (APV, NVP), D1a (R1), N (R8), F (NNM), K (R8, APF e APV), H e J (ambos para NSP). Para a característica produção - PRO, avaliada em 2001, foram detectados QTLs nos GL E, G, O e K. QTLs consistentes entre anos foram mapeados para R1 (GL D1a), R8 (GL N) e NNM (GL F). Os intervalos entre os marcadores Satt147 - Satt408 (GL D1a) e Sat\_033 - Satt237 (GL N), foram significativos para várias características, no ano de 2001, sugerindo efeito pleiotrópico destas regiões para as diferentes características. Os resultados deste trabalho serão úteis para a seleção assistida à resistência ao NCS aos programas brasileiros de melhoramento da soja.

## ABSTRACT

SILVA, Marcia Flores da, D.S., Universidade Federal de Viçosa, February 2006.  
**Mapping and validation of QTLs for resistance to soybean cyst nematode.**  
Adviser: Maurilio Alves Moreira. Committee members: Cosme Damião Cruz,  
Everaldo Gonçalves de Barros and Ivan Schuster.

To study soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) resistance to the cyst nematode - NCS (*Heterodera glycines* Ichinohe) and to help the implantation of the marker assisted selection in breeding programs, the present work was carried with the following objectives: (a) to study the inheritance of resistance to the races 3, 9 and 14 of NCS in different populations; (b) to identify and map microsatellites linked to gene(s) for resistance to those races in a population of recombinant inbred lines (RILs); (c) to validate QTLs in F<sub>2</sub> populations originated from different resistance sources from which the QTLs were mapped; and (d) to map QTLs for several agronomic characteristics of soybean. In the inheritance study, four epistatic genes for resistance to the race 14 and three epistatic genes for the races 3 and 9 were detected in the RILs population of the crossing Hartwig x Y23. In F<sub>2</sub> population from the crossing Msoy8001 x Conquista, a recessive gene conditioning moderate resistance and two recessive genes giving complete resistance to race 3 were identified. For race 14, two recessive genes for the moderate resistance were identified in the F<sub>2</sub> population of the crossing S5995 x Renascença. In mapping of QTLs in RILs, for resistance to NCS, the following were identified: four QTLs for race 3 in the linkage groups (GL) G, A2, J and M, explaining from 12.9% to 34.8% of phenotypic variation; one QTL for resistance to race 9 in GL G, explaining 22%

of resistance; and only significant associations between markers and race 14, mainly in the GL G and C2. For race 3, the assisted selection accomplished with the most significant markers of the GL G and A2 showed a result similar to that of the phenotypic selection. In validation of microsatellites for marker assisted selection of plants with resistance to race 3, the association of resistance with markers of GLs A2 and G was confirmed, and together the markers Satt309 in GL G and GMENOD2B in GL A2 showed 100% efficiency in selection (ES). For resistance to race 14, evaluated in the population S5995 x Renascença, only markers in GL G showed significant association with resistance. The Satt309 marker explained the highest proportion of phenotypic variance. The best marker combination for the selection of plants resistant to this race was Satt309 with Satt356, that together provided 100% of ES. In 2001, studying the QTLs mapping for agronomic characteristics, were mapped: five QTLs in GL D1a for the characteristics concerning to days for flowering - R1, plant height in flowering – APF, first pod height – APV, pod number per plant – NVP, and seed number per plant – NSP; four QTLs in GL N for the characteristics concerning to APF, R1, node numbers in maturation – NNM, and days for maturation - R8; and two QTLs in GL F for node number at maturation – NNM, and seed number per plant – NSP. In evaluations performed in 2002, the QTLs were identified in GL A2 (NNM), C2 (APV, NVP), D1a (R1), N (R8), F (NNM), K (R8, APF and APV), H and J (both for NSP). For the yield, evaluated in 2001, QTLs were detected in the GLs E, G, O and K. In both years, consistent QTLs were mapped for R1 (GL D1a), R8 (GL N) and NNM (GL F). In 2001, the intervals between the markers Satt147 - Satt408 (GL D1a) and Sat\_033 - Satt237 (GL N) were significant for several characteristics, therefore suggesting a pleiotropic effect of these regions for different characteristics. It is worth to emphasize that these results will be useful to the assisted selection for resistance to NCS in the Brazilian soybean breeding programs.

## 1. INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é a mais importante oleaginosa cultivada no mundo e também a cultura mais rica em proteína, sendo o quarto grão mais produzido depois do milho, do trigo e do arroz (Anuário, 2000). O grão de soja típico apresenta 40% de teor protéico e 20% de teor de óleo (Hymowitz, 2004). Com isso um vasto complexo agro-industrial foi gerado destinado ao processamento de derivados, fazendo da soja uma das principais “*commodities*” do mundo (Embrapa, 2005).

Os programas de melhoramento da soja, de maneira geral, objetivam a obtenção de cultivares com finalidades diversas (Toledo et al., 1994), e que apresentem alta produtividade e estabilidade de produção em ambientes variados. A estabilidade é conferida pela introdução de resistência às doenças, aos nematóides e aos insetos e de características especiais como tolerância aos solos ácidos, raiz profunda e alta qualidade fisiológica da semente, tornando a planta tolerante a fatores adversos que comprometem a produção (Almeida e Kiihl, 1998).

As doenças que acometem a cultura estão entre os principais fatores que limitam a obtenção de altos rendimentos. Segundo a Embrapa (2006), 46 doenças causadas por fungos, bactérias, nematóides e vírus, já foram identificadas no Brasil. A importância econômica de cada doença varia de ano para ano e de região para região, dependendo das condições climáticas de cada safra. As perdas anuais de produção por doenças são estimadas em cerca de 15% a 20%, entretanto algumas doenças podem ocasionar perdas de quase 100%.

Dentre os agentes patológicos da soja, o Nematóide de Cisto da Soja (NCS), *Heterodera glycines* Ichinohe, é uma das limitações mais sérias para a produção de soja no Brasil e no mundo (Wrather et al, 1997; Young, 1996; Wrather et al, 2003), pois além de causar grandes prejuízos na produção, também é de difícil manejo

(Embrapa, 2006). O uso de cultivares resistentes é o método de controle mais econômico e eficiente, entretanto, seu uso exclusivo pode provocar pressão de seleção de raças, devido à grande variabilidade genética do parasita. Portanto, recomenda-se como controle do NCS a rotação com culturas não hospedeiras, o manejo do solo e o uso de cultivares de soja resistentes, promovendo rotatividade dos genes de resistência de diferentes fontes (Dias et al., 2005).

Vários estudos foram e têm sido feitos para identificar novas fontes de resistência e caracterizar o mecanismo de herança de resistência ao NCS e os genes associados. Com base em estudos de herança clássicos, genes recessivos e dominantes foram relatados (Caldwell et al., 1960; Matson e Williams, 1965; Rao-Arelli, 1988; Rao-Arelli et al., 1994; Epps e Hartwig, 1972; Anand e Gallo, 1984; Anand et al., 1985; Young, 1990; Rao-Arelli et al., 1997), porém o número de genes e o tipo de ação gênica predominante na resistência permanecem pouco conhecidos até o momento.

Mansur et al. (1993) propuseram que a herança da resistência fosse estudada como quantitativa, com base na distribuição contínua do número de cistos na população. A idéia foi adotada pela comunidade científica e o desenvolvimento de marcadores moleculares polimórficos, como os microssatélites (*Simple Sequence Repeats* – SSR), facilitou o estudo genético da herança. Com estes marcadores tornou-se possível a construção de mapas genéticos saturados para a soja, permitindo a identificação, a localização e a caracterização de QTLs para a resistência ao NCS. Além disso, a utilização destes marcadores é tecnicamente simples, sendo necessário pouca quantidade de DNA para que dezenas de plantas possam ser analisadas de uma só vez (Ferreira e Gratapaglia, 1998).

Dentre vários mapas genéticos publicados para a soja (Keim et al., 1997; Shoemaker e Specht, 1995; Wu et al., 2001), uma grande contribuição foi a construção de um mapa genético consenso, que integrou cinco populações de mapeamento. Este mapa integrado é constituído de 20 grupos de ligação, com mais de 1000 marcadores SSR e com saturação média de 2,5 cM entre marcadores (Cregan et al., 1999a; Song et al., 2004). Assim, marcadores associados a um QTL de interesse podem ser usados como ancora para localizar as regiões dentro do mapa de ligação da soja, em uma outra população (Schuster et al., 2001).

Com base nas informações do mapa consenso da soja, Concibido et al. (2004) fizeram um resumo dos QTLs de resistência ao NCS publicados no período de 1992 a 2004 e verificaram que, embora existam algumas inconsistências nos resultados, foram identificados QTLs em 17 grupos de ligação da soja. Dentre os QTLs detectados, um de efeito maior foi encontrado no GL G, região do gene *rhg1*, condicionando resistência a várias raças do NCS, nas PIs 209332, 90763, 437654, 89772, 88788 e nas cultivares Pecking e Hartwig (Concibido et al., 1994; 1996; 1997; Cregan et al., 1999b; Webb et al., 1995; Yue et al., 2001). Outro QTL de grande importância para a resistência à raça 3 foi detectado na região do gene *Rhg4* (GL A2) (Weisemann et al., 1992; Webb et al., 1995; Prabhu et al., 1999; Wang et al., 2004). Guo et al. (2005) sugeriram que um QTL no GL B1 é importante para a distinção entre a resistência à raça 3 e às raças 2 e 5. Sugere-se que os genes menores reportados em outros GL podem estar envolvidos na raça especificidade, porém necessitam de mais validação (Guo et al., 2005; Schuster et al., 2001).

Com estes resultados, a seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) para a resistência NCS tornou-se uma valiosa ferramenta de auxílio nos programas de melhoramento. A SAM permite identificar linhagens com base nos alelos de marcadores genéticos ligados à resistência, reduzindo o número de linhagens a serem avaliadas em casa de vegetação (Young e Mudge, 2002), que é uma das grandes limitações para desenvolver cultivares resistentes, uma vez que é demorada, dispendiosa, influenciada pelo ambiente e restringe o número de plantas avaliadas.

Apesar da SAM ser uma estratégia mais econômica, ela só está sendo utilizada para a raça 3, uma vez que, deve-se tomar cuidado em assumir que a ligação marcador-QTL irá permanecer em diferentes *backgrounds* genéticos ou em diferentes experimentos. Vários fatores podem influenciar a detecção de QTLs como: a magnitude do QTL; a existência de outros QTLs ligados; o tamanho da população de mapeamento; a veracidade da avaliação fenotípica; os erros de genotipagem; os dados perdidos e os efeitos ambientais (Francia et al., 2005; Collard et al., 2005). Portanto, para a aplicação no melhoramento, os QTLs já publicados só serão úteis se puderem ser validados em populações independentes (Fasoula et al., 2004). Validar neste contexto significa determinar a eficiência de seleção dos marcadores moleculares em outros *backgrounds* genéticos. Além disso, para características como os componentes de produção é importante que sejam detectados QTLs consistentes

em vários ambientes para que estes possam efetivamente ser utilizados em programas de melhoramento.

Este trabalho teve como objetivos: (a) estudar a herança da resistência ao NCS, considerando padrão de herança qualitativo às raças 3, 9 e 14 do NCS em uma população de RILs e em outras duas populações de melhoramento  $F_2$ ; (b) identificar e mapear marcadores moleculares ligados ao(s) gene(s) de resistência às raças 3, 9 e 14 do NCS, em uma população de RILs, visando a sua utilização nos programas de melhoramento; (c) validar marcadores microssatélites identificados para as raças 3 e 14 do NCS, em populações com diferentes fontes de resistência daquelas em que os marcadores foram mapeados; e (d) mapear QTLs para diversas características agronômicas da soja.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. SOJA IMPORTÂNCIA E ASPECTOS GERAIS

#### 2.1.1 *Centro de origem e importância econômica*

O centro de origem da soja está localizado na região leste da Ásia, muito provavelmente na região centro-sul da China (centro primário). A Manchúria, região chinesa onde a soja foi domesticada, constitui o centro secundário (Xu et al., 1989). No Brasil, a soja foi introduzida em 1882, na Bahia, e em 1890, foi testada como produtora de forragem em Pelotas (RS), porém, só começou adquirir importância econômica na década de 1940, no Rio Grande do Sul, com a introdução de algumas cultivares dos EUA (Almeida e Kiihl, 1998) e foi estabelecida como cultura de importância econômica para o país somente na década de 1960 (Embrapa, 2006).

Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor de soja do mundo, sendo esta a principal cultura de exportação do país, sendo cultivada em 17 estados. Na safra de 2004/2005 foram cultivados 23.301 milhões de hectares, 9% a mais em relação à safra anterior, com uma produção de 51,09 milhões de toneladas, 2,6% a mais que no ano anterior. No entanto, a produtividade média foi de 2.193 kg/ha, 5,8% menor que a da safra anterior. Esta redução no rendimento foi atribuída à acentuada seca no Sul e nos outros estados (Conab, 2005).

A soja e seus derivados têm grande participação na pauta das exportações do país, além de ser a maior fonte de óleo comestível no Brasil (Roessing e Guedes, 1993). Os maiores clientes do Brasil são: Holanda, China, Alemanha e Espanha, que importam mais de 9,2 milhões de toneladas do produto, correspondendo a quase 60% dos negócios internacionais do país no que se refere à soja em grãos e ao farelo (Conab, 2003).

### 2.1.2 Aspectos taxonômicos, genéticos e genômicos da soja

A soja cultivada é uma planta anual, herbácea, cuja posição taxonômica é a seguinte: Divisão - Spermathophyta; Subdivisão - Angiosperma; Classe - Dicotiledônea; Ordem - Rosale; Família - Leguminosae; Subfamília - Faboideae; Tribo - Phaseoleae; Gênero - *Glycine*; Espécie - *Glycine max* (L.) Merrill (Menosso, 2000).

O gênero *Glycine* é formado por dois subgêneros: *Glycine* e *Soja*. O subgênero *Glycine* inclui as espécies anuais a soja cultivada *G. max* e a soja selvagem *G. soja*. Essas duas espécies são alotetraplóide ( $2n = 40$ ), com comportamento meiótico de um diplóide normal e são facilmente cruzadas, constituindo efetivamente uma espécie simples (Probst e Judd, 1973; Singh e Hymowitz, 1988), que apresentam alto grau de auto-polinização e são consideradas como linhagens endogâmicas. Existem outras 22 espécies perenes reconhecidas dentro do gênero *Glycine*, das quais *Glycine tabacina* e *Glycine tomentella* são neopoliploides ( $2n=78, 80$ ; Hymowitz, 2004).

O genoma da soja possui tamanho médio comparado com o de muitas outras plantas, compreendendo 1,115 milhões de pares de base por genoma haplóide (Shoemaker et al., 2003), sendo mais de 35% constituído de heterocromatina, com o braço curto de seis dos 20 cromossomos bivalentes completamente heterocromáticos (Sing e Hymowitz, 1988). Apresenta ainda entre 40 a 60% de seqüências de DNA repetitivo e, das sondas RFLP testadas, aproximadamente 90% detectaram locos duplicados (Shoemaker et al., 1996), dentre essas cerca de 60% detectaram três ou mais locos. Considera-se que sua história de poliploidia, seja a razão de genes duplicados (dois genes independentes controlando a mesma característica) (Palmer e Kilen, 1987).

Os rearranjos que ocorreram no genoma da soja, provavelmente, como parte de um processo de diploidização, tornam difícil identificar extensões prolongadas de segmentos cromossômicos sintênicos entre soja e outras leguminosas relacionadas. Segundo Lee et al. (1999) e Shoemaker et al. (2003) segmentos homeólogos de grupos de ligação da soja apresentam alto grau de sintênia com cromossomos de feijoeiro comum.

Quanto aos marcadores moleculares de DNA, mais de 1000 microssatélites já foram identificados para a soja e estão disponíveis comercialmente. Morgante et al.

(2002) e Cardle et al. (2000) (em Song et al., 2004) sugeriram que microssatélites estão, significativamente, associados à fração do genoma de plantas de baixo número de cópias, baseado na estimativa da densidade de microssatélites em *Arabidopsis thaliana*, arroz, soja, milho e trigo. A frequência de SNPs no genoma da soja é considerada baixa, de aproximadamente 1,98/kbp e 4,68/kbp em regiões codantes e não codantes, respectivamente, estimado em 25 genótipos (Zhu et al., 2003).

## 2.2. NEMATÓIDE DE CISTO DA SOJA

### 2.2.1. Caracterização e danos à cultura da soja

O Nematóide de Cisto da Soja (NCS), *Heterodera glycines* Ichinohe, é membro da ordem Tylenchida, família Heterodidae (Wrather et al., 1984). A doença causada por esse patógeno, primeiramente observada no Japão em 1915, recebeu o nome de nanismo-amarelo, devido aos sintomas que causava nas plantas infectadas. Posteriormente, foi relatada a sua presença na Coreia, na China, nos EUA, no Egito e na Colômbia, em 1973 (Tihohod, 1993).

No Brasil, o NCS foi detectado pela primeira vez na safra 1991/1992 (Lima et al., 1992; Lordello et al., 1992; Monteiro e Morais, 1992), e atualmente está presente em mais de 100 municípios, de dez estados brasileiros (MT, MS, GO, MG, RS, PR, SP, BA, TO e MA) (Embrapa, 2005) e é um dos principais fatores limitantes à produção de soja no Brasil. Em 1998, a Conab reportou que as perdas na produção da soja brasileira devido ao NCS, desde a safra 1991/1992, superaram US\$ 200 milhões, ressaltando-se que somente na safra 1997/1998 esse valor foi de US\$ 140 milhões. A evolução da doença no Brasil é considerada rápida em comparação com o que ocorreu nos EUA, onde essa doença surgiu em 1954 e, após 25 anos, os prejuízos alcançaram cerca de US\$ 350 milhões na safra de 1979 (Goellner, 1995, citado por Cunha, 1997).

Noel (1992) verificou 20 a 30% de prejuízos no rendimento da soja em campos infestados com nematóides, mesmo na ausência de sintomas severos. Young (1996) também relatou redução do rendimento mesmo sem sintomas visíveis, sugerindo que amostras periódicas nos campos de cultivo de soja são necessárias para monitorar as infestações do NCS. Segundo Chen et al. (2001), os rendimentos tanto de cultivares resistentes quanto de suscetíveis podem estar relacionados à densidade da população do NCS.

### 2.2.2. Etiologia, sintomatologia e controle

O NCS é um parasito de fecundação cruzada e endoparasita sedentário obrigatório. O ciclo de vida varia de 21 a 24 dias à temperatura de 23 a 25°C, consistindo de seis estádios: ovo, quatro estádios larvais e a forma adulta que é dimórfica e sexualmente ativa. O segundo estágio larval (J2) é a forma infectiva. A larva penetra na raiz, migra até uma região próxima ao cilindro vascular, onde após algumas transformações nas células vegetais e da larva, se forma a estrutura de alimentação do nematóide (Endo, 1992). Após 15 a 20 dias da infecção, os machos abandonam a raiz e a fêmea adulta produz entre 200 e 400 ovos, que permanecem em seu interior. Após a morte da fêmea, sua cutícula se altera quimicamente, adquire coloração marrom e se transforma em uma estrutura rígida, chamada de cisto, que é cheia de ovos altamente resistentes a deteriorização e a dessecação, além de muito leve, facilitando o desprendimento da raiz e ficando no solo (Triantaphyllou e Hirschmann, 1962).

Apesar da gama de espécies hospedeiras do NCS ser limitada, da maioria das espécies de plantas cultivadas serem resistentes, e do NCS não se reproduzir nas plantas daninhas mais comuns nas lavouras de soja no Brasil, o cisto do nematóide pode sobreviver no solo, na ausência de plantas hospedeira, por mais de oito anos, o que o torna praticamente impossível de ser eliminado onde há ocorrência. Em solo úmido com temperaturas de 20 a 30°C, as larvas eclodem e, se encontrarem a raiz de uma planta hospedeira, penetram e o ciclo se completa em três ou quatro semanas (Embrapa, 2003). Desta forma, o NCS tornou-se uma das principais pragas da cultura da soja pelos prejuízos que pode causar e pela facilidade de disseminação.

Nas raízes de plantas de soja, o NCS dificulta a absorção de água e de nutrientes retardando o crescimento das mesmas e inibindo a nodulação do *Bradyrhizobium japonicum* (Kirchner) Buchanan (Riggs e Schmitt, 1989), causando redução do porte e do número de vagens e, como consequência, a baixa produtividade. O primeiro sintoma da infestação por NCS aparece no campo como uma área circular ou oval, de plantas atrofiadas, cloróticas e com poucas vagens, denominada reboleira. Em locais de alta infestação do patógeno também pode ocorrer morte prematura de plantas (Riggs e Schmitt, 1989). O sistema radicular fica reduzido e infestado por minúsculas fêmeas do nematóide com formato de limão

ligeiramente alongado (Embrapa, 2003). Frequentemente, os danos mais severos são produzidos no centro da reboleira, reduzindo nas margens.

Asmus e Ferraz (2002) reportaram reduções marcantes da taxa fotossintética e do teor de clorofila, acompanhados de intenso amarelecimento nas folhas. Além disso, em seus estudos, mesmo na menor densidade populacional utilizada, o nematóide causou expressivas reduções na área foliar, na massa fresca das raízes e na produção da massa seca total da parte aérea e de grãos.

A utilização de variedades resistentes é uma das principais ferramentas de controle do NCS (Boerma e Hussey, 1992), porém, seu uso exclusivo pode provocar pressão de seleção de raças, devido à grande variabilidade genética desse parasito. A recomendação é que o controle seja realizado combinando as estratégias de rotação com culturas não hospedeiras, manejo do solo e a utilização de cultivares resistentes (Embrapa, 2003). Além disso, para o uso efetivo de cultivares resistentes em rotações de culturas devem-se utilizar diferentes fontes de resistência (Chen et al., 2001). Outras estratégias para reduzir a reprodução e disseminação do NCS é o controle biológico por fungos (Hartwig, 1981) e o uso de produtos químicos (Tihohod, 1993).

### 2.2.3. Variabilidade genética e identificação de raças do NCS

O melhoramento para resistência a doença difere do melhoramento para outras características por ser necessário levar em consideração a variabilidade genética dos dois organismos biológicos envolvidos: a planta hospedeira e o parasita (Singh, 1986). Assim, em programas de melhoramento, os testes para reação às principais doenças são realizados simultaneamente ao avanço das gerações (Buss et al., 1989).

O NCS possui grande variabilidade genética e a maioria dos cultivares de soja plantadas no Brasil é suscetível (Embrapa, 2006). O termo raça é utilizado para designar as formas intra-específicas do NCS, entretanto o conceito de raça aplicado a este patógeno não é baseado no seu genótipo e sim no fenótipo predominante em uma determinada população em um determinado tempo. Ross (1962) informou, pela primeira vez, a existência de raças fisiológicas dentro de *H. glycines*. Anos depois, Golden et al. (1970) propuseram descrever a diversidade do NCS por um sistema de raças fisiológicas, utilizando quatro genótipos de soja resistentes e um padrão suscetível. Com base neste critério, a raça de uma população de NCS era

determinada pela sua habilidade de reprodução no conjunto de variedades de soja diferenciadoras. Com este sistema os autores identificaram quatro raças (denominadas numericamente), usando como hospedeiros diferenciais os genótipos Pickett, Peking, PI 88788 e PI 90763 e o padrão suscetível, Lee. Posteriormente, Riggs et al. (1988) propuseram outro modelo para identificação de 16 raças de *H. glycines*, utilizando também quatro diferenciadores (Quadro 1). Entretanto, nesse modelo as raças 11, 12, 13 e 16 são apenas hipotéticas, visto que o cultivar Pickett não herdou todos os genes de resistência presentes em Peking (Riggs et al., 1977). Embora esse método seja usado com sucesso na identificação de raças, não existe padronização completa dos fatores envolvidos, e um mesmo isolado pode ser classificado em raças diferentes, dependendo do local onde foi feito o teste. Segundo os autores, isso é consequência de variações nos testes de raça e das diferenças genéticas das plantas e da variabilidade genética nas populações de nematóides.

Niblack et al. (2002) propuseram a inclusão de novas variedades diferenciadoras ou linhas indicadoras para melhor descrever a diversidade do NCS fossem incluídas diferenciadoras adicionais ou linhas indicadoras. Adicionalmente, eles sugeriram classificar populações de nematóides como “tipos *H. glycines*” (tipos HG), por considerar que o sistema de raças não avalia toda a diversidade presente para o NCS.

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

Doze raças já são conhecidas nos EUA (raças 1 a 10, 14 e 15) e no Brasil, já foram encontradas 11 (1, 2, 3, 4, 4<sup>+</sup>, 5, 6, 9, 10, 14 e 14<sup>+</sup>), embora o histórico da utilização de cultivares resistentes ao NCS ser recente. A raça 3 seja é a mais comum nos EUA e também no Brasil (Noel et al., 1994; Embrapa, 2005), sendo que as raças 1, 2, 9 e 14 vêm se tornando cada vez mais importantes. Atualmente, a distribuição das raças do NCS no Brasil é a seguinte: Mato Grosso, raças 1, 2, 3, 4, 4<sup>+</sup>, 5, 6, 9, 10, 14 e 14<sup>+</sup>; Mato Grosso do Sul e Goiás, raças 3, 4, 5, 6, 10 e 14; Minas Gerais e Rio

Grande do Sul, raças 3 e 6; Paraná, São Paulo e Bahia, raça 3; Tocantins, raça 1; e Maranhão, raça 9 (Dias et al., 2005).

Quadro 1 – Esquema utilizado para identificação de raças de *Heterodera glycines*

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

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

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

### 2.3. RESISTÊNCIA DA SOJA AO NCS E DIVERSIDADE GENÉTICA

#### 2.3.1. Estudos de herança qualitativa para a resistência ao NCS

Para se fazer uso adequado do germoplasma em um programa de melhoramento genético para a resistência, é importante que se conheça a relação genética entre as várias fontes de resistência, estabelecendo primeiramente o modo de herança de cada fonte. Se os padrões forem simples e similares nas fontes, posteriormente, deve-se determinar se a resistência nas diferentes fontes está no mesmo ou em diferentes locos (Buss et al., 1989).

O mecanismo de resistência ao NCS é do tipo reação de hipersensibilidade, pois os tecidos afetados morrem e o nematóide não consegue completar seu desenvolvimento (Mendes, 1993). A capacidade de parasitar dos nematóides é uma característica qualitativa, portanto o nematóide possui ou não. Porém, a agressividade das populações do nematóide é considerada uma característica quantitativa, definida em relação ao nível de reprodução do nematóide que ocorre no genótipo do

hospedeiro. De forma geral, os hospedeiros resistentes não permitem o desenvolvimento das fêmeas até a maturidade reprodutiva, desenvolvendo reação de hipersensibilidade.

Desde que o NCS foi identificado, nos EUA, vários estudos foram realizados para identificar novas fontes de resistência e caracterizar os genes de resistência associados. Ross e Brim (1957) identificaram pela primeira vez resistência ao NCS. Em estudos posteriores, genes dominantes e recessivos foram identificados em diversas fontes de resistência (Quadro 2). Hartwig (1985) reportou que Peking, PI90763, PI88788 e PI89772 possuem genes para uma grande variedade de populações de NCS. Rao-Arelli e Anand (1988) verificaram que Peking tem genes em comum com a PI 90763 e PI 438489B, enquanto a PI 90763 têm genes em comum com a PI 438489B, PI 404166 e PI 404198. Além disso, dois genes dominantes e um recessivo estão envolvidos na resistência no cruzamento de Peking X PI 88788, e dois genes dominantes no cruzamento PI88788 X PI 438496B.

A dificuldade na condução de testes de alelismo com os genes de resistência ao NCS estabelecidos é uma limitação para a descoberta de novos genes de resistência (Concibido et al., 2004).

Deve-se considerar, também, que vários fatores dificultaram a melhor compreensão da resistência ao NCS como: 1) estudos de herança utilizando populações de NCS geneticamente heterogêneas (Luedders, 1989); 2) a classificação do genótipo resistente considerando um valor de IP inferior a 10%, que pode reduzir as estimativas do número de locos de resistência, pois uma linhagem avaliada como resistente pode não ter todos os locos da fonte doadora; 3) o estudo da herança como qualitativa (Mansur et al., 1993).

Mansur et al. (1993), considerando a resistência ao NCS de natureza quantitativa, determinaram que os efeitos genéticos aditivos explicaram os resultados obtidos em quase todos os cruzamentos realizados. Esses autores observaram, efeitos devido à dominância e herdabilidades no sentido amplo entre 0,48 e 0,81.

Quadro 2. Estudos da herança de resistência da soja ao nematóide de cisto realizados em diferentes fontes de resistência e para diferentes raças do NCS.

