

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE
Heterodera glycines DE MUNICÍPIOS DA REGIÃO DA
ESTRADA DE FERRO NO ESTADO DE GOIÁS**

Janaina Alves de Almeida Moreira
Eng. Agrônoma

JANAINA ALVES DE ALMEIDA MOREIRA

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Heterodera glycines* DE
MUNICÍPIOS DA REGIÃO DA ESTRADA DE FERRO NO ESTADO DE GOIÁS**

Orientador: Prof. Dr. Fernando Godinho de Araújo
Co-orientador: Prof. Dr. Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes

Dissertação apresentada ao Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas para obtenção do título de MESTRE.

Urutaí – GO
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/IF Goiano Campus Urutaí

M835c Moreira, Janaina Alves de Almeida.

Caracterização Genética de Populações de *Heterodera glycines* de Municípios da Região da Estrada de Ferro no Estado de Goiás / Campus Urutaí. [manuscrito] / Janaina Alves de Almeida Moreira. -- Urutaí, GO: IF Goiano, 2018.

20 fls.

Orientador: Dr. Fernando Godinho de Araújo

Coorientador: Dr. Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes

Dissertação (Mestrado) – Instituto Federal Goiano - Campus Urutaí, 2018.

1. Nematóide de cisto da soja. 2. Marcadores de RAPD. 3. Polimorfismo. 4. Teste de raça. I. Título.

CDU 631/635



INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROTEÇÃO DE
PLANTAS

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Caracterização genética de populações de nematoide de cisto da soja.

AUTORA: Janaina Alves de Almeida Moreira

Dissertação defendida e aprovada como parte das exigências para obtenção do título de Mestra em Proteção de Plantas.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Fernando Godinho de Araújo (orientador)
Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí

Prof. Dr. Ricardo Diógenes Dias Silveira
Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí

Dra. Adriana Figueiredo
Monsanto

Urutaí, 27 de fevereiro de 2018

ppgpp.urt@ifgoiano.edu.br

(64) 3465-1912

RODOVIA GERALDO S. NASCIMENTO, KM 2,5
CEP 75790-000, URUTAÍ – GO
www.ifgoiano.edu.br/urutai

INSTITUTO
FEDERAL
Goiano

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus pela minha vida, família e amigos.

Ao Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí, pela oportunidade de realização do mestrado e pela concessão da bolsa estudo, que foi imprescindível durante a realização do mestrado.

Aos meus pais, pelo amor, incentivo e apoio durante toda a minha formação acadêmica. Palavras não são suficientes para descrever a importância deles em minha vida.

Ao meu esposo, Danyel Lucas, por ser meu porto seguro, pelo amor, compreensão e pelos incentivos durante a realização deste trabalho.

Ao professor e orientador Fernando Godinho de Araújo, pelas orientações, conselhos, apoio e confiança e acima de tudo, pela amizade.

Ao co-orientador Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes, por abrir as portas do LaGeM (Laboratório de Genética Molecular) e pela orientação.

A todos os professores da instituição, em especial a Gleina Costa Silva Alves e Flávio Gonçalves de Jesus, por me proporcionarem um grande aprendizado, tanto científico, ético e moral.

À Aprosmat (Associação dos Produtores de Sementes de Mato Grosso), pelo fornecimento de materiais necessário para realização deste trabalho.

À todas as revendas e consultorias que abriram as portas e apoiaram a realização deste trabalho.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Fisiologia Vegetal e do Parasitismo (Tayrlen, Rodolfo, Mirian, Emerson, Cássio, Amanda, Diego, Janaina Grasielle, Matheus, José Roberto, Marluce, Paulo Henrique, Carina Marina), Débora (Laboratório de Nematologia) e Letícia (Laboratório LaGeM) que me auxiliaram nas práticas laboratoriais e condução deste trabalho e, por tornarem os dias mais alegres através da boa convivência e das brincadeiras.

Por fim, agradeço a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha pós-graduação, o meu muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	3
MATERIAL E MÉTODOS	4
RESULTADOS E DISCUSSÃO	9
CONCLUSÕES.....	17
REFERÊNCIAS	18

RESUMO

O *Heterodera glycines*, também conhecido como Nematóide de Cisto da Soja (NCS), desde sua detecção no Brasil na safra 1991/1992, vem se configurando entre os problemas fitossanitários que dificultam a obtenção de elevados rendimentos na cultura da soja (*Glycine max*), devido a sua capacidade de disseminação e a elevada variabilidade de raças fisiológicas. Identificar corretamente a raça fisiológica desse nematóide presente na área de cultivo é o primeiro passo para o emprego correto e seguro das cultivares resistentes, a fim de evitar a pressão de seleção de novas raças. Diante dessa problemática, objetivo do presente estudo foi a caracterização genética, de populações de *Heterodera glycines* provenientes de municípios produtores de soja, da região da Estrada de Ferro (estado de Goiás) em raças e também a caracterização molecular empregando marcadores de RAPD. Os estudos foram conduzidos no IF Goiano – campus Urutaí, em Urutaí – GO. Inicialmente foram realizadas coletas de amostras de solo (em áreas comerciais de cultivo de soja) nos municípios da região da Estrada de Ferro e posteriormente, análise nematológica para confirmar a presença do NCS no inóculo a ser multiplicado em casa de vegetação. Para o teste de raça, o experimento foi arranjado em DIC com 30 (populações do NCS) x 6 (diferenciadoras de soja) com dez repetições. As sementes das diferenciadoras de soja (Pickett, Peking, PI88788, PI90763, Hartwig e Lee) foram pré-germinadas em bandejas células. No momento do transplante dessas diferenciadoras para tubetes (contendo apenas areia autoclavada), realizou-se a inoculação (4000 ovos e juvenis de segundo estágio) de cada população do NCS. Trinta dias após a inoculação foi avaliado o número de fêmeas sobre cada diferenciadora para calcular o índice de fêmeas (IF%) de acordo com a metodologia de Riggs & Schmitt (1988). Para a caracterização molecular, utilizou-se 28 primers RAPD e a extração de DNA foi realizada pelo método CTAB 2%. A seguir, quantificou o DNA através de comparações visuais das bandas geradas em gel de agarose (0,8%) corado com brometo etídio ($0,5 \text{ mgL}^{-1}$). As reações de RAPD foram montadas para um volume final de 25 μL , compostas de 10mM Tris-HCL (pH 8,3), 50 mM KCl, 2,4 mM de MgCl_2 , 100 μM de cada deoxiribonucleotídeo, 0,4 μM do “primer”, 1 U de enzima Taq DNA polimerase, e 30 ng de DNA. As reações de PCR foram feitas em termociclador e os produtos amplificados foram separados por eletroforese horizontal, em gel de agarose 1,2% contendo brometo de etídio, e submerso em tampão TBE (0,09 M Tris-Borato; 0,002 M EDTA). Os dados de RAPDs obtidos foram avaliados de forma binária, atribuindo valores de (1) para presença e (0) ausência da banda amplificada para cada primer. A matriz binária foi usada para estimar a distância genética entre as populações com base na dissimilaridade de Jaccard. A análise de agrupamento com base na matriz de dissimilaridade genética calculada foi obtida pelo método de Ward utilizando o programa estatístico R versão 3.0.3. Foram encontradas 9 raças fisiológicas distintas de *Heterodera glycines* em municípios da região da Estrada de Ferro (Estado de Goiás). No município de Orizona, foram constatadas as raças 3, 6, 9 e 10. Em Vianópolis as raças encontradas foram a 3 e 10. Já em Silvânia e Leopoldo de Bulhões, detectou-se as raças 3 e 1 em ambos municípios. As raças 3, 4+, 6, 10 e 14+ foram detectadas em Ipameri. Em Campo Alegre de Goiás identificou as raças 6, 13, e 14. Já em Gameleira de Goiás e Catalão, detectou apenas a raça 3. Dos 28 primers RAPD, apenas 10 foram polimórficos entre as populações do NCS e o restante não amplificaram ou tiveram baixa amplificação do fragmento de DNA. O uso de marcadores RAPD permitiu verificar diferenças no conjunto gênico que compõe diferentes raças do *Heterodera glycines*. Foram obtidos cinco grupos geneticamente distintos entre os acessos populacionais de *H. glycines* provenientes de municípios da região da Estrada de Ferro, cuja variabilidade genética entre eles foi elevada.

