

GENÉTICA QUANTITATIVA ASSOCIADA AO USO DE  
MARCADORES MOLECULARES PARA SELEÇÃO DE  
GENÓTIPOS DE SOJA COM RESISTÊNCIA A  
*Meloidogyne javanica*

JOÃO FLÁVIO VELOSO SILVA

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Agronomia, Área de Concentração: Fitopatologia.

PIRACICABA  
Estado de São Paulo - Brasil  
\* Novembro - 2000

**GENÉTICA QUANTITATIVA ASSOCIADA AO USO DE  
MARCADORES MOLECULARES PARA SELEÇÃO DE  
GENÓTIPOS DE SOJA COM RESISTÊNCIA A  
*Meloidogyne javanica*.**

**JOÃO FLÁVIO VELOSO SILVA**  
**Engenheiro Agrônomo**

Orientador: Prof. Dr. **LUIZ CARLOS C.  
BARBOSA FERRAZ**

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Agronomia, Área de Concentração: Fitopatologia.

**PIRACICABA**  
**Estado de São Paulo – Brasil**  
**Novembro - 2000**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP**

Silva, João Flávio Veloso

Genética quantitativa associada ao uso de marcadores molecular para seleção de genótipos de soja com resistência a *Meloidogyne javanica* / João Flávio Veloso Silva. - Piracicaba, 2000.

73 p.

Tese (doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2000.  
Bibliografia.

1. Genética quantitativa 2. Marcador genético 3. Meloidoginose 4. Nematóide parasito de planta 5. Resistência ao parasito 6. Seleção genética 7. Soja I. Título

CDD 633.34

**“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”**

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos melhoristas, em suas várias correntes.....dedico àqueles que ainda vêem o melhoramento de plantas como uma arte...como um rio em constante movimento.

## AGRADECIMENTOS

Pois é, chegamos no fim desta jornada e é o momento de agradecer. Isto é complicado, pois foram tantas pessoas que deixaram um pouco no trabalho, mas vamos lá:

Ao CNPq, pelo financiamento,

Ao Orientador (que merece a abrangência do termo) Prof. Luiz Carlos C. Barbosa Ferraz,

Ao Dr. Carlos Arrabal Arias, pela enorme ajuda na parte da genética quantitativa,

Ao Prof. Ailton Rocha Monteiro,

Aos Professores do Departamento de Fitopatologia, Entomologia & Zoologia,

Aos colegas Pesquisadores da Embrapa Soja,

Ao pessoal da música do Bar do Pinheiro,

À companheira Márcia e ao filhote Tiago.

Enfim, foram momentos intensos.....resta a certeza de que, vendo os tempos de Piracicaba com os olhos do futuro poderá se dizer : Foi bom.

## SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	06
2.1 Gênero <i>Meloidogyne</i> : os Nematóides de Galhas.....	06
2.2 Resistência de Plantas a Nematóides.....	09
2.1.1 Terminologia.....	09
2.1.2 Medindo a Resistência de Plantas a Nematóides.....	10
2.1.3 Mecanismos de Resistência de Plantas a Nematóides.....	11
2.1.4 A Base Genética da Resistência.....	13
2.1.5 Marcadores Moleculares para a Resistência baseados no DNA.....	14
2.1.6 Resistência genômica de 'hot-spots'.....	17
3. MATERIAL & MÉTODOS.....	18
3.1 Descrição dos Genótipos.....	18
3.2 Obtenção das Sementes.....	21
3.3 Avaliação da Resistência de Plantas de Soja a <i>Meloidogyne</i> <i>javanica</i> .....	22
3.4 Genética quantitativa.....	23
3.4.1 Análise Genética dos Dados.....	24
3.4.1.1 Componentes Genéticos de Média.....	24
3.4.1.2 Componentes Genéticos e Ambientais de Variância.....	28
3.4.1.3 Herdabilidade.....	30
3.5 Marcadores Moleculares para a Resistência a <i>Meloidogyne</i> <i>javanica</i> .....	31

	Página
4. RESULTADOS & DISCUSSÃO.....	34
4.1 Obtenção das sementes.....	34
4.2 Avaliação da resistência de plantas de soja a <i>Meloidogyne javanica</i> .....	35
4.3 Genética quantitativa.....	36
4.3.1. BRS 133 x Coodetec 201.....	36
4.3.1.1. Análise genética dos dados.....	37
4.3.1.1.1. Parâmetros genéticos obtidos pelos testes de médias e variâncias.....	41
4.3.1.1.2. Determinação do número de genes envolvidos na resistência.....	42
4.3.2. BRS 133 x PI 595099.....	43
4.3.2.1. Análise genética dos dados.....	44
4.3.2.1.1. Parâmetros genéticos obtidos pelos testes de médias e variâncias.....	44
4.3.2.1.2. Determinação do número de genes envolvidos na resistência.....	47
4.3.3. Coodetec 201 x PI 595099.....	47
4.3.3.1. Análise genética dos dados.....	48
4.3.3.1.1. Parâmetros genéticos obtidos pelos testes de médias e variâncias.....	49
4.3.3.1.2. Determinação do número de genes envolvidos na resistência.....	50
4.4. Herdabilidade.....	54
4.5. Considerações finais.....	55

	Página
4.6 Marcadores moleculares para a resistência a <i>Meloidogyne javanica</i> .....	57
5. CONCLUSÕES.....	61
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

## LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Evolução diária das temperaturas máxima, mínima, média e no solo no interior do tubete, em três experimentos realizados em casa de vegetação.....	38
2. Distribuição das médias das famílias F <sub>3</sub> (4), indivíduos F <sub>2</sub> (3) e dos parentais BRS 133 (1) e Coodetec 201 (2) para o número de galhas (NG) por planta causadas por <i>M. javanica</i> .....	39
3. Distribuição da média das famílias F <sub>3</sub> , indivíduos F <sub>2</sub> e dos parentais para o número de galhas por grama de raiz (NGR) por planta causadas por <i>M. javanica</i> no cruzamento entre Embrapa 133 e Coodetec 201.....	40
4. Distribuição das médias das famílias F <sub>3</sub> (4), indivíduos F <sub>2</sub> (3) e dos parentais BRS 133 (1) e PI 595099 (2) para o número de galhas (NG) por planta causadas por <i>M. javanica</i> .....	46
5. Distribuição das médias das famílias F <sub>3</sub> (4), indivíduos F <sub>2</sub> (3) e dos parentais Coodetec 201 (1) e PI 595099 (2) para o número de galhas (NG) por planta causadas por <i>M. javanica</i> .....	51
6. Lado direito: marcadores de microssatélites utilizado, localizados em parte dos grupos de ligação D1b+W e F da soja e, em negrito, marcadores de RFLP (Tamulonis et al., 1997b) associados a resistência a <i>Meloidogyne javanica</i> . No lado esquerdo estão indicadas as distâncias (cM) entre eles.....	58

## LISTA DE TABELAS

	Página
1. Genes de resistência a doenças da soja e 'QTL's localizados no grupo de ligação F (adaptado do original de Tamulonis <i>et al.</i> , 1997b) no mapa do USDA /ARS-IS (Shoemaker & Specht, 1995).....	17
2. Dados de origem e características morfológicas e fitotécnicas dos genótipos de soja utilizados nos cruzamentos.....	20
3. Reação dos genótipos usados nos cruzamentos a alguns patógenos importantes para a sojicultura.....	21
4. Parentais e gerações segregantes utilizados no experimento com os respectivos números de famílias e indivíduos dentro de cada família.....	24
5. Componentes genéticos aditivos e dominantes de média dos parentais e de suas gerações segregantes, segundo Mather & Jinks (1982).....	25
6. Informações necessárias para o teste conjunto de escala envolvendo dois progenitores mais as suas gerações segregantes F <sub>2</sub> , F <sub>3</sub> , conforme Souza (1992).....	26
7. Componentes genéticos aditivos, dominantes e epistáticos de média dos parentais e de suas gerações segregantes, segundo Mather & Jinks (1982).....	28
8. Componentes do modelo genético simples presentes nas variâncias dos parentais e de suas gerações segregantes, mostrando as variâncias entre famílias (QME) e das variâncias dentro de famílias (QMD).....	29

	Página
9. Componentes de variância genética aditiva, de dominância e de interação genótipo x micro-ambiente dos parentais e de suas gerações segregantes.....	30
10. Marcadores de RAPD usados para confirmação do sucesso dos cruzamentos entre os genótipos de soja BRS 133, Coodetec 201 e PI 595099.....	34
11. Número de galhas (NG) e número de galhas por grama de raízes (NGR) causadas por <i>Meloidogyne javanica</i> nos parentais e nas gerações F <sub>2</sub> e F <sub>3</sub> derivadas do cruzamento entre BRS 133 e Coodetec 201.....	36
12. Médias e variâncias do número de galhas (NG) e número de galhas por grama de raízes (NGR) das gerações parentais, F <sub>2</sub> e F <sub>3</sub> do cruzamento entre BRS 133 e Coodetec 201, inoculados com <i>Meloidogyne javanica</i> .....	37
13. Componentes de médias para número de galhas (NG) e número de galhas por grama de raízes (NGR) no cruzamento entre BRS 133 e Coodetec 201....	41
14. Componentes de variâncias para número de galhas (NG) e número de galhas por grama de raízes (NGR) no cruzamento entre BRS 133 e Coodetec 201.....	42
15. Distribuição de famílias F <sub>3</sub> [observado (O) e esperado (E)], com dois genes dominantes no sentido da resistência (9R:7S) para as variáveis número de galhas (NG) e número de galhas por grama de raízes (NGR).....	43

	Página
16. Número de galhas por planta (NG) causadas por <i>Meloidogyne javanica</i> nos parentais e progênie do cruzamento BRS 133 x PI 595099.....	43
17. Médias e variâncias do número de galhas (NG) das gerações parentais, F <sub>2</sub> e F <sub>3</sub> do cruzamento entre BRS 133 e PI 595099.....	44
18. Componentes de médias para o número de galhas por planta (NG) no cruzamento entre BRS 133 e PI 595099.....	45
19. Componentes de variâncias para número de galhas por planta (NG) no cruzamento entre BRS 133 e PI 595099.....	45
20. Teste de Qui-quadrado para o padrão de segregação com dois genes aditivos complementares (1R:15S) para a média do número de galhas (NG) da geração F <sub>3</sub> .....	47
21. Número de galhas por planta (NG) causadas por <i>Meloidogyne javanica</i> nos parentais e progênie do cruzamento entre Coodetec 201 e PI 595099.....	48
22. Médias e variâncias do número de galhas (NG) das gerações parentais, F <sub>2</sub> e F <sub>3</sub> do cruzamento Coodetec 201 x PI 595099.....	48
23. Componentes de médias para o número de galhas por planta (NG) causadas por <i>M. javanica</i> no cruzamento Coodetec 201 x PI 595099.....	49
24. Componentes de variâncias para o número de galhas por planta (NG) para o cruzamento Coodetec 201 x PI 595099.....	49

	Página
25. Teste de Qui-quadrado para média do número de galhas (NG) da geração F <sub>3</sub> do cruzamento entre Coodetec 201 e PI 595099.....	54
26. Estimativa da herdabilidade da resistência à formação de galhas causadas por <i>Meloidogyne javanica</i> para os cruzamentos BRS 133 x Coodetec 201, BRS 133 x PI 595099 e Coodetec 201 x PI 595099.....	55
27. Locus marcadores significativamente associados à redução do número de galhas de plantas F <sub>3</sub> oriundas dos cruzamentos BRS 133 x Coodetec 201 e BRS 133 x PI 595099.....	60

## LISTA DE SIGLAS , ABREVIATURAS & SÍMBOLOS

COODETEC - Central Agrícola Agropecuária de Desenvolvimento Tecnológico e Econômico LTDA;

CTAB - hexadeciltrimetil amônio bromo;

[ d ] - Componente genético de média, resultante da soma dos efeitos aditivos;

$D = S(d^2)$  - Componente geneticamente aditivo da variância, resultante do somatório do quadrado dos efeitos aditivos dos k locos pelos quais os pais diferem;

DNA - Ácido desoxiribonucléico;

E ( $E_1$  e  $E_2$ ) - Componente não herdável (ambiental) da variância dos parentais e seus descendentes;

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético;

Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária;

g.l. - Graus de liberdade;

[ h ] - Componente genético da média, resultante da soma dos efeitos de dominância dos locos que estejam em heterozigose nas gerações segregantes;

H - Componente genético de dominância da variância, resultante dos quadrados dos efeitos de dominância dos k locos pelos quais os pais diferem;

$h^2$  - Herdabilidade;

$h^2_p$  - Herdabilidade no sentido restrito a nível de planta;

$h^2_m$  - Herdabilidade no sentido restrito a nível de média;

HCl - Ácido clorídrico;

[ i ] - Componente genético da média resultante da interação entre *loci* em homozigose (interação do tipo aditivo por aditivo);

KCl - Cloreto de potássio;

m - Média;

MgCl<sub>2</sub> - Cloreto de magnésio;

n - Número de indivíduos numa família;

N - Número de indivíduos numa geração;

NaCl - Cloreto de sódio;

NG - Número de galhas;

NGR - Número de galhas por grama de raíz;

P - Probabilidade;

PCR - Reação de polimerase em cadeia

R - Resistente;

QTL – Locos de caracteres quantitativos;

S - Suscetível;

TBE - Tris-Borato e ácido etilenodiaminotetracético;

TE - Tris-ácido etilenodiaminotetracético;

TRIS-HCl - Tris-Ácido clorídrico;

$\chi^2$  - Qui-quadrado.

# **GENÉTICA QUANTITATIVA ASSOCIADA AO USO DE MARCADORES MOLECULARES NA SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE SOJA COM RESISTÊNCIA A *Meloidogyne javanica*.**

Autor: João Flávio Veloso Silva

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos C. Barbosa Ferraz

## **RESUMO**

A herança da resistência a *M. javanica* dos genótipos de soja PI 595099 e Coodetec 201, quando cruzados com BRS 133, parental suscetível, foi estudada em 120 famílias  $F_{2,3}$ , 120 indivíduos  $F_2$  e 60 indivíduos de cada parental. O sucesso dos cruzamentos foi verificado através de marcadores de RAPD e fenotípicos. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, sob condições de luz e temperatura controlados. As plantas foram conduzidas em tubetes plásticos (4,5 cm de diâmetro e 19 cm de comprimento) contendo substrato esterelizado e inoculadas com 3.000 ovos de *M. javanica*. A avaliação da resistência foi feita 30 dias após a inoculação através do número de galhas por planta e, para o cruzamento entre BRS 133 x Coodetec 201, também do número de galhas por grama de raízes.

Dois genes dominantes e aditivos controlam a resistência a *M. javanica* no cruzamento entre Coodetec 201 x BRS 133. A herança da resistência é quantitativa e controlada por efeitos aditivos, de dominância e efeitos epistáticos do tipo aditivo por aditivo. A seleção visando a resistência a *M. javanica* no cruzamento BRS 133 x Coodetec 201 deve ser feita com base na média das famílias e em gerações mais avançadas.

Dois genes complementares, com distribuição independente e ausência de dominância, sendo que a resistência é determinada por genótipos homozigóticos para os alelos dos dois genes, controlam a resistência a *M. javanica* no cruzamento entre BRS 133 e PI 595099. A herança da resistência é quantitativa e controlada por efeitos aditivos

e por efeitos epistáticos, do tipo aditivo por aditivo, entre os genes que controlam o caráter. A seleção visando a resistência a *M. javanica* no cruzamento BRS 133 x PI 595099 pode ser feita tanto com base na reação de plantas individuais como na média das famílias e em gerações precoces.

Dada a presença de segregação transgressiva no cruzamento entre Coodetec 201 e PI 595099 (ambos resistentes a *M. javanica*), os genes que controlam o caráter nestes dois genótipos não são os mesmos.

As estimativas da herdabilidade foram altas para todos os cruzamentos, indicando que uma grande porcentagem da variação no número de galhas entre a progênie F<sub>3</sub> foi devida a causas genéticas, o que possibilita ganhos na seleção.

Marcadores moleculares de microssatélites (SSR) também foram avaliados para a seleção de plantas de soja com resistência a *M. javanica*. Foram estudados 20 locos na amplificação do DNA oriundo das 120 plantas F<sub>2</sub> obtidas de cada cruzamento entre BRS 133 e os dois parentais resistentes. A escolha desses locos foi feita flanqueando marcadores de RFLP associados a QTL's descritos na literatura. Para o cruzamento entre BRS 133 e Coodetec 201, análises de variância mostraram associações significativas entre a média do número de galhas das famílias F<sub>3</sub> e os locos Satt 266 e Sat 133. Apenas o marcador SOYHSP 176 mostrou associação mais próxima ( $P = 0,13$ ) do aceitável para o cruzamento entre BRS 133 e PI 595099.

Esses resultados corroboram dados de literatura, que apontam a existência de QTL's condicionantes de resistência a *M. javanica* próximos aos marcadores de RFLP A725, no grupo de ligação D1b + W, e A806D e A186D/A757V, no grupo de ligação F.

# QUANTITATIVE GENETIC STUDIES ASSOCIATED TO THE USE OF MOLECULAR MARKERS IN THE SELECTION OF SOYBEAN GENOTYPES WITH RESISTANCE TO *Meloidogyne javanica*

Author: João Flávio Veloso Silva

Adviser: Prof. Dr. Luiz Carlos C. Barbosa Ferraz

## SUMMARY

The inheritance of resistance to *Meloidogyne javanica* in soybean was studied for the crosses BRS 133 (susceptible) x Coodetec 201 (resistant) and BRS 133 x PI 595099 (resistant). RAPD and phenotypic markers were used to certify the success of the crosses. Each of the F<sub>2</sub> (120) and F<sub>3</sub> (120 families) generations and the parents (60 of each) were screened in a greenhouse for resistance to gall formation. The plants were grown in plastic tubes (4,5 cm of diameter x 19 cm length) filled with methyl bromide-fumigated soil amended with sand. The seedlings were individually inoculated with 3,000 eggs and evaluated by counting the root galls 30 days later.

For BRS 133 x Coodetec 201, two dominant and additive genes control the resistance. The selection would be based on F<sub>3</sub> family means and would be carried out in more advanced generations. For BRS 133 x PI 595099, two complementary and independent genes control the resistance, which is determined by homozygotic genotypes for the alleles of the two genes. Neither resistance nor susceptibility was dominant. The selection would be based on single plants or in family means, even in early generations. For both crosses, the F<sub>2</sub> and F<sub>3</sub> distribution indicated that resistance was quantitatively inherited.

The uniqueness of resistance genes was determined by crossing Coodetec 201 and PI 595099. The F<sub>3</sub> progeny from this cross exhibited transgressive segregation indicating that the genes are different.

Twenty loci of simple sequence repeat (SSR) were used to amplify the DNA of the 120 F<sub>2</sub> plants of the crosses BRS 133 x Coodetec 201 and BRS 133 x PI 595099. The loci are located close to some QTL's on the linkage group D1b + W and F as described in the literature. Analysis of variance indicated significant marker/nematode galls association for Satt 266 and Sat 133 (BRS 133 x Coodetec 201) and HSP 176 (BRS 133 x PI 595099).

This data corroborates the existence of QTL's conferring resistance to *M. javanica* located close to RFLP markers A725 on linkage-group D1b + W, and A806D and A186D/A757V on linkage-group F. However, the loci detected here did not explain much of the total phenotypic variation of the number of galls. Thus, further studies dealing with the evaluation of SSR loci on the same genomic location will be necessary until these markers can be fully applied on assisted selection of soybean genotypes with resistance to *M. javanica*.