Fonte de resistência	Raça	Genes identificados	Referência
Peking	1	3 recessivos independentes ( <i>rhg1</i> , <i>rhg2</i> e <i>rhg3</i> )	Caldwell et al., 1960
Peking	3	1 dominante ( <i>Rhg 4</i> )	Matson e Williams, 1965
Peking	5	2 recessivos (ou 2 dominantes)	Anand e Arelli, 1989
Peking	3	<i>rhg1</i> , <i>rhg 2</i> e <i>Rhg4</i>	Rao-Arelli et al., 1992
Peking	1, 3 e 5	1 dominante e 2 recessivos	Qiu et al., 1997
PI 88788	14	2 dominantes e 1 recessivo	Thomas et al., 1975
PI 88788	3	Peking X PI 88788 – 1 dominante e 1 recessivo	Rao-Arelli e Anand, 1988
PI88788	3	<i>rhg 2</i> , <i>Rhg4</i> e <i>Rhg5</i>	Rao-Arelli et al., 1992
PI 90763	2	1 recessivo diferente de Peking	Hartwig e Epps., 1970
PI90763	“X”	1 recessivo	Hancock et al., 1987
<b>PI90763</b>	5	2 recessivos ou 2 dominantes	Anand e Arelli, 1989
PI 90763	3	<i>rhg 1</i> , <i>rhg 2</i> e <i>Rhg4</i>	Rao-Arelli et al., 1992
PI 90 763	5	1 dominante e 2 recessivos	Anand, 1994
PI 437654	5	2 recessivos e 2 dominantes	Myers et al., (1988)
PI 437654	5	1 recessivos e 2 dominantes	Myers et al., (1991)
Hartwig	3	1 recessivo e 1 dominante	Faghihi et al. (1995).
PI 438489B	3	2 recessivos	Rao-Arelli, 1994
PI 438489B	5	1 recessivo	Anand e Arelli, 1989
PI 438489B	1,3 e 5	2 dominantes e 1 recessivo	Yue et al., 2000
PI 438489B	2	1 dominante e 3 recessivos	Yue et al., 2000
PI 438489B	14	3 recessivos	Yue et al., 2000
PI 438496B	3	Peking X PI438496B– 2 dominantes	Rao-Arelli e Anand, 1988
PI89772	3	1 dominante e 1 recessivo	Rao-Arelli, 1994
PI 209332	3	1 dominante e 1 recessivo	Rao-Arelli, 1994
PI 424595	5	3 recessivos	Anand (1994)

### 2.3.2. Estudos de QTLs para a resistência ao NCS

Considerando a resistência ao NCS como de natureza quantitativa (Mansur et al., 1993), a tecnologia dos marcadores de DNA e a construção de mapas genéticos altamente saturados para soja (Cregan et al., 1999; Song et al., 2004) vêm dando uma grande contribuição no esclarecimento da resistência da soja ao NCS. Estas estratégias têm gerado informações relativas a número, ação e especificidade dos locos envolvidos no mecanismo de resistência, além de facilitar o mapeamento e, eventualmente, a clonagem de genes.

Concibido et al (2004) resumiram todos os QTLs de resistência ao NCS reportados em 16 trabalhos realizados no período de 1992 a 2004. Os autores verificaram associações marcador-resistência ao NCS em 17 grupos de ligação (GL) da soja (Figura 1). No GL G, foram detectadas quatro regiões associadas à resistência, nos GL B1, C2 e D2 três, nos GL A1, B2, D1a, E e M dois, e nos outros GL, apenas uma. Das fontes de resistência estudadas, nove QTLs, em regiões independentes, foram mapeados na cultivar Peking, oito na PI438489B, seis na PI 437654 e cinco ou menos em outras PIs (Figura 1). Os efeitos dos QTL reportados explicaram de 1 a 91% da variação fenotípica total para resistência nas populações utilizadas.

Um QTL de grande efeito para várias raças do NCS foi detectado no GL G nas fontes de resistência PIs 209332, 88788, 90788, 90763, 437654, Peking e Hartwig (Cregan et al., 1999b; Concibido et al., 1997; Mudge et al., 1997; Cervigni et al., 2003), conferindo resistência parcial às raças 1, 2, 3, 5, 6, 9 e 14 do NCS e o gene correspondente foi denominado *rhg1*. Outra região importante é a do gene *Rhg4* (Weisemann et al., 1992; Matthews et al., 1998) mapeado no GL A2 de grande efeito para a raça 3.

Vierling et al. (1996) identificaram quatro marcadores RFLP ligados a locos de resistência à raça 3, um de efeito maior e os outros de efeito menor, no cruzamento 'Williams 82' x 'Hartwig'. Na PI 437654 (ancestral de Hartwig), Weeb et al. (1995) mapearam três QTLs de efeito maior nos grupos de ligação A, G e M, conferindo resistência à raça 3. Para as PIs 209332, 90763, 88788 e para a cultivar Peking, Concibido et al. (1996) consideraram a resistência à raça 3 como qualitativa e detectaram ligação com marcadores RFLP no GL G. Apesar de diferentes fontes de

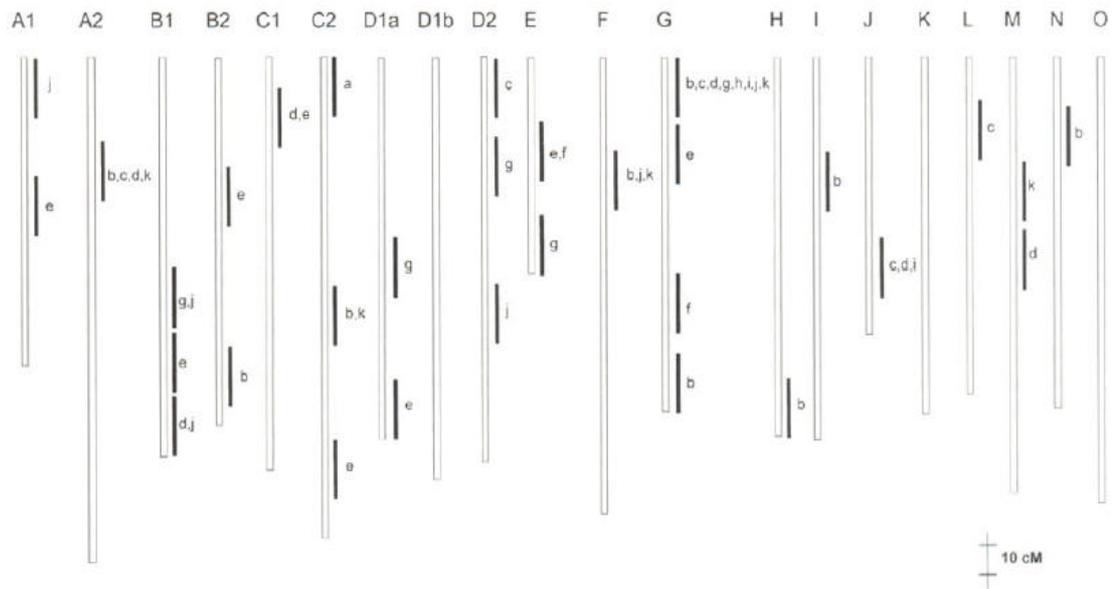
resistência terem sido identificadas, a relação entre os diferentes genes de resistência ainda é desconhecida (Young, 1996).

Yue et al. (2001a), estudando a base genética da PI 89772 às raças 1, 2, 3, 5, e 14 (moderadamente resistente a raça 14), verificaram um loco de efeito maior para resistência às diferentes raças do NCS próximos a região do *rhg1* no GL G e outros locos nos grupos de ligação B1, D1a, D2 e E que conferem resistência às raças 1, 2 e 5. Os autores concluíram que nenhum loco simples pode condicionar resistência completa a qualquer raça do NCS, mas a combinação de locos com efeitos maiores pode resultar em altos níveis de resistência. Yue et al. (2001b) também estudaram a PI 438489B, resistente às raças 1, 2, 3, 5 e 14, e encontraram QTLs nos grupos de ligação A1, A2, B1, B2, C1, C2, D1a, E e G. Entretanto, o QTL no GL G não está na região do *rhg1*, tornando esta PI única, pois é uma das poucas reportadas que não possui o *rhg1*. Os autores concluíram que alguns QTLs para diferentes raças compartilham a mesma região flanqueada por marcadores, porém QTLs para raças múltiplas deveriam estar ligados ou estar envolvidos em efeitos pleiotrópicos.

Diers e Arelli (1999) verificaram que, nas PIs 92720, 22897, 438503 e 404166, a maioria da resistência às raças 3 e 14 pode ser explicada por marcadores estreitamente ligados a genes de resistência que os melhoristas estão correntemente usando como o *rhg1* e o *Rhg4*. Para a raça 9 foram relatados um QTL de efeito menor no GL G (Cervigni et al., 2003) correspondente ao gene *rhg1*, e outro de efeito maior no GL D2 (Schuster, 1999) sendo os únicos QTLs associados à resistência à raça 9 do NCS.

O mapeamento do QTL na região do *rhg1* apresenta bastante consistência, a região do *Rhg4* no GL A2 também é comum em muitas fontes e ainda existem pelo menos outras quatro regiões que foram significativas em mais de um *background* genético. Sugere-se que os genes menores reportados estão envolvidos com a raça especificidade (Concibido et al., 2004). Utilizando marcadores microssatélites, Brucker et al. (2005) detectaram diferentes alelos de resistência do *rhg1* nas PIs 88788 e 437654.

A identificação e estudo de QTLs de resistência parcial às raças específicas, permite otimizar suas pirâmidações e com isso conseguir uma maior durabilidade espaço-temporal da resistência, sem promover a diversificação genética da população de NCS presente no solo (Anand e Koenning, 1986).



Legenda: A81-356022 – (a); Peking – (b); PI 209332 – (c); PI 437654 – (d); PI 438489B – (e); PI 468916 – (f); PI 89772 – (g); PI 88788 – (h); PI 90763 – (i); Peking + PI437654 (j); Peking + PI88788 + PI 90763 – (k)

Figura 1. Mapa de ligação da soja (Cregan et al., 1999) mostrando aproximadamente as localizações de QTLs publicados para o NCS. As linhas brancas representam os GL, as linhas curtas escuras representam intervalos de 20 cM onde QTL para NCS foram mapeados (Fonte: Concibido et al., 2004).

## 2.4. SITUAÇÃO ATUAL NOS PROGRAMAS DE MELHORAMENTO

### 2.4.1. Fontes de resistência utilizadas

Embora muitas PIs terem sido identificadas, como fonte de resistência, poucas foram utilizadas para desenvolver cultivares resistentes ao NCS, caracterizando a vulnerabilidade do germoplasma melhorado de soja ao nematóide. Além disso, Diers et al. (1997) avaliaram a diversidade genética entre as PIs com resistência ao NCS e verificaram que PIs com resistência a múltiplas raças associam-se em poucos grupos maiores baseados em marcadores RFLP, caracterizando relativamente pouca diversidade genética entre as fontes de resistência. Segundo Anand (1991), de 130 cultivares de soja resistentes ao NCS desenvolvidas na América do Norte, em 69 a resistência era proveniente de Pecking, em 24 da PI88788, em 31 de ambas as cultivares e em duas da PI90763. Em 2001, dentre 760 cultivares dos grupos de maturidade I a IV, em 705 a resistência era proveniente somente da PI88788 (Concibido et al., 2004). Naquele país agora é dada mais ênfase ao melhoramento com fontes adicionais de resistência tais como PI437654 e PI89779 (Anand, 1992; Nickell et al., 1999) e PI209332 (Orf e MacDonald, 1995).

Segundo Dias et al. (2005), no Brasil a cultivar Hartwig é a fonte de resistência ao NCS mais utilizada pelos programas de melhoramento de soja. Esta cultivar é resistente a quase todas as raças com exceção das raças 4<sup>+</sup> e 14<sup>+</sup>. As cultivares disponíveis comercialmente, geralmente são resistentes apenas às raças 1 e 3. Assim, em áreas afetadas com outras raças, principalmente em Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul existe grande chance das populações do nematóide serem disseminadas para outras regiões. Além disso, o monocultivo de cultivares que tenham os mesmos genes de resistência pode reduzir a vida útil das mesmas. Para amenizar o problema é preciso desenvolver cultivares com resistência oriunda de outras fontes como as PIs 88788 e 90763 e que estas cultivares sejam rotacionadas pelos agricultores.

### 2.4.2. Seleção assistida por marcadores moleculares

Normalmente, a transferência de genes de resistência a patógeno é realizada pelo método de retrocruzamento, porém no caso do NCS o monitoramento dos locos em transferência é trabalhoso e demorado, uma vez que envolve a identificação de raças, a inoculação nas progênies e a avaliação fenotípica nas linhagens do programa. Outra dificuldade deste procedimento é a grande necessidade de mão-de-obra, de

espaço físico e do alto custo (Cervigni, 2003; Young e Mudge, 2002; Concibido et al., 2004). Segundo Diers e Arelli (1999), a avaliação fenotípica em casa de vegetação, é a limitação mais significativa para o desenvolvimento de variedades resistentes ao NCS. A seleção assistida por marcadores, SAM, neste caso é de grande importância, uma vez que permite a identificação de linhagens com alta probabilidade de possuírem genes de resistência, com base nos alelos dos marcadores, reduzindo o número de linhagens a serem avaliadas em casa de vegetação.

Para o NCS, a SAM está sendo realizada principalmente para a região do gene *rhg1*, presente em quase todas as fontes de resistência e com grande efeito para a maioria das raças. Exemplos de seleção assistida por marcadores moleculares para plantas resistentes ao NCS já são encontrados na literatura. Mudge et al. (1997) mostraram que a SAM utilizando marcadores SSR que flanqueiam o *rhg1* proporcionou 98% de acurácia na identificação de linhas resistentes do cruzamento Evans X PI209332, selecionando como plantas resistentes as com 30% da reprodução do nemátodo. Cervigni (1999) selecionou plantas resistentes homocigotas à raça 3 do NCS, com base em marcadores SSR, e obteve uma eficiência de seleção de 92%. Este resultado é similar ao obtido por Concibido et al (1996), cuja eficiência de seleção foi de 83-90%, usando marcadores RFLP. Mudge et al. (1997) reportaram uma acuracidade de predição fenotípica de 98% para resistência à raça 3 do NCS usando um par de SSR. Schuster et al. (2001) reportaram um decréscimo, em média, de 70% no índice de parasitismo (IP) para a raça 14 do NCS, usando marcadores SSR. Costa et al. (2003) também obtiveram eficiência na seleção assistida para a raça 3 do NCS, em populações com o parental resistente derivado de Peking. Apesar dos valores de ES apresentados serem semelhantes aos obtidos com métodos convencionais na ausência de dominância, os estudos sobre a base da resistência ao NCS têm mostrado que o número e tipo de ação gênica variam de uma fonte de resistência para outra, bem como o número de genes de resistência presentes nas fontes. Nesses casos, a seleção fenotípica dificilmente seria eficiente nas etapas iniciais de um programa de melhoramento, o que aumenta o tempo necessário à fixação dos alelos de resistência. Entretanto, a seleção com marcadores ligados aos QTLs de resistência pode ser realizada nas gerações iniciais do programa de melhoramento, além de poder ser usada na piramidação de vários QTLs. A ES de marcadores moleculares difere de uma fonte de resistência para outra, devido a

distância genética relativa dos marcadores ao QTL que o flanqueiam. Portanto, deve-se salientar que esses marcadores antes de serem usados em programas de melhoramento, devem ser validados, isto é deve-se determinar a ES que eles terão considerando a fonte de resistência e a raça do NCS para a qual se pretende introduzir a resistência (Alzete-Marin et al., 2005).

Segundo Concibido et al. (2004), para a resistência ao NCS, a SAM é de menor custo e de alta efetividade em relação à seleção em casa de vegetação. O custo da SAM varia de 0,25 a 1,0 dólar por planta, dependendo do volume da operação a fenotipagem, em casa de vegetação, varia de 1,50 a 5.0 dólares por planta, além de demorar cerca de 30 dias.

#### 2.4.3. Validação de marcadores moleculares associados a QTLs

Segundo Yue et al. (2000), mesmo quando um único gene controla a característica, não há garantia de que os marcadores de DNA identificados em uma população serão úteis em diferentes populações, principalmente quando as populações são originadas de germoplasma pouco relacionados. Além disso, os marcadores devem revelar polimorfismos em diferentes populações derivadas de uma ampla variação de genótipos parentais para serem mais úteis nos programas de melhoramento (Langridge et al., 2001).

Para o uso efetivo da SAM, os marcadores associados a QTLs, antes de serem utilizados nos programas de melhoramento, devem ser validados, isto é, deve-se testar sua efetividade na determinação do fenótipo alvo em populações independentes e em diferentes *backgrounds* genéticos (Collard et al., 2005; Alzete-Marin et al., 2005). No caso do NCS, é necessário também determinar a eficiência de seleção dos marcadores considerando a fonte de resistência e a raça do NCS para a qual se pretende introduzir a resistência.

Embora, em soja, existam muitos QTLs descritos para uma grande variedade de características, especificamente para o NCS, relativamente poucos marcadores têm sido aplicados aos programas de melhoramento de plantas (Young, 1999), em razão da baixa confiança nos marcadores para predição do fenótipo desejado. Em muitos casos isto pode ser atribuído à baixa acurácia de estudos de mapeamento de QTL ou validação inadequada (Sharp et al., 2001; Young, 1999).

No caso do NCS, a região do loco *rhg1* que confere resistência a várias raças e a do loco *Rhg4* para a resistência à raça 3, são regiões confirmadas em vários *backgrounds* genéticos, portanto tem-se utilizado, com confiança marcadores desta região para a SAM. No entanto, vários QTLs de efeito maior para outras raças ainda precisam ser validados. Assim, Glover et al. (2004) validaram um QTL de efeito maior para a raça 14 no GL J. Entretanto, ainda é necessário determinar os efeitos destes QTLs validados em diferentes fontes de resistência para as diferentes raças do NCS.

Muitos trabalhos de validação estão sendo reportados para diversas culturas, como trigo (Singh-Harjit et al., 2001) e cevada (Williams et al., 2001). Em soja, Fasoula et al. (2004) validaram diferentes QTLs, em duas populações de diferentes cruzamentos para teor de proteína, de óleo e peso de sementes. Para esta última característica, os autores confirmaram os QTLs em apenas uma das populações e sugeriram que os QTLs não confirmados podem ser devido a falsos positivos na populações de mapeamento (erro tipo I), do uso de probabilidade relaxada para testar às associações marca-QTLs nas populações originais de mapeamento e de alguns dos QTLs detectados serem influenciados pelo ambiente.

A identificação de QTLs necessita de boa qualidade dos dados fenotípicos, de grandes populações avaliadas em múltiplos ambientes, e de verificação independente em populações paralelas para se determinar a significância de um QTL e sua confirmação em vários *backgrounds* genéticos.

### 3. BIBLIOGRAFIA

ALMEIDA, L.A.; KIIHL, R.A.S. Melhoramento de soja no Brasil – desafios e perspectivas. In: CÂMARA, G.M.S. (Ed.). **Soja tecnologia da produção**. Piracicaba: Publique. p.40-54, 1998.

ANAND, S.C. Genetic diversity for resistance to *Heterodera glycines* race 5 in soybean. **Journal of Nematology**, v.26, p.76-79, 1994.

ANAND, S.C. Registration of ‘Hartwig’ soybean. **Crop Science**, v.31, p.1069 -1070, 1992.

ANAND, S.C. Sources of resistance to *Heterodera glycines* in soybean cultivars. In COLYER P. T. (ed.) **Proc. Southern soybean Disease workers 18<sup>th</sup> Ann. Meet.** Lexington, KY, 1991.

ANAND, S.C.; GALLO, K.M.; BAKER, L.A.; HARTWIG, E.E. Soybean plant introductions with resistance to races 4 ou 5 of the soybean cyst nematode. **Crop Science**, v.28, p. 563-564, 1988.

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

ANAND, S.C.; RAO-ARELLI, A.P. Genetic analyses of soybean genotypes resistant to soybean cyst nematode race 5. **Crop Science**, v29, p.1181-1184, 1989.

ANUÁRIO – **Anuário Brasileiro da Soja**. Santa Cruz do Sul-RS: Gazeta Grupo de Comunicações. 143p, 2000-2001.

ASMUS, G.L.; FERRAZ, L.C.C.B. Effect of population of *Heterodera glycines* race 3 on leaf area, photosynthesis and yield of soybean. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 3, p.273-278, 2002.

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

BRUCKER, E.; CARLSON, S.; WRIGHT, E.; NIBLACK, T.; DIERS, B. *Rhg1* alleles from soybean PI437654 and PI88788 respond differentially to isolates of

*Heterodera glycines* in the greenhouse. **Theoretical Applied Genetics**, v.111, p.44-49, 2005.

BUSS, G.R.; CHEN, S.; TOLIN, A.; ROANE, C.W. Breeding soybeans for resistance to *Soybean mosaic virus*. In: PASCALE, A.J. (Ed.) **Proc. World Soybean Res. Conf. IV**. Argentina Soybean Association. Buenos Aires – Argentina. p.1144-1154, 1989.

CALDWELL, B.E.; BRIM, C.A.; ROSS, J.P. Inheritance of resistance to soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*. **Agronomy Journal**, v.52, n.6, p.635-636, 1960.

CERVIGNI, G.D.L.; SCHUSTER, I.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Two microsatellite markers flanking a dominant gene for resistance to soybean cyst nematode race 3. **Euphytica**, v. 135, p. 99-105, 2004.

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

COLLARD, B.C.Y.; JAHUFER, M.Z.Z.; BROUWER, J.B.; PANG, E.C.K. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. **Euphytica**, v.142, p. 169-196, 2005.

CONAB. **Estimativas da safra 2001/02**. Brasília: 15.03.2003. (<http://www.conab.gov.br/>).

CONAB. **Estimativas da safra 2004/05**. Brasília: 09.12.2005. (<http://www.conab.gov.br/>).

CONCIBIDO, V.C.; DENNY, R.L.; LANGE, D.A.; ORF, J.H.; YOUNG, N.D. RFLP mapping and marker-assisted selection of soybean cyst nematode resistance in PI 209332. **Crop Science**, v.36, n.6, p.1643-1650, 1996.

CONCIBIDO, V.C.; DIERS, B.W.; ARELLI, P.R. A decade of QTL mapping for cyst nematode resistance in soybean. **Crop Science**, v.44, p.1121-1131, 2004.

CONCIBIDO, V.C.; DOUGLAS, L.; DENNY, R.L.; ORF, J.H.; YOUNG, N.D. Genome mapping of soybean cyst nematode resistance genes in Peking, PI 90763, and PI 88788 using DNA markers. **Crop Science**, v.37, n.1, p.258-264, 1997.

COSTA, M.C.; DI MAURO, A.O.; TREVISOLI, S.H.U. Seleção de genótipos resistentes ao nematóide de cisto da soja (raça 3) através de marcadores moleculares. In: 2º CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS: 2003, Porto Seguro, BA. **Resumo expandido**: SBMP,2003. 1 CD-ROM.

CREGAN, P.; MUDGE, J.; FICHUS, E.W.; DENNY, D.R.; YOUNG, N.D. Two simple sequence repeat markers to select for soybean cyst nematode resistance

conditioned by the *rhg1* locus. **Theoretical Applied Genetics**, v.99, p.811-818, 1999b.

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

CUNHA, G. E. **Reação de progênies de soja ao nematóide de cisto (*Heterodera glycines* Ichinohe) e estimativas de herdabilidade de caracteres agrônômicos**. Viçosa, MG: UFV. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 78p, 1997.

DIAS, W.A.; SILVA, J.F.V.; GARCIA, A.; CARNEIRO, G.E.S. Distribuição das raças de *Heterodera glycines* no Brasil. In: **Resumos da XXVII Reunião da Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil**. p.365-366. 2005. Embrapa Soja. Documentos 257. Cornélio-Procópio – PR.

DIERS, B.W.; ARELLI, P.R. Management of parasitic nematodes of soybean through genetic resistance. In KAUFFMAN, H.E. (ed.) **Proc. World Soybean Research Conf. VI**, Chicago, IL p. 300-306, 4-7 Aug. 1999.

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

DIERS, B.W.; ARELLI, P.R.; KISHA, T.J. Genetic mapping of soybean cyst nematode resistance genes from PI 88788. **Soybean Genetics Newsletter**, v.24, p.194-195, 1997a.

EMBRAPA. **Tecnologia de produção de soja para a região central do Brasil**. Londrina: Embrapa Soja : Embrapa Agropecuária Oeste, 220p. 2006

ENDO, B.Y. Cellular response to infection. In: **Biology and management of the soybean cyst nematode**. Ed. R.D. Riggs and J. A. Wrather. APS Press, p.37-49, 1992.

EPPS, J. M.; HARTWIG, E. E. Reaction of soybean varieties and strain to race 4 of soybean cyst nematode. **Journal of Nematology**, Beltsville, v.4, n.4, p. 222. 1972. (Abstract).

FAGHIHI, J.; VIERLING, R.A.; HALBRENDT, J.M.; FERRIS, V.R.; FERRIS, J.M. Resistance genes in a ‘Williams 82’ x ‘Hartwig’ soybean cross to an inbred of *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology**, v.27, n.3, p.418-421, 1995.

FASOULA, V.A.; HARRIS, D.K.; BOERMA, R.H. Validation and designation of quantitative trait loci for seed protein, seed oil and seed weight from two soybean populations. **Crop Science**, v.44, p.1218 -1225, 2004.

FERREIRA, M.E.; GRATAPAGLIA, D. Classes de marcadores moleculares para análise genética. In: FERREIRA, M.E., GRATAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2.ed. Brasília: MA/EMBRAPA/CENARGEN, 1996. p.13-67.

FRANCIA, E.; TACCONI, G.; CROSSATI, C.; BARABASCHI, D.; BULGARELLI, D.; DALL'AGLIO, E.; VALÈ, G. Marker assisted selection in crop plants. **Plant Cell**, v. 82, p. 317-342, 2005.

GOLDEN, A.M.; EPPS, J.M.; RIGGS, R.D.; DUCLOS, L.A.; FOX, J.A.; BERNARD, R.L. Terminology and identity of intraspecific forms of the soybean cyst nematode *Heterodera glycines*. **Plant Disease Report**, v.54, n.2, p.544-546, 1970.

GLOVER, K.D.; WANG, D.; ARELLI, P.R.; CARLSON, S.R.; CIANZIO, S.R.; DIERS, B.W. Near isogenic lines confirm a soybean cyst nematode resistance gene from PI 88788on linkage group J. **Crop Science**, v. 44, p.936-941, 2004.

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

HARTWIG, E.E., Breeding productive soybean cultivars resistant to the soybean cyst nematode for the southern United States. **Plant Disease**, v.65, n.1, p.303-307, 1981.

HYMOVITZ, T. Speciation and Cytogenetics. In BOERMA , H. R.; SPECHT, J.E. (eds). **Soybeans: improvement, production and uses**. Ed.3. Agronomy monograph nº 16. American Society of Agronomy – Crop science Society of América – soil science Society of América, madison, WI, p. 97-136, 2004.

HANCOCK, J.A.; HANCOCK, F.G.; CAVINESS, C.E.; RIGGS, R.D. Genetics of resistance in soybean to race X of soybean cyst nematode. **Crop Science**, v.27, n.1, p.704-707, 1987.

HARTWIG, E.E.; EPPS, J.M. An additional gene for resistance to soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*. **Phytopathology**, v.69, n.7, p.584-590, 1970.

LANGRIDGE, P.; LAGUDAH, E.; HOLTON, T.; APPELS, R.; SHARP, P.; CHALMERS, K. Trends in genetic and genome analyses in wheat: a review. **Aust J Agric Res.**, v.52, p. 1043-1077, 2001.

LEE, J.M.; BUSH, A.; SPECHT, J.E.; SHOEMAKER, R.C.; Mapping of duplicate genes in soybean. **Genome**, v. 42, p.829-836, 1999.

LIMA, R.D.; FERRAZ, S.; SANTOS, J.M. Ocorrência de *Heterodera* sp. em soja no Triângulo Mineiro. **Nematologia Brasileira**, v.16, n.1/2, p.101-102, 1992.

LORDELLO, A.I.L.; LORDELLO, R.R.A.; QUAGGIO, J.A. Ocorrência do nematóide de cisto da soja (*Heterodera glycines*) no Brasil. **Revista de Agricultura**, v.67, n.3, p.223-225, 1992.

LUEDDERS, V.D. Inheritance of genes for resistance to soybean cyst nematode populations. **Crop Science**, v.29, n.1, p.667-671, 1989.

MANSUR, L.M.; CARRIQUIRY, A.L.; RAO-ARELLI, A.P. Generation mean analysis of resistance to race 3 of soybean cyst nematode. **Crop Science**, v.33, n.3, p.1249-1253, 1993.

ALZETE-MARIN, A.L.; CERVIGNI, G.D.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p.333- 342, 2005.

MATSON, A.L.; WILLIAMS, L.F. Evidence of four genes for resistance to the soybean cyst nematode. **Crop Science**, v.22, n.1, p.588-590, 1965.

MATTHEWS, B.F.; MACDONALD, M.H.; GEBHARDT, J.S.; DEVINE, T.E. Molecular markers residing close to the *Rhg4* locus conferring resistance to soybean cyst nematode race 3 on linkage group A of soybean. **Theoretical Applied Genetics**, v.97, p. 1047-1052, 1998.

MENDES, M.L. O nematóide do cisto da soja. ARANTES, N. E., SOUZA, P.I.M. (Eds.). In: **Cultura da soja nos cerrados**. Piracicaba: POTAFOS, p.35, 1993.

MENOSSO, O.G. Descrição Botânica. In: Embrapa Soja. Londrina. **A cultura da soja no Brasil**. Londrina: Embrapa Soja/BASF, 2000.

MONTEIRO, W.F.; MORAIS, S.R.A.C. **Ocorrência do nematóide de cisto da soja, *Heterodera glycines*, Ichinohe, 1952, prejudicando a cultura da soja no Mato Grosso do Sul**. In: Congresso Brasileiro de Nematologia, 16, Lavras, 1992.

MUDGE, J.; CREGAN, P.B.; KENWORTHY, J.P.; KENWORTHY, J.W.; ORF, J.H.; YOUNG, N.D. Two microsatellite markers that flank the major soybean cyst nematode resistance locus. **Crop Science**, v.37, n.3, p.1611-1615, 1997.

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

MYERS, G.O.; ANAND, S.C.; RAO-ARELI, A.P. Inheritance of resistance to race 5 of *Heterodera glycines* in soybeans. **Agronomy Abstracts**, v.80, p.90, 1988.

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

NICKELL, C.D.; NOEL, G.R.; CARY, T.R.; THOMAS, D.J.; LENZ, R.A. Registration of 'Ina' soybean. **Crop Science**, v.39, p. 1533, 1999.

NOEL, G.R. History, distribution and economics. p. 1-13. In : RIGGS, R.D.; WRATHER, J.A. (ed.) **Biology and management of the soybean nematode cyst**. APS press, St. Paul, MN. 1992.

