

GERARDO DOMINGO LUCIO CERVIGNI

**ANÁLISE GENÔMICA DA RESISTÊNCIA ÀS RAÇAS 3 E 9 DO NEMATÓIDE DE
CISTO E AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE ARACTERES
AGRONÔMICOS EM SOJA**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2003

GERARDO DOMINGO LUCIO CERVIGNI

**ANÁLISE GENÔMICA DA RESISTÊNCIA ÀS RAÇAS 3 E 9 DO NEMATÓIDE DE
CISTO E AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE CARACTERES
AGRONÔMICOS EM SOJA**

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

APROVADA: 03 de abril de 2003.

Dr. Luiz Antonio dos Santos Dias

Prof. Carlos Sigueyuki Sedyama
(Conselheiro)

Dr. Ivan Schuster

Prof. Cosme Damião Cruz

Prof. Maurilio Alves Moreira
(Orientador)

*A minha mãe Teresa,
meu exemplo de humanidade.
A meu filho Lucio (in memoriam),
quem me ensinou o significado da palavra liberdade.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do Curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos, dentro do convênio de intercâmbio PEC/PG, Argentina – Brasil.

A minha mãe Teresa Cervigni, pela vida, pelo amor, pelo apoio e incentivo constante.

Ao professor orientador Maurilio Alves Moreira, pela dedicação, pela confiança e pela amizade, que fez possível este trabalho.

Ao professor Everaldo Gonçalves de Barros, pelo incentivo, pela amizade, pelas sugestões valiosas e pela confiança.

Ao professor Carlos Sigueyuki Sedyama, pelas sugestões e pela confiança.

Aos membros da banca de defesa Prof. Maurilio A. Moreira, Prof. Cosme Damião Cruz, Prof. Carlos Sigueyuki, Dr. Ivan Schuster e Dr. Luis Antonio dos Santos Dias.

À equipe do laboratório de Nematologia da Embrapa - Soja, pela realização das inoculações de raças do Nematóide de Cisto da Soja.

Aos colegas de BIOMOL/BIOAGRO, pelo companheirismo, e pela convivência agradável durante o período do curso.

Aos funcionários de BIOAGRO, pelo auxílio e sempre boa disposição durante a realização de este trabalho.

A meu amigo Jaime Araujo Cobuci pela amizade, pelo companheirismo e convivência agradável de tantos anos.

A meus amigos de república Adilson, Marco e Leandro, pela amizade, pelo companheirismo e pelo convívio alegre.

A meus amigos Fernanda e Rogério Backes pela amizade, pelo companheirismo e pela preocupação constante do bem-estar comum ao longo de todos esses anos do curso.

A todas aquelas pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização de esta tese.

BIOGRAFIA

GERARDO DOMINGO LUCIO CERVIGNI, filho de Alejandro Segundo Cervigni e Teresa Pasquini, nasceu em 20 de setembro de 1965, em General Baldissera, Córdoba, Argentina.

Cursou os estudos primários em Isla Verde e os secundários em Cavanagh, onde obteve o título de Técnico Agrícola. Posteriormente, em fevereiro de 1992, formou-se em Genética pela Universidade Nacional de Misiones (UNaM), Posadas, Misiones, Argentina.

No período de 1992 até 1994, atuou como pesquisador contratado no Centro de Estudos Fotosintéticos y Bioquímicos (CEFOTBI), Rosario, Santa Fe, Argentina. Nesse mesmo centro, foi bolsista até 1997 pelo Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), realizando pesquisas em cultura de tecidos e transformação genética de plantas.

Em março de 1997, iniciou o curso de Mestrado em Genética e Melhoramento, na Universidade Federal Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, Brasil, defendendo tese em fevereiro de 1999.

Em março de 1999, iniciou o curso de Doutorado em Genética e Melhoramento, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, Brasil, defendendo tese em abril de 2003.

CONTEÚDO

RESUMO.....	IX
ABSTRACT.....	X
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Importância econômica da soja	3
2.2. O nematóide de cisto da soja	3
2.2.1. Ciclo de vida do NCS.....	4
2.2.2. Identificação de raças do NCS	6
2.2.3. Sintomatologia	8
2.2.4. Métodos de controle	9
2.2.5. Base genética da resistência ao NCS.....	10
2.3. Marcadores moleculares.....	12
2.3.1. Aspectos gerais	12
2.3.2. Marcadores RAPD.....	14
2.3.3. Marcadores microssatélites	15
2.4 Identificação de QTLs.....	16
2.5. Objetivos.....	18
BIBLIOGRAFIA.....	19

CAPÍTULO 1

HERDABILIDADES DA RESISTÊNCIA ÀS RAÇAS 3 E 9 DO NEMATÓIDE DE CISTO DA SOJA

RESUMO.....	27
-------------	----

MATERIAL E MÉTODOS	30
<i>Material Genético</i>	30
<i>Inoculação e Avaliação do NCS</i>	30
<i>Estimativas das herdabilidades</i>	30
<i>Parâmetros genéticos analisados e seus estimadores</i>	31
RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
<i>Análise de variância e estimativas de parâmetros</i>	33
BIBLIOGRAFIA.....	37

CAPÍTULO 2

MARCADORES MICROSSATÉLITES LIGADOS A UM LOCO DE RESISTÊNCIA ÀS RAÇAS 3 E 9 DE *Heterodera glycines* EM SOJA

RESUMO	39
MATERIAL E MÉTODOS	42
<i>Material vegetal</i>	42
<i>Inoculação e Avaliação do NCS</i>	42
<i>Extração do DNA e análise dos marcadores moleculares</i>	43
<i>Análise de Ligação e Mapeamento de QTLs</i>	44
RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
<i>Dados fenotípicos</i>	46
<i>Associação dos marcadores moleculares com a resistência ao NCS</i>	48

<i>Herdabilidade do gene de resistência</i>	52
<i>Eficiência da Seleção dos Marcadores Identificados</i>	53
BIBLIOGRAFIA.....	55

CAPÍTULO 3

MAPEAMENTO DE CARACTERES AGRONÔMICOS USANDO LINHAGENS ENDOGÂMICAS RECOMBINANTES

RESUMO.....	59
INTRODUÇÃO.....	60
MATERIAL E MÉTODOS	62
<i>Material Genético</i>	62
<i>Experimento de campo</i>	62
<i>Características quantitativas</i>	62
<i>Correção de dados</i>	63
<i>Análise de variância</i>	64
<i>Parâmetros genéticos analisados e seus estimadores</i>	65
<i>Extração do DNA e amplificação de marcadores microssatélites</i>	66
<i>Análise de ligação e associação marcadores-QTLs</i>	67
RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
<i>Análise de variância e estimativa de parâmetros</i>	68
<i>Segregação das Características Quantitativas</i>	70

<i>Análise de ligação e mapeamento de QTLs</i>	74
BIBLIOGRAFIA.....	79
RESUMO E CONCLUSÕES GERAIS.....	82

RESUMO

CERVIGNI, Gerardo Domingo Lucio, D.S., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2003. **Análise genômica da resistência às raças 3 e 9 do nematóide de cisto e avaliação da variabilidade genética de caracteres agronômicos em soja.** Orientador: Maurilio Alves Moreira. Conselheiros: Everaldo Gonçalves de Barros, Carlos Siqueyuki Sedyama.