Palavras-chave: nematóide de cisto da soja; marcadores de RAPD; polimorfismo; teste de raça.

ABSTRACT

Heterodera glycines, also known as Soybean Cyst Nematode (SCN), since it is detected in Brazil in the 1991/1992 crop, has been confusing among the phytosanitary problems that make it difficult to obtain high yields in soybean (*Glycine max*) due to their capacity of dissemination and the high variability of physiological races. To correctly identify the physiological race of this nematode present in the cultivation area is the first step for the correct and safe use of the resistant cultivars in order to avoid the selection pressure of new breeds. In view of this problem, the objective of the present study was the genetic characterization of populations of *Heterodera glycines* from soybean producing municipalities of the region of the Estrada de Ferro (state of Goiás) in races and also the molecular characterization employing RAPD markers. The studies were conducted at the Goiano IF - Urutaí campus, in Urutaí - GO. Soil samples (in soybean commercial areas) were collected in the municipalities of the region of the Estrada de Ferro and later, a nematological analysis was performed to confirm the presence of NCS in the inoculum to be multiplied in a greenhouse. For the race test, the experiment was arranged in DIC with 30 (NCS) populations x 6 (soybean differentiators) with ten replicates. The seeds of the soybean differentiators (Pickett, Peking, PI88788, PI90763, Hartwig and Lee) were pre-germinated in cell trays. At the moment of the transplanting of these differentiators for tubes (containing only autoclaved sand), inoculation (4000 eggs and juveniles of second stage) of each SCN population was carried out. Thirty days after inoculation, the number of females on each differentiator was calculated to calculate the female index according to the methodology of Riggs & Schmitt (1988). For the molecular characterization, 28 RAPD primers were used and DNA extraction was performed by the 2% CTAB method. It then quantified the DNA by visual comparisons of bands generated on agarose gel (0.8%) stained with ethidium bromide (0.5 mgL^{-1}). The RAPD reactions were assembled to a final volume of 25 μl , composed of 10 mM Tris-HCL (pH 8.3), 50 mM KCl, 2.4 mM MgCl₂, 100 μM of each deoxyribonucleotide, 0.4 μM of the " primer ", 1 U of Taq DNA polymerase enzyme, and 30 ng of DNA. PCR reactions were done in a thermal cycler and the amplified products were separated by horizontal electrophoresis, 1.2% agarose gel containing ethidium bromide, and submerged in TBE buffer (0.09 M Tris-Borate, 0.002 M EDTA). The RAPD data obtained were evaluated binary, assigning values of (1) for presence and (0) absence of the amplified band for each primer. The binary matrix was used to estimate the genetic distance between populations based on Jaccard dissimilarity. The clustering analysis based on the calculated genetic dissimilarity matrix was obtained by the Ward method using the statistical program R version 3.0.3. There were found 9 distinct physiological races of *Heterodera glycines* in municipalities of the region of the Estrada de Ferro (State of Goiás). In the municipality of Orizona, races 3, 6, 9 and 10 were found. In Vianópolis, races 3 and 10 were found. In Silvânia and Leopoldo de Bulhões, races 3 and 1 were detected in both municipalities. Races 3, 4+, 6, 10 and 14+ were detected in Ipameri. In Campo Alegre de Goiás, he identified races 6, 13 and 14. In Gameleira de Goiás and Catalão, he detected only race 3. Of the 28 RAPD primers, only 10 were polymorphic among the NCS populations and the rest did not amplify or have had low amplification of the DNA fragment. The use of RAPD markers allowed to verify differences in the gene pool that compose different breeds of *Heterodera glycines*. Five genetically distinct groups were obtained among the population accesses of *Heterodera glycines* from municipalities of the region of the Railroad, whose genetic variability among them was high.

Key words: soybean cyst nematode; RAPD markers; polymorphism; race test.

INTRODUÇÃO

O *Heterodera glycines* Ichinohe (1952), também conhecido como nematoide de cisto da soja (NCS), desde sua detecção no Brasil na safra 1991/1992 (Lima et al., 1992; Lordello et al., 1992; Monteiro & Morais, 1992) vem se configurando entre os problemas fitossanitários que dificultam a obtenção de elevados rendimentos na cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill). Nos locais onde foi detectado o NCS, os prejuízos nas lavouras foram significativos, variando de 10 a 100% (Sinclair, 1982; Silva, 1998). Dhingra et al. (2009) alertaram que as perdas de produtividade de grãos podem atingir 90%, em combinação com o grau de infestação e raça do nematoide, fertilidade do solo e suscetibilidade do cultivar.

A adoção de estratégias de manejo, em áreas de cultivo com a presença do nematoide de cisto da soja, faz-se necessária para manter a viabilidade econômica da sojicultura. Atualmente, as principais estratégias de manejo têm sido baseadas em: rotação de culturas (Riggs & Schmitt, 1993; Yorinori, 2000), manejo do solo (Dhingra et al. 2009; Embrapa, 2015) e uso de cultivares resistente (Embrapa, 2015). Embora a utilização de cultivares resistente tem sido o método de controle mais empregado no manejo do *H. glycines* devido a sua praticidade de utilização e viabilidade econômica (Niblack et al., 2002), deve-se estar atento às escolhas dos materiais resistentes a serem utilizados no manejo.

Tais materiais apresentam diferentes níveis de resistência ao NCS, o que permite que o nematoide supere com facilidade a resistência dessas cultivares devido a sua alta variabilidade genética (Young, 1996; Li et al., 2004; Brucker et al., 2005). No Brasil, essa variabilidade tem se mostrado maior comparada a outros países; das dezesseis raças fisiológicas descrita por Riggs & Schmitt (1988) do *H. glycines*, já foram encontradas as raças 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 14, além da 4+, 9+ e 14+ (Dias et al., 2006 & Asmus et al., 2012). Sendo as três últimas referentes a raças que diferem das raças 4, 9 e 14 clássicas, pela habilidade de parasitar a cultivar norte-americana Hartwig, até então considerada resistente a todas as raças (Dias et al., 2009).

Nos estados brasileiros de Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, a evolução de raças com genes adicionais de parasitismo tem acontecido de forma muito rápida (Dias et al., 2010). A saber que a reprodução desse nematoide é por anfimixia, aliada à copulação da fêmea com vários machos da espécie (Triantaphyllou & Esbenshade, 1990), promove grande variabilidade genética dentro espécie. Dessa forma, o manejo do *H. glycines* somente pelo uso de cultivares resistentes e uso seguido da mesma fonte de resistência, faz com que o patógeno supere com facilidade a resistência dessas cultivares (Dias et al., 2009) o que muitas vezes não

impede a manutenção do inóculo na área. Assim, promove pressão de seleção sobre a população e selecionando indivíduos capaz de parasitar o sistema radicular dessas cultivares (Dias et al., 1998).

Sendo assim, identificar corretamente a raça fisiológica desse nematoide presente na área é o primeiro passo para o emprego correto e seguro das cultivares resistentes, a fim de evitar a pressão de seleção, visto que esse nematoide possui grande variabilidade genética (Riggs & Schmitt, 1993). No entanto, esses testes são de difícil realização, pois podem demorar meses, além de envolver linhagens de soja diferenciadoras (Pickett, Peking, PI 88788, PI 90763, Lee – padrão de suscetibilidade, Hartwig – padrão de resistência) não adaptadas para as nossas condições edafoclimáticas (Riggs & Schmitt, 1988).

Estudos sobre a diversidade genética dentro espécie *H. glycines* ainda são escassos e, em função da variabilidade genética apresentada pela espécie, tais estudos se fazem necessários. Através dos avanços na área de biologia molecular foi possível o desenvolvimento de técnicas de caracterização molecular. Neste contexto, a técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) vem sendo utilizada em análises de diversidade genética de diferentes tipos de fitopatógenos (Cobb & Clarkson, 1993; Faleiro et al., 1998). O RAPD se baseia na amplificação de fragmentos de DNA com o uso de “primers” de sequência arbitrária se destaca principalmente pela facilidade e simplicidade das análises.