ORF, J. H.; MACDONALD, D.H. Registration of 'Faribaulty' soybean. **Crop Science**, v.35, p. 1227, 1995.

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

PROBST, A.H.; JUDD, R.W. Origin U.S. history and development and world distribution. In CALDEWELL, B.E. **Soybeans, improvement, production and uses**. Madison ASA, 618p. 1973.

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

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

RAO-ARELLI, A.P.; ANAND, S.C. Genetic relationships among soybean plant introductions for resistance to race 3 of soybean cyst nematode. **Crop Science**, v.28, p.650-652, 1988.

RAO-ARELLI, A.P.; ANAND, S.C.; WRATHER, J.A. Soybean resistance to soybean cyst nematode race 3 is conditioned by an additional dominant gene. **Crop Science**, v.32, p.862-864, 1992.

RAO-ARELLI, A.P.; WILCOX, J.A.; MYERS, O. Jr.; GIBSON, P.T. Soybean germoplasm resistant to races 1 and 2 of *Heterodera glycines*. **Crop Science**, v.37, p.1367-1369, 1997.

RIGGS, R.D.; SCHMIDT, D.P.; NOEL, G.R. Variability in race tests with *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology**, v.20, n.4, p.565-572, 1989.

RIGGS, R.D.; HAMLIN, M.L.; RAKES, L. Development of *Heterodera glycines* pathotypes as affected by soybean cultivars. **Journal of Nematology**, v.9, n.1, p.312-318, 1977.

ROESSING, A.C.; GUEDES, L.C.A. Aspectos econômicos do complexo soja: sua participação na economia brasileira e evolução na região central. In: ARANTES, N.E.; SOUZA, P.I.M. (Eds.). **A cultura da soja nos cerrados**. Piracicaba: Potafos, p.1-69, 1993.

ROSS, J.; BRIM, C.A. Resistance of soybean on the soybean-cyst nematode as determined by a double-row method. **Plant Disease Report**, v.41, n.19, p.923-924, 1957.

ROSS, J.P. Crop rotation effects on the soybean cyst nematode population and soybean yields. **Phytopathology**, v.52, n.2, p.815-818, 1962.

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

SCHUSTER, I. **Identificação de QTL para a resistência a Nematóide de Cisto da Soja e capacidade de combinação de genitores**. Viçosa, MG: UFV, 1999. 86p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 1999.

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

SHARP, P.J.; JOHNSTON, S.; BROWN, G.; MCINTOSH, R.A.; PALLOTA, M.; CARTER, M.; BARIANA, H.S.; KHARTKAR, S.; LAGUDAH, E.S.; SINGH, R.P.; KHAIRALLAH, M.; POTTER, R.; JONES, M.G.K. Validation of molecular markers for wheat breeding. **Aust J Agric Res.**, v. 52, p. 1357 -1366, 2001.

SHOEMAKER, R.C.; SCHLUETER, J.A.; CREGAN, P.; VODKIN, L. The status of soybean genomics and its role in the development of soybean biotechnologies. **AgBioforum**, v. 6, p. 4-7, 2003.

SHOEMAKER, R.C.; POLZIN, K.; LABATE, J.; SPECHT, J.; BRUMMER, E.C.; OLSON, T.; YOUNG, N.; CONCIBIDO, V.; WILCOX, J.; TAMULONIS, J. P. Genome duplication in soybean (*Glycine subgenus soja*). **Genetics**, v.144, 329-338, 1996.

SHOEMAKER, R.C.; SPECHT, J.E. Integration of the soybean molecular and classical genetic linkage groups. **Crop Science**, v.35, p.436-446, 1995.

SING-HARJIT; PRASAD, M.; VARSHNEY, R.K.; ROY, J.K.; BALYAN, H.S.; DHALIWAL, H.S.; GUPTA, P.K. STMS markers for grain protein content and their validation using near-isogenic lines in bread wheat. **Plant Breeding**, v.120, p. 273-278, 2001.

SINGH, D.P. **Breeding for to diseases and insect pests**. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. 222p., 1986.

SINGH, R.J.; HYMOWITZ, T. The genomic relationship between *Glycine max* (L.) Merr. and *G. soja* Sieb. and Zucc. as revealed by pachytene chromosome analysis. **Theoretical Applied Genetics**, v.76, p.705-711, 1988.

SONG, Q.J.; MAREK, L.F.; SHOEMAKER, R.C.; LARK, K.G.; CONCIBIDO, V.C.; DELANNAY, X.; SPETCH, J.E.; CREGAN, P.B. A new integrated genetic linkage map of the soybean. **Theoretical Applied Genetics**, v. 109, p. 122-128, 2004.

THOMAS, J.D.; CAVINES, C.E.; RIGGS, R.D.; HARTWIG, E.E. Inheritance of reaction to race 4 of soybean cyst nematode. **Crop Science**, v.15, n.1, p.208-210, 1975.

TIHOHOD, D. Os nematóides formadores de cistos gêneros: *Heterodera* e *Globodera*. In:TIHOHOD. D. **Nematologia agrícola aplicada**. São Paulo: FUNEP/FCAV, p.334-339, 1993.

TOLEDO, J.F.F.; ALMEIDA, L.A.; KIIHL, R.A.S.; CARRÃO-PANIZZI, M.C.; KASTER, M.; MIRANDA, L.C.; MENOSSO, O.G. Genetic and Breeding. In: Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Soja. Londrina. **Tropical soybean: improvement and production**. ROME : FAO (FAO Plant production and protection series, 27), p.19-36, 1994.

TRIANANTAPHYLLOU, A.C.; IRSCHMANN, H. Oogenesis and mode of reproduction in the soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*. **Nematologica**, v.7, n.1, p.235-241, 1962.

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

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

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

WEISEMANN, J.M.; MATTHEWS, B.S.; DEVINE, T.E. Molecular markers located to the soybean cyst nematode resistance gene, *Rhg4*. **Theoretical Applied Genetics**, v.85, n.1, p.36-138, 1992.

WILLIAMS, K.; BOGACKI, P.; SCOTT, L.; KARAKOUSIS, A.; WALLWORK, H. Mapping of a gene for leaf scald resistance in barley line 'B87/14' and validation of microsatellite and RFLP markers for marker-assisted selection. **Plant Breeding**, v. 120, p. 301-304, 2001.

WRATHER, J.A.; ANDERSON, T.R.; ARSYAD, D.M.; GAI, J.; PLOPER, L.D.; PORTA -PUGLIA, A.; RAM, H.H.; YORINORI, J.T. Soybean disease loss estimates for the top soybean producing countries in 1994. **Plant Disease**, v. 81, p. 107-110, 1997.

WRATHER, J.A.; ANAND, S.C.; DROPKIN, V.H. Soybean cyst nematode control. **Plant Dis.**, v.68, n.9, p.829-833, 1984.

WRATHER, J.A.; KOENNING, S.R.; ANDERSON, T.R. Effect of diseases on soybean yields in the United States and Ontario (1999-2002 [Online]. Plant health progress.doi:1.1094/PHP-2003-0325-01-RV. Verificado em 25 de junho de 2004, em <http://plantmanagementnetwork.org/sub/php/review/2003/soybean/>

XU, B.; ZHEN, H; LU, Q.; ZHAO, S. Three new evidences of the original area of soybean. 1989. In: CONFERENCIA MUNDIAL DE INVESTIGACION EN SOJA, 4, 1989, Buenos Aires. **Actas...** Buenos Aires: AASoja, t.1, p.124-128, 1989.

YOUNG, L.D. Efficiency gained by screening segregation soybean progenies with soybean cyst nematode race 2 versus race 5. **Crop Science**, v.9, p.1248 – 1249, 1999.

YOUNG, L.D. Survey of soybean cyst nematode races in Tennessee. Supp. **Journal of Nematology**, v.22, p. 672-675, 1990.

YOUNG, L.D. Yield loss in soybean caused by *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology**, v.24, n.45, p.604-607, 1996. Supplement.

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

YU, K.; PARK, S.; POYSA, V. Marker – assisted selection of common beans for resistance to common bacterial blight: Efficacy and economics. **Plant Breeding**, v.119, p.411-415, 2000.

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

YUE, P.; SLEPER, D.A.; ARELLI, R.P. Mapping resistance to multiple races of *Heterodera glycines* in soybean PI 89772. **Crop Science**, v.41, p.1589-1595, 2001a.

ZHU, Y.L.; SONG, Q.J.; HYTEN, D.L.; VAN TASSELL, C.P.; MATUKUMALLI, L.K.; GRIMM, D.R.; HYATT, S.M.; FICKUS, E.W.; YOUNG, N.D.; CREGAN, P.B. Single nucleotide polymorphism (SNPs) in soybean. **Genetics**, v.163, p.1123-1134, 2003.

## CAPÍTULO 1

### HERANÇA DA RESISTÊNCIA DA SOJA AO NEMATÓIDE DE CISTO, RAÇAS 3, 9 E 14, EM POPULAÇÕES DE RILs E F<sub>2</sub>

#### RESUMO

O método mais eficiente para o controle do nematóide de cisto da soja (NCS) é o uso de cultivares resistentes associados à rotação com culturas não hospedeiras. Estudos sobre a base da resistência ao NCS têm mostrado que o tipo de ação gênica e o número de genes de resistência variam nas diferentes fontes de resistência. Pelo menos três genes recessivos e dois dominantes são envolvidos na herança da resistência ao NCS. O objetivo deste trabalho foi estudar a herança da resistência da soja às raças 3, 9 e 14 em uma população de RILs do cruzamento Hartwig (Resistente-R) x Y23 (Suscetível-S); à raça 3 em 65 famílias F<sub>2:3</sub> (do cruzamento Msoy8001 - R x Conquista -S) e; à raça 14, em 66 famílias F<sub>2:3</sub> (do cruzamento S5995 - R x Renascença - S). Entre três e seis plantas por RIL e cinco a seis plantas por família F<sub>2:3</sub>, foram inoculadas individualmente com 4.000 ovos das diferentes raças avaliadas, e os cistos foram contados após 30 dias. A média de cistos desenvolvidos no total de plantas de cada RIL e de cada família F<sub>2:3</sub> foi transformada em Índice de Parasitismo (IP). As plantas foram classificadas para o estudo de herança, em relação à resistência, da seguinte forma: resistentes (R) com IP < 10, moderadamente resistentes (MR) com IP 10 e < 30, moderadamente suscetíveis (MS) com IP 30 e < 60 e suscetíveis (S) com IP > 60. Foi detectado um maior número de genes de resistência ao NCS na população de RILs em relação às populações F<sub>2</sub>. Em todos os casos um gene a mais foi necessário para condicionar resistência completa em relação à resistência moderada. Na população de RILs foram detectados quatro genes epistáticos condicionando resistência à raça 14 e três genes epistáticos para as raças 3 e 9. Para a resistência moderada foram necessários três genes epistáticos para a raça 14, e dois genes epistáticos para as raças 3 e 9. Os resultados indicam que para a raça 14 um maior número de genes é necessário para a resistência. No entanto, o maior número de genes envolvidos também é um indicativo de genes de efeitos menores. Como as populações de RILs apresentam apenas linhagens homozigotas, não foi possível saber se os genes envolvidos são dominantes ou recessivos. Na população F<sub>2</sub> de Msoy8001 x Conquista, foi detectado um gene recessivo que condiciona resistência moderada à raça 3 e dois genes recessivos para a resistência completa. Para a raça 14, na população de famílias F<sub>2:3</sub>, dois genes epistáticos recessivos foram identificados condicionando resistência completa e a presença de pelo menos um condicionando a resistência moderada. Não surpreende o fato da população derivada de Hartwig ter mais genes segregando, uma vez que esta cultivar é uma das fontes de resistência amplamente utilizada em melhoramento para NCS. Nos outros cruzamentos foram utilizadas cultivares melhoradas. Os resultados deste estudo visam contribuir no delineamento de cruzamentos com a maior chance de acumular genes que conferem resistência às diversas raças do NCS.

## 1. INTRODUÇÃO

O nematóide de cisto da soja (*Heterodera glycines* Ichinohe - NCS) é um dos patógenos da soja, [*Glycine max* (L.) Merrill] que mais causa danos à cultura em todo o mundo, resultando em grandes prejuízos como as estimativas de US\$ 783,8 milhões no ano de 2002 nos EUA (Wrather et al., 2003) e de US\$ 24 milhões em 1993 no Brasil (Mendes, 1993).

O controle do NCS mais seguro e econômico é o uso de cultivares resistentes combinado com a rotação de culturas não hospedeiras (Embrapa, 2006). Para o desenvolvimento de cultivares resistentes é necessário identificar os genes presentes nas fontes de resistência e transferí-los para as cultivares comerciais suscetíveis. Apesar de vários estudos terem sido feitos para identificar novas fontes de resistência e caracterizar seus genes de resistência associados (Diers et al., 1997; Zhang et al., 1999), genes provenientes de poucas fontes de resistência têm sido incorporado em cultivares comerciais de soja, freqüentemente genes oriundos da PI 88788 e de Peking, nos EUA e de Hartwig no Brasil (Anand, 1991; Embrapa 2005, Concibido et al., 2004). Este fato, associado à ampla diversidade de raças fisiológicas do NCS (Golden et al., 1970; Niblack et al., 2002) causam certa vulnerabilidade das cultivares de soja disponíveis para os produtores (Dias et al., 2005). Portanto, é necessário que se aumente a diversidade de genes de resistência usados nos programas de melhoramento para evitar a quebra da resistência pelo NCS nas cultivares recomendadas.

No Brasil já foram detectadas 11 raças do NCS (1, 2, 3, 4, 4<sup>+</sup>, 5, 6, 9, 10, 14 e 14<sup>+</sup>), porém, as cultivares disponíveis para cultivo no país apresentam resistência somente às raças 1 e 3, e resistência moderada às demais raças (Dias et al., 2005).

Para o desenvolvimento de variedades de soja resistentes a várias raças do NCS, necessita-se dispor de populações base com alta frequência de genes de resistência a várias raças do NCS, além de conhecer a relação genética entre as várias fontes de resistência e o seu modo de herança (Buss et al., 1989). Os estudos de genética têm sido úteis na identificação de fontes de resistência, porém o número de genes e o tipo de ação gênica predominante na resistência permanecem pouco conhecidos até o momento. Sabe-se o tipo de ação gênica e o número de genes resistência variam nas diferentes fontes de resistência. Considerando o modelo genético qualitativo, genes recessivos e dominantes foram relatados (Tabela 1). Diferentes alelos para o mesmo loco, o *rhg1*, foram identificados nas PIs 88788 e 437654 (Brucker et al., 2005). Entretanto, segundo Dong et al. (1997), alguns genes de resistência são comuns nas PIs e outros são únicos, caracterizando uma base genética restrita da soja.

A cultivar Hartwig, oriunda da PI 437654 (Anand, 1992) é resistente à maioria das raças do NCS, com exceção da 4<sup>+</sup> e 14<sup>+</sup>. Para essa cultivar já existem estudos de herança à raça 3 e para a PI 437654 às raças 3 e 5. Mas, apesar de Hartwig ser amplamente utilizada nos programas de melhoramento genético de soja no Brasil, ainda não se tem estudos de herança da resistência para as raças 9 e 14, de ocorrência no país. O objetivo deste trabalho foi estudar, qualitativamente, a herança de resistência de Hartwig às raças 3, 9 e 14 do NCS utilizando uma população de RILs originada do cruzamento desta fonte de resistência com a linhagem suscetível Y23. E estudar a resistência qualitativa para as raças 3 e 14, de materiais melhorados utilizando duas populações de melhoramento F<sub>2</sub>, a primeira derivada do cruzamento Msoy8001 (R) x Conquista (S), avaliada para a raça 3, e a segunda originada do cruzamento S5995 (R) x Renascença (S) para a resistência a raça 14.

Tabela 1. Estudos da herança de resistência da soja ao NCS realizados em diferentes fontes de resistência, para diferentes raças do NCS

Fonte de resistência	Raça	Genes identificados	Referência
Peking	1	3 recessivos ( <i>rhg1</i> , <i>rhg 2</i> e <i>rhg3</i> )	Caldwell et al., 1960
Peking	3	1 dominante ( <i>Rhg 4</i> )	Matson e Williams, 1965
Peking	5	2 recessivos (ou 2 dominantes)	Anand e Rao-Arelli, 1989
Peking	3	<i>rhg1</i> , <i>rhg 2</i> e <i>Rhg4</i>	Rao-Arelli et al., 1992
Peking	1,3 e 5	1 dominante e 2 recessivos	Qiu et al., 1997
PI 88788	14	2 dominantes e 1 recessivo	Thomas et al., 1975
PI 88788	3	Peking x PI 88788 – 1 dominante e 1 recessivo	Rao-Arelli e Anand, 1988
PI88788	3	<i>rhg 2</i> , <i>Rhg4</i> e <i>Rhg5</i>	Rao-Arelli et al., 1992
PI 90763	2	1 recessivo diferente de Peking	Hartwig e Epps., 1970
PI90763	“X”	1 recessivo	Hancock et al., 1987
PI90763xForest	5	2 recessivos ou dois dominantes	Anand e Arelli, 1989
PI 90763	3	<i>rhg1</i> , <i>rhg 2</i> e <i>Rhg4</i>	Rao-Arelli et al., 1992
PI 90 763	5	1 dominante e 2 recessivos	Anand, 1994
PI 437654	5	2 recessivos e 2 dominantes	Myers et al., 1988
PI 437654	5	1 recessivos e 2 dominantes	Myers e Anand., 1991
Hartwig	3	1 recessivo e 1 dominante	Faghihi et al. 1995
PI 438489B	3	2 recessivos	Rao-Arelli, 1994
PI 438489B	5	1 recessivo	Anand e Arelli, 1989
PI 438489B	1, 3 e 5	2 dominantes e 1 recessivo	Yue et al., 2000
PI 438489B	2	1 dominante e 3 recessivos	Yue et al., 2000
PI 438489B	14	3 recessivos	Yue et al., 2000
PI 438496B	3	Peking x PI438496B – 2 dominantes	Rao-Areli e Anand, 1988
PI89772	3	1 dominante e 1 recessivo	Rao-Arelli, 1994
PI 209332	3	1 dominante e 1 recessivo	Rao-Arelli, 1994
PI 424595	5	3 recessivos	Anand, 1994

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### *Material Genético*

Foi obtida uma população de linhagens endogâmicas recombinantes (*Recombinant Inbred Lines* - RILs) do cruzamento entre Hartwig (genitor R) e a linhagem Y23 (genitor S), segregando para resistência ao NCS raças 3, 9 e 14. Plantas F<sub>2</sub> obtidas de 5 plantas F<sub>1</sub> foram avançadas até a geração F<sub>6</sub>, usando o método descendente de uma única semente (*Single Seed Descent* - SSD), em casa de vegetação, como reportado por Brim (1966). RILs F<sub>6:7</sub> foram avaliadas quanto à resistência para as raças 3 e 9 do NCS e RILs F<sub>6:9</sub> avaliadas para a raça 14. Apesar de ser o mesmo cruzamento o número de RILs avaliadas foi de 134, 110 e 128 para as raças 3, 9 e 14, respectivamente. O número de plantas por RIL variou de 3 a 6.

As populações F<sub>2:3</sub> foram obtidas dos cruzamentos Msoy8001 (R) x Conquista (S) e S5995 (R) x Renascença (S). No primeiro cruzamento, 65 famílias F<sub>2:3</sub> foram avaliadas para a resistência à raça 3 e no segundo 66 famílias F<sub>2:3</sub> para resistência à raça 14. O número de repetições por F<sub>2:3</sub> variou de 4 a 6.

### *Avaliação fenotípica*

Os ensaios foram realizados em casa de vegetação (temperatura entre 25-30°C e 16h de luz), utilizando o esquema de delineamento inteiramente casualizado com 3 a 6 repetições (plantas) por tratamento (RIL ou família F<sub>2:3</sub>).

Nos ensaios foram incluídas a população de RILs e F<sub>2:3</sub>, os genitores, as linhagens diferenciadoras de soja (Peking, Pickett, PI 90763 e PI 88788) e a cultivar suscetível (Lee). As sementes foram germinadas em areia a 25°C. Cada plântula (2 a 3 após a germinação) foi transplantada para vasos de argila com capacidade de 0,5

litro, contendo mistura de solo e areia, na proporção 1:2. Simultaneamente ao transplântio, foi realizada a inoculação de 4000 ovos em cada vaso.

Trinta dias após a inoculação, as plantas foram retiradas dos vasos e suas raízes lavadas sob forte jato de água em peneira com malha de 20 mesh, acoplada sobre outra de 60 mesh e os cistos contados sob lupa estereoscópica (Figura 1). O número médio de cistos obtidos em cada RIL e família  $F_{2:3}$  foi transformado em índice de parasitismo (IP) estimado como segue:

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

Os dados dos genitores suscetíveis de cada população foram utilizados no denominador da expressão acima, objetivando avaliar as diferenças genéticas entre os genitores de cada cruzamento. Para a confirmação da raça do NCS, o IP foi calculado substituindo o denominador da expressão acima pelo número de cistos e fêmeas em Lee (padrão suscetível), conforme proposto por Riggs et al. (1988).

A classificação das RILs em relação às diferentes raças foi feita de acordo com o proposto por Schmitt e Shannon (1992) da seguinte forma: resistentes (R) com  $IP < 10$ , moderadamente resistentes (MR) com  $IP \geq 10$  e  $< 30$ , moderadamente suscetíveis (MS) com  $IP \geq 30$  e  $< 60$  e suscetíveis (S) com  $IP \geq 60$ . Os resultados obtidos foram testados estatisticamente pelo teste do Qui-quadrado.



Figura 1. Ensaio em casa de vegetação (A), coleta e lavagem das raízes (B a E), contagem dos cistos (F).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram observados contrastes entre os genitores de cada cruzamento e ampla variação da resistência para as raças avaliadas, dentro de cada população (Tabela 2). A segregação transgressiva observada nas RILs e dentro das famílias  $F_{2:3}$  para todas as raças estudadas, evidencia que interações alélicas e/ou gênicas estão presentes no controle do caráter. A segregação transgressiva é de interesse para o melhorista porque permite que a seleção de descendentes com um número de genes favoráveis superiores aos pais (Ramalho et al., 2001). Na população S5995 x Renascença, a média de cistos no progenitor resistente foi maior em relação aos outros cruzamentos avaliados para as demais raças, nesta população. Assim, foi considerado que genes para resistência moderada estariam segregando para a raça 14.

Tabela 2. Número médio de cisto nos genitores (R – resistente e S – suscetível) e nas populações e número médio máximo e mínimo de cistos detectados nas RILs e nas famílias  $F_{2:3}$ .

	Hartwig x Y23 RIL/ raça 3	Hartwig x Y23 RIL/ raça 9	Hartwig x Y23 RIL/ raça 14	Msoy8001 x Conquista $F_2$ / raça 3	S5995 x Renascença $F_2$ /raça 14
<i>Genitor R</i>	4,6	8,4	0,0	1,9	76,3
<i>Genitor S</i>	39,3	59,2	275,1	165,6	284,8
<i>População</i>	90,5	35,8	174,2	71,23	98,6
<i>Mín-Máx</i>	0,4-278,5	0,6-150,6	0,0-351,6	0,5-179	35,63-203,4
N*	134	110	128	65	66

N\* = número de indivíduos avaliados em cada cruzamento.

A distribuição das RILs e das famílias  $F_{2:3}$  conforme a classificação com base no IP, está demonstrada na Tabela 3. Comparando as avaliações feitas nas populações de RILs e nas  $F_2$ , pode-se observar que, proporcionalmente, nas duas populações  $F_2$ , a maioria das plantas foi classificada nas classes intermediárias (MR e MS). Provavelmente seja reflexo das interações alélicas envolvidas no controle do caráter. Deve-se considerar que efeitos de dominância não podem ser detectados na população de RILs, pela natureza genética da população. Além disso, um maior número de plantas suscetíveis foi detectado na população de RILs.

Tabela 3. Número de plantas (NP) e número médio de cistos (NMC) obtidos nas diferentes classes das RILs e das famílias  $F_{2:3}$ : Resistente-R (IP<10); Moderadamente resistentes-MR (IP 10 e <30), Moderadamente suscetíveis-MS (IP 30 e <60); e Suscetíveis-S (IP 60).

População-raça	R		MR		MS		S		Total
	NP	NMC	NP	NMC	NP	NMC	NP	NMC	
RIL - 3	16	3,93	14	11,43	6	28,41	98	119,32	134
RIL - 9	11	2,69	29	12,56	19	37,17	43	66,02	110
RIL -14	10	5,62	7	66,95	45	127,01	66	240,93	128
$F_{2:3}$ - 3	7	5,21	16	34,05	25	72,87	17	124,33	65
$F_{2:3}$ - 14	-	-	33	62,90	27	118,82	6	204,78	66

Para a avaliação da herança de resistência da soja ao NCS foram feitas duas análises para cada raça nas diferentes populações (RILs e  $F_{2:3}$ ), uma considerando o padrão de resistência moderada (MR) todos os indivíduos com IP > 30 e a outra em que o padrão de resistência (R) era apenas aqueles classificados com IP > 10 (Tabela 4).

Para a população de RILs foi detectado um maior número de genes de resistência ao NCS em relação às populações  $F_{2:3}$ , indicando maior quantidade de genes de resistência na cultivar Hartwig, que nas outras já melhoradas. A cultivar Hartwig foi lançada nos EUA em 1992 (Anand, 1992) e possui genes de resistência para a maioria das raças do NCS descritas, com exceção das raças 4<sup>+</sup> e 14<sup>+</sup>. Portanto, é esperado que apresente maior quantidade de genes de resistência que as cultivares lançadas recentemente pelos programas de melhoramento.

Tabela 4. Avaliação da herança da resistência da soja ao NCS na população de RILs (Hartwig x Y23) avaliadas para a resistência às raças 3, 9 e 14, e nas populações F<sub>2:3</sub> Msoy 8001 x Conquista, avaliada para a resistência a raça 3, e S5995 x Renascença e para resistência a raça 14.

Raça	Avaliação	População	R	S	Hipótese		$\chi^2$	P(%)	Total
					NG	Segr			
3	IP<30 (MR)	F <sub>2:3</sub>	23	42	1	1:3	3.738	5.31	65
		RIL	30	104	2	1:3	0.487	48.51	134
	IP<10 (R)	F <sub>2:3</sub>	7	58	2	1:15	2.265	12.87	65
		RIL	16	118	3	1:7	0.038	84.47	134
9	IP<30 (MR)	RIL	40	90	2	1:3	2.307	12.87	110
	IP<10 (R)	RIL	11	99	3	1:7	0.055	81.36	110
14	IP<30 (MR)	F <sub>2:3</sub>	32	34	2	7:9	0.601	43.81	66
		RIL	17	111	3	1:7	0.004	94.80	128
	IP<10 (R)	F <sub>2:3</sub>	-	66	-	-	-	-	66
		RIL	10	118	4	1:15	0.054	81.58	128

IP - Índice de parasitismo; R – número de indivíduos resistentes; S – número de indivíduos suscetíveis; P(%) probabilidade; NG – número de genes; Segr - segregação

Em todos os casos, um gene a mais foi necessário para condicionar resistência completa em relação à resistência moderada. Porém, no cruzamento de S5995 x Renascença, apesar de terem sido detectados dois genes recessivos para a resistência moderada, a presença de apenas um deles foi necessário para condicionar resistência moderada e não foi possível saber quantos genes são necessários para condicionar resistência completa, uma vez que não foi detectada nenhuma família F<sub>2:3</sub> com IP<10 nesta população (Tabela 4).

Na população F<sub>2:3</sub> Msoy 8001 x Conquista, avaliada para a raça 3, foi detectado um gene recessivo para condicionar resistência moderada e dois genes recessivos para a resistência completa. Enquanto que na população de RILs (Hartwig x Y23), avaliada para a raça 3, dois genes epistáticos foram identificados para a resistência moderada e três genes epistáticos para condicionar resistência completa (IP<10) (Tabela 4). A epistasia identificada nas RILs avaliadas para esta raça indica que os indivíduos que apresentaram dois genes foram moderadamente resistentes e aqueles que apresentaram três genes foram resistentes. Como as populações de RILs são constituídas de linhagens homozigotas, não é possível saber se os genes envolvidos são dominantes ou recessivos. Concordando com os resultados deste estudo, Faghihi et al (1995) também detectaram dois genes para a resistência à raça 3 em Hartwig, um recessivo e o outro dominante. Na PI 437654, ancestral de Hartwig,

outros dois genes dominantes e um recessivo foram detectados condicionando resistência a raça 5 (Myers et al., 1991).

O fato de dois genes recessivos estarem condicionando resistência para a raça 3 na população Msoy 8001 x Conquista, diferindo de Hartwig na qual Faghihi et al. (1995) detectaram um gene recessivo e um gene dominante, é um indicativo de que genes de outras fontes de resistência podem estar presentes na cultivar Msoy8001, o que a torna uma boa cultivar para ser utilizada em programas de melhoramento para a resistência ao NCS.

Nas RILs avaliadas para a raça 9, foram identificados dois genes epistáticos condicionando resistência moderada (1R:3S) e três genes epistáticos (1R:7S) para a resistência completa. Também neste caso, pelas RILs serem linhagens homozigotas, não é possível saber se os genes envolvidos são dominantes ou recessivos, além disso, não há relatos de estudos de herança qualitativa para a resistência a esta raça.

Para a raça 14, na população de famílias  $F_{2,3}$ , dois genes recessivos foram identificados, sendo necessário pelo menos um para condicionar a resistência moderada (7R:9S). Os fatos do genitor que condiciona a resistência desse cruzamento (S5995) ter sido classificado como MR e de dois genes terem sido identificados condicionando a resistência moderada são indícios de que mais de dois genes são necessários para condicionar a resistência completa a esta raça, e o genitor S5995 não possui este(s) gene(s) adicional(is). Na população de RILs três genes epistáticos (segregação 1R:7S) foram necessários para condicionar resistência moderada a essa raça e quatro genes epistáticos (segregação 1R:15S) para a resistência completa.