Neste trabalho foram realizados os experimentos: (1) estimativa da herdabilidade da resistência às raças 3 e 9 do nematóide de cisto da soja (NCS), (2) mapeamento de locos de resistência ao NCS e (3) avaliação da variabilidade genética de caracteres agronômicos em soja. Nos três experimentos foi utilizada uma população de linhagens endogâmicas recombinantes derivada do cultivar norte-americano Hartwig (genitor resistente ao NCS) e a linhagens brasileira Y23 (genitor suscetível ao NCS). A herdabilidade no sentido amplo para raça 3 foi estimada em 80,97%, e para raça 9 em 80,39%. Com a finalidade de identificar e mapear QTLs associados à resistência para as raças 3 e 9, a genotipagem da população acima mencionada foi realizada com 40 marcadores microssatélites. A análise de regressão linear simples identificou 6 e 2 marcadores associados à resistência para as raças 3 e 9, respectivamente. Porém, na regressão linear múltipla, apenas o marcador Satt038 foi significativo para as duas raças, explicando 25,38% ($P > F = 0,0001$) da variação fenotípica da raça 3 e 12,60% ($P > F = 0,0001$) da raça 9 do NCS. O QTL ligado ao marcador Satt038 foi identificado como correspondendo ao gene *rhg1*, mapeado na extremidade do grupo de ligação G. Para o terceiro experimento foram avaliados treze caracteres agronômicos. A identificação de QTLs realizou-se através do contraste de médias e pela regressão linear simples. Foram identificados QTLs para doze dos treze caracteres considerados. Os QTLs identificados foram localizados nos grupos de ligação B2, O, G, E e H. A variabilidade genética detectada na população foi significativa para as treze características, sugerindo que a população é útil para realizar estudos genéticos e de mapeamento de QTLs.

ABSTRACT

CERVIGNI, Gerardo Domingo Lucio, D.S., Universidade Federal de Viçosa, April 2003. **Genomic analysis of resistance to races 3 and 9 of *Heterodera glycines* and assessment of genetic variability for agronomic characters in soybean.** Adviser: Maurilio Alves Moreira. Committee Members: Everaldo Gonçalves de Barros, Carlos Siqueyuki Sedyama.

In this work were accomplished the experiments: (1) estimating of resistance to race 3 and 9 of the soybean cyst nematode (SCN), (2) mapping *loci* for resistance to SCN and (3) assessment of genetic variability for agronomic characters in soybean. In the three experiments were carried out to using a population of recombinant inbred lines derived from Hartwig (resistant parent) and Y23 (susceptible parent). Broad sense heritability estimates for race 3 was 80,97% and 80,39% for race 9. To mapping quantitative trait loci (QTLs) for resistance to SCN and each agronomic characters, forty SSRs markers were amplified in the population. Single linear regression identified 6 and 2 SSRs associates to resistance for races 3 and 9, respectively. However, evaluation through multiple regression, showed that only Satt038 was significant for both races. This marker explained 25.38% ($P > F = 0.0001$) of the phenotypic variation of race 3, and 12.60% ($P > F = 0.0001$) of race 9 of NCS. QTL linked to Satt038 was identified as *rhg1* gene, and mapped at the extreme of the linkage group G. In the third experiment thirteen characters were measured. QTLs identification were accomplished comparing the mean for each allelic form. The proportion of the phenotypic variance explained by markers linked to a QTL was investigated by simple linear regression analysis. QTLs for all characters were identified and positioned in the linkage groups B2, O, G, E and H. The genetic variability detected in the RIL population was significant for the thirteen traits. It is suggested that the population will be useful to accomplish further genetic studies and QTLs mapping.

1. INTRODUÇÃO

Originária da China, a soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é a leguminosa mais cultivada no mundo (ROESSING e GUEDES, 1993). Nos anos 70, a produção brasileira de soja apresentou grande incremento, alterando sua importância relativa em nível 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.

O elevado teor de proteína e de óleo de soja gerou vasto complexo agro-industrial destinado ao processamento de derivados, tornando a soja 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, 1994).

O sistema de monocultivo, adotado para sua produção, faz com que a soja seja atingida por diversas doenças. Segundo YORINORI et al. (1993), estima-se que 35 doenças atacam a soja no Brasil, sendo 26 causadas por fungos, três por bactérias, quatro por vírus e duas por nematóides.

Desde sua descoberta em 1954 (WINTSTEAD et al., 1955), o nematóide de cisto da soja (NCS) (*Heterodera glycines* Ichinohe) tem-se convertido em um dos principais fatores limitantes da produção de soja no mundo. Em 1998, a CONAB reportou que as perdas de produção brasileira, devido ao NCS, desde a safra 91/92 tinha superado US\$200 milhões, ressaltando-se que somente na safra 97/98 esse valor foi de US\$140 milhões. A evolução da doença no Brasil é considerada rápida em comparação com o que ocorreu nos EUA, onde essa doença surgiu em 1954 e, após 25 anos, os prejuízos alcançaram cerca de US\$350 milhões na safra de 1979 (Goellner, 1995, citado por GOMES DA CUNHA, 1997).

O manejo dos nematóides formadores de cistos geralmente é de pouca eficiência. Os produtos químicos, independentemente da dosagem ou do método de aplicação, quase nunca conseguem erradicá-los (TIHOHOD, 1993). A rotação de culturas também é utilizada como forma de controle, entretanto, como os outros métodos, não consegue erradicar as populações do patógeno, causando apenas a sua diminuição (EPPS e CHAMBERS, 1965; TIHOHOD, 1993). A utilização de variedades resistentes surge, portanto, como uma das ferramentas mais úteis de

controle do NCS (BOERMA e HUSSEY, 1992).

O NCS possui grande variabilidade genética. Além disso, os principais cultivares de soja usados no Brasil são suscetíveis. Portanto, programas de melhoramento visando transferir genes de resistência de NCS para cultivares comerciais de soja já foram iniciados no Brasil em várias instituições que se dedicam ao melhoramento da soja. Normalmente, a transferência de genes de resistência se realiza por meio do método dos retrocruzamentos. Embora esse método seja o mais aconselhável, o monitoramento dos genes em transferência é trabalhoso e demorado, uma vez que envolve identificação de raças, inoculação nas progênies a serem testadas e avaliação do nível de dano nas linhagens que compõem estes programas. Outra desvantagem de tal procedimento é a grande necessidade de mão-de-obra e de espaço físico.

Marcadores moleculares de DNA vêm sendo usados com sucesso na identificação de locos de resistência a doenças numa grande variedade de culturas, incluindo a soja. Na seleção assistida, marcadores moleculares de DNA permitem uma avaliação maior de linhagens, aumentam a eficiência da seleção, não são destrutíveis (a análise é feita a partir do DNA extraído de uma folha) e permitem a análise de caracteres quantitativos (PATERSON et al., 1988).

Os tipos de marcadores moleculares mais usados no melhoramento são o RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) e microssatélites (*Simple Sequence Repeats – SSR*). Ambos, baseados na técnica de reação em cadeia da polimerase (*Polimerase Chain Reactions - PCR*), constituem ferramentas muito úteis e práticas, por serem tecnicamente simples e de fácil montagem, requererem poucas quantidades de DNA e permitirem que dezenas de plantas possam ser analisadas de uma só vez (WAUGH e POWELL, 1992).