Abdelnoor et al. (2001) verificaram a diversidade genética entre populações de *H.glycines*, utilizando marcadores RAPD observaram que as populações caracterizadas como raça 4 e 9 (não parasitaram a Hartwig) são geneticamente distintas das raças 4+ e 9+ (parasitam a Hartwig). Dessa forma, esses autores afirmaram que com tais marcadores é possível verificar diferenças no conjunto gênico que compõe diferentes raças desse nematoide. Silva et al. (2000), estudando a possível variação genética entre dezesseis populações do NCS, mostraram que os marcadores de RAPD podem ser empregados nos estudos de variabilidade genética entre populações e dentro das raças do nematoide e também, utilizados para o monitoramento da dinâmica populacional desse patógeno.

OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi a caracterização genética, de populações de *Heterodera glycines* provenientes de municípios produtores de soja, da região da Estrada de Ferro no Estado de Goiás em raças e também a caracterização molecular empregando marcadores de RAPD.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos, em ambiente protegido, no Instituto Federal Goiano – campus Urutaí no município de Urutaí – GO, tendo como suporte o Laboratório de Fisiologia Vegetal e do Parasitismo e o Laboratório de Genética Molecular (LaGeM) ambos da própria instituição. No primeiro momento realizou-se coletas de amostras de solo (5 kg de solo por amostra), na profundidade de 0-20 cm, em áreas comerciais de cultivo de soja, nos municípios da Região da Estrada de Ferro – GO (Figura 1). Foram amostrados no mínimo três propriedades distintas por município e foram retiradas as coordenadas geográficas das áreas amostradas (Tabela 1) e encaminhadas para o laboratório para realizar uma análise nematológica e confirmar a presença do nematoide de cisto no inóculo a ser multiplicado.

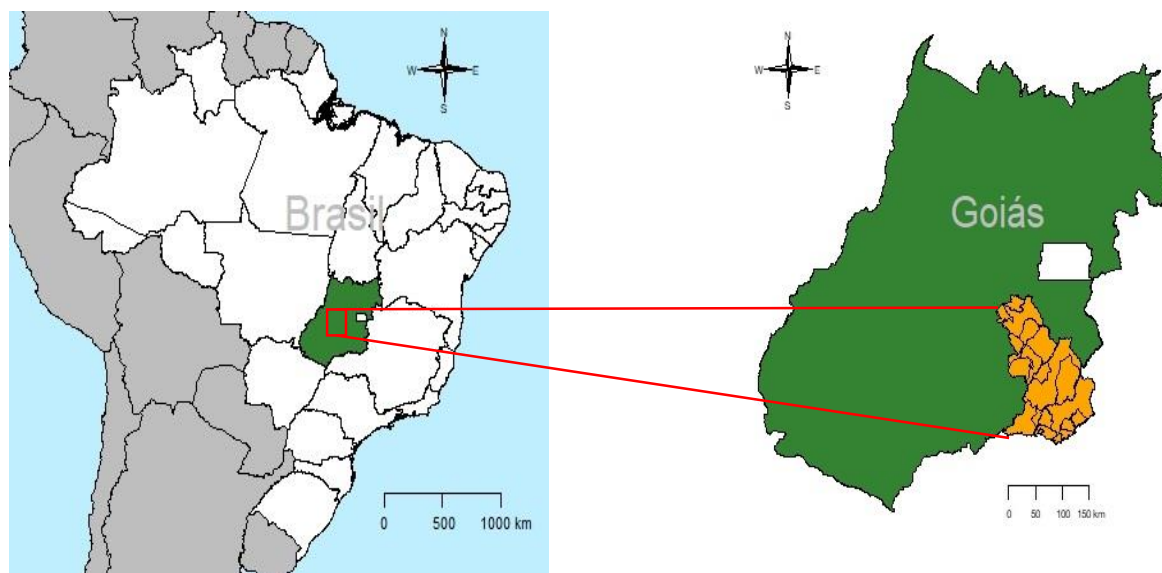


Figura 1. Região da Estrada de Ferro no Estado de Goiás. Urutaí, GO.

Tabela 1. Localização das amostras de solo coletadas para multiplicação do inóculo de *Heterodera glycines* e quantificação de cistos viáveis para compor a população inicial. Urutaí, GO.

Amostras coletadas	Município	Coordenadas geográficas		Cistos viáveis*
		W	S	
Orizona 1	Orizona	48,22592	16,58397	6
Orizona 2		48,1151	16,52163	52
Orizona 3		48,08596	16,5006	37
Orizona 4		48,08595	16,50066	100
Orizona 5		48,11774	16,505301	6
Vianópolis 6	Vianópolis	48,2716,6	16,53531	72
Vianópolis 7		48,18593	16,3446,7	313
Vianópolis 8		48,16247	16,40027	169

Vianópolis 9		48,24557	16,50595	241
Vianópolis 10**		48,491395	16,781386	10
Silvânia 11		48,677974	16,674365	12
Silvânia 12		48,677758	16,65622	96
Silvânia 13**	Silvânia	48,663515	16,658895	43
Silvânia 14		48,615235	16,713996	49
Silvânia 15		48,615741	16,715755	45
Silvânia 16		48,614301	16,712219	32
Leopoldo de Bulhões 17 ¹		48,800542	16,681599	28
Leopoldo de Bulhões 18		48,47354	16,39114	194
Leopoldo de Bulhões 19	Leopoldo de bulhões	48,729424	16,639343	11
Leopoldo de Bulhões 20		48,731473	16,650823	9
Leopoldo de Bulhões 21** ¹		48,715556	16,643514	2
Ipameri 22		48,17433	17,424684	59
Ipameri 23		48,17444	17,33882	10
Ipameri 24	Ipameri	48,12539	17,29189	47
Ipameri 25		48,12549	17,53294	85
Ipameri 26		48,07433	17,424631	269
Campo Alegre de Goiás 27		47,43203	17,42144	56
Campo Alegre de Goiás 28		47,49325	17,36303	136
Campo Alegre de Goiás 29	Campo Alegre	47,52033	17,30003	27
Campo Alegre de Goiás 30 ¹		47,51513	17,2914	196
Campo Alegre de Goiás 31 ¹		47,48176	17,36254	103
Gameleira de Goiás 32		48,35431	16,26196	90
Gameleira de Goiás 33** ¹	Gameleira de Goiás	48,43292	16,2214	12
Gameleira de Goiás 34** ¹		48,38231	16,27595	41
Gameleira de Goiás 35 ¹		48,39365	16,31351	2
Catalão 36** ¹		47,926855	18,183692	126
Catalão 38	Catalão	47,900372	18,305498	52
Catalão 39** ¹		47,903	18,305391	158

* = fêmea do nematoide morta com ovos retidos em seu interior

** = população amostrada que não realizou a caracterização molecular

¹ = população que não realizou a caracterização em raça

Caracterização genética em raça de populações de *H. glycines*

Para determinação de raças de *H. glycines* foram utilizadas populações provenientes de oito municípios produtores de soja (Gameleira de Goiás, Leopoldo de Bulhões, Silvânia, Vianópolis, Orizona, Ipameri, Campo Alegre de Goiás, Catalão) da região da Estrada de Ferro (estado de Goiás). O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 6 (linhagens

diferenciadoras de soja) x 29 (populações de *H. glycines* coletadas nos municípios supracitados) com dez repetições. É importante ressaltar que as populações que não atingiram a quantidade suficiente de inóculo (4.000 ovos e juvenis de segundo estágio (J2) do nematoide) não foram avaliadas (Tabela 1).

Para a condução do experimento utilizou-se as linhagens de soja diferenciadoras Pickett, Peking (PI 548402), PI 88788 e a PI 90763, o qual permite a caracterização de até 16 raças (Riggs & Schmitt, 1988), a cultivar 'Lee' 74 foi utilizada com padrão de suscetibilidade e a Hartwig como padrão de resistência (Niblack et. al., 2002). Amostras de solo contendo cistos de *H. glycines* foram coletadas em áreas naturalmente infestadas (Tabela 1) foram acondicionadas em vasos de cerâmica e semeadas sementes de soja (BRS Valiosa RR) suscetível ao nematoide (Embrapa, 2014) para multiplicá-los durante trinta dias. Depois os sistemas radiculares das plantas foram submetidos à extração das fêmeas e posteriormente de ovos, seguindo a metodologia proposta por Tihohod (2000) para obtenção da suspensão de ovos +J2 do nematoide a serem inoculadas.