## 1. INTRODUÇÃO

*“Se a cana lembra os tempos coloniais e o café recorda a transição do império para a república, a soja tem a cara do Brasil surgido depois da Segunda Guerra Mundial....Foi, por fim, o vetor de uma revolução dos costumes. A presença da soja na vida moderna começa com a margarina no café da manhã, passa pelo óleo de soja usado na cozinha, está no hambúrguer, na salsicha, nos matinais, nos pães especiais, nos achocolatados” ( Hasse, 1996, p.19).*

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] começou a ser semeada comercialmente no Brasil na década de 50, entretanto o primeiro registro do seu cultivo no País ocorreu em 1882, na Bahia (Hasse, 1996). O Instituto Agrônomo de Campinas (IAC/SP) foi a primeira instituição brasileira a trabalhar com a cultura, distribuindo sementes para agricultores interessados. Outra referência à introdução da soja no Brasil data de 1900, em Pelotas, RS, quando foi avaliada quanto à produção de forragem (Hasse, 1996). Nos anos 70, a produção brasileira de soja apresentou crescimento extraordinário, alterando a sua importância relativa nos cenários nacional e internacional.

A expansão da soja para a Região Central do Brasil, em áreas dos Cerrados, proporcionou um segundo salto na produção brasileira, no final da década de 70. Cultivar soja em regiões de latitude inferior a 20 graus só foi possível graças ao desenvolvimento de diversos programas de melhoramento genético em instituições

brasileiras de pesquisa. O sucesso do cultivo nessa região de expansão foi de tal magnitude que, atualmente, as melhores produtividades são ali obtidas. Os elevados teores de proteína e óleo da soja geraram vasto complexo agro-industrial destinado ao processamento de seus derivados, tornando-a uma das principais *commodities* do mundo. O Brasil participa com aproximadamente 18% da produção mundial, embora seja o país com maior potencial de expansão de área e produtividade (Embrapa, 1998). No cerrado brasileiro, cerca de 20 milhões de hectares são cultivados para a produção de grãos, com a soja ocupando um terço dessa área. Estima-se que ainda exista uma fronteira agrícola a ser explorada com 180 milhões de hectares. O que limita a produção da soja e outros produtos nessas regiões do norte do Brasil é a precariedade do sistema de transporte (D'Agostini, 1999).

A produção agrícola brasileira representa aproximadamente 8,9% do Produto Interno Bruto (PIB). Desse montante, a soja participa com 11,06% do PIB agrícola. Na safra 1999/2000, foram colhidas 31.644.100 toneladas no Brasil, numa área cultivada de 13.327.300 hectares, com produtividade média de 2.374 kg/ha (CONAB, 2000). A produtividade média do País vem crescendo e, em algumas regiões, observam-se valores bastante elevados, como no Paraná e no Mato Grosso (3.000 kg/ha).

Entre os fatores que contribuem para a queda de rendimento estão diversas doenças, destacando-se aquelas causadas por nematóides fitoparasitos. Os fitonematóides constituem de fato um dos principais problemas para a cultura, estimando-se em 10,6% da produção mundial as perdas anuais em razão do parasitismo que exercem (Barker, 1998). Mais de 100 espécies, envolvendo cerca de 50 gêneros, foram assinaladas associadas a cultivos de soja em todo o mundo (Good, 1973; Rebois & Golden, 1978).

O nematóide de cisto, *Heterodera glycines*, e os nematóides de galhas, do gênero *Meloidogyne*, são os que apresentam maior potencial de dano à sojicultura (Schmitt & Noel, 1984). No Brasil, as espécies mais freqüentemente associadas a danos são *Meloidogyne javanica*, *M. incognita*, *M. arenaria*, *Heterodera glycines*, *Pratylenchus brachyurus*, *Rotylenchulus reniformis* e *Tubixaba tuxaua* (Silva, 1998). A severidade do dano depende da espécie envolvida e de seu nível populacional, das condições climáticas, do tipo de solo e das práticas culturais sob as quais a soja seja cultivada. Além disso, a

situação pode agravar-se pela interação com outros organismos patogênicos, em especial fungos do solo, como *Phytophthora*, *Fusarium* e *Rhizoctonia* (Good, 1973; Sasser, 1989). Os danos causados por *Fusarium solani* mostram-se crescentes no Brasil, especialmente em Goiás e Minas Gerais, sendo coincidentes com áreas infestadas por nematóides.

*Heterodera glycines* tem sido considerada a espécie mais prejudicial à cultura nos Estados Unidos desde a sua detecção em 1954 (Good, 1973; Sinclair & Schurtelff, 1974; Sasser, 1989). No Brasil, onde foi registrada originalmente em 1992 (Lima *et al.*, 1992; Lordello *et al.*, 1992; Monteiro & Morais, 1992), a rápida resposta da pesquisa agrícola levou ao desenvolvimento de diversas práticas eficientes de controle, reduzindo-lhe as perdas causadas (Silva, 1998). O melhoramento genético nacional foi possível graças ao uso de fontes de resistência identificadas a partir de programas de melhoramento norte-americanos. Assim, genes de resistência a diversas raças do nematóide foram rapidamente incorporados a variedades superiores adaptadas.

Em todos os países sojicultores das regiões tropical ou subtropical, o problema com nematóides do gênero *Meloidogyne* está se tornando crítico. Esses nematóides já ocorriam no Brasil antes do início do cultivo da soja e têm causado danos crescentes em diversas regiões, como o norte do Rio Grande do Sul, sudoeste e norte do Paraná, sul de São Paulo e Mato Grosso do Sul e em diversos pontos nos Cerrados do Centro-Oeste. A baixa eficiência da rotação de culturas na redução populacional desses parasitos, que em geral podem se reproduzir em grande número de espécies vegetais, e a evidente deficiência de variedades resistentes adaptadas às diferentes regiões de cultivo no País são as principais razões dessa situação. De fato, no Brasil há poucas variedades com resistência, em especial a *M. javanica*, ao que tudo indica a espécie associada a maiores perdas na produção. No início do presente estudo, existiam no Brasil poucas variedades com algum nível de resistência a *M. javanica*, enquanto para *M. incognita* havia um número maior, uma vez que já se dispunha de fontes de resistência para esta espécie (Quadro 01). Contudo, várias delas eram suscetíveis ao agente causal do cancro da haste (*Diaphorte phaseolorum* f. sp. *meridionalis*), inviabilizando-lhes o uso. Atualmente, esse quadro pouco se alterou e a redução das perdas na produção causadas por essas duas espécies ainda permanece como desafio para a pesquisa agrícola brasileira.

**Quadro 01.** Cultivares comerciais brasileiras de soja com diferentes graus de resistência a *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* disponíveis na safra 97/98 (Embrapa, 1998).

Cultivar	<i>M. incognita</i>	<i>M. javanica</i>
Bragg*	R <sup>1</sup>	R
BR-4*	MR <sup>2</sup>	S <sup>3</sup>
BR-6*	-	R
BR-30*	R	R
CEP-20-Guajuvira	R	S
Coodetec 201	MR	R
Cobb*	R	S
FT-Cometa	R	MR
FT-Eureka*	MR	S
IAC-8*	R	R
Invicta	MR	S
MG/BR-46 (Conquista)	R	R
MG/BR-48 (Garimpo RCH)	S	MR
MS/BR-19 (Pequi)*	R	R
MS/BR-34 (EMPAER 10)*	R	MR
MT/BR-49 (Pioneira)	R	MR
OCEPAR 4 (Iguaçu)*	R	R
RS 5-Esmeralda*	R	S
RS 7-Jacuf*	MR	S
UFV/ITM 1*	R	MR

1. Resistente 2. Moderadamente resistente 3. Suscetível

\*. Suscetível ao cancro da haste (*Diaphorte phaseolorum* f.sp. *meridionalis*)

Dentro do contexto apresentado, acredita-se que um maior conhecimento acerca do mecanismo de herança da resistência bem como o desenvolvimento de métodos mais rápidos e eficientes na seleção de genótipos com resistência a *M. javanica* permitirão que

programas de melhoramento de soja desenvolvidos em instituições brasileiras possam incorporar genes de resistência aos cultivares mais adaptados e produtivos recomendados às diferentes regiões do País. Assim, buscou-se, no presente trabalho, estudar a herança da resistência a *M. javanica* dos genótipos de soja PI 595099 e Coodetec 201 quando cruzados com BRS 133, progenitor suscetível, por meio de genética quantitativa. Marcadores moleculares de microssatélite também foram avaliados como ferramentas para a seleção de plantas de soja com resistência a *M. javanica*. Objetivou-se, ainda, a adequação do método de avaliação de plantas sob condições controladas.

## 2 . REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Gênero *Meloidogyne*: os Nematóides de Galhas

Os nematóides de galhas são cosmopolitas, reduzindo a produtividade de diferentes culturas em muitos países ao redor do mundo (Lordello, 1982). Isso é atribuído a vários fatores, como a ampla gama de hospedeiros, a produção de grande quantidade de ovos e a capacidade de sobrevivência em diferentes ambientes (Sasser, 1977).

As principais espécies causadoras de danos na sojicultura são *M. javanica* (Treub.) Chitwood, *M. incognita* (Kofoid & White) Chitwood, *M. arenaria* (Neal) Chitwood e *M. hapla* Chitwood. As duas primeiras destacam-se como as mais prejudiciais, sendo que *M. javanica* assume maior importância em regiões de clima tropical, como é o caso do Brasil (Schmitt & Noel, 1984).

O ciclo de vida desses nematóides dura 22 a 25 dias, dependendo da temperatura do solo. Os ovos são depositados no interior de matriz gelatinosa produzida pela fêmea, que os conserva protegidos do calor excessivo, da dessecação e de certos inimigos naturais. Os juvenis sofrem a primeira ecdise ainda dentro dos ovos, transformando-se em juvenis de segundo estágio (J2), que eclodem e passam a migrar no solo à procura de raízes de plantas que possam hospedá-los. Penetram na ponta das raízes, onde as células ainda não estão diferenciadas, e, pela da injeção de hormônios e outras substâncias, modificam algumas células localizadas próximas à região dos vasos. Essas células, chamadas gigantes ou nutridoras, tornam-se bem maiores, ficam com o citoplasma mais denso e granuloso e passam a fornecer alimento ao nematóide, que se torna sedentário. Outras células menores, formadas próximas às células gigantes, são produzidas para assimilação e transferência do

alimento. Depois de passar por mais dois estádios juvenis (J3 e J4), nos quais não se alimentam, atingem a fase adulta. Nas espécies mais importantes (do ponto de vista de dano à agricultura), a reprodução dá-se por partenogênese mitótica obrigatória, sem a participação do macho no processo (Ferraz & Monteiro, 1995). Assim, a variabilidade genética observada decorre de mutações em alguns indivíduos. Cada fêmea produz, em média, 400 a 500 ovos. Como o ciclo de vida é curto, a população cresce exponencialmente quando plantas hospedeiras são plantadas na área (Taylor & Sasser, 1978). Dessa forma, perdas ocasionadas por nematóides do gênero *Meloidogyne* são frequentes.

O controle é difícil em razão de seus largos círculos de hospedeiros. Assim, a rotação de culturas necessita ser muito bem planejada, uma vez que a maioria das espécies de plantas cultivadas pode ser parasitada. Além disso, muitas vezes depara-se com uma mistura de espécies do parasito na área infestada, tornando a situação mais complexa. Da mesma forma, a presença de plantas invasoras na área pode possibilitar-lhes a sobrevivência e a reprodução, visto que muitas delas atuam como hospedeiras, comprometendo os resultados esperados com a rotação (Tihohod, 1993). Alguns produtos químicos têm bom efeito nematicida, mas o alto custo e a elevada toxicidade ao homem tornam o uso inviável em culturas de escala, como a soja. Outras alternativas de controle, como o uso de agentes de biocontrole e métodos físicos, não são exequíveis para cultivos que ocupam grandes áreas. Nesse cenário, o uso de variedades resistentes ou tolerantes é o método de controle mais eficiente, prático e econômico (Mai, 1985), além de não poluente.

Variedades resistentes possibilitam adequado controle de nematóides fitoparasitos tanto em sistemas agrícolas de baixo como de alto uso de tecnologia (Roberts, 1990). De acordo com Boerma & Hussey, (1992), algumas vantagens específicas podem ser obtidas com o uso dessas variedades, como:

- a) suprimir a reprodução da espécie de nematóide em questão;
- b) reduzir a duração do período de rotação com culturas não hospedeiras para abaixar o nível populacional do nematóide;
- c) reduzir o risco de contaminação do ambiente;
- d) não requerer ou exigir equipamentos especiais para a utilização;

e) possibilitar, no geral, a aquisição das sementes a um custo similar ao das variedades suscetíveis;

O efeito do uso de variedades resistentes a nematóides também pode ser sentido nos plantios subseqüentes de outras espécies vegetais suscetíveis, que são beneficiadas pela redução populacional do nematóide na área.

O desenvolvimento de programas específicos de melhoramento de soja resultaram na obtenção de muitos cultivares resistentes às diferentes espécies de *Meloidogyne* (Schmitt & Noel, 1984). O primeiro relato de resistência de soja aos nematóides de galhas no Brasil foi feito por Silva *et al.* (1952). Desde então, alguns trabalhos têm sido realizados com o intuito de se identificar fontes de resistência e introduzi-las nas principais cultivares de soja recomendadas para as diferentes regiões do país (Covolo, 1975; Ferraz, 1978; Alcântara *et al.*, 1980; Antônio & Dall'Agnol, 1982; Sharma & Spehar, 1983; Tihohod & Ferraz, 1985; Gouveia & Silva, 1996; Martini & Silva, 1996). Algumas vezes, entretanto, os resultados obtidos revelaram-se divergentes. Essa discrepância pode ser atribuída à utilização de diferentes raças do parasito, especialmente no caso de *M. incognita*, que muitas vezes não são identificadas nos trabalhos, e à falta de padronização nos métodos empregados na avaliação da resistência. A seleção de genótipos resistentes tem sido problemática, principalmente em avaliações realizadas em áreas naturalmente infestadas. A falta de áreas com infestação uniforme e a flutuação populacional sazonal do parasito, entre outros fatores, têm contribuído para a obtenção de resultados conflitantes (Hussey & Boerma, 1981; Sharma & Spehar, 1983; Tihohod & Ferraz, 1985).

## 2.2 Resistência de Plantas a Nematóides

### 2.2.1 Terminologia

Os termos e definições adotados neste trabalho são os estabelecidos por Roberts (1990). A maioria das plantas é imune aos nematóides. A imunidade é definida como condição da planta que leva à incapacidade de o nematóide desenvolver-se e reproduzir no interior de seus tecidos, freqüentemente por mecanismo de bloqueio que se manifesta já no início da penetração, inibindo-a. Essas plantas não são danificadas pelos nematóides.

A resistência e a suscetibilidade de plantas referem-se à habilidade evidenciada na supressão do desenvolvimento e da reprodução de determinadas espécies de nematóides. Plantas altamente resistentes possibilitam taxas de reprodução muito restritas dos parasitos, ao passo que as suscetíveis (não resistentes, hospedeiras) permitem abundante reprodução. Em soja, existe um gradiente em relação a essas duas características, com genótipos apresentando reações intermediárias (moderadas) entre os extremos.

Outra definição importante é a de tolerância. Plantas tolerantes a certas espécies de nematóides sofrem pouca ou nenhuma injúria, mesmo sob alta infecção. Plantas intolerantes, por sua vez, sofrem danos severos. Os atributos de resistência e tolerância são independentes e podem ser herdados de maneira separada e diferenciada. Assim, plantas resistentes podem ser intolerantes, sofrendo injúria mesmo sob baixa infecção.

A resistência também pode ser caracterizada pelo número de genes que controlam a característica, podendo ser monogênica (um único gene - *M. incognita* em tomate), oligogênica (dois a três genes - *H. glycines* em soja) ou poligênica (vários genes). O modo como a resistência a nematóides é herdada é importante na definição da estratégia a ser adotada para incorporá-la em cultivares comerciais de soja. Na maioria dos casos devidamente estudados, a resistência de plantas a nematóides apresentou controle monogênico e oligogênico (Boerma & Hussey, 1992). Os genes de resistência também podem ser classificados com base em seus efeitos na expressão da característica (genes maiores x genes menores).

De acordo com Vanderplank (1968), a resistência pode ser vertical (raça-específica, qualitativa), diferenciando variantes interespecíficas do patógeno, ou horizontal (raça-não específica, quantitativa), efetiva contra todos os variantes do patógeno. A resistência vertical é usualmente conferida por um ou poucos genes maiores, enquanto a resistência horizontal é conferida por vários genes menores (poligênica), com pequenos efeitos aditivos e com herança quantitativa.

### 2.2.2 Medindo a Resistência de Plantas a Nematóides

Para que um programa de melhoramento de plantas visando à resistência a nematóides possa ser conduzido é necessário que haja metodologia definida para tal e fontes de resistência disponíveis. Deve-se buscar fontes de resistência inicialmente em cultivares comerciais adaptados, para somente depois buscá-la no germoplasma selvagem e/ou por introduções de plantas (PI's). Em algumas situações, é possível recorrer a outras espécies do gênero. A transferência interespecífica de genes pode ser feita com o uso de técnicas especiais (Camargo & Bergamin Filho, 1995), apesar de que, recentemente, a opinião pública não tem sido muito favorável à introgressão de genes estranhos numa dada espécie para a produção de alimentos transgênicos.

A avaliação da resistência é freqüentemente realizada com base na capacidade ou taxa de reprodução dos nematóides nas plantas testadas. A reprodução é medida procedendo-se à contagem dos nematóides (ovos, juvenis e/ou adultos, conforme o gênero envolvido) extraídos do sistema radicular e/ou da rizosfera. Sintomas bastante evidentes decorrentes da interação planta-nematóide também podem ser utilizados para avaliar a resistência das plantas, como é o caso da contagem de galhas radiculares incitadas por *Meloidogyne* spp.. Nesse caso, é fundamental que haja correlação entre a ausência dos sintomas e a resistência da planta. No caso da soja, utiliza-se a contagem de galhas, pois há correlação positiva destas com a suscetibilidade das plantas (Kinloch, 1990, 1998; Young, 1998). Para outras espécies de plantas, como o milho, esta correlação não é verdadeira, havendo a necessidade de se recorrer a outros parâmetros.

O procedimento de seleção deve permitir a avaliação de milhares de plantas de maneira rotineira e fácil (Young, 1998). Metodologias para a avaliação da resistência de plantas frente a importantes espécies de nematóides estão disponíveis (Starr, 1990) e podem ser praticadas tanto em casa de vegetação como no campo, com distintas limitações. Seleções realizadas no campo permitem a avaliação de um grande número de genótipos, mas também requerem um grande número de controles (variedades de reação conhecida) em diversos pontos da área, pois a distribuição dos nematóides não é aleatória, formando agregados. Misturas de espécies e/ou raças podem ocorrer no campo, dificultando ainda mais a interpretação dos resultados. Em casa de vegetação, pode-se controlar a população inicial dos nematóides, empregando-se níveis de inóculo pré-estabelecidos. O ambiente (umidade, temperatura, luz), no geral, também pode ser ajustado artificialmente, entretanto a disponibilidade de espaço é limitada, reduzindo-se o número de genótipos a ser avaliado.

### 2.2.3 Mecanismos de Resistência de Plantas a Nematóides

Os mecanismos de resistência de plantas a nematóides são vários, complexos e, em alguns casos, pouco conhecidos. A resistência pode decorrer de fatores que estão presentes antes que o nematóide penetre a raiz da planta (Huang, 1985). Nessa categoria, incluem-se o efeito repelente e/ou nematicida de determinadas substâncias químicas presentes no exsudato radicular de algumas plantas. O exemplo mais conhecido é a substância  $\alpha$ -Tertienil, produzida pelos cravos-de-defunto (*Tagetes* spp.), mas outras também têm efeito negativo sobre certos nematóides, como a nimbidina (produzida por *Azadirachta indica*) e o pirocatecol (por *Eragrostis curvula*), entre outras (Huang, 1985).