Realizou-se o presente trabalho usando uma população de linhagens endogâmicas recombinantes (*Recombinant Inbred Lines – RIL*), objetivando a identificação de regiões genômicas associadas a características quantitativas (*Quantitative Trait Loci – QTL*), com base em marcadores moleculares, visando a utilização destes marcadores nos programas de melhoramento, contribuindo assim para o entendimento da organização e efeitos daquelas regiões.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Importância econômica da soja

Os relatos de introdução da soja no Brasil datam de 1882, na Bahia, e de 1890, em Pelotas, quando foi testada como produtora de forragem (HASSE, 1996). A cultura da soja como cultivo comercial evoluiu sobremaneira, passando de 170 mil ha na década de 50 para aproximadamente 16,32 milhões de ha, com produção total estimada em 42 milhões de toneladas e média nacional de 2.567 kg/ha (CONAB, 2002). Atualmente, a soja contribui com 11,06% do Produto Interno Bruto (PIB) agrícola brasileiro. A soja e seus derivados têm grande participação em divisas na pauta das exportações do país, além de ser a maior fonte de óleo comestível no Brasil (ROESSING e GUEDES, 1993).

No Brasil, já foram desenvolvidas variedades adaptadas ao cultivo em diferentes latitudes, solos e condições climáticas. Entretanto, vários fatores limitam a obtenção de altos rendimentos por esses cultivares. As doenças estão entre as principais causas responsáveis pela redução na produtividade, impedindo que as variedades melhoradas expressem o seu potencial de rendimento (YORINORI et al., 1993).

2.2. O nematóide de cisto da soja

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

No Brasil, este patógeno foi detectado, pela primeira vez, na safra 91/92, em amostras de solo e raízes provenientes de Chapadão do Sul, MS (LORDELLO et al., 1992), Nova Ponte, MG (LIMA et al., 1992) e Campo Verde, MT (MONTEIRO e MORAIS, 1992). Posteriormente, em um levantamento mais extenso, o nematóide

foi detectado em Iraí de Minas, MG, Chapadão do Céu e Aporé, GO, e Chapadão do Sul, MS (MENDES e DICKSON, 1993). Até então o Brasil era considerado área livre do NCS, sendo que todas as variedades disponíveis na época eram suscetíveis ao nematóide. Os municípios inicialmente infestados eram pólos de expansão da soja nos cerrados naquele momento. Estima-se que a região dos cerrados brasileiros possui cerca de 49,5 milhões de hectares ainda a serem ocupados pela agricultura. Segundo o relatório da Conab de 1999, naquela época o NCS já tinha infestado um total de 1,5 milhão de hectares.

A princípio, todas as regiões produtoras de soja do Brasil são favoráveis ao desenvolvimento do NCS, todavia as características físico-químicas do solo, o regime de chuvas e a temperatura devem influenciar na maior ou menor expansão da infestação e nos níveis de danos (EMBRAPA, 1994).

2.2.1. Ciclo de vida do NCS

Heterodera glycines Ichinohe ou Nematóide de Cisto da Soja (NCS) é um parasita de fecundação cruzada e endoparasita sedentário obrigatório. O ciclo de vida consiste de seis estádios: ovo, quatro estádios larvais e a forma adulta, dimórfica e sexualmente ativa. O segundo estágio larval (J2) é a forma infectiva. Depois da larva penetrar na raiz, migra até uma região próxima ao cilindro vascular, onde após algumas transformações nas células vegetais e da larva, se forma a estrutura de alimentação do nematóide (ENDO, 1992). Após 15 – 20 dias da infecção, os machos abandonam a raiz. A fêmea adulta produz entre 200 a 400 ovos, os quais permanecem, primeiramente, no interior da fêmea. Após a morte da fêmea, sua cutícula altera-se quimicamente, adquire coloração marrom e transforma-se em uma estrutura rígida, chamada de cisto (TRANTAPHYLLOU e HIRSCHMANN, 1962). O ciclo de vida do NCS varia de 21 a 24 dias à temperatura de 23 a 25°C, sendo possível a ocorrência de quatro a cinco gerações em um único cultivo de soja. Os ovos do NCS, dentro do cisto, são capazes de sobreviver vários anos sob condições ambientais adversas (ALSTON e SCHMITT 1988).

As diferentes formas de manejo do solo (tipo de preparo, semeadura e fertilização) podem afetar a dinâmica das populações do NCS, por causar alterações de ordem física, química e biológica no ambiente do solo (KOENNING et al., 1995).

Com respeito ao efeito do preparo do solo, convencional ou plantio direto, existem poucos trabalhos de pesquisa no Brasil, não permitindo ainda conclusões claras.

Outro fator importante a considerar, em soja cultivada em áreas infestadas por *H. glycines*, refere-se aos aspectos químicos do solo e à nutrição das plantas. Embora não esteja ainda bem avaliada a relação entre a fertilidade do solo e a dinâmica populacional do NCS, os sintomas da parte aérea das plantas de soja afetadas são típicos de deficiência nutricional, possivelmente causados pela interferência do NCS no transporte de água e nutrientes das raízes para a parte aérea da planta (WRATHER et al., 1992)

O pH do solo é outro fator importante a considerar. CANEVESE (1996) e GARCIA e SILVA (1996) observaram que, em solos do cerrado brasileiro com valores de pH e saturação por bases elevadas, por calagem superestimada, a população de cistos persistiu alta mesmo após o cultivo de um ou dois anos com milho. Possivelmente, valores de pH alto condicionam dois dos fatores desfavoráveis à soja cultivada nessas condições: redução na população de fungos antagonistas do NCS e imobilização de alguns micronutrientes do solo.

Os danos produzidos na cultura da soja por *H. glycines* dependem, ainda, da proporção argila/areia no solo (SCHMITT et al., 1987). Todd e Pearson (1988) verificaram grande número de fêmeas e ovos de *H. glycines*, tanto em solos argilosos e siltosos quanto em solos siltosos, após oito semanas de inoculação de quantidades similares de ovos em ambos os tipos de solos. Apesar de o número de ovos e de fêmeas ter aumentado em ambos os casos, quantidades elevadas de argila prejudicam a distribuição e mobilidade dos nematóides (Noe e Barker, 1985, citados por HEARTHERLY e YOUNG, 1991).

A dispersão dos cistos dá-se pelo vento, pela água da enxurrada ou irrigação, por maquinarias agrícolas, por veículos, pelo homem, pelas aves e por outros animais, bem como por intermédio de sacarias ou sementes que contenham pequenas partículas de solo infectado com cistos (GOMES et al., 1995).

A importância dessa enfermidade reside não só no seu efeito negativo sobre a produção, mas também na impossibilidade prática de se erradicar o NCS do solo. A adaptação do nematóide para sobrevivência sob condições adversas, por meio de formação de cistos, torna-o extremamente versátil às mais variadas formas de disseminação, pois esta ocorre por qualquer meio de dispersão de solo (YORINORI

et al., 1994).