As sementes das linhagens diferenciadoras de soja foram pré-germinadas em bandejas células, preenchidas com substrato para planta, e transplantadas para tubetes contendo apenas areia autoclavada a 120 °C por 20 minutos. No momento do transplante, foi realizada a inoculação (Riggs & Schmitt, 1988) das populações de *H. glycines*, no período mais fresco do dia, com auxílio de uma pipeta automática. Foram inoculados por plântula, uma suspensão contendo 4.000 ovos + J2 do nematoide.

Os tubetes foram mantidos em casa de vegetação e, trinta dias após a inoculação se fez a avaliação do número de fêmeas presentes no sistema radicular de cada diferenciadora. No laboratório, a parte aérea das plantas foram descartadas e as raízes foram lavadas sob jato forte de água sob conjunto de peneiras de 20 e 60 Mesh (Tihohod, 2000) para extrair as fêmeas dos sistemas radiculares. Em seguida, o material retido na peneira de 20 Mesh foi descartado e o que ficou retido na peneira de 60 Mesh foi recolhido em um béquer (com auxílio de uma pisseta) e filtrado em papel filtro sobre uma calha telada (Andrade et al., 1995). Em seguida, esse material filtrado foi encaminhado à um microscópio estereoscópio, com aumento de 15 x, para quantificar o número de fêmeas do nematoide.

A designação das raças, proposta por Riggs e Smith (1988), se dá em função do número de fêmeas que se desenvolve sobre cada linhagem diferenciadora, em relação ao número encontrado no cultivar padrão Lee 74. Desse modo, para cada uma das diferenciadoras é calculado o índice de fêmeas (IF). Se a diferenciadora apresentar um IF inferior a 10%, ela é classificada como resistente (-). No entanto, se apresentar um IF maior ou igual a 10%, é tida como suscetível (+).

Portanto, determinou-se as reações nas diferenciadora com base no IF, onde $IF = (\text{número médio de fêmeas presente a diferenciadora} / \text{número médio de fêmeas presente a cultivar 'Lee' 74}) * 100\%$. O IF foi utilizado para caracterizar a raça de cada população avaliada, de acordo com Riggs & Schmitt (1988).

Caracterização molecular de populações de *H. glycines*

A caracterização molecular das populações de *H. glycines* foi realizada através de 28 “primers” de RAPD (Tabela 2) previamente selecionados. O alto número de fragmentos amplificados por primer foi utilizado como critério para a seleção dos primers com base na literatura (Silva et al., 2000; Abdelnool et al., 2001; Lax et al., 2003).

Tabela 2. Relação dos “primers” de RAPD e suas sequências de nucleotídeos, utilizados para a caracterização de populações de *Heterodera glycines* provenientes de municípios da região da Estrada de Ferro (Goiás). Urutaí, GO.

Primers	Sequência (orientação 5'-3')	Primers	Sequência (orientação 5'-3')
OPAA-02	GAG ACC AGA C	OPAC-02	GTC GTC GTC T
OPAC-12	GGC GAG TGT G	OPA-13	CAG CAC CCA C
A-05	CAC CAG GTG A	OPA-07	GAA ACG GGT G
OPA-06	GGT CCC TGA C	A-03	AAG ACC CCT C
A-01	CCC AAG GTC C	OPAC-14	GTC GGT TGT C
OPAC-07	GTG GCC GAT G	AT-04	AAT CGG CTG
OPA-18	AGG TGA CCG T	OPAC-04	ACG GGA CCT G
OPA-11	CAA TCG CCG T	OPA-10	GTG ATC GCA G
OPAC-03	CAC TGG CCC A	OPA-08	GTG ACG TAG G
OPA-03	AGT CAG CCA C	OPAC-11	CCT GGG TCA G
OPAC-01	TCC CAG CAG A	OPAC-19	AGT CCG CCT G
OPA-02	TGC CGA GCT G	OPAD-02	CTG AAC CGC T
OPAD-11	CAA TCG GGT C	OPAC-06	CCA GAA CGG A
OPA-17	GAC CGC TTG T	OPAC-09	AGA GCG TAC C

O DNA genômico foi obtido a partir de fêmeas de *H. glycines* extraídas dos sistemas radiculares das plantas de soja, de cada população, seguindo a metodologia de Tihohod (2000). Uma quantidade de 50-100 fêmeas brancas de *H. glycines* de cada população foram coletadas em tubo Eppendorf de 2 mL e congeladas a -20 °C até o momento da extração. Vale ressaltar que as populações que não tiveram essa quantidade de espécimes do nematoide não compôs o teste, por esse motivo, foram avaliadas apenas 31 populações do NCS (Tabela 1). A extração do DNA foi feita usando tampão CTAB à 2% conforme a metodologia proposta por Doyle & Doyle (1990), com modificações: as fêmeas foram maceradas diretamente no tubo Eppendorf em nitrogênio líquido (N₂) com o auxílio de esferas de inox (6 mm).

O DNA extraído, das 31 populações do NCS, foi quantificado através de comparações visuais das bandas geradas de uma série de concentrações conhecidas de DNA fago λ (50, 100 e 200 ng) em géis de agarose (0,8%) e corados com brometo de etídio (0,5 mgL⁻¹) (Figura 2). Em seguida, o DNA foi diluído em água milliQ para concentração de uso de 10 ngμL⁻¹ e estocados a -20 °C.

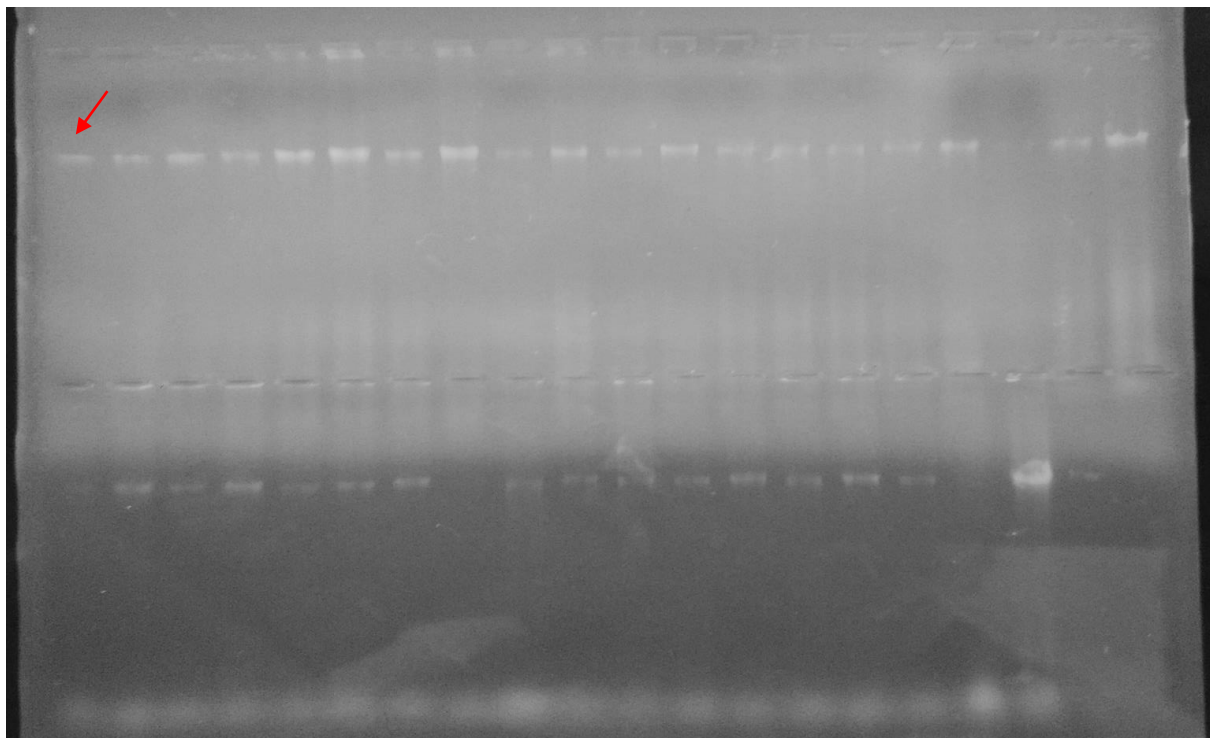


Figura 2. Fotografia do gel de agarose (0,8 %), cuja a “seta” destaca o DNA fago λ , para quantificação do DNA extraído de populações de *Heterodera glycines*, provenientes de municípios da Região da Estrada de Ferro, por comparação com o DNA fago λ (50, 100 e 200 ng). Urutaí, GO.