Na população de RILs para a resistência ( $IP < 10$ ) foram necessários quatro genes para a raça 14 e três genes para as raças 3 e 9. Para a resistência moderada foram necessários três genes para a raça 14, enquanto que somente dois foram necessários para as raças 3 e 9. Este resultado indica que para a raça 14, um maior número de genes é necessário para a resistência, porém um maior número de genes envolvidos também é um indicativo de genes de menores efeitos.

Com base em 67 RILs avaliadas para as três raças 3, 9 e 14, foi estimado o coeficiente de correlação fenotípica de 0,2 entre a resistência às raças 3 e 14, de 0,12 entre as raças 9 e 14, e de 0,1 entre as raças 3 e 9. Entretanto, somente a correlação entre as raças 3 e 14 foi estatisticamente significativa pelo teste de Mantel a 5% de probabilidade. Os dados indicam que, pelo menos em parte, os componentes

genéticos associados à resistência para ambas às raças do NCS são herdados de forma conjunta.

Neste estudo pode-se constatar que diferentes números de genes são necessários para condicionar resistência às três diferentes raças do NCS. Além disso, a quantidade de genes, para a resistência a cada raça influencia o nível de resistência na planta, quanto mais genes envolvidos maior o nível de resistência obtida. Os resultados deste estudo não permitem dizer se existem genes comuns segregando para as diferentes raças, porém a falta de correlação significativa para a resistência entre as raças avaliadas, sugere que diferentes estratégias de melhoramento devem ser adotadas para cada raça.

Como o desenvolvimento de cultivares resistentes a uma raça específica do NCS é muito trabalhoso e demorado e muitas progênies devem ser avaliadas para se obter poucas plantas resistentes, Kim et al. (1998) sugeriram que a seleção poderia ser feita para mais de uma raça simultaneamente, se estas raças pudessem ser agrupadas conforme sua diversidade. Estes autores dividiram oito raças do NCS em quatro grupos, com base em avaliações feitas em 524 linhagens e cultivares de soja. No primeiro grupo foram agrupadas as raças 2, 4 e 14; no segundo, as raças 6 e 9; no terceiro, as raças 1 e 3; e no quarto, a raça 5. Portanto, as diferentes raças em cada grupo devem ter genes de resistência em comum, o que explica o fato de que apesar da maioria das cultivares brasileiras terem sido selecionadas para a raça 3, também serem resistentes à raça 1. Com base neste estudo pressupõe-se que o melhoramento para a raça 14, também elevaria o nível de resistência para as raças 2 e 4.

Segundo Dias et al. (2005), das 11 raças do NCS detectadas em 10 estados brasileiros, a raça 3 tem predominância nos estados de Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul e está presente em outros cinco estados. A raça 14 já infesta quatro estados e a raça 9 dois. Entretanto, a maioria das cultivares disponíveis para cultivo no país apresentam resistência somente às raças 1 e 3 e resistência moderada as demais raças, sendo a resistência derivada da cultivar Hartwig. Portanto, é necessário que se aumente a diversidade de genes de resistência usados nos programas de melhoramento para evitar que o NCS quebre a resistência dos cultivares. Para isso, novos genes de resistência precisam ser identificados nas PIs, para as diferentes raças, e transferidos para as cultivares comerciais. Além disso, outras fontes de resistência também devem ser utilizadas nos programas de melhoramento, para permitir que os genes de resistência possam ser rotacionados pelos agricultores.

Neste sentido, a cultivar Msoy8001, que provavelmente apresenta genes de resistência à raça 3 diferentes daqueles encontrados em Hartwig, pode ser de grande utilidade nos programas de melhoramento uma vez que já é um material adaptado.

Estudos de herança de resistência são de grande importância em programas de melhoramento, os resultados deste estudo visam contribuir para que se possam delinear cruzamentos com a maior chance de acumular genes favoráveis à resistência para as diversas raças do NCS.

#### 4. BIBLIOGRAFIA

ANAND, S.C. Genetic diversity for resistance to *Heterodera glycines* race 5 in soybean. **Journal of Nematology**, v.26, p.76-79, 1994.

ANAND, S.C. Registration of 'Hartwig' soybean. **Crop Science**, v.31, p.1069 -1070, 1992.

ANAND, S.C. Sources of resistance to *Heterodera glycines* in soybean cultivars. In COLYER P. T. (ed.) **Proc. Southern soybean Disease workers 18<sup>th</sup> Ann. Meet.** Lexington, KY, 1991.

ANAND, S.C.; GALLO, K.M.; BAKER, L.A.; HARTWIG, E.E. Soybean plant introductions with resistance to races 4 and 5 of the soybean cyst nematode. **Crop Science**, v.28, p. 563-564, 1988.

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

BRIM, C.A. A modified pedigree method of selection in soybeans. **Crop Science**, v.6, p.22, 1966.

BRUCKER, E.; CARLSON, S.; WRIGHT, E.; NIBLACK, T.; DIERS, B. *Rhgl* alleles from soybean PI437654 and PI88788 respond diferencialy to isolates of *Heterodera glycines* in the greenhouse. **Theoretical Applied Genetics**, v.111, p.44-49, 2005.

BUSS, G.R.; CHEN, S.; TOLIN, A.; ROANE, C.W. Breeding soybeans for resistance to *Soybean mosaic virus*. In: PASCALE, A.J. (Ed.) **Proc. World Soybean Res. Conf. IV.** Argentina Soybean Association. Buenos Aires – Argentina. p.1144-1154, 1989.

CALDWELL, B.E.; BRIM, C.A.; ROSS, J.P. Inheritance of resistance to soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*. **Agronomy Journal**, v.52, n.6, p.635-636, 1960.

CONCIBIDO, V.C.; DIERS, B.W.; ARELLI, P.R. A decade of QTL mapping for cyst nematode resistance in soybean. **Crop Science**, v.44, p.1121-1131, 2004.

DIAS, W.A.; SILVA, J.F.V.; GARCIA, A.; CARNEIRO, G.E.S. Distribuição das raças de *Heterodera glycines* no Brasil. In.: **Resumos da XXVII Reunião da Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil**. p.365-366, 2005. Embrapa Soja. Documentos 257.Cornélio-Procópio – PR.

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

DONG, K.; BAKER, K.R.; OPPERMAN, C.H. Genetic of soybean *Heterodera glycines* interactions. **Journal of Nematology**, v.29, p.509-522, 1997.

EMBRAPA. **Tecnologia de produção de soja para a região central do Brasil**. Londrina: Embrapa Soja, Embrapa Agropecuária Oeste, 220p. 2006

EPPS, J.M.; HARTWIG, E.E. Reaction of soybean varieties and strain to race 4 of soybean cyst nematode. **Journal of Nematology**, v.4, n.4, p. 222. 1972. (Abstract).

FAGHIHI, J.; VIERLING, R.A.; HALBRENDT, J.M.; FERRIS, V.R.; FERRIS, J.M. Resistance genes in a ‘Williams 82’ x ‘Hartwig’ soybean cross to an inbred of *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology**, v.27, n.3, p.418-421, 1995.

GOLDEN, A.M.; EPPS, J.M.; RIGGS, R.D.; DUCLOS, L.A.; FOX, J.A., BERNARD, R.L. Terminology and identity of intraespecific forms of the soybean cyst nematode *Heterodera glycines*. **Plant Disease Report**, v.54, n.2, p.544-546, 1970.

HANCOCK, J.A.; HANCOCK, F.G.; CAVINESS, C.E.; RIGGS, R.D. Genetics of resistance in soybean to race X of soybean cyst nematode. **Crop Science**, v.27, n.1, p.704-707, 1987.

HARTWIG, E.E.; EPPS, J.M. An additional gene for resistance to soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*. **Phytopathology**, v.69, n.7, p.584-590, 1970.

KIM, D.G.; RIGGS, R.D.; MAUROMOUSTAKOS, A. Variation in resistance of soybean lines to races of *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology**, v.30, p. 184-191, 1998.

MATSON, A.L.; WILLIAMS, L.F. Evidence of four genes for resistance to the soybean cyst nematode. **Crop Science**, v.22, n.1, p.588-590, 1965.

MENDES, M.L.; DICKSON, D.W. Detections of *Heterodera glycines* in Brazil. **Plant Disease**, v.77, n.5, p.499-500, 1993.

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

MYERS, G.O.; ANAND, S.C.; RAO-ARELI, A.P. Inheritance of resistance to race 5 of *Heterodera glycines* in soybeans. **Agronomy Abstracts**, v.80, p.90, 1988.

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

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

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

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

RAO-ARELLI, A.P.; ANAND, S.C. Genetic relationships among soybean plant introductions for resistance to race 3 of soybean cyst nematode. **Crop Science**, v.28, p.650-652, 1988.

RAO-ARELLI, A.P.; ANAND, S.C.; WRATHER, J.A. Soybean resistance to soybean cyst nematode race 3 is conditioned by an additional dominant gene. **Crop Science**, v.32, p.862-864, 1992.

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

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

THOMAS, J.D.; CAVINES, C.E.; RIGGS, R.D.; HARTWIG, E.E. Inheritance of reaction to race 4 of soybean cyst nematode. **Crop Science**, v.15, n.1, p.208-210, 1975.

WRATHER, J.A.; ANDERSON, T.R.; ARSYAD, D.M.; GAI, J.; PLOPER, L.D.; PORTA -PUGLIA, A.; RAM, H.H.; YORINORI, J.T. Soybean disease loss estimates for the top soybean producing countries in 1994. **Plant Disease**, v. 81, p. 107-110, 1997.

WRATHER, J.A.; KOENNING, S.R.; ANDERSON, T.R. Effect of diseases on soybean yields in the United States and Ontario (1999-2002 [Online]. Plant health progress.doi:1.1094/PHP-2003-0325-01-RV. Verificado em 25 de junho de 2004, em <http://plantmanagementnetwork.org/sub/php/review/2003/soybean/>.

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

YUE, P.; SLEPER, D.A.; RAO-ARELLI, A.P. Genetic analysis of resistance to soybean cyst nematode in PI 438489B. **Euphytica**, v.116, p.118 -186, 2000.

## CAPÍTULO 2

### MAPEAMENTO DE QTLs COM MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA A RESISTÊNCIA ÀS RAÇAS 3, 9 E 14 DO NEMATÓIDE DE CISTO DA SOJA

#### RESUMO

QTLs (*Quantitative Trait Loci*) associados à resistência ao nematóide de cisto da soja (NCS) já foram identificados para diferentes raças do nematóide e em várias fontes de resistência. O número genes de resistência e o tipo de ação gênica variam de uma fonte de resistência para outra. Duas regiões genômicas são importantes para a resistência ampla ao NCS, a região do *rhg1* (GL G) e a do *Rhg4* (GL A2). Estes dois locos respondem por cerca de 100% da variabilidade da soja para a resistência à raça 3 do NCS, e grande parte da variabilidade para as outras raças. Sugere-se que os genes menores reportados em outros GL possam estar envolvidos na raça-especificidade, porém é necessário mais validação. No presente trabalho 134, 110 e 128 RILs (*Recombinant Inbred Lines*), oriundas do cruzamento Hartwig (resistente) x Y23 (suscetível), foram fenotipadas para as reações às raças 3, 9 e 14 do NCS, respectivamente. Foram avaliadas de três a seis plantas por RIL e a média de cisto foi transformada em índice de parasitismo (IP). As plantas com  $IP \leq 30$  foram consideradas moderadamente resistentes. O DNA de cada RIL foi extraído separadamente e 154 marcadores microssatélites polimórficos foram amplificados nas populações. Utilizando o programa QTMOL, foram identificados cinco QTLs para a raça 3 nos GL G, A2, J e M, explicando entre 12,9 e 34,8% da variação fenotípica, um QTL para a resistência a raça 9 no GL G, explicando 22% da resistência, e marcadores associados á resistência à raça 14, principalmente nos GL G e C2. Para a resistência a raça 3 do NCS, a seleção assistida realizada com os marcadores mais significativos dos GL G e A2 apresentou resultado similar à seleção fenotípica. Estes resultados podem ser úteis nos programas brasileiros de melhoramento da soja para a resistência ao NCS, visto que os dados obtidos em grande parte concordam com a literatura e a cultivar Hartwig é a fonte de resistência mais utilizada no Brasil.

## 1. INTRODUÇÃO

Mais de dez anos de pesquisas em mapeamento de QTLs (*Quantitative Trait Loci*), associados à resistência ao nematóide de cisto da soja (NCS) são justificados pelos grandes prejuízos na produção de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] causados pelo NCS (Wrather et al., 1997; Wrather et al., 2003), pela ampla diversidade de raças fisiológicas do patógeno (Golden et al., 1970; Niblack et al., 2002) e pela limitação da avaliação fenotípica que é de alto custo, demorada e influenciada pelo ambiente.

Os programas de melhoramento devem continuamente desenvolver cultivares resistentes ao nematóide, para associá-las à rotação de culturas com espécies não hospedeiras (principal método de controle do NCS). A seleção assistida por marcadores (SAM) neste sistema é uma valiosa ferramenta de auxílio ao melhoramento, possibilitando a seleção de linhagens resistentes com os alelos de marcadores ligados a genes de resistência, reduzindo o número de genótipos a serem avaliados em casa de vegetação (Young e Mudge, 2002; Concibido et al., 2004).

Na literatura consta que já foram detectados QTLs para a resistência ao NCS em pelo menos 17 grupos de ligação (GL), considerando várias fontes de resistência e várias raças do NCS (Concibido et al., 2004). O número de genes de resistência e o tipo de ação gênica variam entre fontes de resistência (Matson e Williams, 1965; Rao-Arelli et al., 1988; Rao-Arelli, 1994). Por consenso, a região do gene *rhg1* (GL G) é considerada importante para a resistência ampla ao NCS, tendo sido detectada nas PIs 209332, 90763, 437654, 89772 e nas cultivares Hartwig e Pecking (Concibido et al., 1994; 1996; 1997; Cregan et al., 1999b; Webb et al., 1995; Yue et al., 2001; Cervigni et al., 2004). A região do gene *Rhg4* (GL A2) também foi relatada

como sendo de grande importância para a resistência à raça 3 do NCS (Weisemann et al 1992; Webb et al., 1995; Prabhu et al., 1999; Wang et al., 2004). Além disso, Guo et al. (2005) reportaram que um QTL no GL B1 é importante para a distinção entre a resistência à raça 3 e às raças 2 e 5. Outros genes de efeito menores, reportados em outros GL, podem estar envolvidos na raça-especificidade, porém necessitam de mais validação.

Embora existam algumas inconsistências, foram mapeados nove QTLs em regiões independentes na fonte de resistência Peking, oito na PI 438489B, seis na PI 437654 e cinco ou menos QTLs em outras PIs, com efeitos variando de 1 a 91% da variação fenotípica total (Concibido et al., 2004). A PI 437654, resistente a todas as raças de NCS, é genitora da cultivar Hartwig (Anand et al., 1988), que é muito utilizada nos programas de melhoramento do Brasil, apresentando resistência à quase todas as raças do NCS, com exceção das raças 4<sup>+</sup> e 14<sup>+</sup> (Dias et al., 2005).

Segundo Dias et al. (2005), as cultivares de soja brasileiras lançadas atualmente apresentam, na maioria das vezes, resistência somente às raças 1 e 3 do NCS, embora 11 raças do patógeno já tenham sido detectadas na última safra em 10 estados, sendo a raça 3 a que mais causa prejuízos. Portanto, é importante que se esclareça às bases genéticas para a resistência às diversas raças do NCS, nas principais fontes de resistência utilizadas com intenção de monitorar a transferência de regiões genômicas que conferem resistência ampla e específica ao nematódeo nos programas de melhoramento.

Assim o uso dos marcadores moleculares conjuntamente com a informação do pedigree das cultivares permitirá que se ratifique a permanência ou não de QTLs inicialmente detectados em Hartwig nos materiais elite de melhoramento. Se comprovadamente existentes e se forem detectados polimorfismos entre as linhagens melhoradas, a seleção assistida de alelos favoráveis de Hartwig poderá ser realizada com sucesso.

Este trabalho tem como objetivo confirmar os QTLs descritos na literatura para a resistência ao NCS raça 3 e 14 na cultivar Hartwig e localizar e caracterizar outro(s) QTL(s) para as raças 3, 9 e 14. Para isso, foi utilizado um mapa genético construído com marcadores microssatélites em uma população de RILs derivada do cruzamento da cultivar Hartwig com a linhagem melhorada Y23.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### *Material Genético*

Foi obtida uma população de *Recombinant Inbred Lines* (RILs) derivada do cruzamento entre Hartwig (genitor resistente) e a linhagem Y23 (genitor suscetível), segregando para resistência às raças 3, 9 e 14 do NCS. Plantas F<sub>2</sub> obtidas de 5 plantas F<sub>1</sub> foram avançadas até as gerações F<sub>6;7</sub> (para as raças 3 e 9) e F<sub>6;9</sub> (para a raça 14), usando o método descendente de uma única semente, (*Single Seed Descent* - SSD), em casa de vegetação, como reportado por Brim (1966). A população RILs F<sub>6;7</sub> foi avaliada quanto a resistência às raças 3 e 9 do NCS e a população F<sub>6;9</sub> foi testada para a raça 14. Apesar de ser o mesmo cruzamento, o número de linhagens variou para cada raça, sendo avaliadas 134, 110 e 128 linhagens para as raças 3, 9 e 14, respectivamente. O número de plantas avaliadas em cada linhagem variou de 3 a 6.

### *Avaliação fenotípica*

Os inóculos das raças 3, 9 e 14 foram mantidos na cultivar suscetível em casa de vegetação com temperatura variando de 25 a 30°C. Para a inoculação, a quantidade de cistos foi aumentada usando o mesmo cultivar para proporcionar inóculo suficiente. Os ensaios para cada raça foram realizados com as RILs, os genitores da população, as linhagens diferenciadoras (Peking, Pickett, PI 90763 e PI 88788) e a testemunha suscetível (Lee). Os experimentos foram montados no esquema de delineamento inteiramente casualizado. As sementes foram germinadas em areia a 25°C. Cada plântula com 2 a 3 dias de idade, foi transplantada para vasos de argila com capacidade de 0,5 litro, contendo mistura de solo e areia, na proporção

1:2. Simultaneamente ao transplante, cada planta foi inoculada com 4000 ovos. As plantas foram mantidas em casa de vegetação a 25-30°C e 16 h de luz.

Trinta dias após a inoculação, as plantas foram retiradas dos vasos e suas raízes lavadas sob forte jato de água em peneira com malha de 20 mesh, acoplada sobre outra de 60 mesh. Os cistos foram contados sob lupa estereoscópica e transformados em índice de parasitismo (IP), estimado como segue:

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

O dados do genitor suscetível foi utilizado no denominador, da expressão acima, com o objetivo de avaliar as diferenças genéticas entre os genitores no cruzamento. Para a confirmação da raça de NCS, o IP foi calculado substituindo do denominador da expressão acima o número de cistos e fêmeas dos progenitores suscetíveis em cada cruzamento pelo número de cistos e fêmeas no padrão suscetível (Lee), conforme proposto por Riggs e Schmitt (1988).

Foi utilizado o esquema de delineamento inteiramente casualizado com 3 a 6 repetições (plantas) por tratamento (linhagem). Os efeitos dos tratamentos foram considerados aleatórios.

#### *Extração do DNA e genotipagem dos SSR*

A extração de DNA de folhas de soja foi feita com base no protocolo descrito por Keim (1988), com algumas modificações. Entre 200 a 300 mg de folhas foram trituradas na presença de N<sub>2</sub> líquido e o pó resultante transferido para microtubos. Após a adição de 650-800 µL de tampão de extração, constituído de Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; EDTA 20 mM; NaCl 1,4 M; CTAB 2% (p/v); PVP 2% (p/v) e β-mercaptoetanol 0,2% (v/v), este último separado dos demais componentes. As amostras foram incubadas em banho-maria a 65°C, durante 20 a 40 minutos.

Após a incubação, as proteínas foram removidas com igual volume de clorofórmio : álcool - isoamílico (24:1) e centrifugação a 14.000 rpm. Os ácidos nucleicos foram precipitados pela adição de isopropanol gelado (na proporção de 1:1, isopropanol: sobrenadante) e posteriormente, foram lavados em etanol gelado a 70% e 95%, secos ao ambiente e ressuspensos em TE, pH 8,0 (Tris-HCl 10 mM e EDTA 1mM). A eliminação do RNA foi realizada adicionando RNAase A, na concentração

final de 40 µg/mL a 37°C, por 30 minutos. O DNA foi novamente precipitado, mediante a adição de NaCl, 5M, na proporção de 1:10 (NaCl: DNA ressuspensão) e após a adição de 2/3 do volume de isopropanol gelado e depois de três horas incubado a -20°C. Para a ressuspensão o DNA foi centrifugado por 10 minutos a 14.000 rpm lavado com etanol gelado a 70% e a 95%, seco ao ambiente, e posteriormente adicionado 200-300 µL de TE. A concentração do DNA foi estimada por espectrofotometria por leitura da absorbância a 260 nm, sendo cada unidade de absorbância correspondente a 50 µg/mL de DNA fita dupla.

Dentre os marcadores microssatélites polimórficos para os genitores Hartwig e Y23, foram selecionados aqueles presentes em regiões genômicas previamente associados com a resistência, para serem amplificados na população. A reação de amplificação na população foi constituída por: Tris-HCl 10 mM, pH 8,3; KCl 50 mM; MgCl<sub>2</sub> 2,4 mM; 100µM de cada um dos desoxinucleotídios; 0,6 µM de cada iniciador, uma unidade de *Taq* polimerase e 30 ng de DNA em um volume final de 15 µL. As reações de PCR foram realizadas em um termociclador Perkin Elmer modelo 9600 programado para 30 ciclos de um minuto a 94°C, um minuto a 50°C e 2 minutos a 72°C, seguidos de uma etapa de sete minutos a 72°C.

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 3% ou em géis nativos verticais de poliacrilamida 10%, usando-se tampão TBA 1X (Tris-acetato 0,09 M e EDTA 0,002 M). Após a eletroforese, os géis foram corados com brometo de etídio (10 mg/ml) e fotografados pelo sistema de fotodocumentação Eagle Eye II (Stratagene).

#### *Análise Estatística, Mapa de Ligação e Detecção de QTLs*

Com o auxílio do programa GENES (Cruz, 1997) foram realizadas a análise de avaliação da normalidade dos dados fenotípicos utilizando o IP médio das RILs, a análise descritiva, a análise de variância e a estimação dos parâmetros genéticos para as RILs avaliadas para cada raça.

O modelo estatístico adotado foi:

$$Y_{ij} = \mu + G_i + E_{ij}$$

Em que:

$\mu$  é a média geral,

$G_i$  é o efeito da  $i$ -ésima RIL, para  $i = 1, 2, 3 \dots g$  (número de RILs ou tratamentos),

$E_{ij}$  é o efeito residual,  $E_{ij} \sim \text{NID}(0, \sigma^2)$ , para  $j = 1, 2, 3 \dots r$  (número de repetições).

Na Tabela 1 encontra-se o esquema da análise de variância desse modelo.

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

FV	GL	QM	E(QM)	F
Genótipos	$g - 1$	QMG	$s_e^2 + ks_g^2$	QMG/QME
Erro	$n - g$	QME	$s_e^2$	

$$k = \frac{N - \left( \frac{1}{N} \sum_{i=1}^g r_i^2 \right)}{g - 1}$$

$$N = \sum_{i=1}^g r_i$$

$$\text{Média} - \hat{m} = \frac{\sum_{ij}^n Y_{ij}}{gk}$$

$$\text{Variância genética } (\hat{S}_g^2) = \frac{QMG - QME}{k}$$

$$\text{Variância fenotípica } (\hat{S}_f^2) = \frac{QMG}{k}$$

$$\text{Variância residual } \hat{S}_e^2 = \frac{QME}{k}$$

$$\text{Coeficiente de variação experimental - CVe (\%)} = \frac{\sqrt{QME}}{\hat{m}} \times 100$$

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

$$\text{Coeficiente de variação genético - CVg (\%)} = \frac{\sqrt{\hat{S}_g^2}}{\bar{x}} \times 10 \text{ (Cruz, 1997).}$$

Para a construção do mapa genético, as distâncias genéticas entre os marcadores foram estabelecidas utilizando os critérios de porcentagem de recombinação máxima de 30%, LOD *score* mínimo de 2,5 e função de mapeamento de Kosambi (1944). A segregação individual dos marcadores moleculares foi testada

usando o teste do qui-quadrado. Os grupos de ligação foram designados de acordo com o mapa consenso da soja (Song et al., 2004).

Para identificar marcadores ligados a um QTL de resistência, foi analisada a co-segregação entre os marcadores amplificados nas populações e o fenótipo de cada linhagem (número médio de cistos por linhagem), pelo método da ANOVA e por regressão linear simples e múltipla. A escolha de cofatores foi feita utilizando o método *stepwise*, com nível de significância adotado de 10% para entrada e saída das variáveis independentes. A localização e caracterização dos efeitos do(s) possível(is) QTL(s) foram realizadas pelo mapeamento por intervalo simples (Lander e Botstein, 1989) e por intervalo composto (Zheng, 1994), mais indicado para estes estudo por indicar a melhor estimativa da porcentagem da variação fenotípica explicada pelo QTL (Schuster e Cruz 2004). As estimativas dos valores aditivos, o coeficiente de determinação do QTL correspondente ao pico de maior significância estatística do QTL e a posição do possível QTL, foram declarados quando os valores da razão da máxima verossimilhança (*Likelihood Ratio* – LR) excederam os valores críticos de corte ( $\alpha = 0,05$ ) em cada grupo de ligação. Os valores de LR críticos foram determinados pela realização de 1000 permutações (Deorge e Churchill, 1994). Todas as análises foram feitas pelo programa GQMOL (2005).

Para a seleção de plantas resistentes, foi usado o critério de resistência moderada (IP = 30%) (Schmitt e Shannon, 1992). A eficiência de seleção (ES) dos marcadores ligados ao loco de resistência foi estimada como segue:

$$ES = \left[ \frac{\text{(Número de linhagens selecionadas corretamente como resistentes e suscetíveis com base nos marcadores)}}{\text{(Número total de linhagens selecionadas com base nos marcadores como resistentes e suscetíveis)}} \right] \times 100.$$

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### *Dados fenotípicos*

A distribuição dos dados dos IPs médios das linhagens para a raça 14, apresentou-se mais contínua que para as raças 3 e 9 (Figura 1), porém a normalidade avaliada pelo teste de Lilliefors a foi rejeitada nos três casos. Apesar disso, não foi utilizada transformação de dados, sendo utilizados os dados originais na análise de mapeamento de QTLs, o que é um procedimento relativamente comum no caso de avaliação de QTLs para resistência ao NCS (Schuster et al., 2001; Cervigni et al., 2004; Guo et al., 2005).

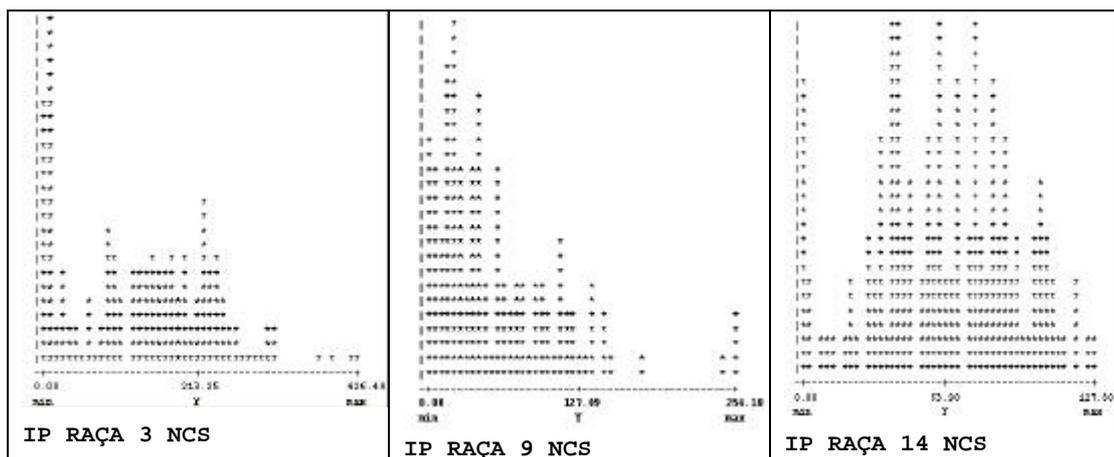


Figura 1. Distribuição dos índices de parasitismo (IP) obtidos para as raças 3, 9 e 14 do NCS em uma população de RILs derivada do cruzamento Hartwig (Resistente) x Y23 (Suscetível).

A variação genética entre os genitores e as diferenças genéticas significativas dentro da população, para cada raça, foi caracterizada por estimativas descritivas e

estatísticas (Tabela 2). Segregação transgressiva foi observada nas duas populações tanto para a redução quanto para o aumento do número de cistos em relação às médias dos genitores, evidenciando efeitos de interação gênica e/ou de interação alélica no controle da resistência para as três raças.

Tabela 2. Média de cistos do NCS, raças 3, 9 e 14, nos genitores e na população de RILs, valores médios mínimos e máximos das populações e parâmetros estatísticos estimados.

	<b>RAÇA 3</b>	<b>RAÇA 9</b>	<b>RAÇA 14</b>
<i>Genitor Resistente</i>	4,60	8,40	0,0
<i>Genitor Suscetível</i>	39,33	59,25	275,17
<i>População</i>	90,59	35,89	174,28
<b>Estimativas</b>			
QMG	18145,96	3894,06	42493,87
QME	8188,26	2580,0	3570,29
Valor F	2,21**	1,51**	11,90**
$\hat{S}_g^2$	2235,61	309,63	6661,21
$\hat{S}_f^2$	4073,96	917,55	7272,21
$\hat{S}_e^2$	1838,35	607,92	611,00
$h_r^2$	54,87	33,74	91,59
CVg	52,19	49,01	46,82
CVg/CVe	0,52	0,34	1,36
CVe	99,88	141,49	34,28
NMR	4,45	4,24	5,84
Número de RILs	134	110	128

QMG, Quadrado médio de genótipos; QME, do erro; NMR – número médio de repetições;  $\hat{S}_g^2$ , estimativa da variância genética;  $\hat{S}_f^2$ , fenotípica;  $\hat{S}_e^2$ , ambiental média;  $h_r^2$ (%), herdabilidade no sentido amplo; CVe, coeficientes de variação experimental; CVg, genético; \*\* F significativo a 1% de probabilidade.