A expressão da incompatibilidade ou resistência depois da penetração (infecção) é basicamente a mesma observada para outros patógenos. Kaplan & Davis (1987) dividiram a resposta da resistência em duas fases: determinativa e expressiva. A primeira envolve a detecção do nematóide por células da planta, por uma reação do tipo elicitor-receptor. O elicitor provavelmente é produzido na glândula esofagiana do nematóide e é injetado no tecido do hospedeiro pelo estilete. Esse reconhecimento gera, direta ou indiretamente, um sinal responsável pela reação de hipersensibilidade, envolvendo ativação de genes, síntese

de m-RNA e transcrição de DNA. As secreções da glândula esofagiana de nematóides endoparasitos (*Meloidogyne* spp., *Heterodera* spp. e *Globodera* spp.) estão intimamente relacionadas com a suscetibilidade das plantas, pois, a partir delas, modificações celulares são induzidas e mantidas, como os sítios específicos de alimentação (células gigantes e síncitos) do nematóide (Hussey, 1985). A fase expressiva inclui uma sucessão de eventos de regulação gênica e modificações bioquímicas que foram iniciados com o processo de sinalização, prevenindo o desenvolvimento do nematóide. Nessa fase, não há desenvolvimento normal dos sítios de alimentação, que se degeneram. Dessa forma, em raízes de plantas resistentes, poucos nematóides desenvolvem-se até adultos, há formação de número maior de machos e quando eventuais fêmeas reproduzem, o fazem com taxas mais baixas de fecundidade. Assim, a reação de hipersensibilidade, já bastante estudada em doenças de plantas causadas por vírus, bactérias e fungos, também está intimamente relacionada com a resistência a nematóides e envolve eventos comuns a outros patógenos, como a agregação do citoplasma, aumento de ribossomos e retículo endoplasmático, desaparecimento de mitocôndrios, perda da permeabilidade de membranas etc. (Roberts, 1998). Veech & Endo (1970) foram os primeiros a demonstrar que as células gigantes produzidas em cultivares de soja resistentes, em resposta à alimentação do nematóide, sofriam colapso e morriam.

Após a penetração, os nematóides ainda podem ser afetados por compostos tóxicos já presentes nos tecidos das plantas (resistência estrutural pré-formada). Correlação positiva entre os teores de compostos fenólicos e a resistência de tomate a *M. incognita* já foi relatada. O ácido clorogênico também foi observado em maior concentração em variedades resistentes de tomate (Huang, 1985).

Algumas espécies de plantas, especialmente leguminosas, podem rapidamente sintetizar compostos antimicrobianos de baixo peso molecular, chamados fitoalexinas, em resposta à penetração de nematóides (Huang, 1985). Em soja, observaram-se maior produção e acúmulo da fitoalexina gliceolina na variedade Centennial, resistente a *M. incognita*, quando inoculada com esse parasito. Já na variedade Pickett 71, suscetível, houve menor acúmulo. Entretanto, quando 'Centennial' foi inoculada com *M. javanica*, ao qual é suscetível, não houve acúmulo expressivo de gliceolina (Kaplan *et al.*, 1980a e

1980b). *Meloidogyne incognita* parece ser bem mais sensível à ação dessa fitoalexina do que *M. javanica*, que suportou elevadas concentrações em experimento *in vitro* (Huang, 1985).

Reações bioquímicas também seguem o mesmo padrão observado para outros tipos de doenças, como o aumento da atividade de determinadas enzimas, como catalase, peroxidase e polifenoloxidase (Roberts, 1998).

#### 2.2.4 A Base Genética da Resistência

O marco inicial da análise genética da resistência ocorreu 35 anos após as descobertas de Mendel, que postulou a existência de unidades discretas de herança passadas dos pais aos filhos. Essas unidades são atualmente conhecidas por genes. Logo no início, houve divisão entre os cientistas que trabalhavam na área, formando a escola Mendeliana, que acreditava que os caracteres herdados na progênie invariavelmente apresentava distribuição fenotípica descontínua. Já a escola Biométrica proclamava, com razão, que a maioria das características apresentava variação contínua, não se adaptando às leis Mendelianas (Camargo, 1995). Hoje, sabe-se que essas diferenças na distribuição fenotípica são devidas ao número de genes que governa a característica. Os biometristas optaram por procedimentos estatísticos de análises de médias e de variâncias para descrever o espectro da variação fenotípica em populações.

A maioria dos trabalhos disponíveis sobre a natureza da herança da resistência a nematóides tem tratado de monogenes de efeitos maiores. No entanto, isso se deve a maior dificuldade em se trabalhar com heranças quantitativas. Ainda assim, alguns casos têm sido documentados também para essa modalidade. Kreike *et al.* (1993), trabalhando com o patossistema *Solanum spegazzinii* – *Globodera rostochiensis*, observaram que a resistência é quantitativa, envolvendo pelo menos dois genes maiores com efeitos aditivos, responsáveis por 22% da variação genética, e por vários outros genes de menor efeito. Esses genes de pequeno efeito também operam de acordo com a teoria 'gene a gene', como foi inicialmente sugerido por Parlevliet & Zadoks (1977) para patógenos vegetais. Tal

cenário, de vários genes menores independentes com pequeno efeito aditivo, dificulta a transferência e manutenção de genes de resistência em variedades superiores.

Os cruzamentos dos genótipos resistentes de soja Gordon, PI 230977 e PI 80466 com o progenitor suscetível CNS indicaram que a herança da resistência a *M. javanica* também é quantitativa, ou seja, governada por vários genes. Para os cruzamentos de 'Gordon' e PI 230977 com 'CNS', a suscetibilidade a *M. javanica* foi parcial a completamente dominante, o que não foi observado no cruzamento com PI 80466, quando foi necessário um modelo aditivo. O baixo componente de herdabilidade estimado para 'CNS' x PI 230977 indicou que PI 230977 possui um gene adicional para resistência a *M. javanica*, que não está presente em 'Gordon' e PI 80466. Da mesma forma, os resultados indicaram que 'Gordon', PI 230977 e PI 80466 possuem genes de resistência a *M. javanica* em diferentes locos ou diferentes alelos no mesmo loco (Luzzi *et al.*, 1995).

### 2.2.5 Marcadores Moleculares para a Resistência baseados no DNA

A exploração do polimorfismo na variação da seqüência de bases do DNA (ou RFLP, designativo de 'Restriction Fragment Length Polymorphism', em inglês) foi proposta pela primeira vez no início dos anos 80 (Botstein *et al.*, 1980). Desde então, vários métodos que revelam a existência de polimorfismos moleculares têm sido descritos na literatura, com destaque aos RAPDs ('Randomly Amplified Polimorphic DNA'), descritos pioneiramente em soja por Williams *et al.* (1990). Esses marcadores, juntamente com os RFLPs, têm sido amplamente utilizados para o estudo da diversidade genética em plantas e constituem-se na "primeira geração" de marcadores moleculares.

No entanto, deve-se ressaltar que o emprego do RFLP e/ou RAPD esbarra em problemas técnicos intrínsecos à natureza do marcador. Assim, o RFLP é tecnicamente trabalhoso (e conseqüentemente moroso), de difícil automação, e, no caso da soja, apresenta um agravante que é a baixa "informatividade" (medida pela diversidade gênica), uma vez que em 90% dos locos analisados, somente dois alelos diferentes foram encontrados (Lorenzen *et al.*, 1995). Comparado com o RFLP, o surgimento do RAPD

representou um avanço técnico no que se refere à simplicidade e perspectiva de automação mediante a incorporação da técnica de PCR ('Polymerase Chain Reaction'), destacando-se a necessidade de pouca quantidade de DNA, a eliminação das etapas de transferência e hibridização, e a possibilidade de se amostrar um maior número de locos (1 a 10) num mesmo gel (Ferreira & Grattapaglia, 1996). Em contrapartida, o RAPD pode apresentar sérios problemas de reprodutibilidade, que dificultam a sua aplicação em larga escala e, além disso, não representou avanço maior na "informatividade".

Mais recentemente, dois outros tipos de marcadores vem sendo desenvolvidos como alternativas para contornar esses problemas: o AFLP ('Amplified Fragment Length Polymorphism') e, principalmente, os Microssatélites, que passam a ser descritos com mais detalhes na seqüência.

Microssatélites, também conhecidos como SSR ('Simple-Sequence-Repeat'), entre outras denominações, consistem numa subclasse de DNA repetitivo formada por pequenas seqüências (2 a 5 nucleotídeos) repetidas *em tandem*, tais como (AT)<sub>n</sub>, (ATT)<sub>n</sub> etc.. A variação no número de repetições (n) dessas seqüências gera uma grande quantidade de polimorfismo, tornando-as bastante atraentes para estudos genéticos. Na prática, esse polimorfismo é detectado através de uma amplificação exponencial em cadeia (PCR) a partir de *primers* complementares às extremidades imediatamente adjacentes ao Microssatélite (de forma a gerar um produto de amplificação normalmente inferior a 300 pares de bases), seguido por fracionamento em gel de agarose ou de poliacrilamida (dependendo do tamanho do fragmento amplificado). A escolha desses *primers* requer o prévio conhecimento da seqüência de DNA das regiões adjacentes ao Microssatélite e, como muitos deles estão localizados em genes, várias dessas seqüências podem ser encontradas através de uma simples busca em banco de dados de DNA (GenBank, EMBL etc). As regiões adjacentes aos Microssatélites são suficientemente conservadas para permitir a amplificação do DNA de diferentes indivíduos (linhagens, cultivares, raças etc.), muitas vezes até de diferentes espécies, com o mesmo par de *primers*. Portanto, ao contrário do que ocorre com o RAPD, em que os *primers* são pequenos e arbitrários, aqui os *primers* e as condições de amplificação são suficientemente específicos para amplificar um único loco em

condições facilmente reproduzíveis. Fica também claro que, devido ao fato de o polimorfismo consistir numa diferença de tamanho dos fragmentos amplificados, os Microssatélites, tal como o RFLP, são marcadores de natureza co-dominante, pois os dois alelos podem ser detectados em indivíduos heterozigotos.

Microssatélites já são amplamente utilizados em estudos genéticos com humanos e camundongos, sendo que mais de cinco mil desses locos já foram mapeados (Dietrich *et al.*, 1996). Curiosamente, a ocorrência desse tipo de polimorfismo em plantas foi demonstrada pela primeira vez em soja (Akkaya *et al.*, 1992; Morgante & Olivieri, 1993). Além da alta reprodutibilidade, os Microssatélites são também muito informativos. Por exemplo, os Microssatélites disponíveis em soja detectam em média 7 alelos diferentes, sendo que até 23 alelos distintos já foram encontrados para um mesmo loco (Rongwen *et al.*, 1995). Microssatélites vem sendo utilizados na caracterização de germoplasma de diversas espécies de plantas, principalmente naquelas com baixo nível de polimorfismo. Por exemplo, Akagi *et al.* (1997) fizeram uma análise de cultivares japonesas de arroz empregando Microssatélites e encontraram uma grande diversidade de genes mesmo entre as cultivares altamente relacionadas.

A seleção de plantas para a resistência a nematóides assistida por marcadores moleculares pode acelerar o trabalho de melhoramento. Em tomate, o gene *Mi*, que confere resistência a *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria*, foi encontrado próximo ao loco da fosfatase ácida-1 (*Aps-1*). Assim, a seleção baseada nessa característica acelerou a obtenção de cultivares resistentes, além de não requerer manutenção de populações, multiplicação e inoculação das plantas com esses nematóides. O desenvolvimento de mapas de RFLP para muitas espécies de plantas cultivadas poderá permitir a identificação de marcas ligadas a genes de resistência a nematóides, como é o caso de nematóides de galhas em soja (Tamulonis *et al.*, 1997c). A obtenção de tais marcas possibilitará a introgressão rápida de genes específicos em programas de melhoramento, acelerando a obtenção de variedades resistentes superiores (Boerma & Hussey, 1992).

## 2.2.6 Resistência genômica de 'hot-spots'

Alguns genes de resistência mantêm uma associação física numa mesma região genômica (homologia). O caso mais bem documentado de genes de resistência localizados em agregados é a região do gene *Mi* do cromossomo 6 do tomateiro, sabidamente uma região rica em genes de resistência a uma série de doenças e pragas. Em adição ao gene de resistência a nematóides do gênero *Meloidogyne* (*Mi*), já foram detectados genes de resistência a *Cladosporium fulvum* (genes ou alelos *cf-2* e *cf-5*), a *Oidium lycopersicum*, ao afídeo *Macrosiphum euphorbiae*, entre outros (Roberts, 1990).

Vários locos controladores de características quantitativas ('QTL') de resistência também têm sido detectados formando agregados numa mesma região genômica do grupo de ligação F da soja (Tabela 1). Tamulonis *et al.* (1997a, 1997b) observaram, na região do marcador de RFLP B212, genes de resistência a *M. javanica* e *M. arenaria*, originários das fontes de resistência PI230977 e PI200538, respectivamente. A partir desses dados e ao longo do estudo, obtiveram a linhagem de soja PI 595099 (Tamulonis *et al.*, 1997b), com o mais elevado nível de resistência a *M. javanica* disponível.

Tabela 1. Genes de resistência a doenças da soja e 'QTL's localizados no grupo de ligação F (adaptado do original de Tamulonis *et al.*, 1997b) no mapa do USDA /ARS-IS (Shoemaker & Specht, 1995)

Patógeno	Gene / Fonte de resistência	Marcador de RFLP
Vírus do mosaico da soja	Rsv1	A186D (A186-1)
Peanut mottle virus	Rpv1	A186D (A186-1)
<i>Heterodera glycines</i>	PI 90763	A186D (A186-1)
<i>Meloidogyne javanica</i>	PI 230977	B212T (B212-1)
<i>Meloidogyne arenaria</i>	PI 200538	B212T (B212-1)
<i>Pseudomonas syringae</i>	Rpg1	K644-1
pv. <i>Glycinea</i>	Rps3	R045I

### **3. MATERIAL & MÉTODOS**

#### **3.1 Descrição dos Genótipos**

Para a realização do estudo foram utilizados como parentais os cultivares de soja BRS 133, Coodetec 201 e o genótipo PI 595099. A escolha foi baseada em resultados de pesquisas anteriores e em dados pertinentes ao assunto disponíveis na literatura especializada, tanto nacional como internacional. Características relevantes dos parentais são apresentadas a seguir e nas tabelas 2 e 3.

- 1. BRS 133 (= Embrapa 133) :** Progenitor padrão de suscetibilidade a *M. javanica*. Cultivar desenvolvido pelo Centro Nacional de Pesquisa de Soja da Embrapa (Embrapa Soja), tendo como origem uma planta selecionada na população F<sub>5</sub> do cruzamento de FT Abyara e BR83-147, conduzida pelo método genealógico modificado. Na média de 30 ambientes, apresentou produtividade maior que a de BR-16, um cultivar muito plantado no estado do Paraná em razão do seu bom rendimento. É do grupo semiprecoce, com hábito de crescimento determinado e resistência ao acamamento e à deiscência de vagens (Tabela 2). Apresenta também boa resistência a algumas doenças importantes para a sojicultura (Tabela 3).

**Coodetec 201:** Cultivar desenvolvido pela Central Agrícola Agropecuária de Desenvolvimento Tecnológico e Econômico LTDA (COODETEC) e obtido pelo cruzamento de OCEPAR 4 (= Iguçu) com o genótipo W20 (Tabela 2). Tem mostrado resistência de campo a *M. javanica* e *M. incognita*. Apresenta também boa resistência a outras doenças importantes para a sojicultura (Tabela 3).

2. **PI 595099:** Linhagem desenvolvida pela Georgia Agricultural Experiment Station (E.U.A.), com ótima resistência a *M. javanica*, *M. incognita*, *M. arenaria* e às raças 3 e 14 do nematóide de cisto da soja, *H. glycines*. Tem resistência a *M. javanica* comparável à de PI 230977, que possui o mais alto nível de resistência ao nematóide já identificado no germoplasma da soja. Foi obtida pelo cruzamento de G83-559 x (G80-1515 x PI 230977) e tinha o número de germoplasma G93-9223. Tem produtividade eqüivalente à do cultivar Bryan e 95% superior à de PI 230977 (Luzzi *et al.*, 1997).

Tabela 2. Dados de origem e características morfológicas e fitotécnicas dos genótipos de soja utilizados nos cruzamentos.

<b>Cultivar</b>	<b>BRS 133<sup>1</sup></b>	<b>Coodetec 201<sup>1</sup></b>	<b>PI 595099<sup>2</sup></b>
<b>Genealogia</b>	FT-Abyara x BR83- 147	OCEPAR 4 (5) x W20	G83-559 x (G80- 1515 <sup>3</sup> x PI 230977)
<b>Linhagem</b>	BR91-12418	OC 95(4) - 2422	G93-9223
<b>Origem</b>	Embrapa Soja	OCEPAR/ COODETEC	Univ. da Georgia
<b>Lançamento</b>	1997	1996	1997
<b>Semente básica</b>	Embrapa	COODETEC	Univ. da Georgia
<b>Recomendação</b>	Paraná	Paraná	-
<b>Cor do hipocótilo</b>	Verde	Verde	Verde
<b>Cor da flor</b>	Branca	Branca	Branca
<b>Cor pubescência</b>	Marrom	Cinza	Marrom
<b>Cor da vagem</b>	Marrom clara	Marrom clara	Marrom
<b>Cor do tegumento</b>	Amarelo claro fosco	Amarelo	Amarelo
<b>Cor do hilo</b>	Marrom	Marrom claro	Preto
<b>Maturação</b>	Semiprecoce	Semiprecoce	Precoce
<b>Altura da planta</b>	82 cm	84 cm	-
<b>Acamamento</b>	Resistente	Mod. suscetível	-
<b>Peso de 100 grãos</b>	16,0 g	16,1 g	-
<b>Deiscência</b>	Resistente	Resistente	-
<b>Qualidade/semente</b>	Média	Boa	-
<b>Reação à peroxidase</b>	-	Positiva	-

<sup>1</sup>- Embrapa, (1998); <sup>2</sup>- Luzzi *et al.* (1997)

Tabela 3. Reação dos genótipos usados nos cruzamentos a alguns patógenos importantes para a sojicultura.

Patógeno	BRS 133 <sup>1</sup>	Coodetec 201 <sup>1</sup>	PI 595099 <sup>2</sup>
<i>Diaphorte phaseolorum</i> f.sp. <i>meridionalis</i> (Cancro da haste)	R <sup>3</sup>	R	-
<i>Cercospora sojina</i> (Mancha olho-de-rã)	R	R	-
<i>Corynespora cassiicola</i> (Mancha alvo)	-	-	-
<i>Microspheera diffusa</i> (Oídio)	MR	AS	-
Mosaico comum da soja	-	S	-
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>glycinea</i> (Crestamento bacteriano)	MR	-	-
<i>Meloidogyne javanica</i>	S	R	R
<i>Meloidogyne incognita</i>	S	R	R
<i>Meloidogyne arenaria</i>	S	-	R
<i>Heterodera glycines</i>	S	S	R
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>glycines</i>	R	-	R

<sup>1</sup> - Embrapa (1998); <sup>2</sup> - Luzzi *et al.* (1997); <sup>3</sup> - Tipo de reação: R = resistente; MR= moderadamente resistente; S = suscetível; AS = altamente suscetível.

### 3.2 Obtenção das Sementes

Foram semeados cinco vasos por semana com cada parental (4 plantas/vaso) durante quatro semanas, para que ocorresse coincidência de floração entre os diferentes parentais. Os cruzamentos foram realizados diariamente, durante o período em que houve flores adequadas, visando obter o maior número de sementes possível para cada cruzamento. Recíprocos foram obtidos do cruzamento dos genótipos parentais, que serviram ora como doador de pólen (pai), ora como receptor de pólen (mãe). Isso foi feito para saber se há efeito materno entre os genótipos para o caráter estudado.