As reações de RAPD foram montadas para um volume final de 25 μ L, compostas de 10mM Tris-HCL (pH 8,3), 50 mM KCl, 2,4 mM de $MgCl_2$, 100 μ M de cada deoxiribonucleotídeo, 0,4 μ M do “primer”, 1 U de enzima Taq DNA polimerase, e 30 ng de DNA. As reações de PCR foram feitas em termociclador e programado com desnaturação inicial a 94 °C por 5 mim, seguidos de 45 ciclos composto por: desnaturação a 94 °C por 15 segundos, anelamento a 35 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto. Por fim, uma extensão final a 72 °C por 5 mim. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese horizontal, em gel de agarose 1,2% contendo brometo de etídio, e submerso em tampão TBE (0,09 M Tris-Borato; 0,002 M EDTA).

Os dados de RAPDs obtidos foram avaliados de forma binária, atribuindo valores de (1) para presença e (0) ausência da banda amplificada para cada primer. A matriz binária foi usada para estimar a distância genética entre as populações com base na dissimilaridade de Jaccard. A análise de agrupamento com base na matriz de dissimilaridade genética calculada foi obtida pelo método de Ward utilizando o programa estatístico R versão 3.0.3 (R Core Team, 2014).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre os anos de 2016 e 2018 foi realizado levantamento da distribuição do nematoide de cisto da soja em municípios da região da Estrada de Ferro (estado de Goiás) (Tabela 1) e, posteriormente, a identificação de suas respectivas raças fisiológicas. Do total de 48 amostras de solo coletadas em onze municípios, para avaliação inicial da presença do nematoide, em torno de 77% das amostras continham cistos (Tabela 1), demonstrando de forma clara a alta capacidade de disseminação deste patógeno em lavouras de soja (Silva et al., 1999).

As populações do NCS, em estudo (77% das amostras), apresentaram raças distintas (Tabela 3), totalizando 8 raças (1, 3, 4+, 6, 9, 10, 14 e 14+), o que indica habilidades diferentes deste patógeno em relação ao parasitismo e sua capacidade de se desenvolver e reproduzir em cultivares suscetível (Niblack et al., 2002).

Tabela 3. Índice de fêmeas – IF (%) de populações de *Heterodera glycines*, provenientes de municípios da região da Estrada de Ferro (GO), inoculadas em linhagens diferenciadoras de soja para identificação de raças fisiológicas do nematoide. Urutaí, GO.

População NCS	Município	IF (%) Pickett	IF (%) Peking	IF (%) PI 88788	IF (%) PI 90763	IF (%) Hartwig	Raça
1	Orizona 1	3,85 (-)	1,92 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)	3
2	Orizona 2	16,96 (+)	0,00 (-)	0,00 (-)	2,68 (-)	9,82 (-)	6
3	Orizona 3	34,55 (+)	10,30 (+)	0,00 (-)	6,86 (-)	0,00 (-)	9
4	Orizona 4	27,03 (+)	12,61 (+)	0,00 (-)	6,31 (-)	0,00 (-)	9
5	Orizona 5	19,07 (+)	4,48 (-)	0,00 (-)	10,82 (+)	0,00 (-)	10
6	Vianópolis 6	0,00 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)	3
7	Vianópolis 7	0,00 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)	6,96 (-)	3
8	Vianópolis 8	19,22 (+)	9,61 (-)	3,15 (-)	25,68 (+)	6,61 (-)	10
9	Vianópolis 9	0,00 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)	0,79 (-)	3
10	Vianópolis 10	3,49 (-)	0,00 (-)	2,95 (-)	0,54 (-)	0,00 (-)	3
11	Silvânia 11	0,00 (-)	0,00 (-)	1,19 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)	3
12	Silvânia 12	0,00 (-)	0,00 (-)	2,63 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)	3
13	Silvânia 13	0,00 (-)	0,00 (-)	2,94 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)	3
14	Silvânia 14	0,00 (-)	0,00 (-)	16,67 (+)	0,00 (-)	0,00 (-)	1
15	Silvânia 15	0,00 (-)	0,00 (-)	0,66 (-)	0,00 (-)	0,66 (-)	3
16	Silvânia 16	0,00 (-)	0,00 (-)	1,10 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)	3
18	Leopoldo de Bulhões 18	0,00 (-)	0,00 (-)	10,67 (+)	0,00 (-)	0,00 (-)	1
19	Leopoldo de Bulhões 19	0,00 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)	3
20	Leopoldo de Bulhões 20	0,00 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)	3
22	Ipameri 22	11 (+)	14,81 (+)	3,70 (+)	11,11 (+)	11,11 (+)	4+
23	Ipameri 23	207,00 (+)	7,34 (-)	0,15 (-)	8,72 (-)	0,00 (-)	6
24	Ipameri 24	0,95 (-)	0,95 (-)	0,95 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)	3
25	Ipameri 25	407,14 (+)	78,57 (+)	0,00 (-)	100,00 (+)	42,86 (+)	14+
26	Ipameri 26	36,52 (+)	5,12 (-)	0,34 (-)	10,92 (+)	0,00 (-)	10
27	Campo Alegre 27	53,01 (+)	42,17 (+)	1,20 (-)	42,17 (+)	0,00 (-)	14

28	Campo Alegre 28	129,08 (+)	22,01 (+)	0,82 (-)	26,57 (+)	0,00 (-)	14
29	Campo Alegre 29	22,86 (+)	9,32 (-)	0,00 (-)	2,00 (-)	0,00 (-)	6
32	Gameleira de Goiás 32	0,00 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)	3
38	Catalão 38	0,00 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)	4,95 (-)	0,00 (-)	3

(-) = diferenciadora de soja RESISTENTE à população avaliada

(+) = diferenciadora de soja SUSCETÍVEL à população avaliada

Essa variabilidade elevada das raças neste estudo corrobora com Dias et al. (2010) quando asseguraram que a evolução das raças do NCS, no Brasil, tem acontecido de forma muito rápida. O panorama de distribuição de raças do NCS no ano de 1994 apresentou apenas as raças 3 e 14 no estado de Goiás (Noel et al., 1994). Em Chapadão do Céu (estado de Goiás), em 1999, foram encontradas as raças 3, 4, e 6 (Silva et al., 1999). No levantamento da ocorrência do NCS no Brasil, realizado por Dias et al. (2004), foram relatadas a presença das raças 3 (Ipameri e Rio Verde), 9 (Jataí), 10 (Rio Verde) e 14 (Chapadão do Céu, Campo Alegre de Goiás, Jataí e Mineiros). Na safra 2004/2005, foram relatadas as raças 3, 6, 10 e 14 no sudoeste goiano (Rio Verde, Montividiu e Jataí) (Baumgratz et al., 2005). Além dessas raças já mencionadas anteriormente (exceto a raça 10), foi detectada também a raça 4 em Mineiros, no sudoeste goiano, na safra de 2006/2007 (Ribeiro et al., 2006). Figueiredo (2008) identificou a presença das raças 3, 5, 6 e 15 em Jataí no estado de Goiás.

Ademais, notou-se que a raça com maior predominância foi a 3 (50% das amostras) presente em todos os municípios, exceto em Campo Alegre de Goiás; seguida das raças 6 e 10 (ambas representando 10% das amostras); as raças 1 e 9 (cada uma representando 6,7%) e finalmente as raças 4+, 14 e 14+ (3,3% das amostras cada raça). Para Silva et al. (1999) a predominância da raça 3 expressa o caráter mais selvagem, uma vez que a maioria das populações apresentaram o índice de fêmeas (IF%) igual a zero em todas as diferenciadoras. Faz-se necessário ressaltar que as raças 4+ e 14+ se diferenciam das raças 4 e 14 clássicas, pela habilidade, dessas duas primeiras, de parasitar a cultivar norte-americana Hartwig, até então considerada resistente a todas as raças (Dias et al., 2004; Dias et al., 2009).

