

## USO DE MARCADORES MOLECULARES NO ESTUDO DO NEMATÓIDE DE CISTO DA SOJA.

Ricardo Vilela Abdelnoor & Álvaro M. R. Almeida  
Centro Nacional de Pesquisa de Soja - Embrapa Soja  
C.P.231, 86 001-970, Londrina, PR  
E-mail: Abdelnor.@cnpso.embrapa.br

### Introdução

O uso de marcadores moleculares em estudos com o nematóide de cisto da soja (NCS) no Brasil é bastante recente, visto que este fitoparasita foi identificado em 1992. Marcadores moleculares são um tipo de marcador genético que vem sendo utilizado com sucesso no estudo de diferentes organismos, como plantas, animais e microorganismos. Dentre as várias aplicações que a técnica de marcadores moleculares pode oferecer, destacam-se os estudos de variabilidade genética, mapeamento de características de importância econômica, monitoramento de retrocruzamentos, seleção assistida, seleções de parentais para cruzamentos, construções de mapas genéticos, dentre outros.

Desde o início do século 20, marcadores genéticos, que podem ser definidos como quaisquer características herdáveis que possam ser associadas a características de importância agronômica, vêm sendo usados no estudo da genética de diferentes organismos. O primeiro tipo de marcador genético utilizado foi o baseado em características morfológicas; mas, devido ao seu número limitado e de ser bastante influenciado pelo ambiente, o seu uso atual tornou-se bastante restrito. Outro tipo de marcador que vem sendo bastante utilizado são as isoenzimas, que são marcadores moleculares baseados em proteínas (Heidrich-Sobrinho, 1982). As isoenzimas são enzimas com funções idênticas, mas com diferentes mobilidades eletroforéticas, que podem ser separadas por eletroforese em gel de amido e visualizadas por métodos histoquímicos, específicos para cada isoenzima. As isoenzimas apresentam vantagem sobre os marcadores morfológicos pelo fato de serem produtos diretos da expressão de genes específicos, mas como dependem da expressão desses genes, podem ser também afetadas pelas condições ambientais. Apesar de serem um pouco mais numerosas

que os marcadores morfológicos, as isoenzimas também apresentam-se em um número reduzido, o que limita o nível de polimorfismo.

#### **Marcadores Moleculares baseados no DNA**

Com o advento de técnicas de biologia molecular, surgiram marcadores moleculares com base no DNA, que são detetados diretamente pela avaliação das diferenças que ocorrem na seqüência de bases do DNA. Esses marcadores apresentam um número praticamente ilimitado e não são influenciados pelo ambiente, visto que, ao contrário dos marcadores morfológicos e isoenzimáticos, o produto não depende da expressão gênica. Os marcadores RFLP, RAPD, microssatélites e AFLP são os que mais se têm destacado no estudo da genética de diferentes organismos.

**RFLP**- Marcadores RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ou polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (Botstein et al., 1980), baseiam-se na fragmentação do DNA com enzimas de restrição e hibridização de sondas específicas a estes fragmentos. O polimorfismo advém do fato de que diferentes indivíduos podem ter seu DNA cortado em diferentes posições, gerando, assim, fragmentos de diferentes tamanhos. Esses marcadores comportam-se como marcadores co-dominantes, visto que ambos os alelos podem ser visualizados em indivíduos heterozigotos.

**PCR** - A técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction), ou reação em cadeia da polimerase, foi descrita pela primeira vez em estudos de genética humana (Saiki et al., 1985). Esta técnica baseia-se na amplificação de segmentos específicos do DNA, utilizando-se de "primers" que flanqueiam o segmento a ser amplificado. Esses "primers" hibridizam-se a seqüências complementares do DNA, de tal forma que a amplificação ocorre na região compreendida entre os "primers". O princípio desta técnica vem sendo usado no desenvolvimento de inúmeras tecnologias, inclusive de diversos tipos de marcadores moleculares.