2.2.2. Identificação de raças do NCS

O conceito de raça aplicado a *H. glycines* não é baseado no seu genótipo e sim sobre o fenótipo predominante em uma determinada população em um determinado tempo. O critério usado para determinar a raça de uma população de NCS é a sua habilidade para reproduzir-se em um conjunto de variedades de soja diferenciadoras. Inicialmente, quatro raças de *H. glycines* foram identificadas, sob a base de se desenvolverem em quatro hospedeiros resistentes diferenciadores Peking, Pickett (a resistência de Pickett é derivada somente de Peking), PI 88788 e PI 90763 e um suscetível-padrão Lee (GOLDEN et al., 1970).

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

Com o método proposto por GOLDEN et al. (1970), RIGGS et al. (1988) propuseram um modelo para identificação das 16 possíveis raças de *H. glycines*, utilizando os quatro diferenciadores constantes no Quadro 1. Entretanto, as raças 11, 12, 13 e 16 são apenas hipotéticas, visto que o cultivar Pickett não herdou todos os genes de resistência presentes em Peking (RIGGS et al., 1977). Muito embora esse método tenha sido usado com sucesso na identificação de raças e como não existe padronização total dos fatores envolvidos, um mesmo isolado pode ser classificado em raças diferentes, dependendo do local onde foi feito o teste. Segundo aqueles autores, isso é consequência das variações nos testes de raça e diferenças genéticas das plantas e da variabilidade genética nas populações de nematóides.

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

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

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

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

O primeiro levantamento de raças no Brasil foi feito por NOEL et al. (1994), que detectaram as raças 2, 3, 4, 5, 10 e 14. Nas safras 1995/96, 1996/97, 1997/98 e 1998/99, cerca de 70 populações do NCS foram coletadas em diferentes regiões do Brasil e levadas para a Embrapa - Soja para a determinação das raças. Foram encontradas as raças 3, 6, 9 e 14 na safra 1995/96, as raças 1, 2, 3, 4⁺, 5, 6, e 9 na safra 1996/97, as raças 3, 4, 6, 9, 10 e 14 na safra 1997/98 e as raças 1, 3, 4, 5, 6 e 14 na safra 1998/99.

Os resultados indicam que apesar da constatação recente do NCS no Brasil e o NCS ainda não ter sofrido pressão de seleção pelo uso de cultivares resistentes, já foram encontradas no País as raças 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10 e 14 14⁺ (NOEL et al. 1994; WAIN e SILVA, 1997; DIAS et al., 1997), além da raça 4⁺ e 14⁺ capaz de quebrar a resistência de Hartwig (DIAS et al., 1998) e até hoje apenas

informada no Brasil. DIAS et al. (1997) estudando a diversidade entre 16 isolados das raças 1, 2, 3, e 9, verificaram que existe variabilidade mesmo dentro de isolados classificados em uma mesma raça, confirmando a heterogeneidade existente nas populações desse nematóide. Esses estudos, além de indicar a grande variabilidade genética dentro das populações brasileiras de NCS, mostram que existe um número maior de raças conforme se avance para o norte do país. Portanto, o acompanhamento da evolução dessas raças deve ser constante e assim dar suporte aos programas de melhoramento genético que visam criar novas variedades resistentes e orientar os sojicultores na escolha de variedades adequadas. Ainda, os produtores devem ser instruídos a evitarem o uso contínuo de uma mesma variedade resistente, ou de variedades com a mesma fonte de resistência, numa determinada área. Isso contribuirá para que a pressão de seleção não seja suficiente para promover a mudança da raça, aumentando, assim, a vida útil desses cultivares.

2.2.3. Sintomatologia

Os sintomas apresentados por culturas infestadas por *H. glycines* não são exclusivos, podendo ser confundidos com danos produzidos pela compactação do solo, deficiência de ferro e outros minerais ou outras doenças que afetam a lavoura (TIHOHOD, 1993). Segundo Noel et al. (1992), citados por YOUNG (1996), têm-se estimado perdas entre 20 e 30%, sem que a lavoura apresente sintomas de infecção. Nesse mesmo sentido, NIBLACK e NORTON (1992) indicaram que os sintomas apresentados pelas lavouras em solos infestados nem sempre são consistentes. A presença de fêmeas adultas e cistos nas raízes da soja são os únicos critérios válidos para diagnosticar a infecção causada por NCS (TIHOHOD, 1993).

O primeiro sintoma óbvio produzido pela infestação de NCS aparece no campo como uma área circular ou oval de plantas cloróticas e menos vigorosas. Frequentemente, os danos mais severos são produzidos no centro dessa área, diminuindo até as margens. Com isso, segundo RIGGS et al. (1988), a produtividade cai drasticamente, assim como a formação de nódulos de rizóbio (MENDES, 1993).

2.2.4. Métodos de controle

Uma vez presente no solo, é possível que o NCS nunca mais seja eliminado. Entretanto, ele pode ser manejado para diminuir sua reprodução e maximizar a produtividade da cultura.

O controle biológico de nematóides tem sido amplamente utilizado (HARTWIG, 1981). Dentro desse sistema de controle, os fungos são os principais agentes biológicos considerados, uma vez que muitas espécies podem atacar os nematóides de cisto (KIM e RIGGS, 1991). Duas espécies de fungos parasitam as fêmeas, *Catenaria auxiliaris* e *Nematophthora gynophila*, e uma parasita os ovos, *Verticillium chlamydosporium* (Tribe, 1977, citado por KIM e RIGGS, 1991). Muitas outras espécies de fungos têm sido isoladas de nematóides, as quais não são parasitas, porém privam os ovos de substratos. Fungos isolados dos ovos são os melhores candidatos para o controle biológico dos nematóides do que aqueles isolados dos cistos (JAPALA, 1986).

Os nematicidas também são usados no controle de NCS. Porém, quando usados, em sua maioria, em tratamentos contínuos de solos infestados, tornam-se antieconômicos e de pouca utilidade (SASSER e UZZELL, 1991). Além disso, normalmente são de difícil aplicação e, em vista da sua alta toxicidade, as licenças de aplicação de alguns deles já foram suspensas (MAHALINGAM e SKORUPSKA, 1995).

A rotação de cultura é a forma mais eficiente para controlar o NCS. O primeiro experimento de rotação foi realizado na Carolina do Norte, EUA, em 1956 (ROSS, 1962). Esse pesquisador justificou a vantagem desta metodologia, tendo em vista o número limitado de plantas hospedeiras de *Heterodera glycines*, o que fez da alternância de culturas um método eficiente e prático de controle.

Experimentos posteriores, feitos por EPPS e CHAMBERS (1965), comprovaram que o tamanho das populações do NCS permaneceu constante ou diminuiu quando cultivares de soja suscetíveis foram alternados com algodão ou milho (culturas não hospedeira) e cultivares de soja resistentes. SCHMITT (1991) demonstrou que a forma mais eficiente de controle do NCS seria a rotação de culturas não hospedeiras / cultivares resistentes / cultivares suscetíveis, promovendo, assim, o uso de cultivares resistentes durante um menor período de tempo em solos infestados com NCS, já que a monocultura de cultivares

resistentes impõe forte pressão de seleção sobre a população de NCS, levando-a à diversificação genética.