No município de Orizona, foram constatadas as raças 3 (20% das amostras), 6 (20% das amostras), 9 (40% das amostras) e 10 (20% das amostras). Em Vianópolis as raças encontradas foram a 3 (80% das amostras) e 10 (20% das amostras). Já em Silvânia, detectou-se a raça 3 (83,3% das amostras) e 1 (16,7% das amostras). Em Leopoldo de Bulhões, também foram encontradas as raças 3 (66,7% das amostras) e 1 (33,3% das amostras). As raças 4+, 6, 3, 14+ e 10 (cada raça representaram 20% das amostras) foram detectadas em Ipameri. Em Campo Alegre de Goiás identificou as raças 6 (25% das amostras) e 14 (50% das amostras). Já em Gameleira de Goiás e Catalão, foi encontrada apenas a raça 3 (100% das amostras) em ambos municípios.

De acordo com Figueiredo (2008) a existência de mais de um tipo e raça do *H. glycines*, indica

que os cultivares de soja utilizadas pelos produtores rurais, em plantios comerciais, exerceram significativa pressão de seleção sobre as populações de NCS existentes. Rao-Arelli (1992) explicou que isso acontece em decorrência da maioria dos materiais de soja resistentes tem genes de Peking (raças 1, 3 e 5), PI88788 (raças 3 e 14) ou de ambas, acompanhado do cultivo por mais de dois anos de uma cultivar de soja resistente. Essa condição, mencionada anteriormente, é suficiente para alterar sua frequência gênica do patógeno, tornando-se assim outra raça que não reconhece aquela variedade de soja como resistente (Santos, 2014). É certo que o manejo do NCS nessa região deve-se pensar em aderir a rotação de culturas e outras ferramentas de manejo, e não apenas o uso exclusivo do controle genético.

Dos 28 “primers” de RAPD testados (Tabela 2) 18 “primers” não amplificaram ou tiveram baixa amplificação de fragmento de DNA: OPAC-01, OPA-02, OPAD-11, OPA-17, OPAC-02, OPA-13, OPA-07, A-03, OPAC-14, AT-04, OPAC-04, OPA-10, OPA-08, OPAC-11, OPAC-19, OPAD-02, OPAC-06 e OPAC-09. Embora em outros estudos com o NCS, estes “primers” apresentaram amplificação com pelo menos 3 bandas polimórficas por “primers” (Silva et al., 2000; Abdelnool et al., 2001; Lax et al., 2003). As causas dessa baixa amplificação são desconhecidas, uma vez que o DNA extraído era de boa qualidade, sem sinais de degradação e contaminação de polissacarídeos.

Neste contexto, apenas 10 “primers” apresentaram polimorfismo, que resultaram 50 produtos de amplificação (bandas no gel de agarose), com média de cinco bandas por “primers” sendo 46 bandas polimórficas (Tabela 4) e as 4 bandas restantes apresentaram o mesmo padrão em todas as populações.

Tabela 4. Relação dos “primers” de RAPD e número de bandas (polimórficas e monomórficas) amplificadas e reveladas em gel de agarose a 1,2 % sob a luz UV.

Primers	Sequência 5'-3'	Bandas	
		polimórficas	monomórficas
OPAA-02	GAG ACC AGA C	8	0
OPAC-12	GGC GAG TGT G	4	1
A-05	CAC CAG GTG A	1	0
OPA-06	GGT CCC TGA C	2	0
A-01	CCC AAG GTC C	5	1
OPAC-07	GTG GCC GAT G	8	1
OPA-18	AGG TGA CCG T	5	0
OPA-11	CAA TCG CCG T	3	0
OPAC-03	CAC TGG CCC A	7	0
OPA-03	AGT CAG CCA C	3	1
total		46	4

total de
bandas

50

Os acessos populacionais do NCS por municípios apresentaram um elevado isolamento genético conforme o valor médio da dissimilaridade de Jaccard calculado a partir das médias das distâncias genéticas, variando de 0,64 entre as populações de Vianópolis e Ipameri, a 0,82 entre as populações Silvânia e Catalão (Tabela 5). Ainda ressalta que não houve uma correlação positiva entre as distâncias genéticas entre os genótipos das populações e as distâncias geográficas (distribuição espacial) das mesmas.

Tabela 5. Matriz da média de dissimilaridade genética entre as populações de *Heterodera glycines*, por município de coleta, calculada com base no coeficiente de Jaccard. Urutaí, GO.

Origem das populações	Ori.	Via.	Sil.	Leo.	Ipa.	Cam.	Gam.	Cat.
Vianópolis (Via.)	0,74							
Silvânia (Sil.)	0,77	0,73						
Leopoldo de Bulhões (Leo.)	0,81	0,77	0,66					
Ipameri (Ipa.)	0,66	0,64	0,67	0,73				
Campo Alegre de Goiás (Cam.)	0,75	0,79	0,81	0,79	0,70			
Gameleira de Goiás (Gam.)	0,75	0,74	0,76	0,73	0,66	0,71		
Catalão (Cat.)	0,77	0,77	0,82	0,80	0,72	0,74	0,70	

Este elevado grau de dissimilaridade entre as populações de *H. glycines* de cada município pode ser retratada na análise de agrupamento (método de Ward), com a formação de dois grupos principais G1 (com menor variabilidade genética em raças) e G2 (com maior variabilidade genética em raças) distintos entre si (Figura 2). O G1 foi constituído pelas populações advindas de Silvânia e Leopoldo de Bulhões, onde estavam presentes apenas as raças 1 e 3; enquanto que o G2 (formado por dois subgrupos, G2.1 e G2.2), sendo o G2.1 constituído com as populações dos municípios de Orizona, Vianópolis, Ipameri (raças 3, 6, 9, 10, 4+ 14+) e o G2.2 com as de Campo Alegre de Goiás, Gameleira de Goiás e Catalão (raças 3, 6 e 14) (Figura 3).

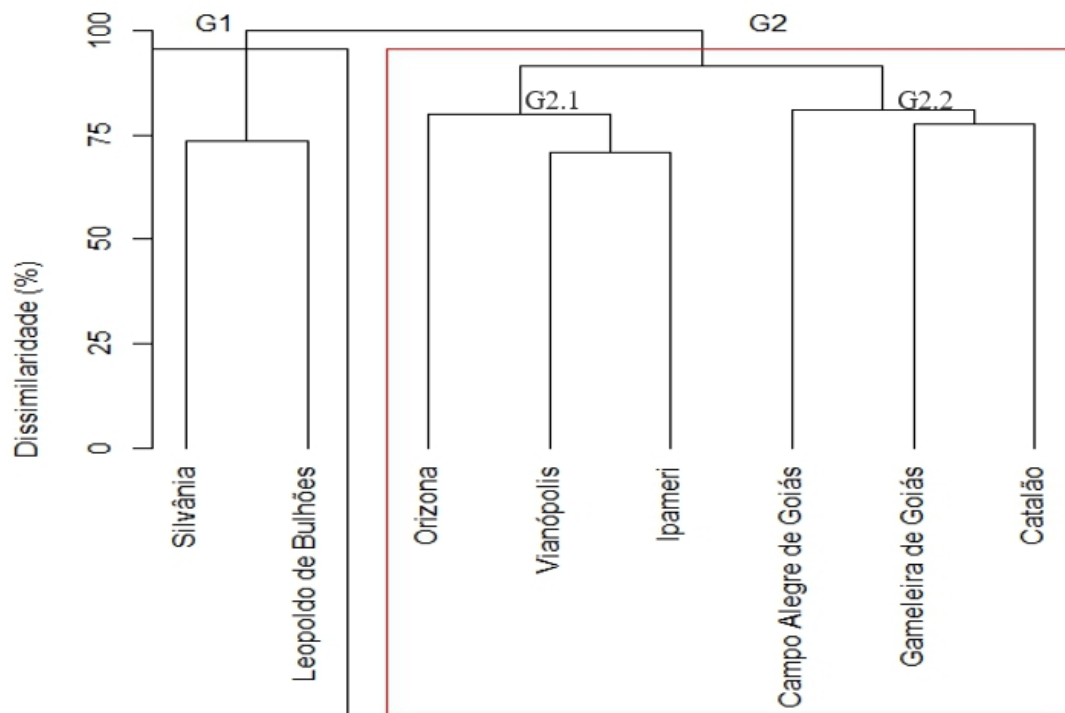


Figura 3. Dendrograma originado a partir das médias de dissimilaridade das populações de *Heterodera glycines* de cada município avaliado. Urutaí, GO.