A metade das sementes (F<sub>1</sub>) obtidas em cada cruzamento foi semeada e o restante guardado em câmara fria. Quando as plantas estavam bem desenvolvidas, de cada vaso foram retiradas folhas para a extração de DNA e confirmação, por marcadores moleculares de RAPD, de que o cruzamento foi realizado com sucesso. Além disso, marcadores fenotípicos (cor da flor, da pubescência e do hilo) foram utilizados. As sementes (F<sub>2</sub>) produzidas pelas plantas F<sub>1</sub> foram semeadas novamente, junto com a metade das sementes do cruzamento inicial (F<sub>1</sub>), que estavam guardadas em câmara fria. Tal procedimento permitiu a obtenção de sementes F<sub>3</sub>, F<sub>2</sub> e dos parentais com mesma idade fisiológica, evitando outras fontes de variação nos resultados das avaliações da resistência das plantas. Além disso, todas as sementes foram produzidas em casa-de-vegetação para minimizar os riscos de polinização cruzada por insetos. Folhas de todas as plantas F<sub>2</sub> e dos parentais foram retiradas para a extração de DNA, objetivando os testes com os marcadores moleculares de microssatélites.

### **3.3 Avaliação da Resistência de Plantas de Soja a *Meloidogyne javanica***

O trabalho foi conduzido em casa-de-vegetação, com controle de temperatura e com luz suplementar. Diariamente, as temperaturas do substrato e do ambiente (máxima e mínima) foram registradas.

A população de *M. javanica* utilizada foi originária do Centro Nacional de Pesquisa de Soja da Embrapa (Embrapa Soja). O inóculo foi multiplicado em plantas de soja cv. Doko durante todo o período das inoculações, de modo a se dispor sempre de ovos com boa viabilidade. A extração dos ovos das raízes foi feita segundo o protocolo proposto por Hussey & Barker (1973), sendo quantificados, para fins de calibragem do inóculo, com auxílio de câmara de contagem, ao microscópio óptico.

Foram estudadas 120 famílias F<sub>2,3</sub>, com 14 repetições, 120 indivíduos F<sub>2</sub> e 60 indivíduos de cada parental para cada cruzamento. Sementes de soja dessas gerações, para cada cruzamento, foram semeadas em tubetes plásticos (com 4,5 cm de diâmetro e 19 cm de comprimento) contendo substrato formado por uma mistura solo : areia (3:1) esterilizada com brometo de metila. Aos 3-4 dias após a emergência, os ovos de *M.*

*javanica* foram depositados no solo, a cerca de 2 cm de profundidade, em dois orifícios feitos próximos ao colo das plântulas, na densidade (= Pi) de 3000 ovos por plântula (Luzzi *et al.*, 1987).

A avaliação da resistência foi feita 30 dias após a inoculação, contando-se o número total de galhas em cada sistema radicular. Para o cruzamento entre BRS 133 e Coodetec 201, as raízes das plantas foram pesadas, obtendo-se o número de galhas por grama de sistema radicular. Para os cruzamentos BRS 133 x PI 595099 e Coodetec 201 x PI 595099, as plantas resistentes foram replantadas após a contagem de galhas. Isso permitiu que formassem sementes, que foram semeadas de novo até atingir a geração F<sub>5</sub>. Essas linhagens serão avaliadas no campo, futuramente, para a aferição do potencial produtivo.

### 3.4 Genética Quantitativa

Além dos três parentais envolvidos, foram utilizadas as gerações segregantes F<sub>2</sub> e F<sub>3</sub>, oriundas desses cruzamentos (Tabela 4).

Os dados de contagem de galhas causadas por *M. javanica* foram organizados e analisados em computador pelo Sistema de Genética Quantitativa (SGQ) da Embrapa soja, que determina, para os parentais e gerações F<sub>2</sub> e F<sub>3</sub>, os graus de liberdade, as médias, as variâncias totais, as variâncias entre e dentro das famílias.

#### 3.4.1 Análise Genética dos Dados

As informações sobre a natureza dos efeitos genéticos envolvidos nos cruzamentos foram obtidas pelo ajuste de modelos genéticos para os componentes de média e variância. Para isso, foi usado o conjunto composto pelos parentais e as gerações segregantes F<sub>2</sub> e F<sub>3</sub>.

Tabela 4. Parentais e gerações segregantes utilizados no experimento com os respectivos números de famílias e indivíduos dentro de cada família.

Genótipos	Número de	
	Famílias	Indivíduos
BRS 133	-	60
Coodetec 201	-	60
PI 595999	-	60
F <sub>2</sub> – BRS 133 x Coodetec 201	-	60
F <sub>2</sub> - Coodetec 201 x BRS 133	-	60
F <sub>2</sub> - BRS 133 x PI 595999	-	60
F <sub>2</sub> - PI 595999 x BRS133	-	60
F <sub>2</sub> - Coodetec 201 x PI 595099	-	60
F <sub>2</sub> - PI 595099 x Coodetec 201	-	60
F <sub>3</sub> - BRS 133 x Coodetec 201	60	14
F <sub>3</sub> - Coodetec 201 x BRS 133	60	14
F <sub>3</sub> - BRS 133 x PI 595999	60	14
F <sub>3</sub> - PI 595999 x BRS 133	60	14
F <sub>3</sub> – Coodetec 201 x PI 595999	60	14
F <sub>3</sub> - PI 595999 x Coodetec 201	60	14

#### 3.4.1.1 Componentes Genéticos de Média

A princípio, foi adaptado um modelo genético simples do tipo aditivo-dominante, envolvendo os componentes  $m$ ,  $[d]$  e  $[h]$  (Tabela 5). Nesse modelo,  $m$  foi definido como a média da distribuição genotípica de todas as linhagens puras extraídas, sem seleção, de um cruzamento (Van Der Veen, 1959), ou o valor médio entre os parentais;  $[d]$  representou a soma algébrica dos efeitos aditivos de todos os  $k$  locos pelos quais  $P_1$  e  $P_2$  diferiram; e  $[h]$  foi a soma algébrica dos efeitos de dominância dos mesmos  $k$  locos. Os parâmetros

genéticos dos componentes de média foram estimados pelo teste conjunto de escala de Cavalli (1952), utilizando-se um programa Fortran (Toledo, 1991). Esse teste proporciona uma avaliação da qualidade do ajuste do modelo genético, obtido através de um teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ). O teste de qui-quadrado possui um número de graus de liberdade igual ao número de gerações menos o número de parâmetros estudados. Quando o número de gerações é igual ao número de parâmetros genéticos, não sobram graus de liberdade para o teste de  $\chi^2$  de qualidade de ajuste do modelo genético.

Tabela 5. Componentes genéticos aditivos e dominantes de média dos parentais e de suas gerações segregantes, segundo Mather & Jinks (1982).

GERAÇÃO	m	[d]	[h]
P <sub>1</sub>	1	1	0
P <sub>2</sub>	1	-1	0
F <sub>2</sub>	1	0	1/2
F <sub>3</sub>	1	0	1/4

O teste conjunto de escala utiliza o método dos quadrados mínimos ponderados (Weighted Least Squares - WLS) para estimar os parâmetros genéticos, no qual é necessário fornecer os dados da média e variância observadas de cada geração, o grau de liberdade, as contribuições dos parâmetros de média para cada geração. O peso ( $W_i$ ) utilizado para ponderar a quantidade de informação fornecida por geração é obtido a partir do inverso da variância das médias ( $V_x$ ) de cada geração. A variância das médias, por sua vez, é obtida pela divisão da variância de cada geração pelo número de indivíduos que a compõem (Oliveira, 1994). O ajuste de um modelo genético envolvendo tão somente efeitos aditivos e dominantes (m, [d] e [h]), que podem ser estimados a partir dos dados apresentados na tabela 6.

Tabela 6. Informações necessárias para o teste conjunto de escala envolvendo dois progenitores mais as suas gerações segregantes F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub>, conforme Souza (1992).

Ger.	N	V <sub>x</sub>	Peso (W <sub>i</sub> )	Média esperada			Média Obs. Y <sub>i</sub>
				m	[d]	[h]	
P <sub>1</sub>	n <sub>1</sub>	VP <sub>1</sub> /n <sub>1</sub>	n <sub>1</sub> /VP <sub>1</sub>	1	1	0	P <sub>1</sub>
P <sub>2</sub>	n <sub>2</sub>	VP <sub>2</sub> /n <sub>2</sub>	n <sub>2</sub> /VP <sub>2</sub>	1	-1	0	P <sub>2</sub>
F <sub>2</sub>	n <sub>3</sub>	VF <sub>2</sub> /n <sub>3</sub>	n <sub>3</sub> /VF <sub>2</sub>	1	0	1/2	F <sub>2</sub>
F <sub>3</sub>	n <sub>4</sub>	VF <sub>3</sub> /n <sub>4</sub>	n <sub>4</sub> /VF <sub>3</sub>	1	0	1/4	F <sub>3</sub>

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

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

sendo que os elementos entre parêntesis são obtidos por:

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

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

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

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

onde:  $O_i$  = média observada da  $i$ -ésima população

$E_i$  = média esperada da  $i$ -ésima população

$W_i$  = peso da  $i$ -ésima população

$n$  = número de gerações

$P$  = número de parâmetros do modelo genético

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

Quando o modelo genético mostrou-se insatisfatório para explicar os mecanismos genéticos no controle dessas características, ou seja, apresentou um  $\chi^2$  significativo ao nível de 5% de probabilidade, foi testado um novo modelo, com a presença de interação não alélica entre pares de locos, adicionando-se ao modelo genético o componente [  $i$  ]. O componente [  $i$  ] representa a interação dos locos em homozigose (epistasia do tipo aditivo x aditivo). Tais estimativas foram realizadas da mesma maneira para todos os conjuntos de gerações referidos. As proporções dos componentes de  $m$ , [  $d$  ], [  $h$  ], [  $i$  ] presentes nas gerações utilizadas para determinar o modelo é apresentada na tabela 7.

Tabela 7. Componentes genéticos aditivos, dominantes e epistáticos de média dos parentais e de suas gerações segregantes, segundo Mather & Jinks (1982).

Geração	m	[d]	[h]	[i]
P <sub>1</sub>	1	1	0	1
P <sub>2</sub>	1	-1	0	1
F <sub>2</sub>	1	0	1/2	0
F <sub>3</sub>	1	0	1/4	0

### 3.4.1.2 Componentes Genéticos e Ambientais de Variância

As gerações parentais e F<sub>2</sub> possuem apenas variância entre indivíduos dentro de geração ou simplesmente 'variância dentro', pois tais gerações não têm estrutura de famílias (Oliveira, 1994). As gerações F<sub>3</sub> são compostas por famílias de progênie e as análises de variância realizadas com elas são constituídas por:

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

Essa análise é realizada devido ao fato de o método de derivação e condução das progênie não permitir a distinção das diversas variâncias dentro de grupos de famílias, que ficam incorporadas como variância entre famílias (Tabela 8).

Tabela 8. Componentes do modelo genético simples presentes nas variâncias dos parentais e de suas gerações segregantes, mostrando as variâncias entre famílias (QME) e das variâncias dentro de famílias (QMD).

Var/Equações	D	H	E	Varição De Amostragem
VP <sub>1</sub>	0	0	1	0
VP <sub>2</sub>	0	0	1	0
V <sub>1</sub> F <sub>2</sub>	1/2	1/4	1	0
V <sub>1</sub> F <sub>3</sub>	1/2	1/16	0	(1/n*) V <sub>2</sub> F <sub>3</sub>
V <sub>2</sub> F <sub>3</sub> = QMD	1/4	1/8	1	0

\*: n = número de indivíduos que compõe cada família, ou sua média harmônica quando o número difere entre famílias.

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

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

Não havendo o ajuste do modelo genético envolvendo os componentes D, H, e E a essas gerações, foi adaptado um outro modelo envolvendo interação genótipo x micro-ambiente (Tabela 9). O termo 'interação genótipo x micro-ambiente' citado está relacionado à interação diferenciada de cada genótipo com o ambiente ao qual foi submetido (Mather &

Jinks, 1982), não havendo conotação com macro-ambientes contrastantes (anos, locais e outros). Esse modelo só foi aplicado depois de analisado o teste de escala para detecção de interação genótipo x micro-ambiente. Nesse caso, os componentes  $E_1$  e  $E_2$  foram adaptados ao modelo, representando os erros de  $P_1$  e  $P_2$ , respectivamente.

Tabela 9. Componentes de variância genética aditiva, de dominância e de interação genótipo x micro-ambiente dos parentais e de suas gerações segregantes.

GERAÇÃO	D	H	$E_1$	$E_2$
VP <sub>1</sub>	0	0	1	0
VP <sub>2</sub>	0	0	0	1
VF <sub>2</sub>	1/2	1/4	1/2	1/2
VF <sub>3e</sub>	$n/2+1/4$	$n/16+1/8$	1/2	1/2
VF <sub>3d</sub>	1/4	1/8	1/2	1/2

### 3.4.1.3 Herdabilidade

*“A herdabilidade é um dos parâmetros genéticos que mais contribui para o trabalho do melhorista. Ela fornece a proporção da variância genética presente na variância fenotípica total. Dessa forma, mede a confiabilidade do valor fenotípico como indicador do valor reprodutivo”.*

*Ramalho et al., 1990, p.221*

Vários métodos podem ser utilizados para estimar a herdabilidade. Aqui, a herdabilidade ( $h^2$ ) foi estimada a partir dos progenitores e das gerações  $F_2$  e  $F_3$ . A herdabilidade pode apresentar sentido restrito, referindo-se à proporção da variância total constituída pela variância genética aditiva, ou sentido amplo, referindo-se à

contribuição de toda a variância herdável para a variância total: A herdabilidade com sentido restrito, que é aquela com maior interesse para programas de melhoramento, pode ainda ser a nível de planta individual ( $h^2_p$ ), ou a nível de média ( $h^2_m$ ) da família F<sub>3</sub>. Para obtenção desses estimadores, utilizaram-se as equações:

$$h^2_p = (0.5 \times D) / (0.5 \times D) + (0.25 \times H) + E$$

$$h^2_m = (0.5 \times D) / (0.5 \times D) + (0.25 \times H) + E/n$$

### 3.5 Marcadores Moleculares para a Resistência a *Meloidogyne javanica*

A extração do DNA de 120 plantas individuais F<sub>2</sub> e dos parentais dos cruzamentos entre BRS 133 (suscetível) x Coodetec 201 (resistente) e BRS 133 (suscetível) x PI 595099 (resistente) seguiu o protocolo proposto por Keim *et al.* (1988). Assim, 1 g de cada planta foi triturado em almofariz, em presença de N<sub>2</sub>. Cada amostra foi colocada em tubos de propileno de 1,5 ml e ressuspendida em 4 vezes o volume da amostra de tampão de extração (2,0 mL de CTAB 5%; 2,8mL de NaCl 5M; 0,4 mL de EDTA 0,5M; 1,0 mL de Tris-HCl 1M, pH 8,0; 0,01 mL de β Mercapto-etanol 0,1% e 3,7 mL de água). Os tubos devidamente identificados foram incubados em água aquecida a 65 °C, por 60 minutos. A cada 15 minutos, os tubos eram cuidadosamente invertidos.

Após esse período, os tubos foram retirados e, já resfriados, acrescentou-se a cada amostra 700 µl da solução clorofórmio : álcool isoamílico (24:1). Os tubos foram suavemente invertidos durante 5 minutos e centrifugados (Eppendorf - 5415C) a 6000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante (fase aquosa) foi transferido para novos tubos e novamente fez-se a adição de 700 µL da solução clorofórmio : álcool isoamílico, procederam-se às inversões por 5 minutos e à nova centrifugação por 15 minutos a 12000 rpm. Os ácidos nucléicos foram precipitados pela adição de isopropanol gelado (2/3 do volume) e suaves inversões. As amostras foram então deixadas durante toda a noite à temperatura de 4 °C.

Na seqüência, as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm por 10 minutos e a fase aquosa (sobrenadante) descartada. Adicionaram-se 500 µL de etanol 70% para lavagem do *pellets* e das paredes do tubo. Os *pellets* foram deixados para secar e

suspendidos em 400  $\mu\text{L}$  de TE (10 mL de Tris-HCl 1,0M, pH 8,0 e 1,0 mM de EDTA, pH 8,0). À cada amostra foi adicionada RNase na concentração final de 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , e os tubos foram mantidos a 37 °C por 45 minutos. O DNA foi novamente precipitado, pela adição de 1/10 do volume de NaCl 5M e 2 volumes de etanol 95% gelado, e as amostras mantidas a 4 °C durante toda a noite. Os *pellets* foram novamente suspensos em 400  $\mu\text{L}$  de TE pH 8,0. Finalmente, o DNA foi diluído e quantificado em espectrofotômetro (Micronal B382), por meio de leitura na faixa de 260 nm, e a sua pureza verificada pela relação entre as leituras das faixas de 260/280 nm.

As reações de PCR (Reação de Polimerase em Cadeia) foram realizadas em termociclador Perkin Elmer 9600 e foram constituídas de 3,0  $\mu\text{L}$  de DNA molde (10 ng/ $\mu\text{L}$ ); 6,7  $\mu\text{L}$  de água MilliQ; 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão de reação 10x (2,5 mM de Tris-HCl e 62,5 mM de KCl); 1,0  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (50 mM); 1,0  $\mu\text{L}$  de desoxinucleosídeotrifosfato (2,5 mM); 0,2  $\mu\text{L}$  de Taq-polimerase (5 U/ $\mu\text{L}$ ) e 0,7  $\mu\text{M}$  dos *primers* F e R (Research Genetics Inc.- Map Pairs™), chegando a um volume final para cada amostra de 17  $\mu\text{L}$ . Esses passos foram repetidos para cada combinação genótipo x marcador microssatélite.

Os programas de termociclagem foram compostos de desnaturação inicial a 94 °C por 7 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 50 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 2 minutos. Um ciclo de 72 °C por 7 minutos foi feito ao final. O produto da amplificação foi resolvido em gel de 0,7% de agarose (GibcoBRL) e 1,15% de aditivo clarificador de agarose (Synergel), preparado com TBE 1x (0,009 M Tris-borato e 2,0 mM EDTA) e corado com brometo de etídio (6,6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). A cada reação, foram adicionados 3  $\mu\text{L}$  de tampão de carregamento (0,25% de azul de bromofenol, 0,25 % de Xylene cyanol e 30 % de glicerol em água). Como referencial dos pesos moleculares, foram empregados 0,7  $\mu\text{g}$  de DNA Ladder 100pb (GibcoBRL).

A eletroforese foi feita a uma voltagem constante de 120 volts em tampão TBE 1x. O registro dos fragmentos separados foi feito em transluminador de luz ultra-violeta, com câmara fotográfica Polaroid contendo filme preto e branco de autoradiografia (Polaroid 667), ajustada para abertura 5,6 e exposição de 1 segundo.

Os 22 *primers* utilizados foram escolhidos a partir de banco de dados de DNA de soja (Cregan *et al.*, 1999) e amplificam seqüências localizadas nos grupos de ligação F e

D1, nos quais QTLs de resistência a *M. javanica* foram detectados a partir de marcadores de RFLP (Tamulonis *et al.*, 1997b), sendo os seguintes:

- Grupo de ligação F e flanqueando a marca A806-D (Tamulonis *et al.*, 1997b): Satt 586, Satt 269, Satt 423, Satt 160, Satt 516, Satt 595.
- Grupo de ligação F e flanqueando as marcas A186D e A757V (Tamulonis *et al.*, 1997b): Sat 133, Satt 114, SOYHSP 176.
- Grupo de ligação F e flanqueando as marcas B212T e R045I (Tamulonis *et al.*, 1997b): Satt 510, Satt 335, Satt 362, Satt 072, Sct 188, Satt 144, Satt 074.
- Grupo de ligação D1 e flanqueando a marca A725-2 (Tamulonis *et al.*, 1997b): Satt 216, Satt 095, Satt157, Satt266.