2.2.5. Base genética da resistência ao NCS

A capacidade de parasitar dos nematóides é uma característica qualitativa que o nematóide possui ou não. Porém, a agressividade das populações dos nematóides é descrita como uma característica quantitativa. A agressividade é definida em relação ao nível de reprodução do nematóide que ocorre no genótipo hospedeiro. O parasitismo das espécies de nematóide, em parasitar um hospedeiro, é medido pela sua reprodução. De forma geral, os hospedeiros resistentes não permitem o desenvolvimento das fêmeas até a maturidade reprodutiva, desenvolvendo uma resposta de reação de hipersensibilidade.

A resistência genética ao NCS foi identificada pela primeira vez por ROSS e BRIM (1957), sendo sua herança relatada por CALDWELL et al. (1960), no cultivar Peking, como controlada por três genes recessivos independentes (*rhg 1*, *rhg 2* e *rhg 3*). Posteriormente, MATSON e WILLIAMS (1965) identificaram o gene dominante *Rhg 4*, como necessário para a resistência, além dos três recessivos previamente informados.

HARTWIG e EPPS (1970) identificaram outro loco recessivo presente na PI 90763, distinto daqueles presentes no cultivar Peking. Essa identificação foi confirmada, posteriormente, pelo trabalho de HANCOCK et al. (1987). Nas populações de cruzamentos entre Peking e PI 88788, THOMAS et al. (1975) demonstraram a existência de um gene dominante e dois recessivos para a resistência à raça 4. MYERS et al. (1988) informaram que PI 437654 apresenta dois locos recessivos e dois dominantes para a resistência à raça 5. Locos dominantes e recessivos têm sido identificados na análise de populações segregantes provenientes do cruzamento Williams 82 x Hartwig realizado por FAGHIHI et al. (1995).

Segundo LUEDDERS (1989), a dificuldade no esclarecimento da resistência é devido ao fato de que todos os estudos de herança foram feitos com populações de NCS geneticamente heterogêneas, podendo ter levado a resultados poucos esclarecedores sobre a base genética da resistência ao NCS.

Outra causa da dificuldade no esclarecimento da base genética da resistência

ao NCS tem sido o critério utilizado para classificar as plantas como suscetíveis ou resistentes, em que o número de cistos inferior a 10%, em relação ao padrão suscetível Lee, classifica o genótipo como resistente. Esse limite teria contribuído para reduzir as estimativas do número de locos de resistência, pois uma linhagem indicada como resistente a determinada raça pode nem sempre carregar todos os locos que estavam presentes na fonte doadora. Por último, o fato de se ter considerado a herança da resistência como “dependendo” de fatores mendelianos simples também poderia ter contribuído para a dificuldade de esclarecer a base genética dessa característica (MANSUR et al., 1993).

Contrariamente aos estudos mencionados, MANSUR et al. (1993) consideraram a resistência ao NCS de natureza quantitativa. Esses autores informaram que o modelo de efeito genético aditivo foi suficiente para explicar os resultados obtidos em quase todos os cruzamentos realizados. No entanto, efeitos devido à dominância também foram observados. Esses mesmos autores estimaram a herdabilidade da resistência ao NCS no sentido amplo foi estimada entre 0,48 e 0,81.

O número e a especificidade dos locos envolvidos no mecanismo de resistência ao NCS também vêm sendo estudados com o uso de marcadores moleculares. A tecnologia dos marcadores moleculares facilita o mapeamento e, eventualmente, a clonagem de genes. Assim, WEISEMANN et al. (1992) identificaram dois marcadores RFLP ligados ao loco do gene *Rhg 4* mapeado no grupo de ligação(GL) A2 do mapa da soja publicado por CREGAN et al. (1999a).

CONCIBIDO et al. (1994) identificaram dois marcadores RFLP que, em conjunto, explicam 51,7% da variação da resistência ao NCS. Posteriormente, CONCIBIDO et al. (1997) relataram que, além, da região no GL G, locos de resistência ao NCS estariam presentes nos GL J e N, porém raça-específicos. Atualmente, sabe-se a região no GL G corresponde ao loco do gene *rhg1*, responsável pela resistência a várias raças do NCS. A posição deste gene foi confirmada posteriormente por MUDGE et al. (1997) usando SSRs, como controlando mais de 50% da variação da resistência na PI 209332, 88788, 90788, 90763, 437654 e Peking e por CREGAN et al. (1999b) e CERVIGNI (1999), ambos usando marcadores SSRs.

Estudos de genética clássica têm sido úteis na identificação de fontes de

resistência ao NCS, porém, a base genética da resistência está ainda pouco esclarecida. A metodologia dos marcadores moleculares tem-se mostrado muito útil nesses estudos estabelecendo os genes *rhg1* e *Rhg4* como necessários para a resistência a várias raças de *H. glycines*. A resistência para outras raças têm sido menos estudada e, em princípio, parecem possuir um comportamento diferente. Isto é, os genes mencionados não parecem ser os principais fatores da resistência. A resistência a raça 9 e 14 foi relatada por SCHUSTER (1999), que detectou um QTL de efeito maior no GL D2. Esse QTL explicou mais de 56% da resistência a essas raças em Hartwig.

Assim, apesar dos grandes esforços realizados pela genética clássica e a tecnologia dos marcadores moleculares, a base genética da resistência ao NCS continua sendo pouco conhecida, sendo necessário estudos mais aprofundados para sua compreensão.

2.3. Marcadores moleculares

2.3.1. Aspectos gerais

Até meados da década de 60, os marcadores utilizados em estudos de genética e melhoramento eram controlados por locos associados a caracteres morfológicos, em geral fenótipos de fácil identificação visual. Essa estratégia de trabalho foi proposta por Sax (1923), que propôs selecionar características quantitativas através de caracteres qualitativos associados, os quais poderiam ser monitorados mais facilmente. Desafortunadamente, a maioria dos marcadores morfológicos causa grandes efeitos sobre o fenótipo (nanismo, albinismo), os quais são indesejáveis num programa de melhoramento. Além disso, o pequeno número de marcadores morfológicos distintos em uma mesma linhagem reduz a probabilidade de se encontrarem associações significativas com caracteres de interesse em populações segregantes, limitando, assim, sua utilização em programas de melhoramento (FERREIRA e GRATAPAGLIA, 1996).

A revolução nesse campo iniciou-se com o desenvolvimento de marcadores isoenzimáticos. O número de marcadores genéticos foi grandemente ampliado e a aplicabilidade da técnica passou a incluir potencialmente todos os programas de melhoramento (TANKSLEY et al., 1989). No entanto, o número de marcadores

previsto pelos ensaios isoenzimáticos é limitado, geralmente entre 10 e 20 por espécie. Mesmo considerando que o número total de locos isoenzimáticos que pode ser detectado seja maior que 100 (Murphy, 1990, citado por FERREIRA e GRATAPAGLIA, 1996), o nível de resolução não permite cobertura completa do genoma e, por conseguinte, limita certos estudos, como a construção de mapas genéticos saturados. Com a utilização desses marcadores, um mapa clássico de ligação foi feito para soja, encontrando-se apenas 17 grupos de ligação, muitos deles com apenas dois marcadores (Palmer e Kiang, 1990, citados por TINGEY et al., 1991).