As estimativas de herdabilidades restrita foram de 33,7%, 54,8% e 91,59% para a resistência às raças 9, 3 e 14, respectivamente. Na literatura são relatados altos valores de herdabilidades no sentido amplo para resistência à raça 3 em cruzamentos com os genótipos resistentes A20, Jack e Cordell (Mansur, 1993). Webb et al. (1995) detectaram herdabilidade no sentido amplo de 97% também para resistência á raça 3 em cruzamentos com a PI 437654. Hancock (1987) estimou herdabilidades restrita de 64%, 61% e 61% para a “raça X”, em cruzamentos entre as fontes de resistência PI 90763 x PI 887888, PI 90763 x R74-1001 e PI 90763 x PI 209332, respectivamente. Schuster et al. (2001) relataram herdabilidade no sentido restrito de

15,59%, para a raça 14 no cruzamento Hartwig x BR-92-31983. Altas herdabilidades no sentido restrito foram estimadas por Yue et al. (2001), utilizando como genitor resistente a PI 438489B. Usando famílias F<sub>2,3</sub>, esses autores relataram herdabilidades para a raça 1 de 55%, para a raça 2 de 68%, para a raça 3 de 59%, para a raça 5 de 88% e de 73% para a raça 14.

Segundo Falconer e Mackay (1996), as estimativas das herdabilidades dependem do material genético, do método de estimação utilizado e do experimento avaliado. Neste trabalho, os valores mais baixos de herdabilidade estimados para as raças 3 e 9 podem ter sido influenciados pelas condições experimentais, indicada pelo coeficiente de variação obtido nos experimentos (Tabela 2). Para a raça 14, existe boa concordância entre as herdabilidades informadas na literatura com as obtidas no presente trabalho. A alta herdabilidade detectada indica que poucos genes de efeito maior estão segregando na população, e que a eficiência de seleção fenotípica para resistência seria alta para esta raça do NCS.

#### *Análise de ligação e mapeamento de QTLs*

De 170 marcadores que foram polimórficos para Hartwig e Y23, 154 que apresentaram bandas nítidas e foram amplificados nos bulks de DNA de cada linhagem da população de mapeamento. Dez microssatélites tiveram seus alelos fixados, na maioria para o alelo do tipo parental Hartwig. Este fenômeno, também detectado por outros autores (Yamanaka et al., 2001), tem causa genética ainda desconhecida.

Pela avaliação da segregação dos marcadores feita pelo teste do qui-quadrado detectou-se que aproximadamente 20% deles apresentaram distorção da segregação mendeliana esperada de 1:1. Em outros estudos com soja, Yang et al. (2000) verificaram 37% de distorção na segregação para marcadores AFLP, Zhang et al. (2004) obtiveram distorção de 17% para RFLPs, SSR e EST, e Tasma et al. (2001) detectaram entre 8,8% a 10,7% de distorção para marcadores RFLPs. A distorção de segregação também é um fenômeno freqüente em diversas culturas, como arroz (Xu et al., 1997), milho (Lu et al., 2002) e café (Ky et al., 2000), sendo manifestada pela transmissão diferencial de alelos tanto de linhagens germinativas do macho como da fêmea (Xu et al., 1997). Essa distorção pode ser atribuída a causas genéticas e fisiológicas, como seleção no estádio gamético (Gadish e Zamir, 1986), locos que apresentam seleção natural ou estão localizados próximos a genes que conferem

menor viabilidade de gametas (Ky et al., 2000), e aborto de sementes durante o desenvolvimento e seleção durante a emergência da semente (Kopish-Obush e Diers, 2006). Uma outra possível causa da distorção são segmentos genômicos duplicados. Neste estudo os marcadores que apresentaram distorção de segregação mendeliana e em análises preliminares não prejudicaram a ligação e o ordenamento de outros marcadores, de acordo com o mapa de ligação consenso da soja (Song et al., 2004), foram mantidos nas análises.

O mapa de ligação obtido foi construído utilizando 181 RILs e 134 microssatélites. Os grupos de ligação formados foram denominados conforme o mapa consenso da soja (Song et al., 2004). Noventa e seis microssatélites se agruparam em 22 GL, cobrindo 943,1cM do genoma (Figura 2). Em relação ao mapa consenso, foram observadas algumas diferenças no ordenamento de marcadores em intervalos menores que 5 cM, o que pode ser devido ao tamanho pequeno de população, para detectar o ordenamento correto quando a saturação de marcadores é alta (Liu, 1998; Ferreira et al., 2006).

Como variaram as linhagens avaliadas para cada raça do NCS, o número de linhagens utilizadas para a construção do mapa foi maior que o número de linhagens avaliadas para cada raça, o que não compromete as análises de QTL uma vez que este tipo de população apresenta a vantagem de ser fixa. Assim, um único mapa genético pode ser usado para os dados fenotípicos avaliados em diversos experimentos, considerando apenas dados perdidos para as linhagens não avaliadas.

No mapa genético obtido foram amostrados segmentos genômicos de 18 grupos de ligação do mapa consenso, excluindo apenas os GL A1 e I. Trinta e sete microssatélites não foram ligados, dentre os quais 12 deles já eram esperados devido às grandes distâncias em relação aos outros marcadores no mapa consenso. Para os marcadores que não ligaram, pode-se considerar que em populações de RILs, ligações gênicas superiores a 20 cM podem não ser detectadas, pela grande quantidade de recombinantes gerados nos sucessivos ciclos de meiose que a população passa. Entretanto, este tipo de população é mais eficiente para a estimação da frequência de recombinação, principalmente para genes ligados a pequenas distâncias ( $r$  menor que 12,5 cM) (Burr et al., 1988).

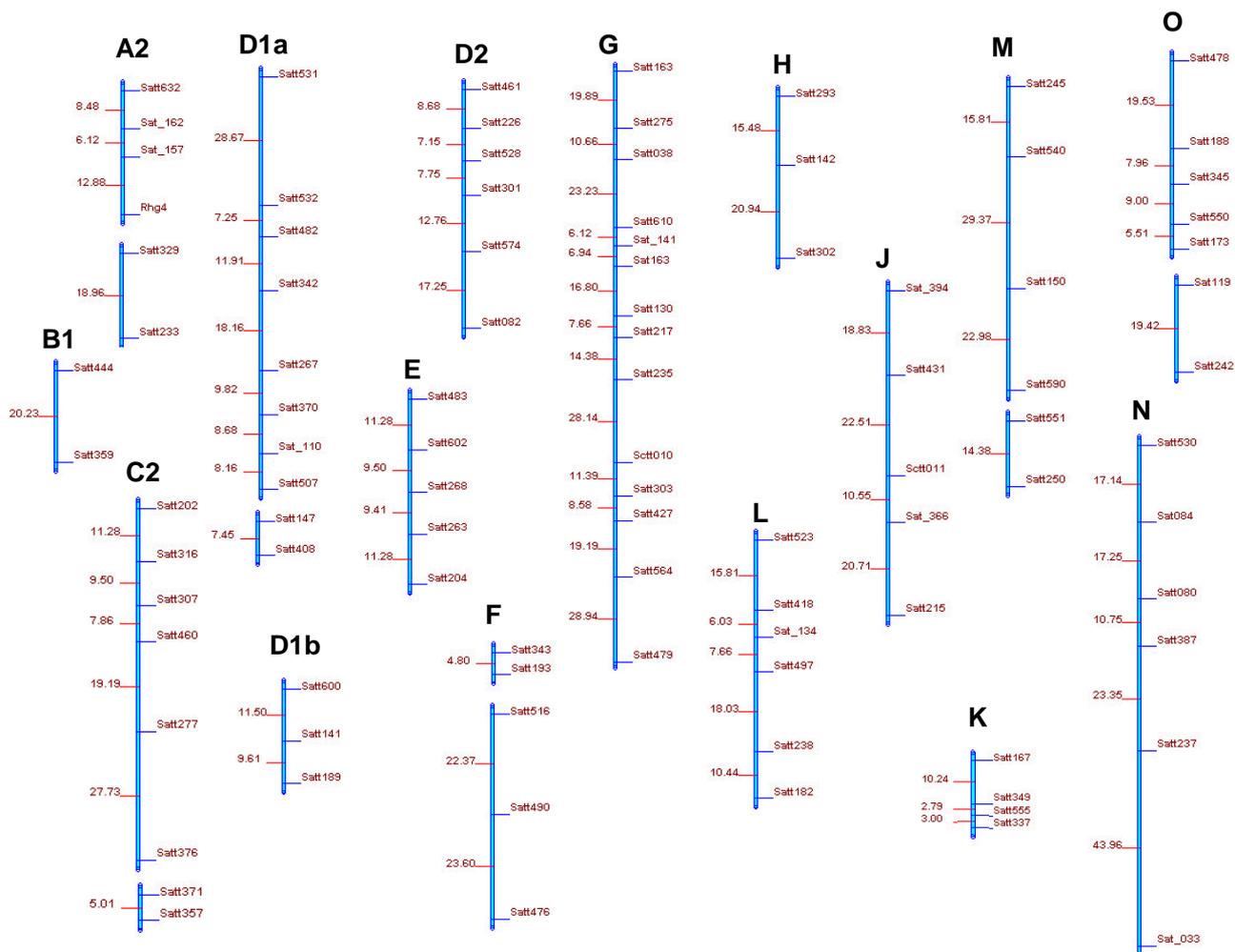


Figura 2. Mapa genético obtido de 181 linhagens endogâmicas recombinantes (RILs) do cruzamento entre Hartwig x Y23.

### *QTLs associados ao NCS*

Na análise de associação marca – característica pelo método da ANOVA, verificou-se associação significativa a 5% de significância de 27 marcas em 11 GL para a raça 3, de 13 marcas em 4 GL para a raça 9, e de 9 marcas em 7 GL para a raça 14 (Tabela 3). Considerando apenas as associações a 1% de probabilidade foram detectadas marcas associadas nos GL A2, G, J e K, para a resistência a raça 3 e G para a resistência às raças 9 e 14 (Tabela 3).

Pela análise utilizando o método do intervalo composto, foram detectados quatro QTLs para resistência a raça 3 nos GL G, A2, J e M, explicando entre 12% e 34% da variação fenotípica e um QTL para a resistência a raça 9 no GL G,

explicando 22% (Tabela 4). Para a resistência a raça 14 associações significativas foram detectadas, principalmente, nos GL G e C2. O QTL detectado para resistência a raça 3 no GL M apresentou efeito aditivo para a suscetibilidade (Tabela 4), ou seja o genitor resistente apresenta alelos que aumenta o número de cistos, portanto a seleção deverá ser feita contra o alelo desse genitor.

Na cultivar Hartwig, aqui utilizada já foram detectados QTLs para a resistência a raça 3 nos GL A1, A2, B1, F, G, J e M e para resistência a raça 14 nos GL B1, D2, G, J e M. Em outras fontes de resistência foram detectados QTLs nos GL A2, B2, C2, D1a, E, F, G, H, J e M para a raça 3, e nos GL C1, C2, D1a e E para raça 14. Na PI 43765, genitora de Hartwig, ainda foram detectados QTLs para a raça 3 nos GL A2, G e M (Weeb et al., 1995). Em nenhum estudo foi detectado associação para a raça 9 (Concibido et al., 2004).

Os marcadores Satt038 e Satt275 apresentaram maior significância na associação com a resistência às raças 3 e 9, e o marcador Sat\_141 para a raça 14. Estes três marcadores estão localizados nos primeiros 9 cM do GL G do mapa consenso da soja (Song et al., 2004). Nesta região já foram mapeados QTLs nas PIs 437654, 90763, 89772, 209332, PI 88788 e nas cultivares Peking e Hartwig (Concibido et al., 1996; 1997; Yue et al., 2001 Webb et al., 1995; Wang et al., 2004; Cervigni et al., 2004). O gene de resistência nesta região é denominado *rhg1*. Concibido et al. (1996) reportaram que na PI209332 este QTL explica 35% da resistência à raça 1, 50% à raça 3 e 54% à raça 6. Cervigni et al. (2004) verificaram que este QTL, em Hartwig, explica 37% da resistência à raça 3. Na maioria dos estudos o efeito genético predominante para o loco é aditivo (Concibido et al., 1996; Schuster et al., 2001; Mansur et al., 1993), porém Cervigni et al. (2004), detectaram efeito de dominância completa para um alelo presente neste loco em um retrocruzamento entre Hartwig e Y23, demonstrando a influência do *background* genético nas interações alélicas. Como as populações de RILs não apresentam genótipos em heterozigose, não foi possível estimar neste estudo, efeito de dominância para os QTLs detectados.

Ainda para a resistência a raça 3, o QTL detectado no GL A2, próximo ao gene de resistência ao NCS *Rhg4*, apresentou consistência com os resultados da literatura. Este QTL já foi mapeado na PI 209332, na cultivar Peking (Weisemann et al., 1992; Mahaligam e Skorupska, 1995) e também na PI 437654 (Weeb et al.,

1995). Enquanto o QTL do GL G tem grande efeito para várias raças do NCS, o QTL GL A2 parece ter importante função raça-específica na resistência à raça 3. Guo et al. (2005) também verificaram este tipo de efeito para a resistência às raças 2, 3 e 5, em um cruzamento com a PI 90763. Estes autores detectaram um QTL no GL G para as três raças, um QTL no GL B1 importante para as raças 2 e 5 e um QTL no GL J associado às raças 2 e 3 e sugeriram que as regiões do GL A2 e B1 podem representar uma importante distinção entre a raça 3 e as raças 2 e 5 do NCS.

Um QTL de efeito maior, explicando 22% da variação fenotípica, foi detectado no intervalo entre os marcadores Satt038 e Satt275 para a resistência à raça 9 (Tabela 4). Na literatura não há relatos de QTLs para esta raça. Para a raça 14, os maiores valores de LR detectados pela análise de regressão múltipla foram para os marcadores Sat\_141 (GL G) e Satt202 (GL C2), porém não significativos (Tabela 4). Para esta raça também existem QTLs relatados nos GL C2 e G, além de QTLs nos GL B1, C1, D1a, D2, E, J e M (Concibido et al., 2004; Wang et al., 2004; Schuster et al.; 2001). Dentre estes, Schuster et al. (2001) detectaram um QTL de maior efeito no GL D2, explicando 41,1% da resistência para a raça 14, em um cruzamento envolvendo Hartwig. Embora neste estudo, também com a cultivar Hartwig, tenha sido detectado o marcador Satt082 estatisticamente associado com a resistência à raça 14 no GL D2, esta associação não foi significativa pela análise de intervalo composto. Entretanto, sabe-se que se deve ter cautela em assumir que a ligação: marcador - QTL irá permanecer entre diferentes *backgrounds* genéticos, tipos de população ou ambientes (Francia et al., 2005; Collard et al., 2005).

Wang et al. (2004) também detectaram um QTL de efeito significativo no GL G, próximo ao *rhg1*, para a resistência à raça 14 do NCS, e confirmaram a presença de um QTL no GL J, próximo ao marcador Satt431 para esta raça, em cruzamentos com a PI 88788. Estes autores também detectaram, pela análise de marca simples, associação significativa entre o marcador Satt277 no GL C2 e a resistência às raças 3 e 14.

Tabela 3. Microssatélites ligados à resistência às raças 3, 9 e 14 do NCS nas RILs.

	<b>MARCA</b>	<b>GL</b>	<b>Prob(F)</b>	<b>Média(2)</b>	<b>Média(0)</b>	<b>DS</b>
RAÇA 3	Sat_162	A2	0,039*	120,58 a	158,56b	-
	Sat_157	A2	0,009**	104,60 a	153,86b	-
	Rhg4	A2	0,029*	111,11 a	153,97b	(71S : 36R)
	Satt632	A2	0,014*	111,66 a	157,95b	-
	Satt371	C1	ns	116,61 a	156,83b	-
	Satt342	D1a	0,030*	159,13 a	120,03b	-
	Sat_163	G	0,038*	115,04 a	153,66b	-
	Satt275	G	0**	82,65 a	177,89b	-
	Sat_141	G	0,006**	105,89 a	157,32b	(81S : 45R)
	Satt610	G	0,037*	96,88a	167,05b	(50S : 22R)
	Satt217	G	0,005**	115,41a	167,14b	-
	Satt130	G	0,036*	113,65a	162,29b	-
	Satt235	G	0,017*	114,13a	159,73b	-
	Satt163	G	0,001**	107,90a	169,22b	-
	Satt038	G	0,000**	94,86a	185,86b	-
	Satt309	G	0,023*	117,98b	162,37a	-
	Satt142	H	0,035*	157,34a	118,44b	-
	Satt353	I	0,0425*	156,43a	118,69b	-
	Satt456	J	0,004**	166,61a	123,55b	-
	Satt215	J	0,009**	165,88a	117,61b	-
	Satt499	K	0,018**	120,77a	159,42b	-
	Satt242	K	0,025*	149,86a	141,00b	(71S : 43R)
	Satt551	M	0,026*	159,38a	115,26b	-
Satt250	M	0,048*	155,70a	118,77b	-	
Satt237	N	ns	106,69a	152,96b	-	
RAÇA 9	Satt556	B2	0,027*	42,12b	76,98a	-
	Satt321	D1a	0,05 ns	48,81b	69,23a	-
	Sat_110	D1a	ns	73,97a	47,18b	-
	Sat163	G	0,055 ns	47,75a	68,06b	-
	Satt275	G	0,023*	43,08a	75,70b	-
	Sat_141	G	0,023*	44,28a	68,47b	(66S : 39R)
	Satt130	G	ns	47,82a	69,27b	-
	Satt235	G	0,038*	46,42a	69,77b	-
	Satt163	G	0,032*	46,16a	69,75b	-
	Satt038	G	0,000**	41,10a	80,93b	-
	Satt309	G	0,009**	45,84b	76,71a	-
	Satt456	J	0,0231*	48,05b	71,42a	-
	Satt215	J	ns	54,06b	67,39a	-
RAÇA 14	Satt476	C1	ns	55,81b	67,80a	(46S : 67R)
	Satt376	C2	0,010*	55,72a	67,84b	(71S : 42R)
	Satt202	C2	ns	52,47a	68,41b	-
	Satt082	D2	0,032*	57,58a	69,66b	(47S : 70R)
	Satt370	D1a	0,027*	66,37a	53,09b	-
	Sat_141	G	0,009**	54,45a	68,81b	(72S : 52R)
	Satt038	G	0,051*	57,88a	69,63b	-
	Satt549	N	ns	53,69a	68,92b	-
	Satt479	O	ns	55,68a	66,82b	-

\*, \*\*, significativo a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente, para o contraste de média entre os alelos SSR(denominados de: 2 - alelo de Hartwig; e 0 - alelo de Y23) usando a estatística *t*. DS = distorção de segregação.

Tabela 4. QTLs para resistência ao NCS para as raças 3, 9 e 14 nas RILs.

Raça	GL	Intervalo	Posição	LR	R <sup>2</sup> %	a
Raça 3	A2	Sat_157 - Rhg4	0,040	13,85**	12,9%	-38,82
	J	Sat_366 - Satt215	0,189	16,35**	17,7%	-37,12
	G	Satt038 - Satt275	0,040	31,53**	34,8%	-66,91
	M	Satt250 - Satt551	0,120	13,39 **	15,5%	36,97
Raça 9	G	Satt038 - Satt275	0,040	15,08*	22,2%	-27,20
Raça 14	C2	Satt316 - Satt202	0,093	6,75ns	5,9%	-7,43
	G	Sat_163 - Sat_141	0,067	7,27ns	5,6%	-7,31

\* e \*\* onde os valores LR excederam os valores críticos de corte com  $\alpha = 0,05$  e  $\alpha = 0,01$ , respectivamente, em cada grupo de ligação. Os valores de LR críticos foram determinados pela realização de 1000 permutações.

É importante salientar que o marcador Sat\_141, estatisticamente associado a resistência às três raças em estudo, apresentou distorção da segregação mendeliana esperada nos três casos, com menor número de indivíduos com o alelo do genitor resistente que o esperado. Distorção de segregação também foi verificado para marcadores associados com a resistência à raça 3 nos GL A2, G e K, e à raça 14 nos GL C2 e D2 (Tabela 3). Em outros estudos de detecção de QTLs para a resistência ao NCS, Webb et al. (1995) verificaram distorção da segregação para um marcador associado a um QTL no GL G. Wang et al. (2004) relataram distorção da segregação para o marcador Satt309, próximo ao Sat\_141, e para um marcador próximo a um QTL de resistência às raças 3 e 14 no GL J, em cruzamentos da PI 88788. Além disso, Kopisch-Obuch e Diers (2006) estudaram a distorção de segregação no loco *rhg1* em 51 populações F<sub>4</sub>, verificando que o fenômeno neste loco é causado por: seleção gamética, aborto de sementes durante o desenvolvimento, e seleção durante a emergência da semente e do desenvolvimento da planta.

A seleção assistida com os marcadores identificados neste trabalho foi mais eficiente para a seleção de resistência à raça 3 e de menor eficiência para a raça 14. A comparação entre a seleção fenotípica com a seleção assistida mostrou que a utilização conjunta de mais de um marcador é o que proporciona mais acertos na seleção assistida, evidenciado pela maior ES, e que a combinação de marcadores de

diferentes GL foi a melhor alternativa de seleção, proporcionando diferenciais de seleção assistida mais próximos aos obtidos pela seleção fenotípica (Tabela 5).

Neste estudo, verificou-se (1) QTLs de grande efeito para a raça 3 do NCS, nos GL G, A2, J, M, sendo que a seleção assistida realizada com os marcadores mais significativos nos GL G e A2 apresentou resultado similar em relação à seleção fenotípica; (2) um QTL de grande efeito para a resistência a raça 9 no GL G; e (3) marcadores associados a resistência à raça 14 nos GL G e C2. Estes resultados podem ser úteis nos programas brasileiros de melhoramento da soja para a resistência ao NCS, visto que os dados obtidos em grande parte concordam com a literatura e foi utilizada a cultivar Hartwig, que é a fonte de resistência mais utilizada no Brasil (Dias et al., 2005).

Tabela 5. Comparação entre a seleção assistida por marcadores microssatélites (SAM) e a seleção fenotípica (FEN) para a resistência às raças 3, 9 e 14 do NCS, considerando os parâmetros de eficiência de seleção (ES%) dos marcadores, de média e de diferencial de seleção (DS%).

	Marcador	RILs selecionadas com marcas	Média			DS(%)	
			SAM	FEN	ES(%)	FEN	SAM
RAÇA 3	Sat_157	47	104,60	34,49	66,7%	-75,07	-24,40
	Satt217	64	115,41	58,39	66,2%	-57,79	-16,59
	Satt163	58	107,89	49,88	62,2%	-63,94	-22,02
	Satt038	55	94,86	45,56	73,4%	-67,07	-31,44
	Satt275	42	82,64	27,43	65,8%	-80,17	-40,27
	Sat_141	44	105,89	30,28	71,4%	-78,11	-23,47
	Satt038+Sat_141	33	97,25	15,00	45,9%	-89,15	-29,71
	Sat_157+Satt038	21	47,86	7,88	88%	-94,30	-65,41
	Satt038 +Satt275	35	76,23	15,54	74,6%	-88,86	-45,37
	Satt275-Satt038+	13	16,76	5,22	93,3%	-96,25	-87,98
	Sat_157						
Satt275+Satt038	12	41,78	4,93	86,6%	-96,46	-70,06	
	+ Rhg4						
RAÇA 9	Satt038	49	42,28	19,64	61,4%	-67,40	-29,83
	Satt038 + Satt275	27	35,68	11,77	59,6%	-80,46	-40,79
	Satt309 +Satt038	22	33,95	9,79	78%	-83,74	-43,66
	Sat_141	53	54,66	33,32	61,7%	-47,17	-13,34
RAÇA 14	Satt202	49	52,47	31,54	62%	-49,99	-16,82
	Satt082 +Sat_141	31	46,66	23,42	60,3%	-62,87	-26,02
	Satt202 +Satt082	30	45,60	22,86	50,8%	-63,75	-27,71
	Satt202 +Sat_141	23	47,64	18,24	50%	-71,08	-24,47
	Satt082+Satt202	18	40,75	13,89	80%	-77,97	-35,40
	+Sat_141						

#### 4. BIBLIOGRAFIA

ANAND, S.C.; GALLO, K.M.; BAKER, L.A.; HARTWIG, E.E. Soybean plant introductions with resistance to races 4 ou 5 of the soybean cyst nematode. **Crop Science**, v.28, p. 563-564, 1988.

BRIM, C.A. A modified pedigree method of selection in soybeans. **Crop Science**, v.6, p.22, 1966.

BRUCKER, E.; CARLSON, S.; WRIGHT, E.; NIBLACK, T.; DIERS, B. *Rhg1* alleles from soybean PI437654 and PI88788 respond differentially to isolates of *Heterodera glycines* in the greenhouse. **Theoretical Applied Genetics**, v.111, p.44-49, 2005.

BURR, B.; BURR, F.A.; THOMPSON, K.H.; ALBERTSON, M.C.; STUBER, C.W. Gene mapping with recombinant inbreds in maize. **Genetics**, v.118, p.519-526, 1988.

CERVIGINI, G.D.L.; SCHUSTER, I.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Two microsatellite markers flanking a dominant gene for resistance to soybean cyst nematode race 3. **Euphytica**, v.135, p. 99-105, 2004.

CHURCHILL, G.A.; DOERGE, R.W. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. **Genetics**, v.138, p.963-971, 1994.

CONCIBIDO, V.C.; YOUNG, N.D; LANGE, D.A.; DENNY, R.L.; DANESH, D.; ORF, J.H. Targeted comparative genome analysis and qualitative mapping of a major partial-resistance gene to the soybean cyst nematode. **Theoretical Applied Genetics**, v.93, p.234-241, 1996.

CONCIBIDO, V.C.; DENNY, R.L.; BOUTIN, S.R.; HAUTEA, R.; ORF, J.H.; YOUNG, N.D. DNA marker analysis of loci underlying resistance to soybean cyst nematode (*Heterodera glycines* Ichinohe). **Crop Science**, v.34, n.1, p.240-246, 1994.

CONCIBIDO, V.C.; DENNY, R.L.; LANGE, D.A.; ORF, J.H.; YOUNG, N.D. RFLP mapping and marker-assisted selection of soybean cyst nematode resistance in PI 209332. **Crop Science**, v.36, n.6, p.1643-1650, 1996.

CONCIBIDO, V.C.; DIERS, B.W.; ARELLI, P.R. A decade of QTL mapping for cyst nematode resistance in soybean. **Crop Science**, v.44, p.1121-1131, 2004.

CONCIBIDO, V.C.; DOUGLAS, L.; DENNY, R.L.; ORF, J.H.; YOUNG, N.D. Genome mapping of soybean cyst nematode resistance genes in Peking, PI 90763, and PI 88788 using DNA markers. **Crop Science**, v.37, n.1, p.258-264, 1997.

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

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2<sup>a</sup> ed. Viçosa: UFV. 390p. 1997.

CRUZ, C.D. **Programa Genes: aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: UFV. 442p., 1997.

DIAS, W.A.; SILVA, J.F.V.; GARCIA, A.; CARNEIRO, G.E.S. Distribuição das raças de *Heterodera glycines* no Brasil. In.: **Resumos da XXVII Reunião da Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil**. p.365-366. 2005. Embrapa Soja. Documentos 257.Cornélio-Procópio – PR.

FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. **Introduction to quantitative genetics**. 4<sup>a</sup>ed. Longman Malaysia. Edinburgh, 464p. 1996.

FERREIRA, A.; SILVA, M.F.; COSTA E SILVA, L.; CRUZ, C.D. Estimating the effects of population size and type on the accuracy of genetic maps. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. xxx-xxx, 2006. (in press).

GADISH, I., ZAMIR, D. Differential zygotic abortion in an interspecific *Lycopersicon* cross. **Genome**, v.29, p.156–159. 1986.

GQMOL. Viçosa: 15.12.2005. (<http://www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm>).

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

HANCOCK, J.A.; HANCOCK, F.G.; CAVINESS, C.E.; RIGGS, R.D. Genetics of resistance in soybean to race X of soybean cyst nematode. **Crop Science**, v.27, n.1, p.704-707, 1987.

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

KOPISCH-OBUCH, F.J.; DIERS, B.W. Segregation at the SNC resistance locus *rhg1* in soybean is distorted by an association between the resistance allele and reduced field emergence. **Theoretical Applied Genetics**, v.112: p. 109-207, 2006.

KOSAMBI, D.D. The estimation of map distance from recombination values. **Ann. Eugen.** v.12, p.185-199, 1944.

KY, C-L.; BARRE, P.; LORIEUX, M.; THOUSLOT, P.; AKAFFOU, S.; LOUARN, J.; CHARRIER, A.; HAMON, S.; NOIROT, M. Interspecific genetic linkage map, segregation distortion and genetic conversion in coffee (*Coffea* sp.). **Theoretical Applied Genetics**, v.101, p.669–676, 2000.

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

LIU, H.B. **Statistical Genomics, linkage, mapping and QTL analysis**. CRC, Boca Raton, Florida, p.611. 1998.

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

MANSUR, L.M.; CARRIQUIRY, A.L.; RAO-ARELLI, A.P. Generation mean analysis of resistance to race 3 of soybean cyst nematode. **Crop Science**, v.33, n.3, p.1249-1253, 1993.