Análises de variância foram realizadas para todas as combinações entre os marcadores polimórficos e o parâmetro 'número de galhas', obtido com a média da família F<sub>3</sub>, como efeitos principais. Todas as análises estatísticas foram feitas com auxílio do programa de computador SAS.

## 4. RESULTADOS & DISCUSSÃO

### 4.1. Obtenção das sementes

O sucesso dos cruzamentos iniciais entre BRS 133, Coodetec 201 (CD 201) e PI 595099 foi confirmado mediante o emprego dos marcadores fenotípicos cor de pubescência e hilo das plantas F<sub>1</sub>. Não foi possível utilizar a cor da flor, pois todos os genótipos parentais apresentavam a mesma cor, ou seja, branca. Marcadores moleculares de RAPD (Operon Technologies) também foram empregados (Tabela 10), assegurando-se, dessa forma, a não utilização no trabalho de sementes oriundas de autofecundações, que, de fato, foram detectadas nas populações.

Tabela 10. Marcadores de RAPD usados para confirmação do sucesso dos cruzamentos entre os genótipos de soja BRS 133, Coodetec 201 e PI 595099.

<b>Genótipo Masculino</b>	<b>Genótipo Feminino</b>	<b>Marcador</b>
PI595099	BRS 133	OPX-03, OPH-04, OPG-04
PI595099	CD 201	OPX-03, OPH-04, OPG-04, OPD-11
BRS 133	CD 201	OPW-05, OPG-14
BRS 133	PI595099	OPG-14, OPN-05, OPW-05
CD 201	PI595099	OPN-05, OPD-11
CD 201	BRS 133	OPB-18, OPD-11

O modo como foram conduzidas as sementeiras para se conseguir o conjunto de gerações Parentais, F<sub>2</sub> e F<sub>3</sub>, permitiu a obtenção de sementes com mesma idade e boa

qualidade fisiológica. Não houve problemas com perda de experimentos em razão de baixa germinação das sementes. Entretanto, o método é bastante exigente em espaço de casa-de-vegetação e mão de obra.

#### **4.2 Avaliação da resistência de plantas de soja a *Meloidogyne javanica***

Cada cruzamento (incluindo o recíproco) foi avaliado em experimento separado e gerou 1.920 plantas individualizadas em tubetes. Foram necessárias 2,5 mesas (8,75 m<sup>2</sup>) para a condução das plantas, sendo 120 dos parentais, 120 da geração F<sub>2</sub> e 1.680 da geração F<sub>3</sub> distribuídos em 120 famílias.

Normalmente são usados vasos com 10 cm de diâmetro para avaliar a resistência de plantas a nematóides do gênero *Meloidogyne*, de acordo com proposta de padronização do International *Meloidogyne* Project (IMP) (Taylor & Sasser, 1978), o que demandaria aproximadamente 19 mesas (66,5 m<sup>2</sup>). Assim, a área ocupada pelos tubetes foi 7,6 vezes menor do que aquela normalmente utilizada.

As temperaturas diárias registradas na casa-de-vegetação, máxima, mínima, média e dentro do substrato (no interior do tubete), são apresentadas na Figura 1. Em todos os experimentos, as temperaturas foram ótimas para o desenvolvimento do nematóide. No primeiro experimento (BRS 133 x CD 201), ocorreram as temperaturas mais elevadas, com a média de 28,88 °C no solo. As mais baixas foram verificadas na avaliação do cruzamento entre BRS 133 x PI 595099, com média no solo de 26,79 °C.

Em todas as avaliações houve diferença significativa entre o número de galhas apresentadas pelo progenitor resistente e o suscetível (Tabelas 11, 16 e 21). A adoção do tubete como o tipo de recipiente representativo da unidade experimental foi vantajosa não só pela economia de espaço, mas também pela boa qualidade dos dados gerados.

### 4.3. Genética quantitativa

Não foi observado efeito de recíprocos (herança materna) em nenhum dos cruzamentos (dados não apresentados), fato já amplamente conhecido (Garland & Maxwell, 1978; Luzzi et al., 1995a e 1995b). Assim, os dados discutidos para cada cruzamento referem-se à soma dos recíprocos.

#### 4.3.1. BRS 133 x Coodetec 201

É um cruzamento do tipo suscetível x resistente. Nesse cruzamento foram estudadas duas variáveis: número de galhas por planta (NG) e o número de galhas por grama de raízes (NGR). Para os parentais (BRS 133 e CD 201), ambas foram significativamente ( $P < 0,01$ ) diferentes (Tabela 11).

O número médio de galhas (NG) das plantas F<sub>2</sub> aproximou-se mais da média de Coodetec 201, progenitor resistente, do que da média aritmética entre os pais (Tabela 11). Esta relação também foi observada para a variável número de galhas por grama de raízes (NGR), sugerindo que, na resistência a *Meloidogyne javanica*, proveniente de Coodetec 201, há efeito de dominância.

Tabela 11. Número de galhas (NG) e número de galhas por grama de raízes (NGR) causadas por *Meloidogyne javanica* nos parentais e nas gerações F<sub>2</sub> e F<sub>3</sub> derivadas do cruzamento entre BRS 133 e Coodetec 201.

Variável	Parentais		Média entre parentais	Progênie	
	BRS 133	Coodetec 201		F2	F3
NG	190,57	72,57	131,57	92,59	125,47
NGR	40,42	15,24	27,83	21,26	31,98

Os números de galhas observados no parental suscetível variaram de 100 a 328, enquanto que no parental resistente variaram de 22 a 155 (Figura 2.1 e 2.2). Para as plantas F<sub>2</sub> esses números variaram de 22 a 262, e, as médias das famílias F<sub>3</sub> variaram de

52,36 a 252,8 galhas por planta (Figuras 2.3 e 2.4). A distribuição do número médio de galhas das famílias F<sub>3</sub> e das plantas F<sub>2</sub> foi contínua, indicando que a resistência a *M. javanica* é herdada quantitativamente.

Para o parâmetro NGR, o parental suscetível variou de 16,81 a 116,25 e o resistente de 3,11 a 38,55 (Figura 3.1 e 3.2). As plantas F<sub>2</sub> variaram de 5,69 a 90,71 e as médias das famílias F<sub>3</sub> de 13,25 a 73,67 (Figura 3.3 e 3.4). Tais distribuições também indicam que a resistência a *M. javanica* é herdada quantitativamente.

#### 4.3.1.1. Análise genética dos dados

BRS 133 apresentou maior variabilidade entre indivíduos na reação a *M. javanica* (Tabela 12), a despeito de as plantas de todos os genótipos parentais utilizadas nos experimentos serem linhas puras (oriundas de uma mesma vagem). Entretanto, isso pode ser justificado pela variabilidade de vigor do sistema radicular das plantas e viabilidade dos ovos de *M. javanica* no inóculo, que têm efeito mais evidenciado em genótipos suscetíveis, aumentando a variância.

Tabela 12. Médias e variâncias do número de galhas (NG) e número de galhas por grama de raízes (NGR) das gerações parentais, F<sub>2</sub> e F<sub>3</sub> do cruzamento entre BRS 133 e Coodetec 201, inoculados com *Meloidogyne javanica*.

Geração	g.l.	NG		NGR	
		Média	Variância	Média	Variância
BRS 133	59	190,57	2.082,96	40,42	268,84
Coodetec 201	59	72,57	1013,47	15,24	81,47
F <sub>2</sub>	116	92,59	1811,35	21,26	149,84
F <sub>3</sub> total	1436	125,49	2.794,38	32,33	331,42
F <sub>3</sub> entre	117	-	6.557,95	-	1.309,46
F <sub>3</sub> dentro	1.319	-	1.535,66	-	222,33

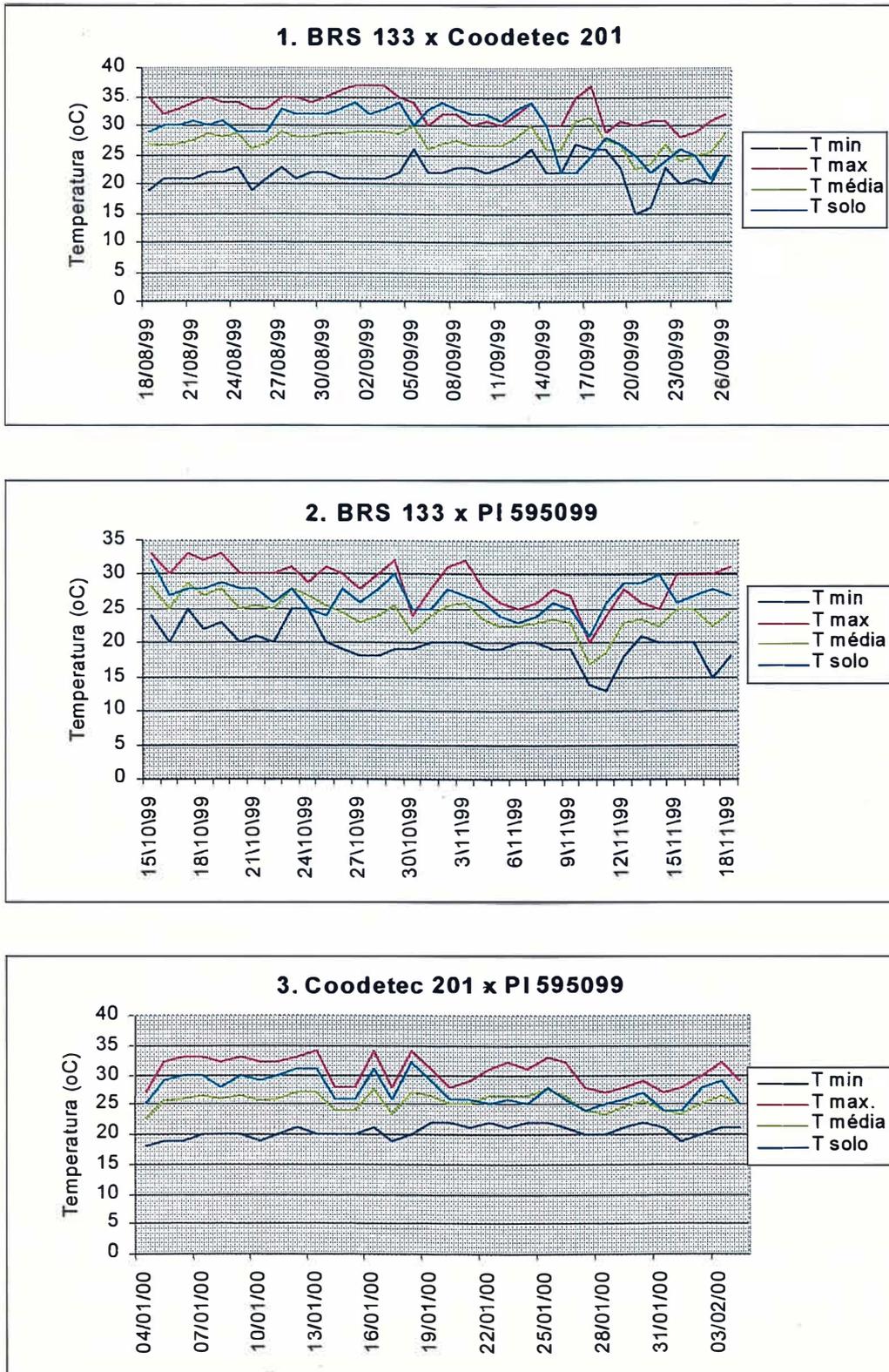


Figura 1. Evolução diária das temperaturas máxima, mínima, média e no solo no interior do tubete, em três experimentos realizados em casa de vegetação.

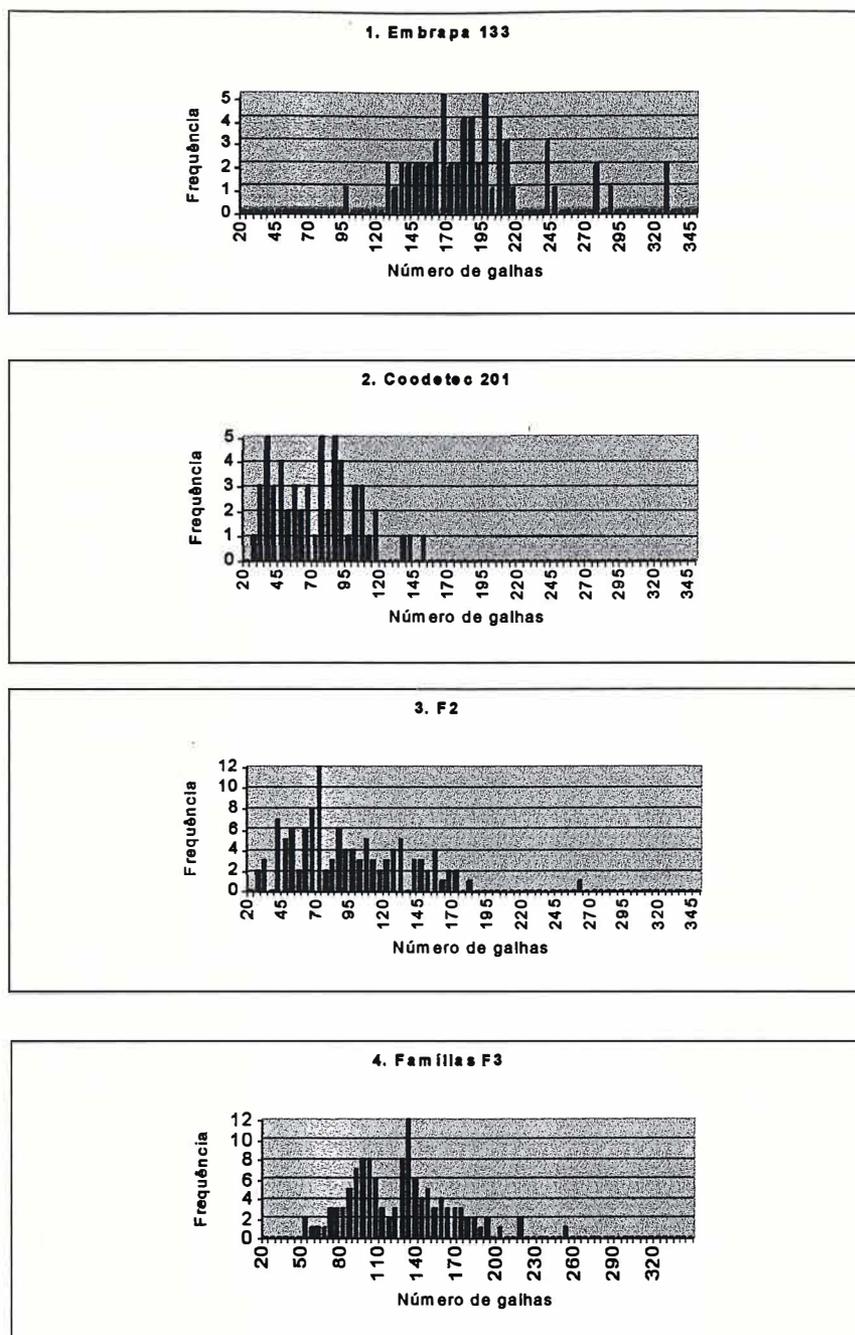


Figura 2. Distribuição das médias das famílias F<sub>3</sub> (4), indivíduos F<sub>2</sub> (3) e dos parentais BRS 133 (1) e Coodetec 201 (2) para o número de galhas (NG) por planta causadas por *M. javanica*.

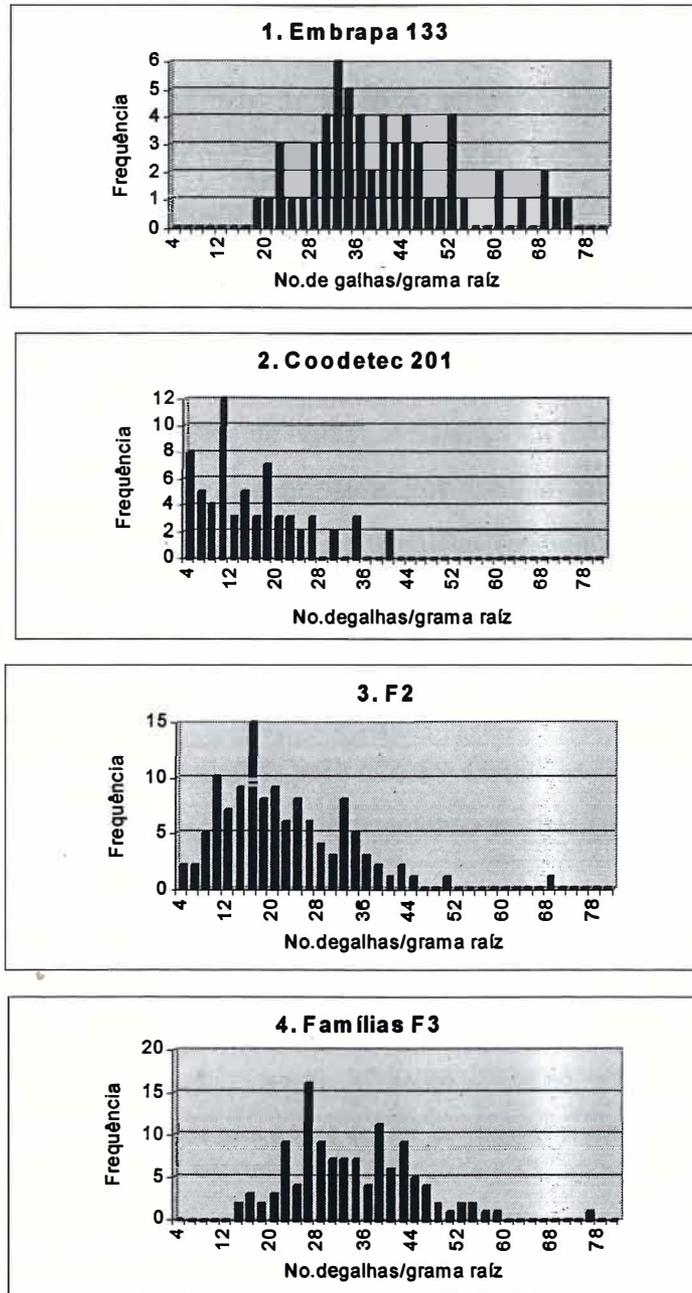


Figura 3. Distribuição da média das famílias F<sub>3</sub>, indivíduos F<sub>2</sub> e dos parentais para o número de galhas por grama de raíz (NGR) por planta causadas por *M. javanica* no cruzamento entre Embrapa 133 e Coodetec 201.

A variável NGR foi utilizada buscando corrigir o efeito da variabilidade do volume do sistema radicular das plantas, pois, teoricamente, um sistema radicular mais vigoroso apresenta maior número de sítios de infecção. De fato, a variância é bastante reduzida quando se trabalha com o número de galhas por grama de raízes (NGR), mas, ainda assim, é mais pronunciada em cultivares suscetíveis.

#### 4.3.1.1.1. Parâmetros genéticos obtidos pelos testes de médias e variâncias

De acordo com os testes de média, a herança da resistência do cruzamento entre BRS 133 e Coodetec 201 é controlada por efeitos aditivos (presença de d), de dominância (presença de h) e efeitos epistáticos (presença de i) do tipo aditivo por aditivo para os dois parâmetros utilizados (Tabela 13). Não sobraram graus de liberdade para os testes do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) para NG e NGR.

Tabela 13. Componentes de médias para número de galhas (NG) e número de galhas por grama de raízes (NGR) no cruzamento entre BRS 133 e Coodetec 201.

Variável	m	[ d ]	[ h ]	[ i ]	$\chi^2$	g.l.	P
NG	158,39	59,00	-131,6	-26,82	*	-	-
	±4,82	±3,59	±16,7	±6,01			
NGR	43,4	12,59	-44,28	-15,57	*	-	-
	±1,46	±1,21	±4,88	±1,90			

\*. Não sobraram graus de liberdade para o teste de Qui-quadrado (Perfect fit).