**RAPD - O RAPD** (Random Amplified Polymorphic DNA), ou polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (Williams et al., 1990), também conhecido como AP-PCR (Welsh & McClelland, 1990), é um dos tipos de marcadores baseado na técnica de PCR. A grande diferença em relação ao PCR é que, no RAPD, os "primers" são de seqüência aleatória, enquanto que, no PCR, é necessário que se conheça previamente a seqüência

do fragmento que se deseja amplificar. Os marcadores RAPD são gerados pela amplificação de segmentos espalhados no genoma com o uso de "primers" únicos de seqüência arbitrária. Como na técnica do PCR, estes "primers", com tamanho de aproximadamente 10 nucleotídeos, ligam-se a seqüências complementares no genoma, permitindo que assim haja amplificação de segmentos compreendidos entre estes. Os produtos de amplificação gerados podem ser separados por eletroforese em gel agarose ou poliacrilamida e corados com brometo de etídio ou prata. Os marcadores RAPD são geralmente dominantes, com o polimorfismo verificado pela presença ou ausência de um determinado fragmento.

**Microssatélites** - Microssatélites, também conhecidos como SSR (Simple Sequence Repeat), são seqüências genômicas simples que consistem de mono-, di-, tri- ou tetranucleotídeos, repetidos em múltiplas cópias, lado a lado (TAUTZ, 1989). Dentre os marcadores moleculares disponíveis atualmente, os microssatélites constituem a classe com o mais alto grau de polimorfismo. A técnica baseia-se no fato de que as seqüências de DNA que flanqueiam os microssatélites são conservadas, permitindo a seleção de "primers" específicos. Assim, estes "primers" são usados para amplificar as regiões repetitivas, usando a reação em cadeia da polimerase (PCR), gerando bandas que podem variar de indivíduo para indivíduo. Estes polimorfismos são detetados quando o produto da amplificação de um locus em particular difere em comprimento do produto de um outro genótipo, devido a diferenças no número de unidades repetidas existentes na região entre os "primers", caracterizando o comportamento co-dominante deste tipo de marcador, sendo encontrados, freqüentemente, casos de múltiplos alelos. Dentre as espécies vegetais, a soja é a cultura que mais tem recebido a utilização desse tipo de marcador. Isso se deve, principalmente, ao seu baixo nível de diversidade genética, fazendo com que marcadores que forneçam níveis de polimorfismo mais elevado, como os microssatélites, sejam extremamente úteis.

**AFLP** - Os marcadores AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), ou polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (Vos et al., 1993), são baseados na amplificação seletiva, pela técnica de PCR, de fragmentos de DNA pré-digeridos com duas enzimas de restrição específicas, uma de corte raro e outra de corte freqüente, no genoma. Em cada reação de amplificação, são gerados múltiplos fragmentos de DNA, distribuídos aleatoriamente no genoma. Estes fragmentos gerados

são então separados em gel de poliacrilamida desnatante. O polimorfismo é verificado pela amplificação ou não de determinado segmento do genoma, tratando-se, portanto, de um marcador do tipo dominante, embora, em alguns casos, seja possível identificar o heterozigoto pela intensidade das bandas.

#### Uso de Marcadores Moleculares no estudo genético da resistência ao NCS

Ultimamente, com a descoberta do nematóide do cisto da soja (NCS), no Brasil, na safra 1991/92, esforços têm sido direcionados no sentido de se obterem métodos de controles eficientes a este fitoparasita, visto que é um dos mais temidos parasitas da soja, podendo causar enormes perdas nas lavouras infestadas. Apesar da existência de alguns métodos que podem ajudar no controle desta enfermidade, como rotação de cultura, uso de nematicidas e controle biológico, a maneira mais prática e econômica de controle, em larga escala, é por meio do uso de cultivares resistentes. Nos Estados Unidos, ANAND et al. (1994) relatam a existência de 130 cultivares resistentes a diferentes raças desse fitoparasita. No entanto, nenhuma destas cultivares são adaptadas para a produção comercial no Brasil. Com base em resultados obtidos durante um levantamento preliminar do NCS e de experimentos para a avaliação de resistência de plantas, conduzidos nas áreas infestadas, concluiu-se que as principais cultivares de soja recomendadas para o plantio no Brasil são suscetíveis. Portanto, programas de melhoramento visando a transferir genes de resistência ao NCS já foram iniciados no Brasil, nas várias instituições de pesquisa que se dedicam a esta cultura. No entanto, o método utilizado para monitorar essa transferência gênica é muito trabalhoso e demorado, uma vez que envolve o isolamento de raças específicas do nematóide, inoculação nas progênies a serem testadas e avaliação do nível de dano, nas milhares de linhagens que compõem estes programas. Deve-se considerar, também, o custo elevado desse tipo de procedimento, pois a mão-de-obra necessária é bastante grande, além de espaço físico em casas-de-vegetação, usadas para manter milhares de plantas, espaço este que poderia estar sendo usado em outros programas de melhoramento.