O desenvolvimento da biologia molecular ofereceu a possibilidade do desenvolvimento de novas técnicas de detecção de polimorfismos em nível de DNA. O polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição obtidos pelo corte da fita dupla de DNA com enzimas de restrição (RFLP), utilizada pela primeira vez por GRODZICKER et al. (1974), constituiu-se numa das classes de marcadores moleculares mais amplamente utilizadas em genética molecular. Atualmente, marcadores baseados na técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), como o RAPD, mini e microsatélites, têm sido mais usados (FERREIRA e GRATAPAGLIA, 1996). Esses marcadores de DNA possuem inúmeras vantagens, entre elas: são baseados na variação de seqüências de nucleotídeos e numericamente ilimitados; quando co-dominantes, permitem a identificação de locos em qualquer tipo de cruzamento; são fenotipicamente neutros; e não possuem interação epistática. A utilidade desses marcadores está em estabelecer relações de ligação entre eles e os locos de interesse. A ligação permite inferir sobre a presença dos locos, mediante o ensaio de alguns desses marcadores, facilitando a transferência e o mapeamento de locos (TANKSLEY et al., 1989).

A eficiência da seleção assistida por marcadores moleculares do DNA pode ser aumentada pelo uso simultâneo de marcadores em acoplamento e em repulsão, fortemente ligados e flanqueando o loco de interesse. O marcador em repulsão estará presente nos indivíduos recessivos ou heterozigotos, e os marcadores em acoplamento estarão presentes nos indivíduos homozigotos dominantes ou heterozigotos (HALEY et al., 1994).

2.3.2. Marcadores RAPD

A tecnologia da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi definida em meados dos anos 80 (MULLIS e FALOONA, 1987; SAIKI et al., 1985). Desde sua concepção, essa técnica causou verdadeira revolução na biologia. A facilidade, rapidez, versatilidade e sensibilidade da PCR tornaram-na verdadeiramente poderosa para estudos genético-moleculares. Dela derivou um tipo de marcador molecular informado por dois grupos independentes nos anos 90, WILLIAMS et al. (1990) o denominaram de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e WELSH e McCLELLAND (1990) o denominaram AP-PCR (*Arbitrarily-Primer PCR*). A primeira denominação tornou-se mais conhecida.

Marcadores do tipo RAPD detectam seqüências polimórficas num ensaio de amplificação de DNA usando somente um iniciador de seqüência arbitrária. Nessa reação, espécies únicas de iniciadores se unem em dois sítios diferentes em fitas opostas do DNA-molde. Se esses sítios estão a uma distância amplificável, uma população de fragmentos de diferentes tamanhos é formada durante a amplificação. O número e o tamanho dos produtos de amplificação dependem, essencialmente, da seqüência do iniciador e do DNA-molde usado.

Os marcadores RAPD têm sido amplamente usados em estudos de mapeamento, identificação de locos, clonagem baseada em mapas, caracterização de cultivares (*fingerprinting*) e seleção assistida por marcadores (SAM). Marcadores RAPD têm sido amplamente utilizados na identificação de polimorfismos ligados a locos de resistência à doença em feijoeiro (CARDOSO DE ARRUDA, 1998), em alface (PARAN e MICHELMORE, 1993), em tomate (MARTIN et al., 1991) e em soja (SILVA, 1998; SCHUSTER, 1999).

Existem, entretanto, alguns fatores que limitam a sua aplicação, como o baixo conteúdo de informação por loco, pois apenas um alelo é normalmente determinado, o desconhecimento da base genética dos fragmentos de DNA amplificados e, por serem marcadores dominantes, não permitem a distinção entre homozigotos e heterozigotos. Um segundo problema apresentado por esses marcadores é a baixa reprodutibilidade dos dados. No entanto, diferentes laboratórios motivados pela sensibilidade do RAPD têm superado esse defeito, padronizando as condições da técnica (YU et al., 1993). Atualmente, é possível aumentar a utilidade e a reprodutibilidade de um marcador RAPD de interesse, convertendo-o em um

marcador mais específico e reprodutível, denominado SCAR - *Sequence Characterized Amplified Regions* (MELOTTO et al., 1996).

2.3.3. Marcadores microssatélites

NAKAMURA et al. (1987) determinaram que locos de seqüências de DNA repetidas em série e de número variável - VNTR (*Variable Number Tandem Repeat*) poderiam ser usados como marcadores genéticos altamente informativos. Esses locos multialélicos foram denominados por JEFFREYS et al. (1985) como minissatélites e como repetições de seqüências flanqueadas por sítios de restrição altamente conservados. Três anos depois, JEFFREYS et al. (1988) sugeriram que a natureza altamente informativa dos locos VNTR fosse combinada com a especificidade e rapidez da reação de PCR com o uso de iniciadores para as regiões conservadas, que flanqueiam os locos de VNTR, permitindo suas amplificações. A mobilidade dos fragmentos amplificados em géis de agarose ou poliacrilamida difere de acordo com o número de unidades repetidas no loco VNTR. As unidades que se repetem foram inicialmente identificadas em humanos (Litt e Luty, 1989; Weber e May, 1989; Tatus, 1989, citados por AKKAYA et al., 1992) como repetições em série de dinucleotídeos (GA/CT)_n, que se repetem no genoma humano aproximadamente 50.000 vezes, com 'n' variando entre 10 e 60. Esse tipo de seqüência repetida foi denominado SSR (*Simple Sequence Repeat*) por JACOB et al. (1991) ou, microssatélites por Litt e Luty (1989), citados por AKKAYA et al. (1992).

Tendo em vista o alto grau de polimorfismo e o nível informativo apresentados por essas seqüências, AKKAYA et al. (1992) conduziram experimentos em soja, objetivando verificar a freqüência, a natureza, a presença de polimorfismo e o modo de herança das SSR. O polimorfismo apresentado foi considerado bom, em média sete locos por par de *primers*, que, juntamente com sua herança mendeliana e sua condição de co-dominante, tornou SSR marcadores que podem ser utilizados em complementação com outros, como RFLP ou RAPD. Aqueles autores relataram que os níveis informativos dos SSR os tornam marcadores extremamente úteis para a soja, devido à sua estreita variabilidade genética. Ao contrário do que foi detectado em humanos, cujas seqüências centrais dos SSR são (GA/CT)_n, em soja foram detectadas as seqüências (AT)_n/(TA)_n e (ATT)_n/(TAA)_n, as quais se repetem em tandem de 2 a 5 pares de bases, formando o centro da seqüência.

Os microssatélites são preferidos sobre outros marcadores moleculares baseados na reação de PCR, como RAPD, por serem co-dominantes e os dados serem altamente reprodutíveis. Na seleção assistida, eles são de fácil aplicação e de baixo custo, o que possibilita a análise de milhares de genótipos rapidamente (MUDGE et al., 1997).