Entre os acessos populacionais de *H. glycines*, foi revelado a formação de cinco grupos genotípicos distintos (Figura 4), agrupados com mais de 60% de dissimilaridade entre eles, confirmando a variabilidade entre as raças do patógeno (Riggs & Schmitt, 1988). O primeiro grupo foi composto por três populações classificadas como raças 4+, 9 e 14. O segundo grupo foi constituído por seis populações, caracterizada como raças 1 e 3. No terceiro grupo foram agrupadas sete populações, representado pelas raças 3, 6, 10. O quarto grupo, também foi constituído por sete populações e pelas raças 3, 9 e 10. E por fim o quinto grupo abrangeu oito populações sendo composto pelas raças 3, 6, 10, 14 e 14+.

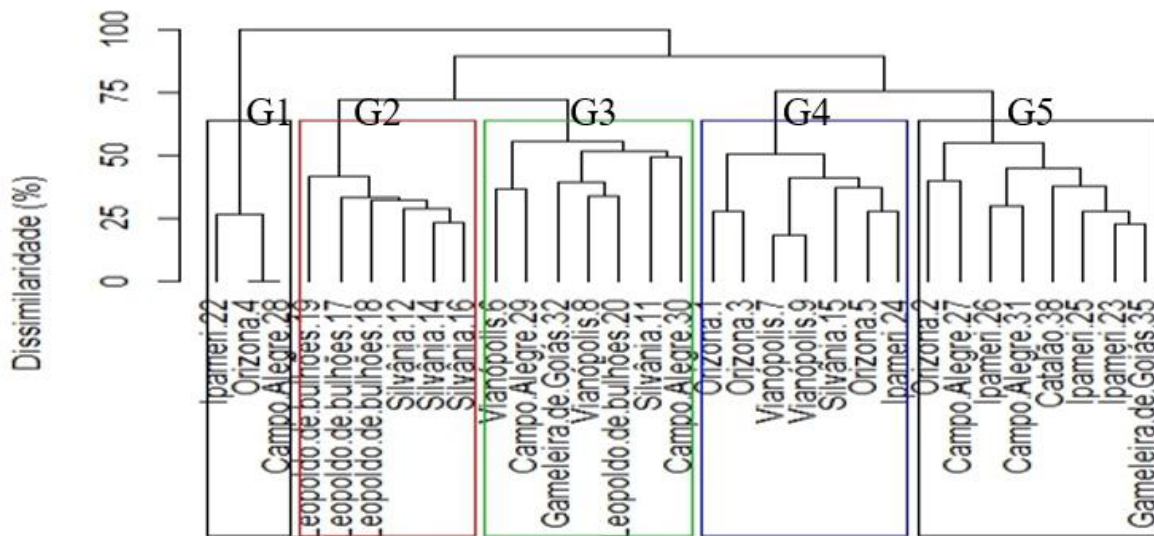


Figura 4. Dendrograma de dissimilaridade genética de 31 populações de *Heterodera glycines*, provenientes de municípios da região da Estrada de Ferro (Goiás) com base no índice de Jaccard, estimado a partir de 10 “primers”. Urutaí, GO.

Esperava-se, que dentro dos grupos genotípicos (Figura 4) não tivesse variação das raças fisiológicas do patógeno, como abordou estudo de Abdelnoor et al. (2001) que obtiveram três grupos distintos, sendo que no primeiro grupo continham populações classificadas como raça 4; no segundo grupo ficaram as populações que parasitaram a Hartwig e no terceiro, enquadraram a raça 9. No entanto, esses conjuntos de acessos populacionais do NCS de raças distintas, apareceram no mesmo grupo, sugerindo que eles sejam similares geneticamente em alguns *locus*, podendo até compartilhar regiões em comum. Isto é justificável, uma vez que a técnica de RAPD amplifica diferenças ao acaso e, nesta análise, não tenha sido suficientemente sensível para detectar tal diferença particular.

Diante do exposto notou-se que esses grupos gerados a partir das distâncias genéticas, embora continham raças diferentes no mesmo nível, eles compartilhavam em comum, características peculiares ao seu parasitismo nas diferenciadoras: as populações do G1, todas apresentaram a habilidade de parasitar as diferenciadoras Pickett e Peking; os acessos agrupados em G2 envolve as populações que não parasitam as diferenciadoras Pickett, Peking, PI 90763 e Hartwig; já em G3 e G4 se caracterizam pelas populações que não hospedam nas diferenciadoras PI 88788 e Hartwig; por sua vez, as populações do G5 nenhuma conseguem parasitar a PI 88788 (Tabela 6).

Tabela 6. Parasitismo das populações de *Heterodera glycines* provenientes de municípios da Região da Estrada de Ferro no Estado de Goiás, nas diferenciadoras de soja utilizadas no teste de raça proposto por Riggs & Schmitt (1988). Urutaí, GO.

Grupos genotípicos	População NCS	Pickett		Peking		PI 88788		PI 90763		Hartwig		Raça
		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	
G1	22	22		22		22		22		22		4+
	4	4		4			4		4		4	9
	28	28		28		28	28				28	14
G2	19		19		19		19		19		19	3
	17											-
	18		18		18	18		18		18		1
	12		12		12		12		12		12	3
	14		14		14	14		14		14		1
	16		16		16		16		16		16	3
G3	6		6		6		6		6		6	3
	29	29		29		29		29		29		6
	32		32		32		32		32		32	3
	8	8		8		8	8				8	10
	20		20		20		20		20		20	3
	11		11		11		11		11		11	3
	30		30	30		30		30		30		13
G4	1		1		1		1		1		1	3
	3	3		3		3		3		3		9
	7		7		7		7		7		7	3
	9		9		9		9		9		9	3
	15		15		15		15		15		15	3
	5	5		5		5	5				5	10
	24		24		24		24		24		24	3
G5	2	2		2		2		2		2		6
	27	27		27		27	27				27	14
	26	26		26		26	26				26	10
	38		38		38		38	38		38		3
	25	25		25		25	25		25		25	14+
	23	23		23		23		23		23		6

+ = diferenciadora é SUSCETÍVEL à população do NCS

- = diferenciadora é RESISTENTE à população do NCS

A saber que não há correlação positiva entre as distâncias geográficas (distribuição espacial) e as distâncias genéticas (genótipos semelhantes), subentende-se que é através dos mecanismos de disseminação (garantido pelos cistos) do *H. glycines*, aliado ao compartilhamento de maquinários e implementos agrícolas, sem a manutenção de limpeza nos mesmos (afim de não levar torrões de terra

que contenham o inóculo do NCS de um local para outro), entre os produtores rurais de diferentes municípios e, a utilização de cultivares resistentes por vários anos consecutivos, que estão promovendo a variabilidade de raças desse patógeno nessa na região da Estrada de Ferro.

CONCLUSÕES

Foram encontradas 8 raças fisiológicas distintas (1, 3, 4+, 6, 9, 10, 14 e 14+) de *Heterodera glycines* em municípios da região da Estrada de Ferro (Estado de Goiás).

No município de Orizona, foram constatadas as raças 3, 6, 9 e 10. Em Vianópolis as raças encontradas foram a 3 e 10. Já em Silvânia e Leopoldo de Bulhões, detectou-se as raças 3 e 1 em ambos municípios. As raças 3, 4+, 6, 10 e 14+ foram detectadas em Ipameri. Em Campo Alegre de Goiás identificou as raças 6, e 14. Já em Gameleira de Goiás e Catalão, detectou apenas a raça 3.

Foram obtidos cinco grupos geneticamente distintos entre os acessos populacionais de *H. glycines* provenientes de municípios da região da Estrada de Ferro, cuja variabilidade genética entre eles foi elevada.