Os efeitos aditivos (D) predominam pelos testes de variância para NG, porém a reação dos parentais ao microambiente difere, pois  $E_1$  e  $E_2$  estão presentes no modelo (Tabela 14). Para NGR, efeitos aditivos (D) e de microambiente ( $E_1$  e  $E_2$ ) também foram significativos nos testes de variância, contudo o modelo foi insuficiente para detectar todos os efeitos presentes, pois o  $\chi^2$  foi significativo (Tabela 14).

A variável NGR não apresentou resultados superiores a NG. Além disso, para sua implementação, as plantas são necessariamente destruídas, não sendo possível o

replântio das mesmas. Assim, considerou-se mais vantajoso utilizar a contagem direta das galhas e basear-se na variável 'número de galhas' (NG), independente da massa do sistema radicular, procedimento adotado nos experimentos subsequentes envolvendo os demais cruzamentos.

De acordo com a presença de efeitos aditivos verificados pelos testes de média e de variância, há ganho genético quando é feita a seleção de plantas resistentes a *M. javanica* obtidas do cruzamento entre BRS 133 e Coodetec 201. Entretanto, como efeitos de dominância e epistáticos no sentido da resistência também estão presentes, a seleção deve ser feita preferencialmente em gerações mais avançadas, já que os genótipos ainda estarão segregando nas gerações precoces.

Tabela 14. Componentes de variâncias para número de galhas (NG) e número de galhas por grama de raízes (NGR) no cruzamento entre BRS 133 e Coodetec 201.

Variável	D	E1	E2	$\chi^2^*$	g.l	P
NG	814,53 ± 5,95	1.782 ± 9,64	931,31 ± 6,02	1,31 n.s.	2	0,52
NGR	166,55 ± 25,22	267,44 ± 23,37	81,34 ± 14,42	11,11	2	0,004

\*.  $\chi^2 = \Sigma(O-E)^2/E$

#### 4.3.1.1.2. Determinação do número de genes envolvidos na resistência

Um modelo com dois genes dominantes (9:7) é suficiente para explicar a distribuição observada para as variáveis NG e NGR. Para se chegar a isso, os gráficos de frequência das famílias  $F_3$  (Figuras 2.4 e 3.4) foram divididos em dois em seu ponto de inflexão. Na Figura 2.4, abaixo de 120 galhas foi formado o grupo de famílias com algum grau de resistência, e acima desse valor, o grupo dos suscetíveis. Na Figura 3.4, abaixo de 34 galhas por grama de raízes foi formado o grupo de famílias com algum

grau de resistência, e acima desse valor, o grupo dos suscetíveis. Os modelos foram testados e aceitos (Tabela 15).

Tabela 15. Distribuição de famílias F<sub>3</sub> [observado (O) e esperado (E)], com dois genes dominantes no sentido da resistência (9R:7S) para as variáveis número de galhas (NG) e número de galhas por grama de raízes (NGR).

		Resistentes	Suscetíveis	N	$\chi^2$ *	P
NG	Esperado	66,38	51,63	118	0,05696 <sub>n.s.</sub>	0,8113
	Observado	65	53			
NGR	Esperado	66,38	51,63	118	0,234 <sub>n.s.</sub>	0,62
	Observado	69	49			
Genótipo		A-B-	aabb, A-bb, aaB-			

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

#### 4.3.2. BRS 133 x PI 595099

É um cruzamento do tipo suscetível x resistente. Os números médios de galhas por planta nos parentais foram significativamente diferentes ( $P < 0,01$ ) (Tabela 16). As médias das gerações F<sub>2</sub> e F<sub>3</sub> foram praticamente iguais (148,66 e 148,16, respectivamente). Uma vez que os valores das médias da população F<sub>2</sub> = m + 1/2 [h], e das famílias F<sub>3</sub> = m + 1/4 [h] e esses valores foram equivalentes, há o indicativo que não existe efeito de dominância [h] na resistência a *M. javanica* vinda de PI595099, ou na suscetibilidade vinda de BRS 133.

Tabela 16. Número de galhas por planta (NG) causadas por *Meloidogyne javanica* nos parentais e progênie do cruzamento BRS 133 x PI 595099.

Variável	Parentais		Média entre Parentais	Progênie	
	BRS 133	PI 595099		F2	F3
NG	218,67	52,58	135,62	148,66	148,16

#### 4.3.2.1. Análise genética dos dados

Pelo exame das médias e variâncias relativas ao número de galhas (NG) (Tabela 17), pode ser observado que a variância do progenitor suscetível (BRS 133), a exemplo do cruzamento anterior, foi bastante alta.

Tabela 17. Médias e variâncias do número de galhas (NG) das gerações parentais, F<sub>2</sub> e F<sub>3</sub> do cruzamento entre BRS 133 e PI 595099.

Geração	N	NG	
		Média	Variância
BRS 133	60	218,67	2359,31
PI 595099	60	52,58	439,87
F <sub>2</sub>	107	148,66	3933,66
F <sub>3</sub> total	1162	148,16	4760,77
F <sub>3</sub> entre	119	-	9557,51
F <sub>3</sub> dentro	1044	-	1794,04

##### 4.3.2.1.1. Parâmetros genéticos obtidos pelos testes de médias e variâncias

A herança da resistência no cruzamento entre BRS 133 e PI 595099 é controlada por efeitos aditivos (presença de *d*) e por efeitos epistáticos entre os genes que controlam o caráter (presença de *i*). Efeitos de dominância [*h*] não estão presentes, de acordo com o teste de médias (Tabela 18), o que já vinha sendo evidenciado pela média das gerações segregantes. Ausência de efeitos de dominância também foi observado no cruzamento entre os genótipos de soja CNS e Jackson, inoculados com *M. arenaria* (Luzzi et al., 1995a). Da mesma forma, efeitos de dominância não foram detectados nos cruzamentos Bossier x PI 96354 e Bossier x PI 417444, inoculados com *M. incognita* (Luzzi et al., 1994a).

Os efeitos aditivos (D) predominam pelos testes de variância para NG, porém a reação dos parentais ao microambiente difere, pois  $E_1$  e  $E_2$  estão presentes no modelo. Além disso, como o modelo de variância foi insuficiente para detectar todos os efeitos presentes ( $\chi^2$  significativo), é provável que haja interação não alélica afetando as variâncias (Tabela 19).

Tabela 18. Componentes de médias para o número de galhas por planta (NG) no cruzamento entre BRS 133 e PI 595099.

<b>Cruzamento</b>	<b>m</b>	<b>[ d ]</b>	<b>[ h ]</b>	<b>[ i ]</b>	<b><math>\chi^2</math>*</b>	<b>g.l.</b>	<b>P</b>
<b>BRS 133 x PI 595099</b>	148,21	83,04	-	-12,58	0,006 <sub>n.s.</sub>	1	0,94
	$\pm 1,92$	$\pm 3,41$		$\pm 3,92$			

$$*\chi^2 = \Sigma (O-E)^2/E$$

Tabela 19. Componentes de variâncias para número de galhas por planta (NG) no cruzamento entre BRS 133 e PI 595099.

<b>Cruzamento</b>	<b>D</b>	<b>E1</b>	<b>E2</b>	<b><math>\chi^2</math></b>	<b>g.l.</b>	<b>P</b>
<b>BRS 133 x PI 595099</b>	1.983,8	2.345,8	439,39	24,9	2	0,0
	$\pm 285,98$	$\pm 214,44$	$\pm 79,82$			

$$*\chi^2 = \Sigma (O-E)^2/E$$

O parental suscetível apresentou números de galhas que variaram de 124 a 327 e o parental resistente variou de 18 a 118 (Figura 4.1 e 4.2). As distribuições das médias do número de galhas das famílias F3 variaram de 49 a 280,78 e das plantas F2 de 11 a 331. Ambas distribuições foram contínuas, mostrando que a resistência à formação de galhas causadas por *M. javanica* foi herdada quantitativamente (Figura 4.3 e 4.4).

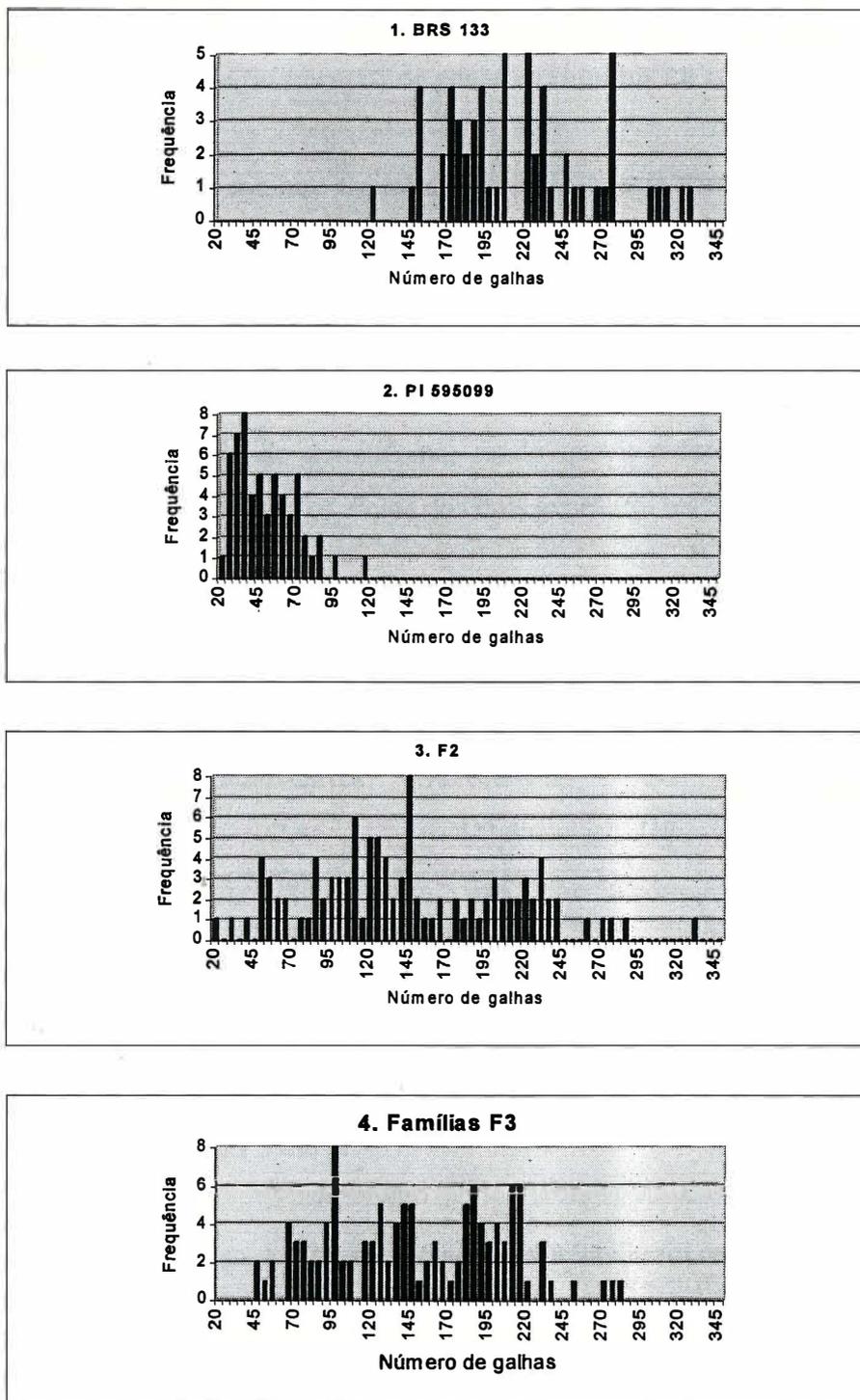


Figura 4. Distribuição das médias das famílias F<sub>3</sub> (4), indivíduos F<sub>2</sub> (3) e dos parentais BRS 133 (1) e PI 595099 (2) para o número de galhas (NG) por planta causadas por *M. javanica*.

#### 4.3.2.1.2. Determinação do número de genes envolvidos na resistência

Optou-se por denominar resistentes as famílias que apresentaram número médio de galhas inferior a 70, de acordo com a inflexão observada neste local dos gráficos de distribuição da médias das famílias F<sub>3</sub> e da população F<sub>2</sub> (Figuras 4.2 e 4.3).

Assim, cinco famílias foram classificadas como resistentes e o restante formou o grupo dos suscetíveis. Um modelo com dois genes complementares, com distribuição independente e ausência de dominância, sendo que a resistência é determinada por genótipos homocigóticos para os alelos dos dois genes, foi testado e aceito (Tabela 20).

Tabela 20. Teste de Qui-quadrado para o padrão de segregação com dois genes aditivos complementares (1R:15S) para a média do número de galhas (NG) da geração F<sub>3</sub>.

	Resistentes	Suscetíveis	N	$\chi^2$ *	P
<b>F3 Esperado</b>	7,4	111,6	119	0,83 <sub>n.s.</sub>	0,36
<b>F3 Observado</b>	5	114			
<b>Genótipo</b>	A <sub>1</sub> A <sub>1</sub> B <sub>1</sub> B <sub>1</sub>	A <sub>1</sub> -B <sub>1</sub> -; A <sub>1</sub> -B <sub>2</sub> B <sub>2</sub> ; A <sub>2</sub> A <sub>2</sub> B <sub>1</sub> -			

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

#### 4.3.3. Coodetec 201 x PI 595099

É um cruzamento do tipo resistente x resistente, e foi realizado para avaliar se os genes 595099 são os mesmos. A presença de segregação transgressiva, com famílias F<sub>3</sub> suscetíveis, é indicativo de que os genes oriundos das duas fontes de resistência são diferentes. Assim, 59 plantas de BRS 133 também foram avaliadas nesse experimento, como referências de suscetibilidade. Os números médios de galhas por planta das parentais Coodetec 201 e PI 595099 foram significativamente diferentes ( $P < 0,01$ ) (Tabela 21). Como no cruzamento anterior, aparentemente não houve efeito de domi-

nância na resistência, pois as médias das gerações segregantes foram praticamente iguais. Os valores de médias e variâncias estão apresentados na Tabela 22.

Tabela 21. Número de galhas por planta (NG) causadas por *Meloidogyne javanica* nos parentais e progênie do cruzamento entre Coodetec 201 e PI 595099.

	Parentais		Média entre	Progênie	
	Coodetec 201	PI 595099	Parentais	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>
NG	123,05	71,31	97,18	123,62	124,61

#### 4.3.3.1. Análise genética dos dados

As médias e variâncias do número de galhas (NG) para o cruzamento entre Coodetec 201 e PI 595099 são apresentadas na tabela 22.

Tabela 22. Médias e variâncias do número de galhas (NG) das gerações parentais, F<sub>2</sub> e F<sub>3</sub> do cruzamento Coodetec 201 x PI 595099.

Geração	N	NG	
		Média	Variância
BRS 133	59	224,91	854,94
Coodetec 201	57	123,05	485,30
PI 595099	55	71,31	289,96
F <sub>2</sub>	103	123,62	2.339,06
F <sub>3</sub> total	1031	124,61	1.669,21
F <sub>3</sub> entre	112	-	6.917,39
F <sub>3</sub> dentro	920	-	964,16

#### 4.3.3.1.1. Parâmetros genéticos obtidos pelos testes de médias e variâncias

A herança da resistência no cruzamento entre Coodetec 201 e PI 595099 é controlada por efeitos aditivos (presença de *d*) e por efeitos epistáticos (presença de *i*) (Tabela 23). Também não houve efeito de dominância [ *h* ], o que já vinha sendo evidenciado pela média das gerações segregantes  $F_2$  e  $F_3$ .

Tabela 23. Componentes de médias para o número de galhas por planta (NG) causadas por *M. javanica* no cruzamento Coodetec 201 x PI 595099.

Cruzamento	m	[ d ]	[ h ]	[ i ]	$\chi^2^*$	g.l.	P
Coodetec 201 x PI 595099	124,54 ±1,23	25,87 ±1,86	-	-27,36 ±2,23	0,042 <sub>n.s.</sub>	1	0,84

\*.  $\chi^2 = \Sigma(O-E)^2/E$

Os efeitos aditivos (D) predominam pelos testes de variância, porém a reação dos parentais ao microambiente difere, pois  $E_1$  e  $E_2$  estão presentes no modelo (Tabela 24). Como já foram detectados efeitos genéticos complicadores, como interação genótipo/microambiente, evidenciou-se que o modelo é complexo, com vários efeitos não aditivos envolvidos.

Tabela 24. Componentes de variâncias para o número de galhas por planta (NG) para o cruzamento Coodetec 201 x PI 595099.

Cruzamento	D	E1	E2	$\chi^2$	g.l.	P
Coodetec 201 x PI 595099	2.183,53 ±206,23	546,31 ±91,13	310,38 ±57,48	21,04	2	0,0

\*.  $\chi^2 = \Sigma(O-E)^2/E$

O parental PI 595099 apresentou números de galhas que variaram de 32 a 101, enquanto que Coodetec 201 variou de 81 a 162 (Figura 5.1 e 5.2). Nas plantas F<sub>2</sub>, a variação foi de 26 a 253, enquanto que as médias das famílias F<sub>3</sub> variaram de 36,8 a 200,1. Ambas distribuições das médias das famílias F<sub>3</sub> e da população F<sub>2</sub> foram contínuas, mostrando que a resistência à formação de galhas causadas por *M. javanica* foi herdada quantitativamente (Figura 5.3 e 5.4).

Dada a presença de segregação transgressiva na média das famílias F<sub>3</sub>, com a presença de uma (1) família com suscetibilidade igual a BRS 133 (95% do intervalo de confiança de BRS 133), além de diferença significativa entre as médias das famílias F<sub>3</sub>, deduz-se que os genes de resistência oriundos de PI 595099 e Coodetec 201 não são os mesmos. O "piramidamento" desses genes permitirá a obtenção de genótipos de soja altamente resistentes a *M. javanica*.

#### **4.3.3.1.2. Determinação do número de genes envolvidos na resistência**

De acordo com os resultados obtidos no cruzamento BRS 133 x Coodetec 201, dois genes, oriundos de Coodetec 201, determinam a resistência a *M. javanica*. No cruzamento BRS 133 x PI 595099, também 2 genes, oriundos de PI 595099, são responsáveis pela resistência. Considerando ainda que os genes dessas duas fontes de resistência não são os mesmos (presença de segregação transgressiva), pelo menos 3 genes devem estar envolvidos na resistência a *M. javanica* observada no cruzamento entre Coodetec 201 e PI 595099.

Denominou-se resistentes (comparável ou superior a PI 595099) as famílias F<sub>3</sub> que apresentaram número médio de galhas inferior a 95, de acordo com a inflexão observada neste local dos gráficos de distribuição da médias das famílias F<sub>3</sub> e da população F<sub>2</sub> (Figuras 5.2 e 5.3). Assim, 12 famílias foram classificadas como resistentes. Entretanto uma delas possuía resistência superior a PI 595099, pois apresentou número médio de galhas inferior ao limite inferior do intervalo de confiança (95%) do número de galhas apresentado por este parental.