MATSON, A.L.; WILLIAMS, L.F. Evidence of a fourth gene for resistance to the soybean cyst nematode. **Crop Science**, v.5, p.477, 1965.

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

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

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

RAO-ARELLI, A.P.; ANAND, S.C. Genetic relationships among soybean plant introductions for resistance to Race 3 of soybean cyst nematode. **Crop Science**, v.28, p.650-652, 1988.

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

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

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

SHUSTER, I.; CRUZ, C.D. **Estatística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados**. Editora UFV: Universidade Federal de Viçosa, 568p., 2004.

SONG, Q.J.; MAREK, L.F.; SHOEMAKER, R.C.; LARK, K.G.; CONCIBIDO, V.C.; DELANNAY, X.; SPETCH, J.E.; CREGAN, P.B. A new integrated genetic linkage map of the soybean. **Theoretical Applied Genetics**, v.109, p.122-128, 2004.

TASMA, I.M.; LORENZEN, L.L.; GREEN, D.E.; SHOEMAKER, R.C. Mapping genetic loci for flowering time, maturity, and photoperiod insensitivity in soybean. **Molecular Breeding**, v.8, p.25-35, 2001.

WANG, D.; ARELLI, P.R.; SHOEMAKER, R.C.; DIERS, B.W. Loci underlying resistance to race 3 of soybean cyst nematode in *Glycine soja* plant introduction 468916. **Theoretical Applied Genetics**, v.103, p.561-566, 2001.

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

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

WEISEMANN, J.M.; MATTHEWS, B.S.; DEVINE, T.E. Molecular markers located to the soybean cyst nematode resistance gene, *Rhg4*. **Theoretical Applied Genetics**, v.85, n.1, p.136-138, 1992.

WRATHER, J.A.; ANDERSON, T.R.; ARSYAD, D.M.; GAI, J.; PLOPER, L.D.; PORTA -PUGLIA, A.; RAM, H.H.; YORINORI, J.T. Soybean disease loss estimates for the top soybean producing countries in 1994. **Plant Disease**, v.81, p.107-110, 1997.

WRATHER, J.A.; ANAND, S.C.; DROPKIN, V.H. Soybean cyst nematode control. **Plant Disease**, v.68, n.9, p.829-833, 1984.

WRATHER, J.A.; KOENNING, S.R.; ANDERSON, T.R. Effect of diseases on soybean yields in the United States and Ontario (1999-2002 [Online]. Plant health progress. doi:1.1094/PHP-2003-0325-01-RV. Verificado em 25 de junho de 2004 Em <http://plantmanagementnetwork.org/sub/php/review/2003/soybean/>.

XU, Y.; ZHU, L.; XIAO, J.; HUANG, N.; McCOUCH, S.R. Chromosomal regions associated with segregation distortion of molecular markers in F<sub>2</sub>, backcross, double haploid and recombinant inbred populations in rice (*Oryza sativa* L.). **Molecular Genetics**, v.253, p. 535-545, 1997.

YAMANAKA, N.; NINOMIYA, S.; HOSHI, M.; TSUBOKURA, Y.; YANO, M.; NAGAMURA, Y.; SASAKI, T.; HARADA, K. An informative linkage map of soybean reveals QTLs for flowering time leaf morphology and regions of segregation distortion. **DNA Research**, v.8, p.61-72, 2001.

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

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

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

YUE, P.; SLEPER, D.A.; RAO-ARELLI, A.P. Genetic analysis of resistance to soybean cyst nematode in PI 438489B. **Euphytica**, v.116, p.118 -186, 2000.

ZHENG, Z.B. Precision mapping of quantitative trait loci. **Genetics**, v.136, p.1457-1468, 1994.

ZHANG, W.K.; WANG, Y.J.; LUO, G.Z.; ZHANG, J.S.; HE, C.Y.; WU, X.L. GAI, J.Y.; CHEN, S.Y. QTL mapping of ten agronomic traits on the soybean (*Glycine max* L. Merr.) genetic map and their association with EST markers. **Theoretical Applied Genetics**, v.108, p.1131-1139, 2004.

## CAPÍTULO 3

### VALIDAÇÃO DE MICROSSATÉLITES PARA A SELEÇÃO ASSISTIDA A RESISTÊNCIA ÀS RAÇAS 3 E 14 DO NEMATÓIDE DE CISTO DA SOJA EM DUAS POPULAÇÕES

#### RESUMO

Este estudo teve como objetivo validar marcadores microssatélites, associados com a resistência às raças 3 e 14 do nematóide de cisto da soja, para serem utilizados na seleção assistida em programas de melhoramento. Considerou-se que validar significa determinar a eficiência de seleção dos marcadores em populações independentes daquelas em que eles foram inicialmente identificados. Os microssatélites avaliados estão presentes em três regiões do genoma da soja, nos grupos de ligação (GL) A2, D2 e G. As populações de estudo constituíram de 65 famílias  $F_{2,3}$  derivadas do cruzamento Msoy8001 (Resistente) x Conquista (Suscetível), avaliadas para a raça 3, e 66 famílias  $F_{2,3}$  do cruzamento S5995 (R) x Renascença (S) avaliadas para a raça 14. A resposta de cada família  $F_{2,3}$  foi dada transformando a média dos cistos desenvolvidos no total de plantas de cada família em Índice de Parasitismo (IP). Foram identificadas como resistentes as famílias com IP de até 30%, pelo conceito de resistência moderada. Para a resistência à raça 3, trinta *primers* próximos às regiões associadas à resistência foram amplificados nos genitores dos quais 23 foram polimórficos e amplificados na população. Para a resistência à raça 14, de 25 marcadores microssatélites avaliados entre os pais, nove foram polimórficos e amplificados. Para a raça 3, a análise de marca simples feita pelo programa GQMOL confirmou a associação dos marcadores nos GL A2 e G. Os marcadores Satt 309 do GL G e GMENOD2B do GL A2 foram responsáveis por explicar a maior proporção da variância fenotípica nos diferentes grupos. A eficiência de seleção (ES) para o *primer* mais explicativo, Satt309, foi de 79,4%. As combinações dos marcadores Satt309+GMENOD2B e Satt309+Satt187 apresentaram uma ES de 100%. Para a raça 14, somente marcadores presentes no GL G apresentaram associação significativa com a resistência no cruzamento avaliado. O marcador Satt309 foi também o responsável pela explicação da maior proporção da variância fenotípica, com ES de 94%. A melhor combinação de marcadores foi a do Satt309 com o Satt356, que juntos proporcionaram 100%. Comparando a seleção fenotípica com a seleção assistida, a utilização conjunta dos marcadores Satt309 e GMENOD2B, proporcionou um diferencial de seleção de -88,4%, para a raça 3. O diferencial de seleção da seleção fenotípica foi de -92,5%. Para a raça 14, a utilização conjunta do Satt309 e Satt356 proporcionou um diferencial de seleção de -42,4%, enquanto que na seleção fenotípica o diferencial de seleção foi de -50,0%, indicando que os dois tipos de seleção podem proporcionar ganhos similares. No entanto, a seleção fenotípica é influenciada pelo ambiente e o número de plantas que podem ser selecionadas em casa de vegetação é limitado, enquanto que a seleção assistida por marcadores moleculares não possui estas limitações.

## 1. INTRODUÇÃO

Uma das grandes limitações para desenvolver cultivares de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] resistentes ao nematóide de cisto (NCS) é a avaliação fenotípica, por ser demorada, dispendiosa e influenciada pelo ambiente, restringindo o número de plantas avaliadas. A seleção assistida por marcadores (SAM) para esta característica tornou-se uma importante ferramenta de auxílio no melhoramento, pois permite selecionar linhagens com base nos alelos de marcadores genéticos ligados à resistência, reduzindo o número de linhagens a serem avaliadas em casa de vegetação (Concibido et al., 2004; Young e Mudge, 2002).

Associados com a resistência ao NCS já foram mapeados vários QTLs em soja, utilizando várias fontes de resistência e diferentes raças do NCS (Concibido et al., 2004). Duas regiões no genoma de soja são de grande importância para a resistência ampla ao NCS, a região do gene *rhg1* (GL G) e a do gene *Rhg4* (GL A2). Estes dois locos respondem pela quase totalidade da variabilidade da soja para a resistência à raça 3 do NCS (Webb et al., 1995; Weisemann et al., 1992), e grande parte da variabilidade para as outras raças (Concibido et al., 1996; 1997; Wang et al., 2004; Guo et al., 2005). Schuster et al. (2001) detectaram uma outra região de efeito maior no GL D2 conferindo resistência à raça 14. Sugere-se que os genes menores reportados em outros GL possam estar envolvidos na raça - especificidade, porém necessitam de mais validação.

Entretanto, deve-se tomar cuidado em assumir que a ligação marcador-QTL irá permanecer em diferentes *backgrounds* genéticos ou em diferentes experimentos,

uma vez que a detecção de QTLs é influenciada por vários fatores tais como a magnitude do QTL, a existência de outros QTLs ligados, o tamanho da população de mapeamento, a acurácia da avaliação fenotípica, os erros de genotipagem, os dados perdidos e os efeitos ambientais (Francia et al., 2005; Collard et al., 2005). Assim, para aplicação no melhoramento, os QTLs já publicados só serão úteis se puderem ser validados em populações independentes (Fasoula et al., 2004), ou seja, deve-se testar a efetividade desses marcadores, na determinação do fenótipo alvo em populações independentes e em diferentes *backgrounds* genéticos (Francia et al., 2005; Fasoula et al., 2004). No caso do NCS, deve-se determinar a eficiência de seleção dos marcadores considerando a fonte de resistência e a raça do NCS para a qual se pretende introduzir a resistência (Cervigni, 2003).

Apesar de muitos QTLs terem sido reportados em soja para resistência ao NCS, poucos foram confirmados em populações adicionais do mesmo ou de diferentes *backgrounds* genéticos. Um dos poucos estudos de validação de QTL para resistência ao NCS foi realizado por Glover et al. (2004), que confirmaram a presença de um QTL conferindo resistência à raça 14 do NCS no grupo J na PI 88788. A validação dos QTL é um passo crítico antes da seleção assistida com marcadores em programas de melhoramento. Assim, este trabalho teve como objetivos validar marcadores microssatélites previamente identificados por estarem associados a QTLs que conferem resistência genética às raças 3 e 14 do NCS, nos grupos de ligação A2, D2 e G, utilizando populações obtidas de diferentes fontes de resistência daquelas em que os marcadores foram mapeados, e, se presente(s), verificar sua(s) eficiência(s) de seleção.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### *Material Genético*

Duas populações de famílias  $F_{2:3}$  foram utilizadas, uma obtida do cruzamento Msoy8001 (resistente) x Conquista (suscetível) e outra do cruzamento S5995 (resistente) x Renascença (suscetível). No primeiro cruzamento foram avaliadas 65 famílias para a reação à raça 3 do NCS e no segundo, 66 famílias para a reação à raça 14.

### *Avaliação fenotípica*

Os experimentos foram realizados em casa de vegetação no esquema de delineamento inteiramente casualizado, sendo avaliadas de quatro a seis plantas por família  $F_{2:3}$  sob condições de temperatura variando de 25 a 30°C e 16 h de luz. A avaliação do cruzamento Msoy8001 x Conquista, para a reação a raça 3, foi realizada de fevereiro a março de 2003 e a do cruzamento S5995 x Renascença, para reação a raça 14, de julho a agosto de 2004.

Os inóculos das raças 3 e 14 foram mantidos em cultivar suscetível em casa de vegetação. Para a inoculação, a quantidade de cistos foi aumentada usando o mesmo cultivar para proporcionar inóculo suficiente. Foram incluídas nos ensaios as populações  $F_{2:3}$ , genitores de cada população, as linhagens diferenciadoras de soja (Peking, Pickett, PI 90763 and PI 88788) e a testemunha suscetível (Lee). As sementes foram colocadas para germinar em areia a 25°C. Cada plântula (de 2 a 3 dias de idade) foi transplantada, individualmente, para vasos de argila com

capacidade de 0,5 litro, contendo mistura de solo e areia, na proporção 1:2. Simultaneamente ao transplântio, foi feita a inoculação de 4000 ovos por vaso.

Trinta dias após a inoculação, as plantas foram retiradas dos vasos e suas raízes lavadas sob forte jato de água em peneira com malha de 20 mesh, acoplada sobre outra de 60 mesh e os cistos foram contados sob lupa estereoscópica. A média de cada família F<sub>2:3</sub> foi transformada em índice de parasitismo (IP), estimado como segue:

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

Os dados dos genitores suscetíveis de cada população foram utilizados no denominador da expressão acima, para calcular o IP de cada família, com o objetivo de avaliar as diferenças genéticas entre os progenitores de cada cruzamento. Para a confirmação da raça do NCS, o IP foi calculado substituindo o denominador da expressão acima pelo número de cistos e fêmeas em Lee (padrão suscetível), conforme proposto por Riggs (1988).

Para a comparação entre seleção assistida e a seleção fenotípica, cada população de famílias F<sub>2:3</sub> foi classificada usando o critério de resistência moderada proposto por Schmitt e Shannon (1992), no qual plantas com IP > 30% são consideradas resistentes.

A eficiência de seleção (ES) dos marcadores ligados ao loco de resistência foi estimada como segue:

$$ES = \frac{\text{N}^\circ \text{ de famílias selecionadas corretamente como resistentes com base nos marcadores} + \text{N}^\circ \text{ de famílias selecionadas corretamente como suscetíveis com base nos marcadores}}{\text{N}^\circ \text{ total de famílias selecionadas com base nos marcadores, resistentes e suscetíveis}} \times 100.$$

#### *Extração do DNA e genotipagem dos SSR*

A extração de DNA de folhas de soja foi feita com base no protocolo descrito por Keim (1988), com algumas modificações. Entre 200 a 300 mg de folhas foram trituradas na presença de N<sub>2</sub> líquido e o pó resultante transferido para microtubos. Após a adição de 650-800 µL de tampão de extração (Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; EDTA 20 mM; NaCl 1,4 M; CTAB 2% (p/v); PVP 2% (p/v) e β-mercaptoetanol

0,2% (v/v), este último separado dos demais componentes), as amostras foram incubadas em banho-maria a 65°C, durante 20 a 40 minutos. Posteriormente, a incubação, as proteínas foram removidas com igual volume de clorofórmio : álcool - isoamílico (24:1) e centrifugação a 14.000 rpm. Os ácidos nucleicos foram precipitados pela adição de isopropanol gelado (na proporção de 1:1, isopropanol: sobrenadante), lavagem com etanol gelado a 70% e a 95%, secos ao ambiente e ressuspensos em TE, pH 8,0 (Tris-HCl 10 mM e EDTA 1mM). A eliminação do RNA foi realizada adicionando RNAase A, na concentração final de 40 µg/mL a 37°C, por 30 minutos. O DNA foi novamente precipitado, mediante a adição de NaCl, 5M, na proporção de 1:10 (NaCl: DNA ressuspense) e após a adição de 2/3 do volume de isopropanol gelado e depois de três horas incubado a -20°C. Para a ressuspensão o DNA foi centrifugado por 10 minutos a 14.000 rpm lavado com etanol gelado a 70% e a 95%, seco ao ambiente, e posteriormente adicionado 200-300 µL de TE. A concentração do DNA foi estimada por espectrofotometria por leitura da absorbância a 260 nm, sendo cada unidade de absorbância correspondente a 50 µg/mL de DNA fita dupla.

No cruzamento de Msoy8001 x Conquista, foram testados 30 *primers* de microssatélites, presentes em regiões dos grupos de ligação A2, D2 e G, nas quais QTL de grande efeito foram previamente para a resistência à raça 3. Dos 30 *primers*, 23 foram polimórficos nos pais e amplificados na população. Na população S5995 x Renascença 25 *primers* microssatélites foram amplificados (dos GL D2 e G), destes nove apresentaram polimorfismos e, portanto, foram amplificados nos bulks de DNA de cada família. As amplificações foram realizadas em 15 µL, contendo Tris-HCl 10 mM, pH 8,3; KCl 50 mM; MgCl<sub>2</sub> 2,4 mM; 100µM de cada um dos desoxinucleotídios; 0,6 µM de cada *primer*, uma unidade de *Taq* polimerase e 30 ng de DNA.

As reações de amplificação foram realizadas em um termociclador Perkin Elmer modelo 9600 programado para 30 ciclos de um minuto a 94°C, um minuto a 50°C e 2 minutos a 72°C, seguido de uma etapa de sete minutos a 72°C.

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 3% ou em géis nativos verticais de poli(acrilamida) 10%, usando-se tampão TBA 1X (Tris-acetato 0,09 M e EDTA 0,002 M). Após a eletroforese os géis foram

corados com brometo de etídio (10 mg/ml) e fotografados pelo sistema de fotodocumentação Eagle Eye II (Stratagene).

#### *Análise da associação marca – característica e Análise Estatística*

Para identificar marcadores ligados ao QTL de resistência, a co-segregação entre os marcadores amplificados nas populações e o fenótipo de cada família  $F_{2:3}$  (IP por família) foi analisado estatisticamente através da análise de marca simples, método da ANOVA. A segregação individual dos marcadores moleculares foi testada usando o teste do qui-quadrado.

Para os marcadores dos mesmos grupos de ligação, as distâncias genéticas entre os marcadores foram estabelecidas com LOD *score* mínimo de 3 e porcentagem de recombinação máxima de 30%, utilizando a função de mapeamento de Kosambi (1944). Para a localização e caracterização do efeito do possível QTL, foi utilizado o método de mapeamento de QTL por intervalo simples (Lander e Botstein, 1989) e intervalo composto (Zheng, 1994). As estimativas dos valores aditivos e de dominância, o coeficiente de determinação do QTL, correspondente ao pico de maior significância estatística do QTL, e a posição do possível QTL foram declarados quando os valores de LOD excederam o valor de 3. Todas as análises foram feitas no programa GQMOL (2005).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### *Dados fenotípicos*

A verificação dos contrastes das médias para as características entre os genitores e a população, indica a alta variabilidade genética entre os genitores (Tabela 1). O alto valor do número médio de cistos encontrado no genitor resistente S5995 evidencia que nesta população estão segregando genes que conferem resistência moderada à raça 14 do NCS. Segregação transgressiva foi observada nas duas populações para a redução do número de cistos (Tabela 1).

Embora tenha sido observada uma distribuição contínua dos valores médios de IP nas duas populações  $F_{2:3}$  (Figura 1), somente a avaliação para a raça 3 apresentou distribuição normal, pelo teste de Lilliefors com probabilidade de 1% (Tabela 1). No entanto, os dados originais foram utilizados para a análise de mapeamento de QTLs também para a raça 14, o que é um procedimento relativamente comum no caso de avaliação de QTLs para resistência ao NCS (Cervigni et al., 2004; Schuster et al., 2001; Guo et al., 2005). A distribuição normal dos dados para a raça 3 pode ser indicativo que mais genes estão segregando para condicionar resistência à raça 3 quando comparada à raça 14.

Sabe-se que poucos genes de efeito maior conferem ampla resistência a várias raças do patógeno (Guo et al., 2005; Cervigni et al., 2004). Neste estudo uma evidência de poucos genes de resistência segregando nas populações foi a constatação de herdabilidades no sentido amplo moderadamente altas para as duas raças (Tabela 1). Apesar da herdabilidade de um caráter ser dependente do método de estimação utilizado (Falconer e Mackay, 1996), os resultados de herdabilidade encontrados no presente trabalho estão de acordo com os da literatura (Hancock, 1987; Yue et al., 2001).

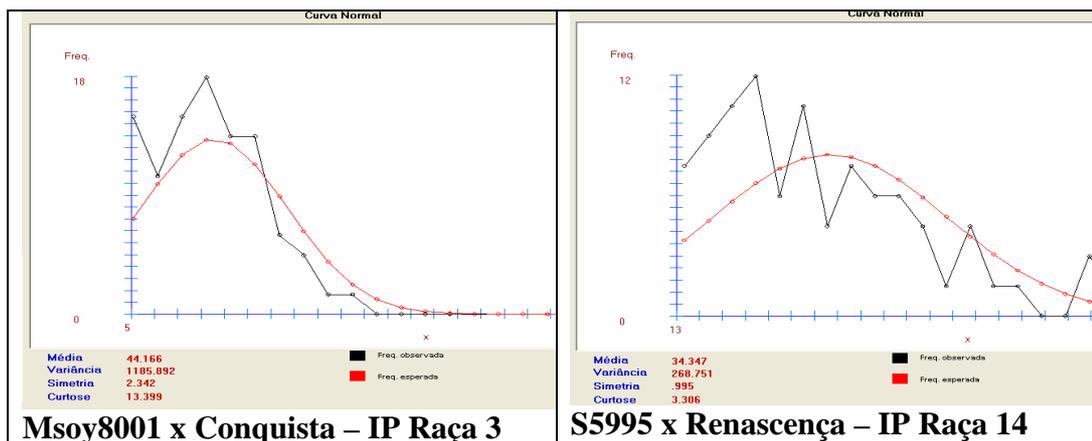


Figura 1. Distribuição dos valores médios dos IPs obtidos de duas populações segregantes de famílias  $F_{2:3}$ , uma avaliada para resistência a raça 3 e outra para a raça 14 do NCS.

Tabela 1. Índice de parasitismo do nematóide de cisto da soja, médias e amplitude dos genitores e famílias  $F_{2:3}$ , herdabilidades no sentido restrito e variâncias fenotípica e genotípica das populações.

População/Raça	Msoy8001 x Conquista / Raça 3	S5995 x Renascença/Raça 14
<b>Médias</b>		
<i>Genitor Resistente</i>	1,9	76,37
<i>Genitor Suscetível</i>	165,67	284,87
<i>População <math>F_{2:3}</math></i>	69,49	98,68
<i>Mínimo -Máximo</i>	0,5 - 179	35,63-224
<b>Estimativas</b>		
QMG	9419,91	9881,80
QME	3365,19	2106,13
Valor F	2,80**	4,69**
CV%	81,43	47,28
$\hat{S}_g^2$	1134,88	1675,69
$\hat{S}_f^2$	1765,64	2129,58
$\hat{S}_e^2$	630,76	453,88
$h_f^2$	64,27	78,68
CVg	47,29	42,17
CVg/CVe	0,580	0,89
NMR	5,35	4,64
Número de Famílias	65	66

QMG, Quadrado médio de genótipos; QME, do erro; NMR – número médio de repetições;  $\hat{S}_g^2$ , estimativa da variância genética;  $\hat{S}_f^2$ , fenotípica;  $\hat{S}_e^2$ , ambiental média;  $h_f^2$ (%), herdabilidade no sentido amplo; CVe, coeficientes de variação experimental; CVg, genético; \*\* F significativo a 1% de probabilidade.

Na população Msoy8001 x Conquista, avaliada para a resistência a raça 3, 23 famílias foram classificadas como moderadamente resistentes (IP menor ou igual a 30) e 42 famílias como suscetíveis (S), que pelo teste do qui-quadrado ( $\chi^2$  calculado = 3,73; Probabilidade de 5,31) se ajustou a segregação 1R:3S. O resultado sugere a presença de um gene recessivo condicionando a resistência moderada à raça 3. Para a população S5995 x Renascença, avaliada para a raça 14, 32 famílias foram classificadas como moderadamente resistentes e 34 como suscetíveis, que pelo teste do qui-quadrado se ajustou a uma segregação de 7R:9S ( $\chi^2$  calculado = 0,612; Probabilidade de 43,81), indicando que dois genes epistáticos recessivos conferem resistência moderada a raça 14. Estes resultados confirmam poucos genes de efeito maior segregando para a resistência as raças 3 e 14 nas duas populações estudadas.

#### *Dados genotípicos*

Na população avaliada para a resistência à raça 3, 23 *primers* polimórficos nos genitores, distribuídos nos GL A2, D2 e G, foram amplificados na população. Destes, sete apresentaram distorção de segregação, porém foram mantidos na avaliação. Marcadores dos GL A2 e G apresentaram associação com a resistência, pela análise de marca simples, sendo os do GL G os de maior significância (Tabela 2). Os marcadores do GL D2 não apresentaram associação com a resistência. Pelo método do intervalo composto foi mapeado um QTL, de efeito aditivo, explicando 33% da variação fenotípica, no intervalo Satt187 e GEMENOD2B (GL A2) e outros dois mapeados no GL G, explicando 31% e 25%, o primeiro de efeito de sobredominância e o segundo com efeito aditivo, nos intervalos Satt275 - Satt570 e Satt309 - Sat\_168, respectivamente (Tabela 3). As posições dos respectivos QTLs podem ser observadas na Figura 2.

Para a população S5995 x Renascença, avaliada para a raça 14, nove microssatélites polimórficos nos genitores foram amplificados na população e destes somente os do GL G foram significativamente associados com a resistência (Tabela 2). Um QTL de efeito maior ( $R^2$  de 58,4%), no intervalo entre os marcadores Satt309 e Sat\_168 (Tabela 3), foi detectado pelo método do intervalo simples. Em função da sua localização e efeito, esta região corresponde ao loco *rhg1* (Cregan et al., 1999). Não foi confirmado o QTL associado à raça 14, reportado por Schuster et al. (2001)

no GL D2, porém não foram identificados marcadores polimórficos, na região estudada por estes autores, nesta população.

Tabela 2. Avaliação da associação dos microssatélites com a resistência às raças 3 e 14 do nematóide de cisto da soja, utilizando o método da marca simples.

Raça	Marca	GL	Anova		Média	
			Prob(F)	Homoz(S)	Heter	Homoz(R)
Raça 3	Satt187	A2	0,014*	84,68	72,23	41,91
	Gmenod2B	A2	0,00**	101,23	71,49	43,83
	Rhg4	A2	0,014*	-	81,02	54,92
	Satt177 d <sup>1</sup>	A2	ns	70,50	72,90	52,81
	Satt424	A2	ns	59,54	75,48	74,78
	Satt163	G	0,004**	92,19	70,34	47,48
	Satt309	G	0,0**	102,21	71,59	36,78
	Satt610	G	0,0**	96,05	72,87	32,33
	Sat_168	G	0,001**	101,94	71,06	29,36
	Satt130	G	0,005**	89,64	70,52	40,16
	Satt570 d	G	0,00***	80,44	89,61	37,34
	Satt275 d	G	0,24*	85,65	74,07	48,16
	Satt356	G	0,014*	91,73	80,21	50,97
	Satt082 d	D2	ns	52,85	77,60	71,03
	Satt226	D2	ns	78,01	76,96	86,90
	Satt301	D2	ns	67,19	74,19	63,11
	Satt311	D2	ns	66,95	65,77	70,86
	Satt514	D2	ns	73,19	73,42	68,03
	Satt574	D2	ns	66,82	70,12	71,88
	Raça 14	Satt341 d	D2	ns	89,51	63,37
Sat_114 d		D2	ns	78,01	76,96	86,90
Satt543		D2	ns	74,02	64,31	71,19
Satt177		A2	ns	103,07	100,26	97,01
Satt389		D2	ns	93,43	98,43	110,11
Satt309		G	0,00**	151,75	93,04	61,42
Sat_168		G	0,00**	132,56	92,69	61,74
Sat_141		G	0,00**	142,70	96,96	64,01
Satt570		G	0,00**	121,44	101,57	66,44
Satt356 d		G	0,00**	139,54	109,51	71,35
Satt217	G	0,003**	124,86	100,48	73,22	

\* e \*\* F significativo a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente; <sup>1</sup> = marcadores que apresentaram distorção de segregação; Homoz(S) = homozigoto suscetível; Heter=heterozigoto; Homoz(R)=homozigoto resistente.

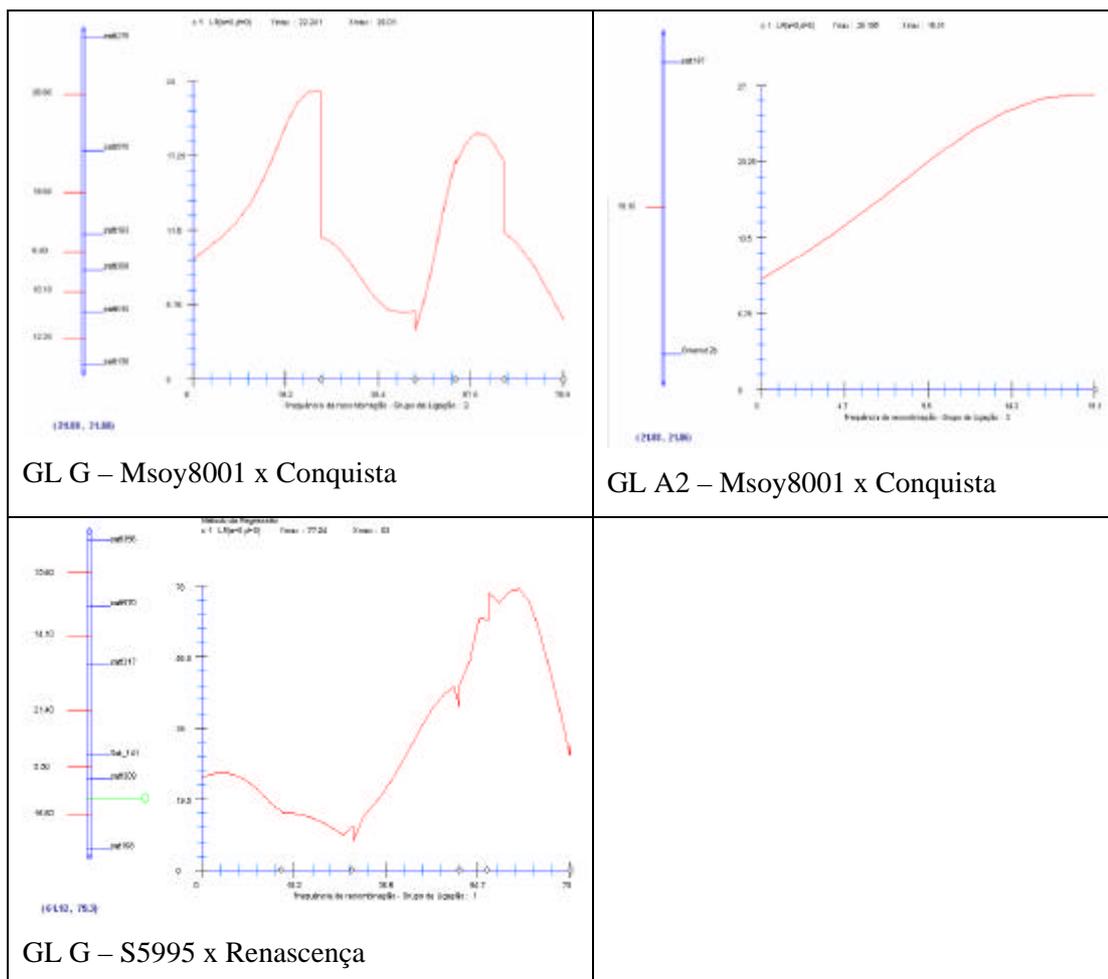


Figura 2. QTLs detectados para a resistência as raças 3 e 14 nos GL A2 e G, em duas populações independentes.