Marcadores microssatélites já foram utilizados para mapeamento de genes de resistência ao NCS em soja (MUDGE et al., 1997; SCHUSTER, 1999) e genes que controlam a floração (LI e NIWA, 1996). Os SSR também foram utilizados como marcadores para a distinção inequívoca de diferentes cultivares de soja, visando à proteção de cultivares (RONGWEN et al., 1995). CREGAN et al. (1999a) publicaram um mapa genético de soja, resultado da integração de três mapas genéticos gerados pela Universidade Estadual de Iowa, Universidade de Utha e Universidade de Nebraska. Este mapa consenso possui 20 GL formados por 1004 marcadores moleculares entre SSR, RFLP, RAPD e isoenzimas. Devido ao grande número de SSR posicionados, 406 pares ao todo, este mapa mostrou ser muito útil para ancorar os QTLs mapeados, permitindo a comparação de mapas genéticos obtidos com diferentes germoplasmas, baseados no pressuposto de que os SSRs são altamente conservados.

2.4 Identificação de QTLs

A herança de muitos caracteres é consequência da ação conjunta de vários genes. Esses caracteres são denominados normalmente, como poligênicos ou quantitativos. GELDERMANN (1975) propôs denominar os locos controladores de caracteres quantitativos de *Quantitative Trait Loci* – (QTL). O termo QTL, em substituição ao termo ‘polygenes’, proposto por MATHER (1941), resultou em uma nomenclatura mais adequada, pois, normalmente a distinção entre genes maiores (oligogenes) e poligenes não se dá por meios diretos.

Embora a teoria da genética quantitativa tenha sido muito útil no estudo de caracteres quantitativos, estes caracteres continuam sendo mais complicados de manipular em programas de melhoramento que os caracteres qualitativos (FALCONER, 1981). Se características complexas fossem dissecadas em seus componentes genéticos individuais, elas poderiam ser tratadas como um caráter qualitativo. Marcadores moleculares em nível de DNA provêm a oportunidade de

identificar QTLs, estimar seus efeitos genéticos e mapear sua posição mediante o uso de mapas genéticos de marcadores moleculares como o reportado para soja por CREGAN et al. (1999a).

A identificação de QTLs através de marcadores moleculares é conceitualmente simples. Do cruzamento entre dois genitores que contrastem para a maioria das características de interesse, se obtém uma população segregante (comumente F_2 , retrocruzamento, RIL dentre outras). Um número de progênie sempre grande (superior a 100 indivíduos) é avaliado para as características de interesse e o fenótipo do marcador molecular obtido a intervalos regulares (5 – 20 cM), ao longo do genoma. A procura dos QTLs realiza-se mediante associações entre os marcadores segregantes e os valores fenotípicos das características. Se tal associação é identificada, significa que existe uma ligação fatorial entre o marcador e o QTL que afeta a característica.

O poder de detecção de QTLs é função da magnitude de seus efeitos gênicos, do tamanho da população e da frequência de recombinação entre o marcador e o QTL. Quanto mais afastados estiverem o marcador e o QTL, menor será a probabilidade de serem transmitidos conjuntamente ao mesmo indivíduo. Como consequência, a análise baseada em marcadores poderia não detectar associação estatisticamente significativa entre o marcador e o QTL, ou seus efeitos genéticos serem subestimados. A associação entre marcadores e QTLs pode ser detectada através de estatísticas simples como qui-quadrado, análise de variância, regressão linear, entre outras. Quando se dispõe de um número suficientemente grande de marcadores, ordenados em grupos de ligação, o mapeamento de QTLs, assim como a estimativa de seus efeitos, pode realizar-se através do método de mapeamento por intervalos proposto por LANDER e BOTSTEIN (1989). Ultimamente vêm-se utilizando o método de mapeamento por intervalo composto (ZENG, 1993; ZENG, 1994; JANSEN, 1993; JANSEN, 1994; JANSEN e STAM, 1994), assim denominado por combinar para o mapeamento de QTLs, o método por intervalo original e a regressão múltipla.

2.5. Objetivos

- Identificar marcadores SSR ligados ao(s) gene(s) de resistência às raças 3 e 9 do nematóide de cisto da soja e mapear estes locos no mapa genético da soja com o auxílio desses marcadores.
- Avaliar uma população de linhagens endogâmicas recombinantes (*Recombinant Inbred Lines* – RIL), visando sua utilização como população de mapeamento.

Nota: Os artigos que compõem esta tese são apresentados segundo as normas estabelecidas pelo periódico *Euphytica*.

BIBLIOGRAFIA

- AKKAYA, M.S., BHAGWAT, A.A., CREGAN, P.B. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. **Genetics**, v.132, n.3, p.1131-1139, 1992.
- ALSTON, D.G., SCHMITT, D.P. Development of *Heterodera glycines* life stages as influenced by temperature. **J. Nematology**, v.20, n.1, p.36-372, 1988.
- BOERMA, H.R., HUSSEY, R.S. Breeding plants for resistance to nematodes. **J. Nematology**, v.24, n.2, p.242-252, 1992.
- CAVENESE, G. Controle do nematóide de cisto na cultura da soja na região tropical nos cerrados do Brasil. (Boletim Técnico n.1), p.15, 1996.
- CALDWELL, B.E., BRIM, C.A., ROSS, J.P. Inheritance of resistance to soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*. **Agron. J.**, v.52, n.6, p.635-636, 1960.
- CARDOSO DE ARRUDA, M.C. **Resistência do feijoeiro-comum à atracnose: herança, identificação de marcadores moleculares e introgressão do gene Co-4 no cultivar Rudá.** Viçosa, MG: UFV, 1998. 101 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- CERVIGNI, G.D.L. **Mapeamento de genes de resistência à raça 3 do nematóide de cisto da soja (*Heterodera glycines* Ichinohe).** 1999. 52p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- CONAB. **Estimativas da safra 2001/02.** Brasília: 15.03.2003. (<http://www.conab.gov.br/>).
- CONCIBIDO, V.C., DENNY, R.L., BOUTIN, S.R., HAUTEA, R., ORF, J.H., YOUNG, N.D. DNA marker analysis of loci underlying resistance to soybean cyst nematode (*Heterodera glycines* Ichinohe). **Crop Sci.**, v.34, n.1, p.240-246, 1994.
- CONCIBIDO, V.C., DOUGLAS, L., DENNY, R.L., ORF, J.H., YOUNG, N.D. Genome mapping of soybean cyst nematode resistance genes in Peking, PI 90763, and PI 88788 using DNA markers. **Crop Sci.**, v.37, n.1, p.258-264, 1997.
- CREGAN, P., JARVIK, T., BUSH, A.L., SHOEMAKER, R.C., LARK, K.G., KAHLER, A.L., VANTOAI, T.T., LOHNES, D.G., CHUNG, J., SPECHT J.E. An integrated genetic linkage map of the soybean. **Crop Sci.**, v.39, p.1464-1490, 1999a.
- CREGAN, P., MUDGE, J., FICHUS, E.W., DANESH, DENNY, D. R., YOUNG, N.D. Two simple sequence repeat markers to select for soybean cyst nematode resistance conditioned by the *rhg1* locus. **Theor. Appl. Genet.**, v.99, p.811-818, 1999b.