O uso de marcadores moleculares surge então como uma ferramenta de auxílio nesse processo de transferência de genes para resistência. O uso de marcadores ligados a genes de interesse agrônomico vem sendo usado

largamente nas mais diferentes culturas, inclusive em soja. A seleção assistida por marcadores apresenta várias vantagens sobre o método tradicional de seleção, pois permite que grande número de linhagens seja analisado em poucos dias, enquanto, pelo método tradicional, se obtém resposta somente após cerca de 40 dias depois da inoculação. Além disso, a identificação precoce das plantas resistentes permite a eliminação dos tipos indesejáveis nas fases iniciais do desenvolvimentos das plantas, economizando tempo de serviço e liberando espaço na casa-de-vegetação para outros usos, além de reduzir o número de linhagens para a seleção pelos melhoristas. Além disso, a genética da resistência ao NCS é bastante complexa, uma vez que envolve vários genes de resistência para as diversas raças existentes. De acordo com Myers & Anand (1991), PI 437654 possui dois ou três genes de resistência para a raça 3, dois a quatro genes para a raça 5 e três ou quatro para raça 14. Este é um fator complicador para os melhoristas, dificultando sobremaneira o desenvolvimento de cultivares de soja resistentes a várias raças do NCS.

Nos Estados Unidos, vários projetos de identificação de marcadores moleculares ligados a genes de resistência ao NCS vêm sendo conduzidos por diversas universidades e instituições de pesquisa. Até o momento, foram identificadas duas principais regiões contendo genes de resistência ao NCS; uma no grupo de ligação A2 e outra no grupo de ligação G. Weisemann et al. (1992) identificaram marcadores RFLP ligados ao gene I, que controla a cor da semente. Anteriormente, este gene já havia sido relacionado com o gene dominante *Rhg4* (Hartwig & Epps, 1970). Posteriormente, verificou-se que este gene de resistência está localizado no grupo de ligação A2 do mapa genético da soja. Marcadores RFLP e RAPD ligados a este mesmo gene foram identificados posteriormente em trabalhos que tinham como fonte de resistência a linhagem PI 437654 (Webb et al., 1995) e Peking (Mahalingan & Skorupska, 1995) para a raça 3 do NCS. No grupo de ligação G, marcadores RFLP ligados ao gene de resistência *rhg1*, para a raça 3, foram primeiramente identificados por Concibido et al. (1994) em uma população baseada em PI 209332. Posteriormente, Concibido et al. (1995) verificou que esta região do genoma possui genes de resistência comuns a vários outros genótipos (PI 88788, PI 90763 e Peking). Webb et al. (1995) também identificaram marcadores RFLP relacionados à resistência neste mesmo grupo de ligação. Recentemente, foram identificados dois marcadores de microsátélites associados a genes de resistência à raça 3 do

NCS (Mudge et al., 1997). Algumas outras regiões do genoma também já foram relatadas como possuidoras de genes de resistência ao NCS, como nos grupos de ligação M (Webb et al., 1995), C e F (Mahalingam & Skorupska, 1995), J e N (Concibido et al., 1997), D, J, I e K (Concibido et al., 1996). Esses marcadores identificados têm sido usados para seleção indireta de plantas resistentes ao NCS em programas de melhoramento nos EUA. Além disso, a saturação de marcas ao redor dos genes de resistência têm facilitado a busca pela clonagem desses genes, especialmente dos genes Rhg4 e rhg1 (Meksem et al., 1999; Penuela et al., 1999).

Atualmente, no Brasil, alguns grupos vêm trabalhando com marcadores moleculares entre eles a Embrapa Soja, em parceria com a Universidade Federal de Viçosa, vem desenvolvendo, há alguns anos, um projeto para a identificação de marcadores moleculares ligados a genes de resistência ao NCS. Utilizando uma população segregante oriunda da fonte de resistência Hartwig, foram identificados quatro marcadores RAPD e dois marcadores microssatélites ligados a genes de resistência às raças 9 e 14 do NCS (Abdelnoor et al., 1999; Schuster et al., 1997). Baseado nos marcadores microssatélites identificados, estes genes de resistência estão localizados no grupo de ligação D2, de acordo com o mapa integrado de microssatélites e RFLPs, desenvolvido pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) e Universidade Estadual de Iowa (ISU). Este é o primeiro relato da ocorrência de genes de resistência neste grupo de ligação. Em um outro trabalho, realizado na Embrapa Soja, foram identificados, também, quatro marcadores RAPD ligados a genes de resistência à raça 3 do NCS, em uma população derivada de Centennial, e na Universidade Federal de Viçosa, foram identificados dois marcadores de microssatélites para a resistência à raça 3, em uma população derivada da cultivar Hartwig. Na Universidade Estadual de São Paulo, Câmpus de Jaboticabal, também estão sendo desenvolvidas pesquisas nesse sentido. Em uma população segregante, tendo a cultivar Peking como fonte de resistência, foram identificados marcadores RAPD ligados a genes de resistência à raça 3 do NCS, usando a estratégia de análise de "bulks" segregantes.