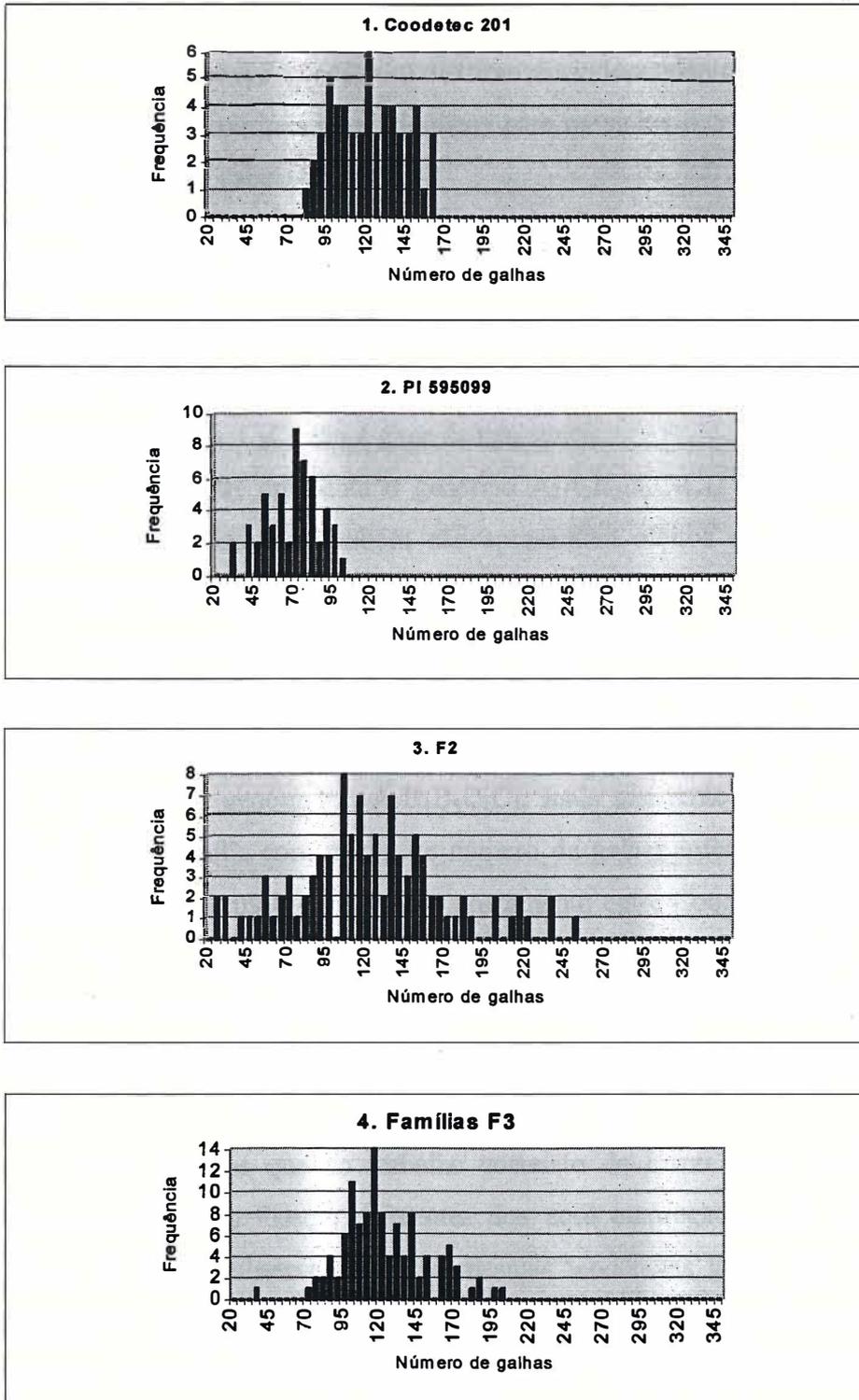


Figura 5. Distribuição das médias das famílias F<sub>3</sub> (4), indivíduos F<sub>2</sub> (3) e dos parentais Coodetec 201 (1) e PI 595099 (2) para o número de galhas (NG) por planta causadas por *M. javanica*.

O modelo com 3 genes com distribuição independente, sendo que a resistência é determinada por genótipos homocigóticos para os alelos dos 3 genes, foi testado e não pôde ser rejeitado (Tabela 25).

De acordo com os resultados observados no cruzamento entre Coodetec 201 e PI 595099, os dois genes de resistência presentes em PI 595099 expressam-se quando em homocigose, pois não apresentam efeitos de dominância, e atuam de maneira aditiva. Assim, PI 595099 possui o seguinte genótipo:  $A_1A_1B_1B_1C_2C_2$ , onde  $A_1A_1$  e  $B_1B_1$  são os genes de resistência.  $C_2C_2$  não é gene de resistência.

Coodetec 201 apresenta o genótipo  $A_2A_2B_2B_2C_1C_1$ , onde  $B_2B_2$  e  $C_1C_1$  são os genes de resistência, que também não apresentam efeitos de dominância, atuam em homocigose e são aditivos.  $A_2A_2$  não é gene de resistência.

Nas plantas obtidas do cruzamento entre Coodetec 201 e PI 595099, o gene de resistência  $B_2B_2$  localiza-se no mesmo loco que  $B_1B_1$ . Quando os genes de resistência oriundos de PI 595099 ( $A_1A_1B_1B_1$ ) são associados ao gene  $C_1C_1$ , vindo de Coodetec 201, é formado o genótipo  $A_1A_1B_1B_1C_1C_1$ , mais resistente a *M. javanica* do que PI 595099. Uma família com média de número de galhas inferior a 95% do intervalo de confiança de PI 595099 foi obtida do cruzamento entre Coodetec 201 e PI 595099. Por outro lado o genótipo  $A_2A_2B_1B_2C_2C_2$  não apresenta genes de resistência em homocigose, devendo ser altamente suscetível a *M. javanica*. Uma família apresentou média de número de galhas comparável a BRS 133 (dentro do intervalo de confiança a 95%).

Vale destacar que no trabalho correlato de Luzzi et al. (1995b), embora os genótipos utilizados fossem diferentes dos aqui empregados, em relação à variável número de galhas observaram-se as mesmas tendências gerais ora relatadas para os cruzamentos BRS 133 x Coodetec 201 (item 4.3.1), BRS 133 x PI 595099 (item 4.3.2) e Coodetec 201 x PI 595099 (presente item, 4.3.3). Assim, à semelhança do verificado no presente estudo, os citados autores observaram, por exemplo, que nos cruzamentos Gordon x CNS, PI80466 x CNS e PI230977 x CNS, do tipo resistente-suscetível, as distribuições de  $F_2$  e  $F_3$  para o número médio de galhas por planta foram contínuas, indicando que a resistência à formação de galhas era herdada quantitativamente.

Também, como era de se esperar, os três parentais resistentes apresentaram números significativamente menores de galhas que o suscetível (CNS). Cumpre observar, por outro lado, que, de modo geral, os genótipos resistentes (3) utilizados no trabalho mencionado propiciaram a formação de menores números médios de galhas do que os empregados (2) no presente estudo, o que deve estar ligado a características genéticas próprias de cada material e ao menor número de ovos no inóculo utilizado por Luzzi et al. (1995b). Em relação aos parentais suscetíveis, respectivamente CNS e BRS 133, houve clara sobreposição dos números de galhas observados.

Tabela 25. Teste de Qui-quadrado para média do número de galhas (NG) da geração F<sub>3</sub> do cruzamento entre Coodetec 201 e PI 595099.

	Altamente resistente	Reação de PI 595099	Reação de CD 201	Suscetível	Altamente suscetível	N	$\chi^2$ *	P
<b>Observado</b>	1	11	83	16	1	112	3,56 <sub>n.s.</sub>	0,47
<b>Esperado</b>	1,75	12,25	80,5	14	3,5			
<b>Genótipo</b>	A <sub>1</sub> A <sub>1</sub> B <sub>1</sub> B <sub>1</sub> C <sub>1</sub> C <sub>1</sub>	A <sub>1</sub> A <sub>1</sub> B <sub>1</sub> B <sub>1</sub> C <sub>1</sub> C <sub>2</sub> A <sub>1</sub> A <sub>1</sub> B <sub>1</sub> B <sub>1</sub> C <sub>2</sub> C <sub>2</sub> A <sub>1</sub> A <sub>1</sub> B <sub>1</sub> B <sub>1</sub> C <sub>1</sub> C <sub>1</sub> A <sub>1</sub> A <sub>1</sub> B <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C <sub>1</sub> C <sub>2</sub> A <sub>1</sub> A <sub>1</sub> B <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub> C <sub>2</sub>	---- C <sub>1</sub> C <sub>1</sub> (exceto: A <sub>1</sub> A <sub>1</sub> B <sub>1</sub> B <sub>1</sub> C <sub>1</sub> C <sub>1</sub> A <sub>1</sub> A <sub>1</sub> B <sub>1</sub> B <sub>1</sub> C <sub>1</sub> C <sub>1</sub> A <sub>1</sub> A <sub>1</sub> B <sub>1</sub> B <sub>1</sub> C <sub>1</sub> C <sub>1</sub> )	A <sub>1</sub> A <sub>2</sub> B <sub>1</sub> B <sub>2</sub> C <sub>1</sub> C <sub>2</sub>	A <sub>2</sub> A <sub>2</sub> B <sub>1</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub> C <sub>2</sub>			
			-- B <sub>1</sub> B <sub>1</sub> -- (exceto: A <sub>1</sub> A <sub>1</sub> B <sub>1</sub> B <sub>1</sub> C <sub>1</sub> C <sub>2</sub> A <sub>1</sub> A <sub>1</sub> B <sub>1</sub> B <sub>1</sub> C <sub>2</sub> C <sub>2</sub> A <sub>1</sub> A <sub>1</sub> B <sub>1</sub> B <sub>1</sub> C <sub>1</sub> C <sub>1</sub> )					
			-- B <sub>2</sub> B <sub>2</sub> -- (exceto: A <sub>1</sub> A <sub>1</sub> B <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C <sub>1</sub> C <sub>2</sub> A <sub>1</sub> A <sub>1</sub> B <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub> C <sub>2</sub> )					
			A <sub>1</sub> A <sub>1</sub> B <sub>1</sub> B <sub>2</sub> C <sub>1</sub> C <sub>1</sub> A <sub>1</sub> A <sub>1</sub> B <sub>1</sub> B <sub>2</sub> C <sub>1</sub> C <sub>2</sub> A <sub>1</sub> A <sub>1</sub> B <sub>1</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub> C <sub>2</sub> A <sub>1</sub> A <sub>1</sub> B <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C <sub>1</sub> C <sub>1</sub>					

\*.  $\chi^2 = \Sigma(O-E)^2/E$

#### 4.4. Herdabilidade

De uma maneira geral as estimativas da herdabilidade foram altas para todos os cruzamentos, indicando que uma grande porcentagem da variação no número de galhas entre a progênie F<sub>3</sub> foi devida a causas genéticas. Para os cruzamentos BRS 133 x

Coodetec 201 e BRS 133 x PI 595099, a herdabilidade ao nível de planta foi baixa, indicando que a seleção individual de plantas não será tão efetiva na obtenção da resistência quanto a seleção baseada em famílias F<sub>3</sub> resistentes (Tabela 26). Tais resultados muito se aproximam dos relatados por Luzzi et al. (1995b), que obtiveram igualmente valores considerados baixos de herdabilidade ao nível de planta para os cruzamentos CNS x Gordon (0,26) e CNS x PI230977 (0,29), concluindo pela maior eficiência de processo de seleção baseado em famílias F<sub>3</sub> que em plantas individuais.

Para o cruzamento entre Coodetec 201 e PI 595099, dada a elevada herdabilidade, também ao nível de planta, a resistência pode ser obtida mesmo que baseada em plantas individuais resistentes.

Tabela 26. Estimativa da herdabilidade da resistência à formação de galhas causadas por *Meloidogyne javanica* para os cruzamentos BRS 133 x Coodetec 201, BRS 133 x PI 595099 e Coodetec 201 x PI 595099.

Cruzamento	Herdabilidade	
	Planta *	Média **
BRS 133 x Coodetec 201	0,23	0,78
BRS 133 x PI 595099	0,36	0,84
Coodetec 201 x PI 595099	0,82	0,98

\*. Herdabilidade ao nível de planta =  $(0.5 \times D) / (0.5 \times D) + (0.25 \times H) + E$

\*\*. Herdabilidade ao nível de média =  $(0.5 \times D) / (0.5 \times D) + (0.25 \times H) + E/n$

#### 4.5. Considerações finais

A resistência a *M. javanica* presente nos genótipos de soja estudados foi herdada de maneira quantitativa em todos os experimentos, corroborando as observações de Luzzi et al., 1995b.

Neste estudo observamos que três genes diferentes, sendo que um deles apresenta alelos diferentes, podem explicar a resistência dos genótipos de soja a *M.*

*javanica*, e que essa resistência apresenta elevada herdabilidade. Vários outros trabalhos também apontam que a resistência de genótipos de soja a espécies de nematóides do gênero *Meloidogyne* apresenta elevada herdabilidade, como para *M. arenaria* (Luzzi et al., 1995a), *M. incognita* (Luzzi et al., 1994a) e *M. javanica* (Luzzi et al., 1995b). Pode-se, assim, afirmar que poucos genes estão envolvidos na resistência da soja a essas espécies de nematóides (resistência oligogênica). Entretanto, também é freqüente a constatação de que os genes presentes nas diferentes fontes de resistência são diferentes, como no nosso caso. Luzzi et al. (1995b) também concluíram que os genes de resistência a *M. javanica* presentes em Gordon, PI 80466 e PI 230977 estão em diferentes locos ou diferentes alelos ocorrem no mesmo loco. Assim, é fundamental que novas fontes de resistência a *M. javanica*, como aquela presente em PI 595099, sejam introduzidas no germoplasma brasileiro de soja, visto que a resistência presente na maioria dos nossos cultivares é oriunda apenas do cultivar Bragg. A diversificação dos genes de resistência possibilitará maior estabilidade e durabilidade da resistência.

#### 4.6. Marcadores moleculares para a resistência a *Meloidogyne javanica*

A extração do DNA das 120 plantas F<sub>2</sub> para o cruzamento entre BRS 133 e Coodetec 201, e deste mesmo número de plantas F<sub>2</sub> para o cruzamento BRS 133 x PI 595099 foi trabalhosa. O grau de pureza, estimado pela razão entre as leituras espectrofotométricas a 260 nm e 280 nm variou de 1,4 a 2,0 (com média de 1,6) para BRS 133 x Coodetec 201, e de 1,3 a 2,0 (média de 1,45) para BRS 133 x PI 595099.

Os vinte locos usados no estudo estão localizados nos grupos de ligação D1b + W e F da soja e foram escolhidos por flanquear locos de RFLP A806D, A186D, A757V, B212T e R045I, A7252, onde desenvolvidos e caracterizados por Tamulonis *et al.* (1997b) (Figura 6).

O loco Satt 362 não amplificou os fragmentos de DNA. O tempo decorrido para a chegada dos *primers*, após a compra e envio pelo fabricante, foi longo, sendo esta a provável razão da sua perda.

Entre os 20 locos analisados, Satt 586, Satt 269, Satt 423, Satt 595, Satt 072, Satt 133, Satt 266 e Satt 216 foram polimórficos para os parentais BRS 133 e Coodetec 201. Entretanto, não foram utilizados para amplificação do DNA oriundo das plantas F<sub>2</sub> os locos Satt 586, Satt 269, Satt 595 e Satt 072, em razão da dificuldade em se visualizar as bandas polimórficas, o que gerava muitas incertezas. Dessa forma, para esse cruzamento foram analisados os locos Satt 133, Satt 423 e Satt 266.

Para o cruzamento entre BRS 133 e PI 595099, os locos Satt 423, SOYHSP 176, Satt 266 e Satt 216 apresentaram polimorfismos entre os parentais, e todos foram utilizados para amplificar o DNA oriundo das plantas F<sub>2</sub>. A ligação entre o polimorfismo no loco e a resistência foi aceita quando houve diferença estatística ( $P < 0,01$ ), para as quais calculou-se o coeficiente de determinação ( $R^2$ ).

Para o cruzamento entre BRS 133 e Coodetec 201, análises de variância mostraram associações significativas entre a média do número de galhas das famílias F<sub>3</sub> e os locos Satt 266 e Satt 133. A porcentagem de variação fenotípica explicada por estes locos foram, respectivamente, 7,5% e 6,1%. Para o cruzamento entre BRS 133 e PI 595099, não foi observada associação significativa entre a resistência, avaliada a partir

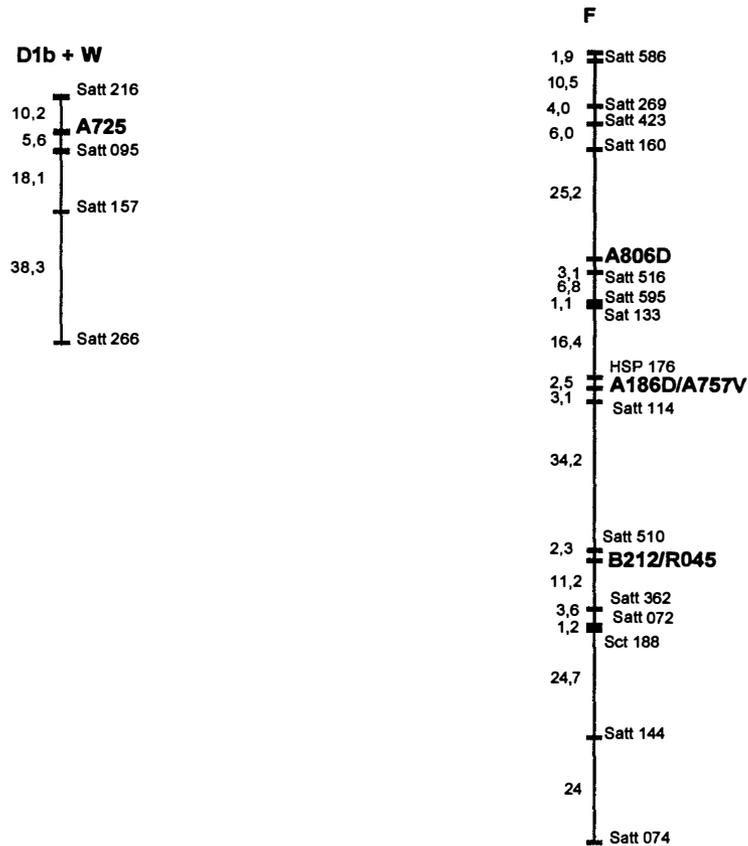


Figura 6. Lado direito: marcadores de microssatélites utilizados, localizados em parte dos grupos de ligação D1b+W e F da soja e, em negrito, marcadores de RFLP (Tamulonis et al., 1997b) associados a resistência a *Meloidogyne javanica*. No lado esquerdo estão indicadas as distâncias (cM) entre eles.

do número de galhas, e os locos. Apenas o marcador SOYHSP 176 mostrou associação mais próxima ( $P = 0,13$ ) do aceitável, com  $R^2$  de 1,98 %. Este loco está situado a 2,5 cM dos locos de RFLP A186D e A757V e é do tipo dominante.

O loco Satt 266 apresentou bandas polimórficas para os dois cruzamentos estudados. Entretanto, somente para o cruzamento BRS 133 x Coodetec 201 a sua associação à redução do número de galhas foi significativa. Este marcador é co-dominante e está situado no grupo de ligação D1b + W, distante 62 cM do loco de RFLP A725, desenvolvido por Tamulonis *et al.* (1997b) (Figura 6). Efeitos de dominância no sentido da resistência foram detectados, uma vez que os indivíduos heterozigotos apresentaram a menor média de galhas (Tabela 27). Efeitos de dominância significativos no sentido da resistência também foram detectados no cruzamento entre BRS 133 e Coodetec 201 através dos testes de médias em genética quantitativa (Item 4.3.1.1.1.).

Para esse mesmo cruzamento, também houve associação significativa com a redução do número de galhas para o loco Sat 133, localizado no grupo de ligação F e muito próximo (2,5 cM) dos locos de RFLP A186D e A757V (Tamulonis *et al.*, 1997b). Sat 133 também é do tipo dominante, não sendo possível identificar os heterozigotos para a marca (Tabela 27).

Os alelos oriundos de PI 595099 e Coodetec 201 contribuíram, em todos os casos, para a redução do número de galhas.