Tabela 3. Proporção da variância fenotípica da resistência explicada ( $R^2\%$ ), componentes aditivos e de dominância e grau médio de dominância (d/a), da resistência para as raças 3 e 14, calculado em duas populações de  $F_{2:3}$ .

Caráter	GL <sup>1</sup>	Intervalo	Posição	LR	$R^2\%$	a	d	d/a
Raça 3	A2	Satt187 - GM2B	0,1801	26,19	33,9	-30,75	-1,23	0,04
	G	Satt275 - Satt570	0,2601	22,24	31,2	-20,74	31,61	-1,5
	G	Satt309 - Sat_168	0,0401	18,96	25,9	-37,78	5,00	-0,13
Raça 14	G	Satt309 - Sat_168	0,0501	77,34	58,4	-50,34	-22,93	0,45

<sup>1</sup> – Grupo de ligação denominado de acordo com Song et al., 2004.

A eficiência de seleção obtida com apenas um marcador, foi maior na população avaliada para a raça 14 que na população avaliada para a raça 3 (Tabela 4). Este resultado era esperado devido ao maior número de marcadores ter sido associado à resistência a raça 3, e à menor herdabilidade da característica, aumentando a chance de erro pela seleção assistida por marcadores.

Tabela 4. Eficiência da seleção assistida (ES%) com microsatélites para a resistência ao nematóide de cisto da soja, raças 3 e 14, em duas populações de famílias  $F_{2:3}$ , e comparação entre a seleção assistida por marcadores (SAM) e seleção fenotípica (FEN), utilizando a média e o diferencial de seleção (DS%)

RAÇA	Marcador	NFS <sup>1</sup>	Média das famílias <sup>2</sup>		ES (%)	DS%	
		pela SAM	SAM	FEN		SAM	FEN
3	Satt187	14	41,91	14,81	76	-39,68	-78,67
	GMENOD2B	20	43,83	22,31	65	-36,91	-67,88
	Satt163	21	47,48	23,35	68	-31,66	-66,40
	Satt309	18	36,78	20,00	79	-47,06	-71,21
	Satt610	15	32,32	16,09	73	-53,47	-76,83
	Sat_168	20	47,77	22,32	70	-31,24	-67,88
	Satt130	16	40,15	17,23	61	-42,21	-75,19
	Satt356	16	50,96	17,23	62	-26,65	-75,19
	Satt570	22	37,34	24,32	57	-46,25	-64,99
	GMENOD2B+Satt309	7	8,02	5,21	100	-88,44	-92,49
	GMENOD2B+Satt187	11	38,38	11,01	75	-44,75	-84,15
	GMENOD2B+Satt610	5	10,04	2,83	90	-85,55	-95,92
	Satt309 + Satt187	6	6,38	2,26	100	-84,77	-94,60
	Satt309 + Sat_168	14	40,28	14,81	78	-42,02	-78,67
Satt309 + Satt610	14	30,66	14,81	63	-55,87	-78,67	
14	Satt309	17	61,41	51,82	94	-37,75	-47,48
	Satt570	19	66,44	53,19	82	-32,67	-46,09
	Satt356	26	71,35	57,83	81	-27,68	-41,39
	Sat_168	13	61,74	49,11	93	-37,42	-50,22
	Satt217	17	73,22	51,82	80	-26,40	-49,53
	Satt309 + Satt570	11	56,95	47,91	95	-42,28	-51,45
	Satt309 + Satt217	11	61,15	47,91	95	-38,03	-51,45
	Satt309 + Sat_168	12	60,67	48,56	100	-38,51	-50,78
	Satt309 + Satt356	12	56,28	48,56	100	-42,39	-50,78

<sup>1</sup> – NFS = número de famílias selecionadas; <sup>2</sup> – A média de 49,7 corresponde ao IP de 30% para as raça 3 e 14.

A seleção assistida com o microsatélite Satt309 mostrou-se mais eficiente que os demais, atingindo uma eficiência de 79% para a resistência a raça 3 e de 94%

para a raça 14 (Tabela 4), confirmando sua localização próxima a região do gene *rhg1*. Esta região já é extensivamente estudada por explicar ampla variação fenotípica da resistência ao NCS (Concibido et al., 2004). Outra evidência que é a região do *rhg1* é que não foi detectado efeito de dominância nos intervalos investigados com este marcador nas duas populações.

As combinações de microssatélites aumentaram a eficiência da seleção assistida para as duas raças. No caso da raça 3, as combinações dos marcadores de diferentes GL, GMENOD2B+Satt309 e Satt309+Satt187, apresentaram 100% de eficiência de seleção, ou seja, todas as famílias selecionadas com os dois marcadores foram resistentes pela avaliação fenotípica. Entretanto, as combinações de marcadores do mesmo grupo não aumentaram a eficiência de seleção. Cregan et al. (1999) relataram que o marcador Satt309, que apresentou maior eficiência de seleção neste estudo, está a 0,4 cM do gene *rhg1*. Portanto a sua utilização já garante alto sucesso na seleção assistida, sendo que a utilização conjunta de outro marcador deve ser avaliada quanto a sua localização no genoma da soja para evitar redução da eficiência de seleção (Tabela 4). Para a raça 14, a combinação dos SSR Satt309+Satt356, do mesmo GL, apresentou eficiência de seleção de 100%.

Comparando a seleção fenotípica e a seleção assistida, considerando o mesmo número de famílias selecionadas pelas duas estratégias e com base nas médias das famílias selecionadas observou-se que a melhor combinação de marcadores moleculares para a resistência à raça 3 foi utilização de marcadores de GL diferentes. Os SSR Satt309 e GMENOD2B juntos, proporcionaram um diferencial de seleção de -88,4%, enquanto que o diferencial de seleção fenotípico foi de -92,5%. Para a raça 14, a combinação do Satt309 e Satt356 proporcionou um diferencial de seleção de -42,4%, enquanto que na seleção fenotípica o diferencial por seleção foi de -50%. Estes resultados são indicativos de que com a estratégia de seleção assistida podem-se obter ganhos similares aos ganhos obtidos pela seleção fenotípica. No entanto, a seleção fenotípica é influenciada pelo ambiente e o número de plantas que podem ser selecionadas em casa de vegetação é limitado, enquanto que a seleção assistida por marcadores moleculares não possui estas limitações.

Neste trabalho, QTLs previamente associados à resistência às raças 3 e 14 do NCS, foram confirmados em populações de melhoramento, revelando-se úteis para o uso na seleção assistida, com alta eficiência em detectar os genótipos resistentes na população. Recentemente, alguns estudos de validação tem sido reportados em soja

para QTLs que condicionam resistência a diferentes raças do NCS (Glover et al., 2004), teor de óleo e proteína e rendimento (Fasoula et al., 2004). Também para outras características importantes em outras culturas como trigo (Singh-Harjit et al., 2001) e cevada (Williams et al., 2001).

O QTL de efeito maior para a resistência a raça 14, reportado por Schuster et al. (2001), no GL D2, não foi confirmado neste estudo, porém também não foi detectado polimorfismo na região de interesse. Este fato caracteriza um outro contratempo para aplicação da seleção assistida no melhoramento, pois mesmo quando um único gene controla um caráter não há garantia que os marcadores identificados em uma população sejam úteis em diferentes populações, especialmente quando estas são originadas de germoplasma divergentes (Yu et al., 2000). Para os marcadores serem mais úteis em programas de melhoramento, eles devem ser polimórficos em diferentes populações derivadas de parentais com ampla variabilidade (Langridge et al., 2001).

Segundo Alzete-Marin et al. (2005), a fase de desenvolvimento e validação de marcadores necessita de incentivo por parte dos órgãos de financiamento para estimular a formação de redes entre diversos grupos de pesquisa que possam colaborar entre si e, dessa maneira, acelerar o processo de criação de novos cultivares de interesse com o auxílio dos marcadores. Assim, o uso da SAM no melhoramento de plantas cria uma oportunidade de estimular a interação entre instituições públicas e privadas, pois o desenvolvimento e a validação de marcadores específicos requerem um esforço concentrado, e os resultados obtidos podem ser utilizados entre diferentes programas de melhoramento.

Os marcadores microssatélites validados neste trabalho poderão ser usados na SAM dos QTLs de resistência às raças 3 e 14 do NCS. Esta metodologia será de grande utilidade, como alternativa aos procedimentos convencionais de avaliação, na seleção de genótipos resistentes ao NCS durante a introgressão destes QTLs de resistência ao NCS em cultivares elite em programas de melhoramento de soja.

#### 4. BIBLIOGRAFIA

BEAVIS, W.D.; GRANT, D.; ALBERTSEN, M.; FINCHER, R. Quantitative trait loci for plant height in four maize populations and their associations with qualitative genetic loci. **Theoretical Applied Genetics**, v.83, p. 141-145, 1991.

CERVIGNI, G.D.L.; SCHUSTER, I.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Two microsatellite markers flanking a dominant gene for resistance to soybean cyst nematode race 3. **Euphytica**, v. 135, p. 99-105, 2004.

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

COLLARD, B.C.Y.; JAHUFER, M.Z.Z.; BROUWER, J.B.; PANG, E.C.K. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. **Euphytica**, v.142, p.169-196, 2005.

CONCIBIDO, V.C.; DIERS, B.W.; ARELLI, P.R. A decade of QTL mapping for cyst nematode resistance in soybean. **Crop Science**, v.44, p.1121-1131, 2004.

CONCIBIDO, V.C.; DOUGLAS, L.; DENNY, R.L.; ORF, J.H.; YOUNG, N.D. Genome mapping of soybean cyst nematode resistance genes in Peking, PI 90763, and PI 88788 using DNA markers. **Crop Science**, v.37, n.1, p.258-264, 1997.

CONCIBIDO, V.C.; YOUNG, N.D.; LANGE, D.A.; DENNY, R.L.; DANESH, D.; ORF, J.H. Targeted comparative genome analysis and qualitative mapping of a major partial-resistance gene to the soybean cyst nematode. **Theoretical Applied Genetics**, v.93, p.234-241, 1996.

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

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2<sup>a</sup> ed. Viçosa: UFV. 390p. 1997.

CRUZ, C.D. **Programa Genes: aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: UFV. 442p., 1997.

FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. **Introduction to quantitative genetics**. 4<sup>a</sup>ed. Longman Malaysia. Edinburgh, 464p. 1996.

FASOULA, V.A.; HARRIS, D.K.; BOERMA, R.H. Validation and designation of quantitative trait loci for seed protein, seed oil and seed weight from two soybean populations. **Crop Science**, v.44, p.1218 -1225, 2004.

FRANCIA, E.; TACCONI, G.; CROSSATI, C.; BARABASCHI, D.; BULGARELLI, D. DALL'AGLIO, E.; VALÈ, G. Marker assisted selection in crop plants. **Plant Cell**, v.82, p. 317-342, 2005.

GLOVER, K.D.; WANG, D.; ARELLI, P.R.; CARLSON, S.R.; CIANZIO, S.R.; DIERS, B.W. Near isogenic lines confirm a soybean cyst nematode resistance gene from PI 88788on linkage group J. **Crop Science**, v. 44, p.936-941. 2004.

GQMOL. Viçosa: 12.12.2005. (<http://www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm>).

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

HANCOCK, J.A.; HANCOCK, F.G.; CAVINESS, C.E.; RIGGS, R.D. Genetics of resistance in soybean to race X of soybean cyst nematode. **Crop Science**, v.27, n.1, p.704-707, 1987.

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

KOSAMBI, D.D. The estimation of map distances from recombination values. **Annals of Eugenics**. v.12, p.173-175, 1944.

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

LANDER, E.S.; KRUGLYAK, L. Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. **Nature Genetics**, v.11. p. 241-247. 1995.

LANGRIDGE, P.; LAGUDAH, E.; HOLTON, T.; APPELS, R.; SHARP, P.; CHALMERS, K. Trends in genetic and genome analyses in wheat: a review. **Aust J Agric Res.**, v.52, p. 1043-1077, 2001.

ALZETE-MARIN, A.L.; CERVIGNI, G.L.D.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas

resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia brasileira**, v.30, p. 333- 342, 2005.

MELCHINGER, A.E.; UTZ, H.F.; SCHON, C.C. Quantitative trait locus (QTL) mapping using different testes and independent population samples in maize reveals low power of QTL detection and large bias in estimates of QTL effects. **Genetics**, v.149, p.383-403, 1998.

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

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

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

SING-HARJIT; PRASAD, M.; VARSHNEY, R.K.; ROY, J.K.; BALYAN, H.S.; DHALIWAL, H.S.; GUPTA, P.K. STMS markers for grain protein content and their validation using near-isogenic lines in bread wheat. **Plant Breeding**, v.120, p. 273-278, 2001.

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

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

WEISEMANN, J.M.; MATTHEWS, B.S.; DEVINE, T.E. Molecular markers located to the soybean cyst nematode resistance gene, *Rhg4*. **Theoretical Applied Genetics**, v.85, n.1, p.36-138, 1992.

WILLIAMS, K.; BOGACKI, P.; SCOTT, L. KARAKOUSIS, A.; WALLWORK, H. Mapping of a gene for leaf scald resistance in barley line ‘ B87/14’ and validation of microsatellite and RFLP markers for marker-assisted selection. **Plant Breeding**, v. 120, p. 301-304, 2001.

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

YU, K.; PARK, S.; POYSA, V. Marker – assisted selection of commom beans for resistance to commom bacterial blight: Efficacy and economics. **Plant Breeding**, v.119, p.411-415, 2000.

YUE, P.; SLEPER, D.A.; RAO-ARELLI, A.P. Genetic analysis of resistance to soybean cyst nematode in PI 438489B. **Euphytica**, v.116, p.118 -186, 2000.

ZHENG, Z.B. Precision mapping of quantitative trait loci. **Genetics**, v.136, n.9, p.1457-1468, 1994.

## CAPÍTULO 4

### MAPEAMENTO DE QTLs PARA CARACTERES AGRONÔMICOS EM SOJA USANDO LINHAGENS ENDOGÂMICAS RECOMBINANTES

#### RESUMO

Este trabalho teve como objetivo mapear QTLs (*Quantitative Trait Loci*) para diferentes características de interesse agrônomo em soja, utilizando marcadores microssatélites em uma população de linhagens endogâmicas recombinantes (*Recombinant Inbred Lines* – RIL). A população de mapeamento foi obtida pelo método do descendente de uma única semente (*Single Seed Descent* - SSD), a partir do cruzamento entre a cultivar Hartwig e a linhagem Y23. Verificou-se considerável variabilidade genética na população para todas as características avaliadas, nos anos de 2001 e de 2002. Altas herdabilidades no sentido restrito foram estimadas para todas as características. A genotipagem da população foi realizada com 154 marcadores microssatélites e um mapa genético com 22 grupos de ligação foi obtido. Por regressão linear simples verificou-se associação marca-característica com 29 marcadores, nas características avaliadas em 2001, com exceção de produção (PRO). Para as mesmas características avaliadas em 2002, foram detectadas 36 associações marca-característica significativas. Pelo método de intervalo composto, foram mapeados, em 2001, cinco QTLs no GL D1a (características: dias para o florescimento -R1; altura da planta no florescimento - APF; altura da primeira vagem - APV; número de vagem por planta - NVP; e número de semente por planta - NSP), quatro QTLs no GL N (características: APF; R1; dias para maturação - R8; e NNM) e dois QTLs no GL F (NNM e NSP). Para as avaliações de 2002, foram mapeados QTLs nos GL A2 (NNM), C2 (APV, NVP), D1a (R1), N (R8), F (NNM), K (R8, APF e APV), H e J (ambos para NSP). Para produção -PRO, avaliada somente em 2001, foram mapeados QTLs nos GL E, G, O e K. QTLs consistentes entre anos foram mapeados para R1 (GL D1a), R8 (GL N) e NNM (GL F). O intervalo Satt147-Satt408, no experimento de 2001, apresentou QTLs para seis características. Entre os marcadores Sat\_033-Satt237 (GL N), também foi detectada significância em quatro das 10 características avaliadas em 2001, sugerindo efeito pleiotrópico destas regiões para as diferentes características.

## 1. INTRODUÇÃO

Em soja [*Glycine max* (L.) Merrill], a base genética para o rendimento ainda não é bem entendida. Porém sabe-se que a característica é influenciada por diversas outras como: maturidade e hábito de crescimento (Mansur et al., 1996; Orf et al., 1999; Specht et al., 1999), resistência a doença (Ntiji et al., 1998), peso de semente (Mian et al., 1996) e altura de plantas. Estas características têm sido utilizadas em programas de melhoramento, visando a seleção fenotípica indireta para o rendimento de grãos e estabilidade (Yuan et al., 2002).

Com a utilização de marcadores moleculares de DNA, muitos QTLs (*Quantitative Trait Loci*), têm sido identificados para a soja, para características agronômicas, resistência a doenças, reprodução e morfologia, conteúdo de óleo e de proteína, altura de planta e rendimento (Keim et al., 1990; Diers et al., 1992; Lark et al., 1995; Lee et al., 1996; Orf et al., 1999; Mansur et al., 1996; Specht et al., 2001; Zhang et al., 2004; Tasma et al., 2001; Concibido et al., 2004; Fasoula et al., 2004; Wang et al., 2004). Entretanto, existem muitas inconsistências nos resultados e poucos estudos de confirmação (Fasoula et al., 2004). Fatores de confundimento como a estrutura e o tamanho da população, os genitores e os diferentes ambientes são indicados como causas de discrepâncias nos resultados em estudos de QTLs (Beavis, 1994). Portanto, é necessário que sejam feitas réplicas dos experimentos em campo para detectar acuradamente os efeitos dos QTLs e verificar sua estabilidade nos diferentes ambientes. Embora efeitos significativos possam ser detectados em vários ambientes, variações na expressão do QTL pelas interações QTL x Ambiente são uma grande limitação à detecção de QTLs consistentes em vários ambientes (Fasoula, 2004).

Dentre os marcadores utilizados para a soja destacam-se os microssatélites, mais de 1000 já foram desenvolvidos, o que possibilitou a construção de mapas genéticos saturados cobrindo todo o genoma da espécie (Cregan et al., 1999, Song et al., 2004). Microssatélites são conservados dentro de uma dada espécie, podendo ser utilizados como ancoras nos mapas de ligação para localizar regiões de interesse em diferentes *backgrounds* genéticos (Schuster et al., 2001).

Em relação aos tipos de populações utilizados nos estudos de mapeamento de QTLs, as populações de linhagens endogâmicas recombinantes (*Recombinant Inbred Lines* – RIL) tem sido usadas por serem populações permanentes, pois podem ser avaliadas ao longo do espaço e do tempo, reduzindo o erro experimental e possibilitando a detecção de pequenas diferenças genéticas (Burr e Burr, 1991; Ferreira et al., 2006). Diversos trabalhos em soja relatam a utilização de RILs para a detecção de QTLs para características agronômicas (Zhang et al., 2004; Yuan et al., 2002), reprodutivas, morfológicas e qualidade de sementes (Mansur, 1993; Mansur, 1996; Orf, 1999; Soares, 2000; Oliveira, 2002).

Neste trabalho foi utilizada uma população de RILs de soja derivada do cruzamento de Hartwig e Y23, para avaliar a presença de QTLs ligados à importantes componentes de produção da soja, avaliados em dois anos consecutivos, 2001 e 2002.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### *Material Genético*

A população de RILs foi obtida do cruzamento entre Hartwig (cultivar norte-americano) x Y23 (linhagem brasileira). Nas 134 RILs (geração F<sub>6:7</sub>) foram avaliadas 10 características agronômicas no ano de 2001. Em 2002 foram avaliadas 143 RILs (geração F<sub>6:8</sub>) para 9 características agronômicas. As RILs foram obtidas a partir de plantas F<sub>2</sub> derivadas de 5 plantas F<sub>1</sub> e foram conduzidas pelo método do descendente de uma única semente (*Single Seed Descent* - SSD), em casa de vegetação, conforme sugerido por Brim (1966), sem ter sido praticado seleção durante o processo de obtenção.

### *Avaliações fenotípicas*

Os experimentos foram conduzidos no Campo Experimental *Prof. Diogo Alves de Mello*, no campus da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. No experimento de 2001 o modelo experimental adotado foi o de famílias com testemunhas intercaladas, devido ao limitado número de sementes, o que dificultou a utilização de delineamentos estatísticos com repetição, com o tamanho de parcela usualmente empregado. O esquema experimental foi o seguinte: as 134 RILs foram dispostas em quatro grupos, iniciando e acabando cada um deles com as testemunhas Hartwig, Y23 e CAC-1. Estas três testemunhas foram repetidas a cada 14 RILs.

No experimento de 2002 o modelo experimental adotado foi o de delineamento inteiramente ao acaso com três repetições para cada RIL.

As características mensuradas foram:

- 1) R1, número de dias para florescimento, contados a partir da emergência até que 50% das plantas da fileira tivessem floridos;
- 2) R8, número de dias para maturação, contados a partir da emergência até que 95% das vagens atingissem a coloração típica de maturação;
- 3) APF, altura da planta no florescimento, expressa em centímetros, do nível do solo até o último nó da haste principal, por ocasião da abertura da primeira flor;
- 4) NNF, número de nós no florescimento, contados na haste principal após o nó cotiledonar, por ocasião da abertura da primeira flor;
- 5) APM, altura da planta na maturação, em centímetros, do nível do solo até o último nó da haste principal, no estágio R8;
- 6) APV, altura da primeira vagem, em centímetros.
- 7) NNM, número de nós na maturação contados na haste principal a partir do nó cotiledonar, no estágio R8.
- 8) NVP, número total de vagens com sementes formadas.
- 9) NSP, número total de sementes produzidas por planta;
- 10) PRO, produção de grãos, peso médio das sementes das plantas, em gramas por planta, avaliada somente em 2001;

Foram realizadas as seguintes análises estatísticas para os dados fenotípicos: teste de normalidade dos dados; estudo de correlação genotípica entre as características; correção dos dados do experimento do ano de 2001 e análise de variância para cada tipo de delineamento, realizadas conforme descrito por Cruz e Regazzi (1997). As análises dos resultados do experimento de 2001 foram realizadas por Cervigni (2003). Para todas as análises biométricas foi utilizado o programa GENES (Cruz, 1997).

#### *Extração do DNA e amplificação de marcadores microssatélites*

A extração de DNA de folhas de soja foi feita com base no protocolo descrito por Keim (1988), com algumas modificações. Entre 200 a 300 mg de folhas foram trituradas na presença de N<sub>2</sub> líquido, sendo o pó resultante transferido para microtubos. Após a adição de 650-800 µL de tampão de extração (Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; EDTA 20 mM; NaCl 1,4 M; CTAB 2% (p/v); PVP 2% (p/v); e β-

mercaptoetanol 0,2% (v/v), sendo este último separado dos demais componentes), as amostras foram incubadas em banho-maria a 65°C, durante 20 a 40 minutos. Posteriormente a incubação, as proteínas foram removidas com igual volume de clorofórmio : álcool - isoamílico (24:1) e centrifugação a 14.000 rpm. Os ácidos nucléicos foram precipitados pela adição de isopropanol gelado (na proporção de 1:1, isopropanol: sobrenadante) e lavagem em etanol gelado a 70% e a 95%. Depois foram secos à temperatura ambiente e ressuspensos em TE, pH 8,0 (Tris-HCl 10 mM e EDTA 1mM). A eliminação do RNA foi realizada adicionando RNAase A, na concentração final de 40 µg/mL a 37°C, por 30 minutos. O DNA foi novamente precipitado, mediante a adição de NaCl, 5M, na proporção de 1:10 (NaCl: DNA ressuspenso) e após a adição de 2/3 do volume de isopropanol gelado e depois de três horas incubado a -20°C. Para a ressuspensão o DNA foi centrifugado por 10 minutos a 14.000 rpm lavado com etanol gelado a 70% e a 95%, seco ao ambiente, e posteriormente adicionado 200-300 µL de TE. A concentração do DNA foi estimada por espectrofotometria por leitura da absorbância a 260 nm, sendo cada unidade de absorbância correspondente a 50 µg/mL de DNA fita dupla.

Cento e cinquenta e quatro primers polimórficos nos genitores foram amplificados nos bulks de DNA de cada RIL da população. As amplificações foram realizadas em 15 µL, contendo Tris-HCl 10 mM, pH 8,3; KCl 50 mM; MgCl<sub>2</sub> 2,4 mM; 100µM de cada um dos desoxinucleotídios (dATP, dTTP, dCTP, dGTP); e 0,6 µM de cada iniciadores, uma unidade de Taq polimerase e 30 ng de DNA. As reações de amplificação ocorreram em um termociclador Perkin Elmer<sup>®</sup> modelo 9600 programado para 30 ciclos de um minuto a 94°C, um minuto a 50°C e 2 minutos a 72°C, seguidos de uma etapa de sete minutos a 72°C.

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 3% ou em géis nativos verticais de poliacrilamida 10%, usando-se tampão TAE 1X (Tris-acetato 0,09 M e EDTA 0,002 M). Os géis foram corados com brometo de etídio (10 mg/mL) e fotografados pelo sistema de fotodocumentação Eagle Eye II (Stratagene).

#### *Análise de ligação e associação marcadores-QTLs*

O mapa de ligação foi construído utilizando os critérios para estabelecer as distâncias genéticas entre os marcadores de LOD *score* mínimo de 2,5 e porcentagem de recombinação máxima de 30%, utilizando a função de mapeamento de Kosambi

(1944). A segregação individual dos marcadores foi testada usando o teste do qui-quadrado. A associação marcador - característica foi avaliada por análise de regressão simples, como análise preliminar de QTLs associados a cada característica. A localização e caracterização do efeito do QTL foi estabelecido pelo método do intervalo composto (Zheng, 1994; Jansen, 1993). As estimativas dos valores aditivos, do coeficiente de determinação do QTL, correspondente ao pico de maior significância estatística do QTL, e da posição do QTL foram declarados quando os valores da razão da máxima verossimilhança (*Likelihood Ratio* – LR) excederam os valores críticos de corte ( $\alpha = 0,05$ ) em cada grupo de ligação. Os valores de LR críticos foram determinados pela realização de 1000 permutações (Churchill e DeGeorge, 1994). Todas as análises foram feitas pelo programa GQMOL (2005).

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### Dados fenotípicos

Cervigni (2003) realizou as análises estatísticas do experimento de campo de 2001 e reportou o potencial em variabilidade genética desta população para as características agronômicas avaliadas, viabilizando o estudo de mapeamento de QTL. Portanto, os resultados da análise estatística do experimento de 2001 serão aqui somente representados e discutidos.

A análise descritiva dos resultados das avaliações fenotípicas, comparando os genitores e a população nos dois anos (Tabela 1), mostra que, todas as características avaliadas, apresentaram contrastes entre as médias dos genitores. A variabilidade genética da população foi confirmada pelos resultados das análises de variância de cada característica, nos dois anos, e das estimativas dos diferentes parâmetros genéticos (Tabela 2). Pelo teste F, todas as características apresentaram variabilidade genética significativa a 1% de probabilidade. Estes resultados sugerem que esta é uma boa população para se fazer estudos de mapeamento de QTLs.

Segregação transgressiva foi observada com grande frequência nas características, especialmente para PRO, NSP e NVP. Este tipo de segregação é de grande interesse para o melhoramento, pois viabiliza a seleção de genótipos com maior acúmulo de alelos favoráveis em relação aos pais (Tabela 1).

Tabela 1. Análise descritiva das características da população de RILs e dos genitores, nos experimentos dos anos de 2001 e 2002.

<b>2001</b>						
Caráter	Unidade	População			Média dos Genitores	
		Média	DP <sup>a</sup>	Min - Máx <sup>b</sup>	Hartwig	Y23
<b>R1</b>	dias	41,19	8,72	28,07 - 56,69	30,57	60,67
<b>R8</b>	dias	116,20	17,61	87,87 - 144,80	94,35	144,00
<b>NNF</b>	-	10,06	2,41	5-31 - 10,31	8,51	13,29
<b>NNM</b>	-	13,57	3,25	7,04 - 26,42	8,49	17,67
<b>APF</b>	cm	41,19	13,75	15,93 - 77,82	23,36	64,64
<b>APM</b>	cm	57,18	21,26	11,76 - 60,61	23,13	76,53
<b>APV</b>	cm	11,04	4,20	2,95 - 26,09	6,84	13,77
<b>NVP</b>	-	71,27	33,66	18,66 - 151,92	33,42	85,77
<b>NSP</b>	-	157,20	73,22	50,66 - 351,24	75,42	187,08
<b>PRO</b>	g	23,51	10,46	6,97 - 50,66	11,27	24,90
<b>2002</b>						
<b>R1</b>	dias	51,25	10,80	31 - 65,66	30,67	61,00
<b>R8</b>	dias	120,39	11,13	102,67 - 142	104,00	141,00
<b>NNF</b>	dias	13,67	2,72	7,39 - 18,88	8,33	18,05
<b>NNM</b>	-	15,50	4,43	9,78 - 37,44	11,00	18,22
<b>APF</b>	-	62,87	20,56	25,5 - 116,11	35,22	93,78
<b>APM</b>	cm	70,10	20,63	34,72 - 130,61	41,77	97,16
<b>APV</b>	cm	12,72	2,86	6,16 - 19,55	10,52	12,28
<b>NVP</b>	cm	61,90	21,20	21,94 - 116,7	34,66	70,00
<b>NSP</b>	-	128,08	42,32	52 - 253,17	66,61	127,44

DP<sup>a</sup> = desvio padrão da característica. Mín/Máx<sup>b</sup> = Valores mínimo e máximo de cada característica. R1 número de dias para florescimento; R8 número de dias para maturação; NNF número de nós no florescimento; NNM número de nós na maturação contados na haste principal; APF altura da planta no florescimento; APM, altura da planta na maturação; APV altura da primeira vagem; NVP número total de vagens com sementes formadas; NSP número total de sementes produzidas por planta; PRO produção em gramas.