#### Uso de Marcadores Moleculares no estudo do Nematóide de Cisto da Soja

Em relação ao NCS, observa-se que muita coisa já é conhecida com relação à planta, entretanto e muito pouco se sabe em relação ao nematóide.

Segundo Triantaphyllou (1987), houve uma co-evolução do nematóide e do hospedeiro, o que justifica o grande número de raças descritas deste organismo. A ocorrência desse nematóide no Brasil, descrita em 1992, baseou-se na comparação de aspectos morfológicos. A ocorrência de uma nova raça no Brasil designada raça 4<sup>a</sup> (Dias et al., 1998), confirmada como sendo *H. glycines*, teve sua identificação comprovada recentemente pelo uso de PCR-RFLP, onde o DNA das amostras brasileiras foi comparado com amostras de diversas espécies de *Heterodera* (T. O. Powers, Universidade de Nebraska, EUA).

Atualmente, a caracterização de uma raça depende da frequência de determinados genes de virulência, dentro da população de nematóides, avaliada através de variedades diferenciadoras, de acordo com o esquema proposto por Riggs & Schmitt (1988). No entanto, uma maneira mais rápida de se fazer essa caracterização, seria através da comparação de padrões eletroforéticos de DNA amplificado por RAPD, APLD e microssatélites, para cada raça específica. O primeiro passo para essa tentativa está sendo feito na Embrapa Soja. Fêmeas coletadas dentro de uma população de *H. glycines* foram isoladas e transferidas para genótipos sabidamente possuidores de diferentes genes para resistência. A transferência continuada desses indivíduos, no mesmo genótipo, associada ao processo endogâmico, tenderá a aumentar a frequência do(s) gene(s) de virulência(s) responsável pela infecção. Essa população será, mais tarde, utilizada para testes de RAPD e AFLP, procurando-se identificar marcadores associados aos genes de virulência, a maior dificuldade será determinar um marcador fortemente ligado ao gene de virulência. Avanços nessa linha de pesquisa foram obtidos com o nematóide de cisto da batata (*Globodera rostochiensis* e *G. pallida*), onde Janssen et al. (1991) comprovaram a relação clássica da teoria gene-a-gene, demonstrando que a virulência está associada a genes recessivos.

Uma outra linha de pesquisa que vem sendo conduzida, refere-se à avaliação da diversidade genética entre isolados de NCS. No Brasil, já foram identificadas nove raças do NCS, além da nova raça identificada em 1997, que é capaz de quebrar a resistência da cultivar Hartwig. Esta variabilidade existente dificulta bastante o trabalho dos melhoristas na obtenção de cultivares com ampla resistência ao NCS. Na Embrapa Soja, foram realizados alguns estudos de diversidade genética, envolvendo vários isolados de diferentes regiões do Brasil e de diferentes raças. Verificou-se

que as populações existentes no País são bastante divergentes entre si, mesmo entre isolados classificados como uma mesma raça. Neste estudo, foi envolvida a raça denominada 4+, que é capaz de parasitar a cultivar Hartwig, e verificou-se que esta raça difere bastante das demais, inclusive da raça 4 padrão (Abdelnoor et al., 1998). Em um outro estudo, na Universidade de Federal de Uberlândia, foi estudada a diversidade entre 16 isolados do NCS, das raças 1, 2, 3 e 9 (Silva, 1997). Foi verificado que existe variabilidade mesmo dentro de isolados classificados como uma mesma raça, confirmando a heterogeneidade existente nas populações deste nematóide.