Esses resultados corroboram aqueles observados por Tamulonis *et al.* (1997b), onde QTL's associados a resistência foram detectados próximos aos marcadores de RFLP A725, no grupo de ligação D1b + W, e A806D e A186D/A757V, no grupo de ligação F. Entretanto os locos aqui detectados explicam pouco da variação de galhas observada. Assim, outros locos de microssatélites devem ainda ser estudados nessas mesmas regiões genômicas para que possam ser utilizados na seleção assistida de genótipos de soja com resistência a *M. javanica*.

Tabela 27. Locos marcadores significativamente associados à redução do número de galhas de plantas F<sub>3</sub> oriundas dos cruzamentos BRS 133 x Coodetec 201 e BRS 133 x PI 595099

<b>Cruzamento</b>	<b>locos de Microsatélite</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>C.V.</b>	<b>SS<sup>1</sup></b>	<b>SR<sup>2</sup></b>	<b>RR<sup>3</sup></b>	<b>P</b>
BRS 133 x Coodetec 201	Satt 266	7,5%	29%	138,7	115,9	142,2	0,01 **
	Satt 423	1,4%	29%	-	-	-	0,50
	Satt 133	6,1%	29%	131,5	-	112,15	0,009**
BRS 133 x PI 595099	Satt 266	1,5%	37%	-	-	-	0,41
	Satt 423	1,4%	27%	-	-	-	0,69
	HSP 176	1,98%	37%	155,9	-	137,7	0,13*
	Satt 216	0,3%	38%	-	-	-	0,85

<sup>1</sup>. Número médio de galhas das linhagens homocigotas para os alelos do progenitor suscetível.

<sup>2</sup>. Número médio de galhas das linhagens heterocigotas.

<sup>3</sup>. Número médio de galhas das linhagens homocigotas para os alelos do progenitor resistente.

## 5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, relativamente à seleção de genótipos de soja visando à resistência a *Meloidogyne javanica*, pode-se concluir que:

- No cruzamento entre BRS 133 e Coodetec 201, dois genes dominantes e aditivos controlam a resistência, sendo a herança condicionada por efeitos aditivos, de dominância e epistáticos do tipo aditivo por aditivo. Nesse cruzamento, a seleção deve ser feita com base nas médias das famílias, e em gerações mais avançadas;
- No cruzamento entre BRS 133 e PI 595099, dois genes complementares, com distribuição independente e ausência de dominância, controlam a resistência, que é determinada por genótipos homozigóticos para os alelos dos dois genes; a herança é condicionada por efeitos aditivos e epistáticos entre os genes controladores do caráter. A seleção pode ser feita com base na reação de plantas individuais ou na média das famílias, e em gerações precoces;
- Os genes de resistência oriundos de Coodetec 201 e PI 595099 são diferentes e a resistência desses genótipos a *M. javanica* é oligogênica;
- A herança da resistência de genótipos de soja a *M. javanica* é quantitativa;

- As estimativas da herdabilidade foram altas para todos os cruzamentos, indicando que uma grande porcentagem da variação no número de galhas entre a progênie F<sub>3</sub> foi devida a causas genéticas, o que possibilita ganhos na seleção;
- Há QTL's que condicionam resistência a *M. javanica* próximos aos marcadores de RFLP A725, no grupo de ligação D1b + W, e A806D e A186D/A757V, no grupo de ligação F, corroborando dados da literatura. Porém, os locos aqui detectados (Satt 266, Sat 133 e HSP 176) explicam pouco da variação de galhas observada, não sendo possível utilizá-los na seleção assistida de genótipos com resistência a *M. javanica*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKAGI, H.; YOKOZEKI, Y.; INAGAKI, A; FUJIMURA, T. Highly polymorphic microsatellites of rice consist of AT repeats, and a classification of closely related cultivars with these microsatellite loci. **Theor. Appl. Genet.** v.94, p.61-67, 1997.

AKKAYA, M.S.; BHAGWAT, A.A.; CREAGAN, P.B. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. **Genetics** v.132, p.1131-1139, 1992.

ALCANTARA, V.S.B.; MIRANDA, M.A.C. de; LORDELLO, R.R.A. Experimento de resistência de cinco cultivares de soja a *Meloidogyne incognita*. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE NEMATOLOGIA, 4., Mossoró, 1980. **Resumos**. Mossoró, SBN, 1980. p.171-176.

ANTONIO, H. & DALL'AGNOL, A. Avaliação de resistência a *Meloidogyne arenaria* nas cultivares de soja recomendada no Brasil em 1980. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE NEMATOLOGIA, 6., Piracicaba, 1982. **Resumos**. Piracicaba: SBN, 1982. p.33-41.

BARKER, K.R. Introduction. In: BARKER, K.R.; PEDERSON, G.A. & WINDHAM, G.L. **Plant and nematode interactions**. Madison: American Society of Agronomy, 1998. p.1-20.

- BOERMA, H.R. & HUSSEY, R.S. Breeding plants for resistance to nematodes. **Journal of Nematology**, v.24, p.242-252, 1992.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R.I.; SKOLNIC, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **Am. J. Hum. Genet.**, v.32, p.314-331, 1980.
- CAMARGO, L.E.A. Análise genética da resistência e da patogenicidade. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia. Volume 1: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. cap. 24, p.470-473.
- CAMARGO, L.E.A. & BERGAMIN FILHO, A. Controle genético. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia. Volume 1: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. cap. 24, p.729-760.
- CAVALLI, J.L. An analysis of linkage in quantitative inheritance. In: REEVE, E.C.R., & WADDIGTON, C.H. (eds). **Quantitative Inheritance**, London: HMSO, 1952. p.135-144.
- COVOLO, G. Contribuição ao estudo de susceptibilidade de algumas variedades de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] ao nematóide *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949. Santa Maria, 1975. 31p. Dissertação (M.S.) - Universidade Federal de Santa Maria.

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, J. & SPECHT, J.E. An integrated genetic linkage map of the soybean genome. *Crop Science* v.39, p.1464-1490, 1999.

D'AGOSTINI, L.R. A produção agrícola e a sustentabilidade em relações homem/ambiente. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, Londrina, 1999. *Anais*. Londrina: Embrapa Soja, 1999. p.43-50.

DIETRICHE, W.F.; MILLER, J.; STEEN, R.; MERCHANT, M.A.; DAMRON-BOLES, D.; HUSAIN, Z.; DREDGE, R.; DALY, M.J.; INGALLS, K.A.; O'CONNOR, T.J.; EVANS, C.A.; DEANGELIS, M.M.; LEVINSON, D.M.; KRUGLYAK, L.; GOODMAN, N.; COPELAND, N.G.; JENKINS, N.A.; HAWKINS, T.L.; STEIN, L.; PAGE, D.C.; LANDER, E.S. A comprehensive genetic map of the mouse genome. *Nature*, v.380, p.149-152, 1996.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Soja. **Recomendações Técnicas para a Cultura da Soja na Região Central do Brasil 1998/99**. Londrina, 1998. 182p. (Embrapa-Soja. Documentos, 120).

FERRAZ, L.C.C.B. & MONTEIRO, A.R. Nematóides. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia. Volume 1: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. cap. 08, p.168-201.

FERRAZ, S. Reação de algumas variedades de soja a *Meloidogyne javanica* e *M. incognita*. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEMATOLOGIA, 3., Mossoró, 1978. **Resumos**. Mossoró: SBN, 1978. p.93-94.

- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** Brasília, DF: Embrapa-Cenargen, 1996. 220 p.
- GARLAND, M.L.; MAXWELL, J.D. Breeding for resistance to the peanut root-knot nematode in soybeans. **Agronomy abstracts**, p.52. 1978.
- GOOD, J.M. Nematodes. In: CALDWELL, B.E. (ed.). **Soybeans: improved, production and uses.** Winconsin: American Society of Agronomy, 1973. p.527-543.
- GOUVEIA, L. & SILVA, J.F.V. Reação de cultivares de soja recomendadas para a região dos cerrados brasileiros frente a *Meloidogyne javanica*. In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 18.,Uberlândia, 1996. **Resumos.** Uberlândia: UFU/EMBRAPA, 1996. p.295.
- HASSE, G. **O Brasil da soja: abrindo fronteiras, semeando cidades.** Porto Alegre: CEVAL Alimentos / L & P. 1996. 256 p.
- HAYMAN, B.I. Maximum likelihood estimation of genetics components of variation. **Biometrics** , v.16, p.369-381, 1960.
- HUANG, J-S Mechanisms of resistance to root-knot nematodes. In: J.N.SASSER & C.C.CARTER, eds. **An advanced treatise on Meloidogyne, v.1: Biology and control.** Raleigh: North Caroline State University Graphics, 1985. p. 165-174.
- HUSSEY, R.S. & BARKER, K.R. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. **Plant Dis. Rep.** v.57, p.1025-1028, 1973.

- HUSSEY, R.S. & BOERMA, H.R. A greenhouse screening procedure for root-knot nematode resistance in soybeans. **Crop Science**, v.21, p.794-796, 1981.
- HUSSEY, R.S. Host-parasite relationships and associated physiological changes. In: J.N.SASSER & C.C.CARTER, eds. **An advanced treatise on *Meloidogyne*, v.1: Biology and control**. Raleigh: North Carolina State University Graphics, 1985. p. 143-154.
- INDICADORES DA AGROPECUÁRIA. Brasília: CONAB, v.9, n.6/7, Jun./Jul. 2000. 50p.
- KAPLAN, D.T. & DAVIS, E.L. Mechanisms of plant incompatibility with nematodes. In: Veech, J.A. & Dickson, D.W. (ed) **Vistas on Nematology**, Hyattsville: Soc. Nematol., 1987. p. 267-276.
- KAPLAN, D.T.; KEEN, N.T. & THOMASON, I.J. Studies on the mode of action of glyceollin in soybean incompatibility to the root knot nematode, *Meloidogyne incognita*. **Physiol. Plant Pathol.**, v.16, p.319-325, 1980a.
- KAPLAN, D.T., KEEN, N.T. & THOMASON, I.J. Association of glyceollin with the incompatible response of roots to *Meloidogyne incognita*. **Physiol. Plant Pathology**, v.16, p.309-318, 1980b.
- KEIM, P.; OLSON, T.C.; & SHOEMAKER, R.C. A rapid protocol for isolating soybean DNA. **Soybean Genetics Newsletter**. v.15, p.150-152. 1988.
- KINLOCH, R.A. Screening for resistance to root-knot nematodes. In: STARR, J.L. 1990. **Methods for evaluating plant species for resistance to plant-parasitic nematodes**. Maryland: Society of Nematologists, 1990. p.16-23.

- KINLOCH, R.A Soybean. In: BARKER, K.R.; PEDERSON, G.A. & WINDHAM, G.L. 1998. **Plant and nematode interactions**. Madison: American Society of Agronomy,1998. p.317-334.
- KREIKE, C.M.; DeKOENING, J.R.A.; VINKE, J.H.; VANOOIJEN, J.W.; GEBHARDT, C. & STIEKEMA, W.J. Mapping of loci involved in quantitatively inherited resistance to the potato cyst-nematode *Globodera rostochiensis* pathotype Ro1. **Theor. Appl. Genet.** v.87, p.464-470, 1993.
- LIMA, R.D.; FERRAZ, S. & SANTOS, J.M. Ocorrência de *Heterodera* sp. em soja no Triângulo Mineiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 16, Lavras, 1992. **Resumos**. Lavras: ESAL, 1992. s.p.
- LORDELLO, A.I.L.; LORDELLO, R.R.A. & QUAGGIO, J.A. *Heterodera* sp. reduz produção de soja no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 16, Lavras, 1992. **Resumos**, Lavras: ESAL, 1992. p.81.
- LORDELLO, L.G.E. **Nematóides das plantas cultivadas**. 7. ed. São Paulo: Nobel, 1982. 314p.
- LORENZEN, L.L.; BOUTIN, S.; YOUNG, N.; SPECHT, J.E.; SHOEMAKER, R.C. Soybean pedigree analysis using map-based molecular markers: tracking RFLP markers in cultivars. **Crop Science** v.35, p.1326-1336, 1995.
- LUZZI, B.M., BOERMA, H.R.; HUSSEY, R.S.; PHILLIPS, D.V.; TAMULONIS, J.; FINNERTY, S.L.; & WOOD, E.D. Registration of javanese root-knot nematode resistant soybean germoplasm line G93-9223. **Crop Science**, v.37, p.1372-1375, 1997.

- LUZZI, B.M., BOERMA, H.R.; HUSSEY, R.S. Resistance to three species of root-knot nematode in soybean. **Crop Science**, v.27, p.259-262, 1987.
- LUZZI, B.M.; BOERMA, H.R.; HUSSEY, R.S Inheritance of resistance to the southern root-knot nematode in soybean. **Crop Science**, v.34, p.1240-1243, 1994a.
- LUZZI, B.M.; BOERMA, H.R.; HUSSEY, R.S A gene for resistance to the southern root-knot nematode in soybean. **Journal of Heredity**, v.85, p.484-486, 1994b.
- LUZZI, B.M.; BOERMA, H.R.; HUSSEY, R.S Inheritance of resistance to the peanut root-knot nematode in soybean. **Crop Science**, v.35, p.50-53. 1995a.
- LUZZI, B.M., TAMULONIS, J.; HUSSEY, R.S; BOERMA, H.R. Inheritance of resistance to the javanese root-knot nematode in soybean. **Crop Science**, v.35, p.1372-1375, 1995b.
- MAI, W. F. Plant parasitic nematodes: their threat to agriculture. In: SASSER, J.N. & CARTER, C.C. (eds.) **An advanced treatise on *Meloidogyne*, v.1: Biology and control**. Raleigh: North Caroline State University Graphics, 1985. p.11-17.
- MARTINI, A. M. & SILVA, J.F.V. Reação de cultivares de soja recomendadas para a região dos cerrados brasileiros frente a *Meloidogyne javanica*. In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 18.,Uberlândia, 1996. **Resumos**. Uberlândia: UFU/EMBRAPA, 1996. p.295.
- MATHER, K. & JINKS, J.L. **Biometrical genetics**. 3 Ed London: Chapman and Hall, 1982. 369 p.

- MONTEIRO, A.R. & MORAIS, S.R.A.C. Ocorrência do Nematóide de Cisto da Soja, *Heterodera glycines* Ichinohe, 1952, prejudicando a cultura no Mato Grosso do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 16, Lavras, 1992. **Resumos**. Lavras: ESAL, 1992. s.p.
- MORGANTE, M.; OLIVIERI, A.M. PCR-amplified microsatellites as marker in plant genetics. **Plant Journal**, v.3, p.175-182, 1993.
- OLIVEIRA, M.F. Análise e previsão do potencial genético de um cruzamento de soja usando vários delineamentos em três épocas de semeadura. Londrina, 1994.114p. Dissertação (M.S.) – Universidade Estadual de Londrina.
- PARLEVLIET, J.E.; & ZADOKS, J.C. The integrated concept of disease resistance: a new view including horizontal and vertical resistance in plants. **Euphytica** v.26, p.5-21, 1977.
- RAMALHO, M.; SANTOS, J.B. & PINTO, C.B. **Genética na agropecuária**. Lavras: FAEPE, 1990. 359p.
- REBOIS, R.V. & GOLDEN, A.M. Nematode occurrences in soybean fields in Mississippi and Louisiana. **Plant Dis. Repr.**, v.62, n.5, p.433-437, 1978.
- ROBERTS, P.A. Resistance to nematodes. Definitions, concepts and consequences. In: STARR, J.L. 1990. **Methods for evaluating plant species for resistance to plant-parasitic nematodes**. Maryland: Society of Nematologists, 1990. p.1-15.

- ROBERTS, P.A.; MATTHEWS, C. & VEREMIS, J.C. Genetic mechanisms of host-plant resistance to nematodes. In: BARKER, K.R.; PEDERSON, G.A. & WINDHAM, G.L. 1998. **Plant and nematode interactions**. Madison: American Society of Agronomy, 1998. p.209-238.
- RONGWEN, J.; AKKAYA, M.S.; BHAGWAT, A.A.; LAVI, U.; CREGAN, P.B. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. **Theor. Appl. Genet.**, v.90, p.43-48, 1995.
- SASSER, J.N. **Plant-parasitic nematodes: the farmer's hidden enemy**. Raleigh, North Carolina State University, 1989. 115p.
- SASSER, J.N. Worldwide dissemination and importance of the root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). **Journal of Nematology**, v.9, p.26-29, 1977.
- SCHMITT, D.P. & NOEL, G.R. Nematodes parasites of soybean. In: NICKLE, W.R. **Plant and insect nematodes**. New York: Marcel Dekker, 1984. p.13-59.
- SHARMA, R.D. & SPEHAR, C.R. Reação de cultivares e linhagens de soja a nematóide formador de galhas, *Meloidogyne javanica*. In: REUNIAO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEMATOLOGIA, 7, Brasília, 1983. **Resumos**. Brasília: SBN, 1993. p.227-238.
- SHOEMAKER, R.C.; SPECHT, J.E. Integration of the soybean molecular and classical genetic linkage groups. **Crop Science**, v.37, p.1903-1909, 1995.
- SILVA, J.F.V. Problemas fitossanitários da soja no Brasil, com ênfase em nematóides. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 21, Maringá, 1998. **Anais**. Maringá: UEM, 1998. p.16-20.

- SILVA, J.G. da; LORDELLO, L.G.E.; MIYASAKA, S. Observações sobre a resistência de algumas variedades de soja ao nematóide das galhas. **Bragantia**, v.12, n.1-3, p.59-63, 1952.
- SINCLAIR, J.B. & SCHURILEFF, M.C. (co-eds.). **Compendium of soybean diseases**. St. Paul: APS, 1975. 104p.
- STARR, J.L. **Methods for evaluating plant species for resistance to plant-parasitic nematodes**. Society of Nematologists, Hyattsville, MD, 1990. 85p.
- TAMULONIS, J.P.; LUZZI, B.M.; HUSSEY, R.S.; PARROT, W.A. & BOERMA, H.R. DNA markers analysis of loci conferring resistance to peanut root-knot nematode in soybean. **Theor. and appl. Genet.** v.95, p.664-670, 1997a.
- TAMULONIS, J.P.; LUZZI, B.M.; HUSSEY, R.S.; PARROT, W.A. & BOERMA, H.R. DNA markers associated with resistance to javanese root-knot nematode in soybean. **Crop Science**, v.37, p.783-788, 1997b.
- TAMULONIS, J.P.; LUZZI, B.M.; HUSSEY, R.S.; PARROT, W.A. & BOERMA, H.R. RFLP Mapping of Resistance to Southern Root-Knot Nematode in Soybean. **Crop Science**, v.37, p.783-788, 1997c.
- TAYLOR, A.L. & SASSER, J.N. **Biology, Identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.)**, Raleigh: Cooperative Pub. Of Univ. North Carolina & USDA, 1978. 111p.
- TIHOHOD, D. & FERRAZ, S. Comportamento de cultivares e linhagens de soja frente a uma população de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, v.9, p.13-14, 1985. /Resumo/.

TIHOHOD, D. **Nematologia Agrícola Aplicada**. Jaboticabal: FUNEP, 1993. 372p.

TOLEDO, J.F.F. de. Programa de computadores para estimar parâmetros genéticos, componentes de média e variâncias, pelo método dos quadrados mínimos ponderados. **Pesq. Agrop. Bras.** v.26, n.7, p.1023-1039, 1991.

VAN Der PLANK, J.E. **Disease resistance in plants**. New York, Academic Press, 1968. 206p.

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

VEECH, J.A. & ENDO, B.Y. Comparative morphology and enzyme histochemistry of root-~~not~~ resistant and susceptible soybean. **Phytopathology**, v.60, p.896-902, 1970.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res.**, v.18, p.6531-6535, 1990.

YOUNG, L.D. Breeding for nematode resistance and tolerance. In: BARKER, K.R.; PEDERSON, G.A. & WINDHAM, G.L. **Plant and nematode interactions**. Madison: American Society of Agronomy, 1998. p.197-208.