Altas herdabilidades no sentido restrito, variando de 74,82% a 98,23% e de 63,95% a 96,27% foram obtidas para todas as características em 2001 e 2002, respectivamente, com exceção da característica número de nós na maturação (NNM), avaliada em 2002, que apresentou herdabilidade de 35,6% (Tabela 2). Os valores altos das estimativas de herdabilidades indicam que a eficiência da seleção fenotípica pode ser alta, uma vez que, segundo Falconer e Mackay (1996), a herdabilidade de um caráter métrico expressa a proporção da variância total que é atribuída à variação

genética, tendo importante função na predição de genótipos, pois expressa a confiança do valor fenotípico como um guia para o valor genético.

Tabela 2 - Quadrado médio de genótipos (QMG) e do erro (QME), estimativa da variância genotípica ( $\hat{\sigma}_g^2$ ), fenotípica ( $\hat{\sigma}_f^2$ ) e ambiental ( $\hat{\sigma}_e^2$ ), herdabilidade no sentido restrito ( $h_r^2$ ), coeficientes de variação experimental (CVe) e genético (CVg), e média ( $\bar{x}$ ) de cada caráter avaliado nas 134 e 142 RILs avaliadas em 2001 e 2002, respectivamente.

2001										
Estimativa	R1	R8	NNF	NNM	APF	APM	APV	NVP	NSP	PRO
QMG	75,1	309,3	5,8	10,5	190,5	468,6	17,3	1172,5	5515,3	112,3
QME	4,47	5,47	0,79	1,28	27,6	53,1	4,3	143,4	704,0	17,8
Valor F	16,7**	56,5**	7,3**	8,2**	6,9**	8,9**	3,9**	8,1**	7,8**	6,3**
$\hat{\sigma}_g^2$	70,6	303,9	5,0	9,2	162,9	415,5	12,9	1029,0	4811,2	84,5
$\hat{\sigma}_f^2$	75,1	309,3	5,8	10,5	190,5	468,6	17,3	1172,5	5515,3	112,3
$\hat{\sigma}_e^2$	4,5	5,4	0,8	1,3	27,6	53,1	4,3	143,4	704,0	17,8
$h_r^2(\%)$	94,0	98,2	86,3	87,8	85,5	88,6	74,8	87,7	87,2	84,1
CVe	5,0	2,0	8,7	3,75	12,7	12,7	19,3	17,6	16,7	18,9
CVg	20,3	15,0	22,1	22,4	31,0	35,5	32,6	44,5	43,7	40,8
2002										
QMG	347,6	363,1	22,4	57,7	1288,2	1297,4	24,3	1353,6	5346,6	-
QME	12,95	29,70	2,02	37,16	136,2	100,6	6,18	463,23	1927,3	-
Valor F	26,8**	12,2**	11,0*	1,5**	9,4**	12,9*	3,9**	2,9**	2,7**	-
$\hat{\sigma}_g^2$	111,6	111,1	6,8	6,8	383,9	398,9	6,1	296,8	1139,8	-
$\hat{\sigma}_f^2$	115,8	121,0	7,4	19,2	429,4	432,5	8,1	451,2	1782,2	-
$\hat{\sigma}_e^2$	4,3	9,9	0,6	12,4	45,4	33,5	2,0	154,4	642,4	-
$h_r^2(\%)$	96,2	91,8	90,9	35,6	89,4	92,2	74,6	65,7	63,9	-
CVe	7,0	4,5	10,3	39,2	18,4	14,2	19,5	34,5	34,1	-
CVg	20,6	8,7	19,0	16,8	30,8	28,3	19,3	27,6	26,3	-

\*,\*\* Valor F significativo a 5% e 1%, respectivamente. R1 número de dias para florescimento; R8 número de dias para maturação; NNF número de nós no florescimento; NNM número de nós na maturação contados na haste principal; APF altura da planta no florescimento; APM, altura da planta na maturação; APV altura da primeira vagem; NVP número total de vagens com sementes formadas; NSP número total de sementes produzidas por planta.

Altos coeficientes de correlação genotípicos foram verificados para a maioria das combinações de caracteres, nas avaliações dos dois anos (Tabela 3). Algumas combinações apresentaram correlações maiores que 90%, indicando a viabilidade de fazer avaliação em apenas um dos caracteres, são exemplos as combinações: APF - APM; R1 - R8; e NNF - NNM. Para estas características, é possível realizar a avaliação somente no florescimento, sem prejudicar significativamente o processo de seleção. A avaliação no florescimento, por sua vez apresenta a vantagem de, em geral, estar associada a herdabilidades maiores do que a avaliação na maturação (Cervigni, 2003). Além disso, os caracteres agronômicos avaliados apresentaram valores de correlação alta e positiva com PRO, confirmando que estes caracteres são bons auxiliares para a seleção indireta das famílias mais produtivas.

Tabela 3 - Coeficientes de correlação genotípica entre todas as características mensuradas.

	2001								
	R8	NPF	APF	NNM	APM	APV	NVP	NSP	PRO
R1	0,87	0,85	0,90	0,96	0,95	0,87	0,92	0,89	0,81
R8		0,82	0,85	0,85	0,88	0,76	0,87	0,84	0,82
NNF			0,81	0,83	0,82	0,76	0,78	0,77	0,74
APF				0,85	0,94	0,80	0,86	0,85	0,86
NNM					0,89	0,84	0,88	0,87	0,79
APM						0,86	0,91	0,89	0,87
APV							0,80	0,80	0,67
NVP								0,99	0,95
NSP									0,93
	2002								
	R8	NPF	APF	NNM	APM	APV	NVP	NSP	-
R1	0,87	0,80	0,77	0,89	0,79	0,69	0,82	0,82	-
R8		0,85	0,79	0,92	0,82	0,65	0,84	0,84	-
NNF			0,94	1	0,92	0,73	0,96	0,92	-
APF				0,88	0,99	0,76	0,99	0,92	-
NNM					0,86	0,55	0,98	0,92	-
APM						0,80	0,95	0,89	-
APV							0,75	0,75	-
NVP								1	-

R1 número de dias para florescimento; R8 número de dias para maturação; NNF número de nós no florescimento; NNM número de nós na maturação contados na haste principal; APF altura da planta no florescimento; APM altura da planta na maturação; APV altura da primeira vagem; NVP número total de vagens com sementes formadas; NSP número total de sementes produzidas por planta; e PRO produção de grãos.

### *Mapa genético e mapeamento de QTLs*

O mapa genético utilizado foi o mesmo do Capítulo 2, visto que é a mesma população, variando apenas o número de RILs entre os diferentes experimentos. Em relação à associação marca-característica, por regressão linear simples, 29 marcadores distribuídos em 16 GLs apresentaram associação significativa com as características a 5% de probabilidade, nas características avaliadas em 2001, com exceção de PRO (Tabela 4). De quatro a 12 marcadores apresentaram associação significativa com cada característica avaliada. Para as mesmas características avaliadas em 2002, associações marca-característica significativas foram detectadas para 36 marcadores em 17 GL. De cinco a 10 marcadores apresentaram associações significativas para cada característica. Dentre as associações marca-características observadas, 17 foram comuns nas avaliações dos dois anos, com marcadores dos GL C1, C2, D1a, D2, F, M, N e O. As diferentes associações marca-característica, detectadas nos dois anos para cada característica, indicam efeito ambiental na expressão genômica diferencial nas características avaliadas.

No ano de 2001, os marcadores Satt147 e Satt408 (GL D1a) foram associados, a todas as características avaliadas, e pelo menos um deles foi associado, estatisticamente significativo, a seis das nove características avaliadas em 2002. Como no mapa consenso estes marcadores estão a menos de 3 cM de distância (Tabela 4), deveriam ser avaliados mais marcadores nesta região para a melhor caracterização dos efeitos genéticos nas características avaliadas.

Tabela 4. Avaliação da associação marca – característica por regressão linear simples

Marca	GL	R1	R8	NNF	NNM	APF	APV	APM	NVP	NSP	PRO	Posição 1
Satt449	A1	*							*			27,78
Satt545	A1						*					71,39
Sat_157	A2				+							51,5
Sat_162	A2				++							51,6
Satt332	B1			+	++	+			+	+		80,89
Sat_009	B2			+								78,7
Satt476	C1	*++	++		*							80,6
Satt376	C2	+					++	*+				97,8
Satt286	C2						+					101,75
Satt277	C2			+					++			107,59
Satt079	C2					*	*	*				117,87
Satt202	C2	*				*	+	*	*			126,24
Satt460	C2						++					117,7
Satt531	D1a									*		40,87
Satt342	D1a	+										48,14
Satt321	D1a	+										50,16
Satt408	D1a	**++	*+	*	*	**	*	**	*+	**+	**	106,09
Satt147	D1a	**++	*	*	*	**+	**	**+	*	*	*	108,89
Satt141	D1b		+									72,89
Satt189	D1b		+									76,32
Satt528	D2						+		*			86,34
Satt212	E							*			*	32,37
Satt602	E										*	41,68
Satt263	E				+							45,4
Satt343	F			*			*	*+	*	**	*	3,04
Satt193	F	*		*+	*	+	*	*+	*	*		3,42
Satt490	F		+	*		+	+					97,97
Satt163	G					*		*	*	*	*	0
Satt038	G			*					**	**	*	1,84
Satt309	G									+		4,53
Satt302	H								+			81,04
Satt293	H									+		89,09
Satt317	H									*		89,52
Satt456	J	+							*		*	40,83
Sat_394	J	+								++		89,43
Satt242	K			*		*						14,34
Satt446	L	+										11,47
Satt590	M	*	+									7,9
Satt463	M			*		+		+				50,1
Satt536	M								+	+		62,1
Satt175	M						++					66,9
Satt250	M										*	107
Satt551	M						*		*	*	*	95,45
Satt530	N			*								32,85
Sat084	N			*								36,86
Sat_033	N	**	**+	**	*	**+		**+			*	58,4
Satt485	N		+	+		++		++	++	++		38,07



Tabela 5. QTLs para características agrônômicas em soja

2001					
Caráter	GL	Intervalo	LR	R2 %	a
R1	D1a	Satt147/Satt408	13,15**	13,26	-3,40
	N	Satt033/Satt237	11,52*	11,13	-5,82
R8	N	Satt033/Satt237	11,14*	14,63	-12,38
APF	D1a	Satt147/Satt408	8,94*	7,85	-4,27
	N	Satt033/Satt237	11,49*	11,1	-9,16
NNM	N	Satt033/Satt237	10,67*	10,37	-1,77
	F	Satt343/Satt193	13,38**	14,81	1,14
APV	D1a	Satt147/Satt408	8,59*	15,45	-1,73
NVP	D1a	Satt147/Satt408	9,82*	9,74	-8,95
NSP	D1a	Satt147/Satt408	8,33*	7,3	-20,72
	F	Satt343/Satt193	9,01*	8,8	22,48
PRO	E	Satt267/Satt532	9,36*	23,85	4,21
	G	Satt275/Satt038	22,46**	54,18	6,22
	O	Satt188/Satt478	7,33*	19,65	4,14
	K	Satt119/Satt242	9,27*	25,57	-4,64
2002					
R1	D1a	Satt147/Satt408	12,02*	10,71	-3,49
R8	N	Satt237/Satt_033	16,70**	19,27	-8,35
	O	Satt478/Satt188	9,43*	20,31	4,37
	K	Satt167/Satt349	10,22**	18,18	3,70
APF	K	Satt119/Satt242	9,25*	11,38	-6,9
NNM	A2	Satt162/Satt_157	11,78**	10,54	-1,65
	F	Satt343/Satt193	7,95*	8,9	1,11
APV	C2	Satt277/Satt376	11,85*	18,28	1,59
	K	Satt242/Satt_119	7,93*	18,49	-1,05
NVP	C2	Satt460/Satt277	7,16*	6,22	-5,47
NSP	H	Satt302/Satt142	7,61*	8,59	13,63
	J	Satt394/Satt431	6,54*	7,47	12,99

GL = Grupo de ligação denominados de acordo com (Song et al., 2004). R2% = proporção da variação fenotípica explicada pelo QTL; a = efeito aditivo estimado para o QTL. \* e \*\* valores LR excederam os valores críticos de corte ( $\alpha = 0,05$  e  $\alpha = 0,01$ , respectivamente) em cada grupo de ligação. Os valores de LR críticos foram determinados pela realização de 1000 permutações.

Para a característica dias para floração (R1), foi detectado um QTL no GL D1a nos dois anos de avaliação e outro QTL no GL N no ano de 2001. Enquanto que para dias para maturação (R8) foi detectado um QTL na mesma posição do GL N nos dois anos, além de outros dois QTLs nos GL O e K no experimento de 2002. Oliveira (2002) também detectou um QTL no GL K associado a R8, além de outros dois nos GL C2 e J. Wang et al (2004) também detectaram, em um cruzamento interespecífico e em diferentes ambientes, QTLs para maturidade no GL O e nos GL L, C2, E e M. Entretanto, na maioria dos estudos são relatados QTLs em diferentes GL dos aqui identificados. Segundo Tasma et al. (2001), estudando duas populações

independentes, estas características seriam controladas por um mesmo QTL de efeito maior identificado para R1, R3 e R7 (explicando de 40,0% a 47,4%) na mesma posição no GL C2, e modificado por vários QTLs de efeito menor identificados para as mesmas características nos GL A1, G, L, J e A2. Em outros estudos, Keim et al (1990) identificaram um QTL para R8 nos GL C1 e D1; Zhang et al. (2004) localizaram para R1, quatro QTLs no GL B1, três QTLs no GL C2 e um no GL E. Para R8, os autores ainda identificaram QTLs de efeito maior nos GL A2, B1, C1, I e M. Mansur (1993; 1996), detectou QTLs de efeito menor para R1 e R8 nos GL C2, M e L, que foram confirmados para R8 por ORF (1999). Os resultados para diferentes populações sugerem que para características de maturidade, incluindo dias para florescimento podem ser população específica, ou seja diferentes regiões genômicas controlam a mesma característica em diferentes populações de mapeamento (Tasma et al., 2001).

Para o número de nós na maturação (NNM), na população de 2001, dois QTLs foram identificados nos GL N e F, enquanto que em 2002 outros dois foram identificados nos GL A2 e F, este último na mesma posição do QTL detectado em 2001 (Tabela 5). Zhang et al. (2004) também detectaram QTLs para número de nós no GL A2 e F, além de QTLs nos GL B1, C2, e I. Oliveira (2002) reportou três QTLs de efeito menor para NNM nos GL D2, K e D1a+W.

Nos GL D1a e N em 2001 e K em 2002 foram detectados QTLs para altura da planta na floração (APF). Lee (1996) também detectou QTL para esta característica no GL N, além dos GL L e H e Oliveira (2002) nos GL D2 e J. Outros QTLs relacionados à altura de plantas foram identificados por Zhang et al. (2004) nos GL B1, C2 e M, por Mian et al. (1998) nos GL C2, E e F e por Orf (1999), para APM nos GL C2, M, L e D1b.

Para as características número de vagem por planta (NVP) e número de semente por planta (NSP) em 2001 foi identificado um QTL comum no GL D1a e um segundo QTL para NSP no GL F. Para as mesmas características em 2002 foram mapeados QTLs no GL C2 para NVP e H e J para NSP.

Para produção de grãos (PRO) foram detectados QTLs nos GL E, G, O e K. Wang et al (2004) estudaram um cruzamento interespecífico e detectaram QTLs em diferentes ambientes para rendimento nos GL C2, E, K e M. Para esta característica, Mansur et al. (1993, 1996) também mapearam QTLs nos GL C2 e M; Orf (1999) nos GL M, C2, D2 e F; e Zhang et al. (2004) nos GL B1, C2 e M.

Os QTLs associados às diferentes características, nos dois anos, encontram-se localizados nos GL A2, C2, D1a, H, J, K, N e O com predominância nos GL D1a e N em 2001, que são grupos pouco relatados à estas características na literatura. Em 2002, foram detectados QTLs em mais e em diferentes GL que em 2001, coincidindo mais com os GL relatados na literatura, embora nesta estejam descritos, na maioria das vezes QTLs nos GL C2 e M (Zhang et al., 2004; Wang et al., 2004; Mansur et al., 1993; 1996).

Características quantitativas, geralmente, apresentam muitos QTLs segregando, cada um com pequenos efeitos individuais. O resultado é que os efeitos das regiões individuais não são facilmente identificados e múltiplas regiões genômicas devem ser manipuladas ao mesmo tempo para se ter um impacto significativo. Por esta razão, réplicas dos experimentos em campo são necessárias para caracterizar acuradamente os efeitos dos QTLs e para avaliar sua estabilidade nos diferentes ambientes. Os resultados deste estudo indicam que o ano da avaliação influenciou a detecção de QTLs uma vez que o mesmo cruzamento foi avaliado em anos consecutivos e QTLs ano específicos e não específicos foram detectados. Esta mesma situação foi relatada por Beavis et al. (1991) e Melchinger et al. (1998) que verificaram, em milho, QTLs não consistentes em três experimentos independentes, repetidos com o mesmo *background* genético. Outro fato importante é que a detecção de QTLs é influenciada pelo tamanho da população de mapeamento e pelo efeito do QTL (Lynch e Walsh, 1998), o que compromete neste estudo a detecção de QTLs de efeito menor, pelo reduzido número de RILs avaliadas.

A identificação de relativamente poucos QTLs para as características agronômicas pode ser pelo fato da população ter sido genotipada com ênfase em detecção de QTLs para a resistência ao NCS e, portanto, as regiões genômicas importantes para estas características podem não terem sido amostradas.

A população em estudo apresenta a variabilidade genética necessária para o estudo de mapeamento de QTLs para características agronômicas da soja. Como é uma população de RILs, permite que se faça avaliações fenotípicas mais acurada e em diversos ambientes. Uma vez que nesta população já se tem mais de 150 microssatélites genotipados, parece promissor investir em novas fenotipagens em mais ambientes, com maior número de RILs e de repetições por RIL. Também em novas genotipagens, principalmente em GL descritos em vários estudos como os GL

B1, C2 e M, tendo em vista verificar QTLs consistentes entre ambientes para estas características, que são de grande importância no melhoramento de soja.

#### 4. BIBLIOGRAFIA

BEAVIS, W.D.; GRANT, D.; ALBERTSEN, M.; FINCHER, R. Quantitative trait loci for plant height in four maize populations and their associations with qualitative genetic loci. **Theoretical Applied Genetics**, v.83, p. 141-145, 1991.

BEAVIS, W.D. The power and deceit of QTL experiments: lessons from comparative QTL studies. **In 49<sup>th</sup> annual corn and shorgum research conference**. American Seed trade association, Washington, p. 252-268, 1994.

BURR, B.; BURR, F.A.; THOMPSON, K.H.; ALBERTSON, M.C.; STUBER, C.W. Gene mapping with recombinant inbreds in maize. **Genetics**, v.118, p.519-526, 1988.

CERVIGINI, G.D. **Análise genômica da resistência às raças 3 e 9 do nematóide de cisto e avaliação da variabilidade genética de caracteres agronômicos em soja**. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 82p, 2003.

CHURCHILL, G.A.; DOERGE, R.W. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. **Genetics**, v.138, p.963-971, 1994.

CONCIBIDO, V.C.; DIERS, B.W.; ARELLI, P.R. A decade of QTL mapping for cyst nematode resistance in soybean. **Crop Science**, v.44, p.1121-1131, 2004.

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

CREGAN, P.B.; JARVIK, T.; BUSH, A.L.; SHOEMAKER, R.C.; LARK, K.G.; KAHLER, A.L.; KAYA, N.; VANTOAI, T.T.; LOHNES, D.G.; CHUNG, L.; SPECHT, J.E. An integrated genetic linkage map of the soybean genome. **Crop Science**, v.39, p.1464-1490, 1999.

CRUZ C.D.; REGAZZI, A.J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2<sup>a</sup> ed. Viçosa: UFV. 390p. 1997.

CRUZ, C.D. **Programa Genes: aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: UFV. 442p., 1997.

DIERS, B.W.; KEIM, P.; FEHR, W.R.; SHOEMAKER, R.C. RFLP analysis of soybean seed protein and oil content. **Theoretical Applied Genetics**, v.83, p.608-612, 1992.

FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. **Introduction to quantitative genetics**. 4<sup>a</sup>ed. Longman Malaysia. Edinburgh, 464p., 1996.

FASOULA, V.A.; HARRIS, D.K.; BOERMA, R.H. Validation and designation of quantitative trait loci for seed protein, seed oil and seed weight from two soybean populations. **Crop Science**, v.44, p.1218 -1225, 2004.

FERREIRA, A.; SILVA, M.F.; COSTA E SILVA, L.; CRUZ, C.D. Estimating the effects of population size and type on the accuracy of genetic maps. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. xxx-xxx, 2006. (in press).

GQMOL. Viçosa: 15.12.2005. (<http://www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm>).

JANSEN, R.C. Interval mapping of multiple quantitative trait loci. **Genetics**, v.135, p.205-211, 1993.

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

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

KOSAMBI. D.D. The estimation of map distances from recombination values. **Annals of Eugenics**. v.12, p.173 – 175, 1944.

LYNCH, M.; WALSH, B. **Genetics and analysis of quantitative traits**. Sinauer: Canada. 980p., 1998.

LARK, K.G.; CHASE, K.; ADLER, F.; MANUR, L.M; ORF, J.H. Interactions between quantitative trait loci in soybean in wich trait variation at one locus is conditinal upon a specific allele at another. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 92, p. 4656 - 4660, 1995.

LEE, S.H.; BAILEY, M.A.; MIAN, M.A.R.; SHIPE, E.R.; ASHLEY, D.A.; PARROT, W.A.; HUSSEY, R.S.; BOERMA, H.R. Identification of quantitative trait loci for plant heigh, loding and maturity in a soybean population segregation for growth habit. **Theoretical Applied Genetics**, v.92, p.516-523, 1996.

LIMA, R.D.; FERRAZ, S.; SANTOS, J.M. Ocorrência de *Heterodera* sp. em soja no Triângulo Mineiro. **Nematologia Brasileira**, v.16, n.1/2, p.101-102, 1992.

MANSUR, L.M.; LARK, K.G.; KROSS, H.; OLIVEIRA, A. Interval mapping of quantitative trait loci for reproductive, morfological, and seed traits of soybean (*Glycine max* L.). **Theoretical Applied Genetics**, v.86, p.907-913, 1993.

MANSUR, L.M.; ORF, J.H.; CHASE, K.; JARVIK, P.B.; CREGAN, P.B.; LARK, K.G. Genetic mapping of agronomic traits using recombinant inbred lines of soybean. **Crop Science**, v.36, p.1327-1336, 1996.

MELCHINGER, A.E.; UTZ, H.F.; SCHON, C.C. Quantitative trait locus (QTL) mapping using different testes and independent population samples in maize reveals low power of QTL detection and large bias in estimates of QTL effects. **Genetics**, v.149, p.383-403, 1998.

MIAN, M.A.R.; WELLS, R.; CARTER, T.E.Jr.; ASHLEY, D.A.; BOERMA, H.R. RFLP tagging of QTLs conditioning specific leaf weight and leaf size in soybean. **Theoretical Applied Genetics**, v.96, p.354-360, 1998.

MIAN, M.A.R.; BAILEY, M.A.; TAMULONIS, J.P.; SHIPE, E.R.; CARTER, T.E. Jr; PARROT, W.A.; ASHLEY, D.A.; HUSSEY, R.S.; BOERMA, H.R. Molecular markers associated with seed weight in two soybean populations. **Theoretical Applied Genetics**, v.93, p.1011-1016, 1996.

NITJI, V.N.; SHENAUT, M.A.; SUTTNER, R.J.; SCHIMIDT, M.E.; GIBSON, P.T.; Relationship between soybean sudden death syndrome (SDS) and yield components in F<sub>6</sub> derived lines. **Crop Science**, v.38, p. 673-678, 1998.

OLIVEIRA, D.A. **Mapeamento de QTLs para características agronômicas e relação entre lipoxigenases e teor de ácido linolênico com qualidade fisiológica de sementes de soja**. Viçosa. MG: UFV. 100 p. Dissertação (Doutorado em Fitotecnia). Universidade Federal de Viçosa, 2002.

ORF, J.H.; CHASE, K.; JARVIK, T.; MANSUR, L.M.; CREGAN, P.B.; ADLER, F.R.; LARK, K.G. Genetics of soybean traits: I. Comparison of three related recombinant inbred populations. **Crop Science**, v.39, p.1642-1651, 1999.

RAFALSKI, A. Applications os single nucleotide polymorphisms in crop genetics. **Current opinion in plant bilology**, v.5, p.94-100, 2002.

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

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

SOARES, T.C.B. **Mapeamento de locos que controlam o conteúdo de proteína em soja**. Viçosa. MG: UFV. 2000 58p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento). Universidade Federal de viçosa. 2000.

SONG, Q.J.; MAREK, L.F.; SHOEMAKER, R.C.; LARK, K.G.; CONCIBIDO, V.C.; DELANNAY, X.; SPETCH, J.E.; CREGAN, P.B. A new integrated genetic linkage map of the soybean. **Theoretical Applied Genetics**, v. 109, p.122-128, 2004.

SPETCH, J.E.; CHASE, K.; MACRANADER, M.; GRAEF, G.L.; CHUNG, J.U.; MARKWELL, J.P.; GERMANN, M.; ORF, J.H.; LARK, K.G. Soybean response to water: a QTL analysis of drought tolerance. **Crop Science**, v.41, p.493-509, 2001.

TASMA, I.M.; LORENZEN, L.L.; GREEN, D.E.; SHOEMAKER, R.C. Mapping genetic loci for flowering time, maturity, and photoperiod insensitivity in soybean. **Molecular Breeding**, v.8, p. 25-35, 2001.

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

YUAN, J.; NITJI, V.N.; MEKSEM, K.; IQBAL, M.J.; TRIWITAYAKORN, K.; KASSEM, MY.A.; DAVIS, G.T. SHIMIDT, M.E.; LIGHTFOOT, D.A. Quantitative trait loci in two soybean recombinant inbred line populations segregating for yield and disease resistance. **Crop Science**, v. 42, p. 271-277, 2002.

ZENG, Z.-B. Precision mapping of quantitative trait loci. **Genetics**, v.136, n.9, p.1457-1468, 1994.

ZHANG, W.K.; WANG, Y.J.; LUO, G.Z.; ZHANG, J.S.; HE, C.Y.; WU, X.L. GAI, J.Y.; CHEN, S.Y. QTL mapping of ten agronomic traits on the soybean (*Glycine max* L. Merr.) genetic map and their association with EST markers. **Theoretical Applied Genetics**, v.108, p. 1131-1139, 2004.

## CONCLUSÕES

1. A resistência para as raças 3, 9 e 14 do NCS é condicionada por diferentes números de genes e o nível de resistência a cada raça é dependente da quantidade de genes envolvidos, sendo que quanto maior o número de genes envolvidos, maior o nível de resistência obtida.
2. O maior número de genes de resistência ao NCS na população de RILs que nas populações F<sub>2</sub>, indica maior concentração de genes de resistência na cultivar Hartwig, que nas outras já melhoradas.
3. A resistência à raça 14 do NCS, na população de RILs, parece envolver um maior número de genes de menor efeito, indicado pelo estudo de herança, e pela falta de detecção de QTLs significativos no estudo de mapeamento de QTLs.
4. Na população S5995 x Renascença, somente um gene foi necessário para condicionar resistência moderada à raça 14 do NCS, embora dois tenham sido identificados pelo estudo de herança. E no estudo de validação, apenas um QTL foi identificado para resistência a esta raça no GL G, em um intervalo onde também foi detectado QTL para a resistência à raça 3.
5. Foi confirmada a presença de QTLs nos GL A2, e G, para resistência a raça 3, na população de melhoramento Msoy8001 x Conquista, porém para a raça 14, na população S5995 x Renascença detectou-se somente um QTL no GL G. A falta de detecção de polimorfismos no GL D2, para esta população, pode ter sido a causa da não detecção de QTLs para a raça 14 nesse GL.

6. A seleção assistida por marcadores moleculares proporcionou ganhos similares aos obtidos pela seleção fenotípica.
7. Microssatélites no GL G estão ligados a regiões genômicas que conferem resistência às raça 3, 9 e 14.
8. Nas RILs foram detectados QTLs associados às diferentes características agronômicas, em dois anos consecutivos, nos GL A2, C2, D1a, H, J, K, N e O com predominância nos GL D1a e N em 2001, que são grupos pouco relatados à estas características na literatura. Em 2002 foram detectados QTLs em mais GL que em 2001.
9. QTLs detectados no mesmo intervalo para várias características agronômicas no ano de 2001 sugerem efeitos pleiotrópicos dessas regiões genômicas.
10. Dada a qualidade da população de RILs para o mapeamento de QTLs e a importância dos caracteres agronômicos avaliados, deve-se realizar novas fenotipagens em um maior número de ambientes, com maior número de RILs e com maior número de repetições, além de novas genotipagens, afim de se verificar QTLs consistentes entre ambientes para estas características.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)