### Desafios para o Futuro

São inúmeras as demandas que podem ser atendidas pelo uso de técnicas moleculares. É necessário, ainda, a identificação de marcadores fortemente ligados a outros genes, que conferem resistência a diferentes raças do NCS, para que, assim, a seleção com base em marcadores possa ser feita para várias raças simultaneamente. Vale lembrar, também, que a raça 4+ do NCS somente ocorre no Brasil. Portanto, a busca por métodos que auxiliem o desenvolvimento de cultivares resistentes a essa raça, deve ser acelerada. Nesse sentido, já foram iniciados, na Embrapa Soja, experimentos que objetivam identificar marcadores para gene(s) de resistência a essa raça, e que, posteriormente, possam ser usados na seleção de plantas resistentes, e desenvolvimento de novas cultivares. Com o uso dos marcadores ligados aos genes de resistência, a seleção poderá ser feita na ausência do patógeno, o que é altamente recomendado, especialmente quando se deseja selecionar a resistência para raças cujo inóculo não esteja disponível. Atualmente, com o mapa genético da soja, baseado em microssatélites, tornou-se possível a identificação, por forma indireta, de marcadores microssatélites localizados em regiões genômicas associadas à resistência a diferentes raças do nematóide. A combinação dos marcadores selecionados do mapa, em conjunto com os marcadores identificados no Brasil, permitirá que a seleção assistida por marcadores seja feita com alta eficiência. Além do uso na seleção de plantas resistentes, esses marcadores serão também muito úteis no isolamento de alguns desses genes de resistência, especialmente o(s) gene(s) que conferem resistência à raça 4+, que até o momento vem sendo estudado somente no Brasil.

Além dos estudos com marcadores moleculares, em uma outra linha

de trabalho, associada ao Dr. Eric L. Davis, da Universidade da Carolina do Norte, USA, pretende-se a identificação de genes do NCS que regulam a secreção nas glândulas esofagianas, que são essenciais para o processo de infecção da planta pelo nematóide. A identificação de genes de secreções que sejam comuns a todas as raças do nematóide, inclusive a nova raça 4+ possibilitará o desenvolvimento de plantas transgênicas que expressem substâncias inibidoras dessas secreções, impedindo o processo infectivo. Esse tipo de resistência, já observada em plantas de fumo transgênicas resistentes ao nematóide de galhas (Baum et al., 1996), provavelmente, será mais durável, visto que são atacados mecanismos fundamentais do parasitismo.

A combinação do uso da técnica de marcadores moleculares para a identificação de genes de resistência na soja e genes de virulência no nematóide, associado com um conhecimento mais profundo dos mecanismos de parasitismo e identificação de novas formas de resistência, certamente facilitará bastante o controle deste fitonematóide no Brasil.

### Bibliografia Citada

- ABDELNOOR, R.V.; SCHUSTER, I.; SILVA, J.F.V.; CARVALHO, V.P.; MARIN, S.S.R.; KIHHL, R.A.S.; BARROS, E.G. & MOREIRA, M.A. SSR markers linked to soybean cyst nematode resistance genes. In: *Plant & Animal Genome VII. Final Program & Abstracts Guide*. Scherago International, Inc. San Diego, CA., 1999.
- ABDELNOOR, R.V.; DIAS, W.P.; SILVA, J.F.V. e KIHHL, R.A.S. Caracterização molecular de isolados de nematóide de cisto da soja que quebram a resistência da cultivar Hartwig. In: *1º Encontro Paranaense de Biotecnologia aplicada à agropecuária*. Embrapa Soja/IAPAR/UEL. Londrina-PR, 1998.
- ANNAND, SANNAND, S.C.; SHARMA, S.B.; RAO-ARELLI, & WRATHER, J.A. Variation in parasitic potencial of *Heterodera glycines* populations. *Crop Sci.*, **34**:1452-1454, 1994.
- BAUM, T.J.; HIATT, A.; PARROTR, W.A; PRATT, L.H. E HUSSEY, R.S. Expression in tobacco of a functional monoclonal antibody specific to stylet secretions of the root-knot nematode. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **9**:382-387, 1996.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M. & DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **Am J. Hum. Genet.** **32**:314-331 1980.

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

CONCIBIDO, V.C.; DENNY, R.L.; LANGE, D.A.; ORF, J.H. & YOUNG, N.D. The soybean cyst nematode resistance gene on linkage group G is common among sources of resistance. **Soybean Genetic Newsletter**, **22**:269-272. 1995.