REFERÊNCIAS

- Abdelnoor, R. V., Dias, W. P., Silva, J. F. V., Marin, S. R. R., Kiihl, A. S. (2001). Caracterização molecular do nematoide-de-cisto-da-soja com índices de parasitismo na cultivar Hartwig. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 36 (2), 331-337.
- Andrade, P. J. M., Asmus, G. L., & Silva, J. F. V. (1995). Um novo sistema para detecção e contagem de cistos de *Heterodera glycines* recuperados de amostras de solo. In: *Anais do XXVIII Congresso Brasileiro de Fitopatologia* (pp.358-358). Ilhéus.
- Asmus, G. L., Teles, T. S., Anselmo, J., Rosso, G. T. (2012). Raças de *Heterodera glycines* na região Nordeste de Mato Grosso do Sul. *Tropical Plant Pathology*, 37 (2), 146-148.
- Baumgratz, C., Campos, H. D., Silva, L. H. C., Campos J. R., Neves, D. L. Nascimento, K. J. T. (2005). Levantamento de raças de nematoides *Heterodera glycines* no sudoeste goiano. In: *Congresso Brasileiro de Fitopatologia*, 38., 2005, Brasília: UnB, p. 697.
- Brucker, E., Carlson, S., Wright, E., Niblack, T., Diers, B. (2005). Rhg1 alleles from soybean PI 437654 and PI 88788 respond differentially to isolates of *Heterodera glycines* in the greenhouse. *Theoretical and Applied Genetics*, 111 (1), 44-40.
- Cobb, B. D., Clarkson, J. M. (1993) Detection of molecular variation in the insect pathogenic fungus *Metarhizium* using RAPD-PCR. *FEMS Microbiology Letters*, 112, 319-324.
- Dhingra, O. D., Mendonça, H. L., Macedo, D. M. (2009). Doenças e seu controle. In: Sedyama, T. *Tecnologias de produção e usos da soja*. Londrina: Mecnas, 2009. p. 133-155.
- Dias, W. P., Silva, J. F. V., Kiihl, R. A. S., Hiromoto, F. M., Abdelnoor, R. V. (1998). Quebra da resistência da cv. Hartwig por população de campo do nematoide de cisto da soja (*Heterodera glycines*). *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 33 (6), 97.
- Dias, W. P., Silva, J. F. v., Garcia, A., Carneiro, G. E. S. (2004). Biologia e controle do nematoide de cisto da soja (*Heterodera glycines* Ichinohe). Resultado de pesquisa da Embrapa, Embrapa Soja, documentos 278, 10-13.
- Dias, W. P., Silva, J. F. V., Carneiro, G. E. S., Garcia, A., & Arias, C. A. A. (2009). Nematoide de cisto da soja: biologia e manejo pelo uso da resistência genética. *Nematologia Brasileira*, 33 (1), 1-16. <http://docentes.esalq.usp.br/sbn/nbonline/ol%20331/1-16%20co.pdf>
- Dias, W. P., Silva, J. F. V., Garcia, A., Carneiro, G. E. S. (2010). Nematoides em soja: Identificação e controle. Circular técnica, Londrina: Embrapa Soja.
- Embrapa (Empresa Brasileira De Pesquisa Agropecuária), Centro Nacional de Pesquisa de Soja. (2006). Tecnologia de produção de Soja Região central do Brasil 2007, Sistema 11 de Produção, 10, 65-89.
- Embrapa (Empresa Brasileira De Pesquisa Agropecuária). Soja BRS Valiosa RR. (2014). Available in: <<https://www.embrapa.br/soja/busca-de-produtos-processos-e-servicos/-/produto-servico/237/soja---brs-valiosa-rr>>. Access: 10 dez. 2014.
- Embrapa (Empresa Brasileira De Pesquisa Agropecuária). Tecnologias de produção de soja – Região Central do Brasil 2004. (2015). Available: <<http://www.cnpsa.embrapa.br/producaosoja/doenca.htm>>. Access in: 16 abr. 2015.
- Faleiro, F. G., Ragagnin, V. A., Mesquita, A. G. G., Vinhadelli, W. S., Paula Júnior, T. J., Moreira, M. A., Barros, E. G. (1998). Genetic diversity of isolates of *Uromyces appendiculatus* with the aid of RAPD molecular markers. *Fitopatologia Brasileira*, 23

- (3), 386-390.
- Figueiredo, A. (2008). Caracterização de tipos e raça de populações do nematoide de cisto da soja detectadas no município de Jataí/GO e proximidades por hospedeiros diferenciadoras. (Dissertação mestrado). Universidade Federal de Uberlândia, Brasil.
- Lax, P., Duenas, J. C. R., Gardenal, C. N., Doucet, M. E. (2004). Genetic variability estimated with RAPD-PCR markers in two populations of *Heterodera glycines* Ichinohe, 1952 (Nematoda: Heteroderidae) from Argentina. *Nematology*, 6 (1), 13-21.
- Li, Y., Chen, S., Young, N. D. (2004). Effect of the *rgh1* gene on penetration, development and reproduction of *Heterodera glycines* race 3. *Nematology*, 6 (5), 729-736.
- Lima, R. D., Ferraz, S., & Santos, J. M. (1992). Ocorrência de *Heterodera* sp., em soja no Triângulo Mineiro. *Nematologia Brasileira*, 16 (1/2), 101-102.
- Lordello, A. I. L., Lordello, R. R. A., & Quaggio, J. A. (1992). Ocorrência do nematoide de cistos da soja (*Heterodera glycines*) no Brasil. *Revista de Agricultura*, 67 (3), 223-225.
- Monteiro, A. R., & Morais, S. R. A. C. (1992). Ocorrência do nematoide de cistos da soja, *Heterodera glycines* Ichinohe, 1952, prejudicando a cultura no Mato Grosso do Sul. *Nematologia Brasileira*, 16 (1/2), 101-102.
- Niblack, T. L. et al. (2002). A revised classification scheme for genetically diverse populations of *Heterodera glycines*. *Journal of Nematology*, 34 (4), 279-288.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2620582/>
- Noel, G. R., Mendes, M. L., Machado, C. C. (1994). Distribution of *Heterodera glycines* race in Brazil. *Nematropica*, 24 (1), 63-68.
- R Core Team. (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <http://www.R-project.org/>.
- Rao-Arelli, A. P., Anand, S. C.; Weather, A. (1992). Soybean resistance to soybean cyst nematode race 3 is conditioned by an additional dominant gene. *Crop Science*, 28, 650-652
- Ribeiro, G. C., Campos, H. D., Silva, J. R. C., Silva, L. H. C. P., Nunes Júnior, J. (2006). Distribuição de raças de *Heterodera glycines* no estado de Goiás, na safra 2005/2006. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 39., 2006, Salvador, p. 722.
- Riggs, R. D., Hamblen, m. l., Rakes, L. (1997). Development of *Heterodera glycines* pathotypes as affected by soybean cultivars. *Journal of Nematology*, 9, 312-318.
- Riggs, R. D., & Schmitt, D. P. Soybean cyst nematode. In: Sinclair, J. G., & Barckman, P. A., *Compendium of soybean disease*, 1993, USA. USA: The American Phytopathological Society Press, p. 65-67, 1993.
- Riggs, R. D., Schmitt, D. P. (1988). Complete characterization of the race scheme for *Heterodera glycines*. *Journal of Nematology*, 20 (3), 392-395.
- Santos, M. A. (2014). Minúsculos e desafiadores. *Revista cultivar grandes culturas (caderno técnico:Soja)*, 182 (7), 04-11.
- Silva, A. T., Penna, J. C. V., Goulart, L. R., Santos, M. A.; Arantes, N. E. (2000). Genetic variability among and within races of *Heterodera glycines* Ichinohe assessed by RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology*, 23 (2), 323-329.
- Silva, J. A. L., Sedyama, T., Teixeira, R. C., Oliveira, R. D. L. (1999). Raças fisiológica do nematoide de cisto da soja (*Heterodera glycines*), nos Estados de Goiás, Mato Grosso, Mato

- Grosso do Sul e Minas Gerais. Revista Ceres, 46 (263), 45-52.
- Tihohod, D. (2000). *Nematologia agrícola aplicada*. Jaboticabal: FUNEP.
- Triantaphyllou, A. C., Esbenshade, P. R. (1990). Demonstration of multiple mating in *Heterodera glycines* with biochemical markers. Journal of Nematology, 22, 452-456.
- Young, L. D. (1996) Yield loss in soybeans caused by *Heterodera glycines*. Journal of Nematology, v. 28, n. 4S, p. 604-607.
- Yorinori, J. T. (2000). Riscos de surgimento de novas doenças na cultura da soja. In: Congresso de Tecnologia e competitividade da soja no mercado global (165-169). Fundação MT: Cuiabá.