CONCIBIDO, V.C.; LANGE, R.L.; DENNY, R.L.; ORF, J.H. & YOUNG, N.D. Genome mapping of soybean cyst nematode resistance genes in 'Peking', 'PI 90763', and 'PI 88788' using DNA markers. **Crop Sci.** **37**:258-264. 1997.

DIAS, W.P.; SILVA, J.F.V.; KIHHL, R.A.S.; HIROMOTO, D.M. & ABDELNOOR, R.V. Quebra da resistência da cv. Hartwig por população de campo do nematóide de cisto da soja. **Pesq. Agropec. Bras.**, **33**(6):971-974, 1998.

HARTWIG, E.E. & EPPS, J.M. Na additional gene for resistance to the soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*. **Phytopathology**, **60**:584, 1970.

HEIDRICH-SOBRINHO, E. Isoenzimas como marcadores genéticos. **Pesq. Agropec. Bras.**, **17**(2):281-286, 1982.

JANSSEN, R.; BAKKER, J. & GOMMERS, F.J. Mendelian proof for a gene for gene relationship between *Globodera rostochiensis* and the H1 resistance gene from *Solanum tuberosum* ssp. *Andigena* CPC. **Ver. Nematol.** **14**:213-223. 1991

MAHALINGAM, R. & SKORUPSKA, H.T. DNA markers for resistance to *Heterodera glycines* race 3 in soybean cultivar Peking. **Breeding Science**, **45**:435-443. 1995.

MEKSEN, K.; LIGHTFOOT, D.A.; RUBEN, E.; ZHANG, H.B.; CHANCHAROENCHAI, K.; ZOBRIST, K.; PANZATOPOULOS, P. &

RAO-ARELLI, P. Soybean gene golfing: positional cloning of the cyst nematode resistance loci in soybean. In: *Plant & Animal Genome VII. Final Program & Abstracts Guide*. Scherago International, Inc. San Diego, CA. 1999.

MUDGE, J.; CREGAN, P.B.; KENWORTHY, J.P.; ORF, J.H. & YOUNG, N.D. Two microsatellite markers that flank the major soybean cyst nematode resistance locus. **Crop Sci.**, **37**:1611-1615, 1997.

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

PENUELA, S.; Foster-Hartnett, D.; DANESH, D.; DENNY, R.; PED, K.; MUDGE, J.; YOUNG, W.; CORYELL, V.; KEIM, P. & YOUNG, N.D. Physical isolation and sequence analysis of the region around rhg1, a major cyst nematode resistance locus in soybean. In: *Plant & Animal Genome VII. Final Program & Abstracts Guide*. Scherago International, Inc. San Diego, CA, 1999.

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

SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A. & ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of  $\beta$ -globine genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, **230**:1350-1354, 1985.

SCHUSTER, I.; ABDELNOOR, R.V.; CARVALHO, V.P.; MARIN, S.S.R.; SILVA, J.F.V.; KIHHL, R.A.S.; SEDIYAMA, T.; BARROS, E.G. & MOREIRA, M.A. Identification of RAPD markers for soybean cyst nematode resistance. In: *XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq) - Programas e Resumos*. Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq. Caxambú-MG., 1997.

SILVA, A.T. Estudo da variabilidade genética do nematóide de cisto da soja (*Heterodera glycines* Ichinohe, 1952) por meio de marcadores RAPD e hospedeiros diferenciadores. Tese MS. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG., 1997.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequence as a general source of polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Res.**, **17**:6493-6471., 1989.

TRIANAPHYLLOU, A.C. Genetics of nematode parasitism on plants. In: Vistas on nematology. J. A. Veech and Dickson, D.W., eds., Society of nematologists, Inc, Hyattsville., 1987.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJNS, M.; VAN DE LEEF, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M. & ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, **23(21)**:4407-4414., 1995.

WEBB, D.M.; BALTAZAR, B.M.; RAO-ARELLI, A.P.; SCHUPP, J.; CLAYTON, K.; KEIM, P. & DAVIS, W.D. Genetic mapping of soybean cyst nematode race-3 resistance loci in the soybean PI 437654. **Theor. Appl. Genet.** **91**:574-581, 1995.

WEISEMANN, J.M.; MATHEWS, B.F. & DEVINE, T.E. Molecular markers located proximal to the soybean cyst nematode resistance gene, Rhg4. **Theor. Appl. Genet.**, **85**:136-138, 1992.

WELSH, J. & McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, **18(24)**:7213-7218, 1990..

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKY, J.A. & TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, **18(22)**:6531-6535, 1990.