- CUNHA, G. E. **Reação de progênies de soja ao nematóide de cisto (*Heterodera glycines* Ichinohe) e estimativas de herdabilidade de caracteres agrônômicos**. Viçosa, MG: UFV, 1997. 78p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- DIAS, W.P.; SILVA, J.F.V.; PEREIRA, J.E. Monitoramento de raças de *Heterodera glycines* no Brasil (safra 1997/98). In: **Reunião de pesquisa de soja da região central do Brasil**, 1998. Londrina. Ata e Resumos. Londrina: EMBRAPA-CNPSO. p. 241, 1997.
- DIAS, W.P.; SILVA, J.F.V.; KIHLE, R.A.S., HIROMOTO, D.M.; ABDELNOOR, R.V. Quebra da resistência da cv. Hartwig por populações de campo do nematóide de cisto da soja. **Pesq. Agrp. Bras.**, v.33, n.6, p. 971-974, 1998.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Manejo da cultura para controle do nematóide de cisto da soja**. Londrina, PR: 1994. 26p.
- ENDO, B.Y. Cellular response to infection. In: **Biology and management of the soybean cyst nematode**. Ed. R.D. Riggs and J. A. Wrather. APS Press, p.37-49, 1992.
- EPPS, J.M., CHAMBERS, A.Y. Populations dynamics of *Heterodera glycines* under various cropping sequences in field binds. **Phytopathology**, v.55, n.1, p.100-103, 1965.
- FALCONER, D.S. **Introdução à genética quantitativa**. New York: Longman, 1981. 25 p.
- FAGHIHI, J., VIERLING, R.A., HALBRENDT, J.M., FERRIS, V.R., FERRIS, J.M. Resistance genes in a 'Williams 82' x 'Hartwig' soybean cross to an inbred of *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology**, v.27, n.3, p.418-421, 1995.
- FERREIRA, M.E., GRATAPAGLIA, D. Classes de marcadores moleculares para análise genética. In: FERREIRA, M.E., GRATAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2.ed. Brasília: MA/EMBRAPA/CENARGEN, 1996. p.13-67.
- GARCIA, A., SILVA, J.F.V. Interação entre a população de cisto de *Heterodera glycines* e o pH do solo. **Fitopatologia Brasileira**, v.21, p.420, 1996.
- GELDERMAN, H. Investigation of inheritance of quantitative characters in animals by gene markers. I. Methods. **Theor. Appl. Genet.**, v.46, n.12, p.319-330, 1975.
- GOLDEN, A.M., EPPS, J.M., RIGGS, R.D., DUCLOS, L.A., FOX, J.A., BERNARD, R.L. Terminology and identity of intraespecific forms of the soybean cyst nematode *Heterodera glycines*. **Plant Dis. Rep.**, v.54, n.2, p.544-546, 1970.

- GOMES, J.L.L., SEDIYAMA, T., TEIXEIRA, R.C., Expansão do nematóide de cisto (*Heterodera glycines*) na cultura de soja. In: SEDIYAMA, T., KAJE, H, H. (Eds.). **Dia de campo sobre a cultura da soja**. Florestal, MG: UFV, 1995. p.24-26. (Boletim Técnico 1).
- GRODZICKER, T., WILLIAMS, J., SHARP, P., SAMBROOK, J. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. **Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.**, v.39, p.439-446, 1974.
- HALEY, S.D., ALFANADOR., L., KELLY, J.D. Selection for monogenic pest resistance traits with coupling- and repulsion-phase RAPD markers. **Crop Sci.**, v.34, n.3, p.1061-1066, 1994.
- HANCOCK, J.A., HANCOCK, F.G., CAVINESS, C.E., RIGGS, R.D. Genetics of resistance in soybean to race X of soybean cyst nematode. **Crop Sci.**, v.27, n.1, p.704-707, 1987.
- HARTWIG, E.E., Breeding productive soybean cultivars resistant to the soybean cyst nematode for the southern United States. **Plant Dis.**, v.65, n.1, p.303-307, 1981.
- HARTWIG, E.E., EPPS, J.M. An additional gene for resistance to soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*. **Phytopathology**, v.69, n.7, p.584-590, 1970.
- HEATHERLY, L.G., YOUNG, D.L. Soybean and soybean cyst nematode response to soil water content in loam and clay soils. **Crop Sci.**, v.31, p.191-196, 1991.
- HEATHERLY, L.G., YOUNG, D.L., EPPS., J.M., HARTWIG, E.E. Effect of upper-profile soil water potential on numbers of cyst of *Heterodera glycines* on soybeans. **Crop Sci.**, v.22, n.3, p.833-835, 1982.
- JACOB, H.J., LINDPAINNER, K., LINCO, S.E., KUSUMI, K., BUNKER, R.K., YI-PEI MAO., GANTEN, D., DZAU, V.J., LANDER, E.S. Genetic mapping of gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. **Cell**, v.67, n.1, p.213-224, 1991.
- JANSEN, R. C. Interval mapping of multiple quantitative trait loci. **Genetics**, v.135, p.205-211, 1993.
- JANSEN, R.C. Controlling the type I and II errors in mapping quantitative trait loci. **Genetics**, v.138, n.3, p.871-881, 1994.
- JANSEN, R.C., STAM, P. High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. **Genetics**, v.136, n.4, p.1447-1455, 1994.
- JAPALA, P. Biological control of plant-parasitic nematodes. **Annual Review of Plant Pathology**, v.24, p.453-489, 1986.
- JEFFREYS, A.J., WILSON, V., THEIN, S.L. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. **Nature**, v.314, n.1, p.67-73, 1985.

- JEFFREYS, A.J., WILSON, V., NEUMANN, R., KEYTE, J. Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction: towards DNA fingerprinting of single cells. **Nucleic Acids Res.**, v.16, n.25, p.10953-10971, 1988.
- KIM, D.G., RIGGS, R.D. Characteristics and efficacy of a sterile hypomycete (ARF 18), a new biocontrol agent for *Heterodera glycines* and other nematodes. **J. Nematology**, v.23, n.3, p.275-282, 1991.
- KOENNING, S.R.; SCHMITT, D.P.; BARKER, K.R.; GUMPERTZ, M.L. Impact of crop rotations and tillage systems on *Heterodera glycines* populations density and soybean yield. **Plant Dis.**, v.79, n.3, p. 282-286, 1995.
- LANDER, E.S., BOTSTEIN, D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics**, v.121, n.1, p.185-199, 1989.
- LI, J., NIWA, M. Microsatellite DNA markers linked to a gene controlling days to flowering in soybean (*Glycine max*) under shortday conditions. **Breeding Science.**, v.46, n.1, p.81-84, 1996.
- LIMA, R.D., FERRAZ, S., SANTOS, J.M. Ocorrência de *Heterodera* sp. em soja no Triângulo Mineiro. **Nematologia Brasileira**, v.16, n.1/2, p.101-102, 1992.
- LORDELLO, A.I.L., LORDELLO, R.R.A., QUAGGIO, J.A. Ocorrência do nematóide de cisto da soja (*Heterodera glycines*) no Brasil. **Revista de Agricultura**, v.67, n.3, p.223-225, 1992.
- LUEDDERS, V.D. Inheritance of genes for resistance to soybean cyst nematode populations. **Crop Sci.**, v.29, n.1, p.667-671, 1989.
- MANSUR, L.M., CARRIQUIRY, A.L., RAO-ARELLI, A.P. Generation mean analysis of resistance to race 3 of soybean cyst neamtode. **Crop Sci.**, v.33, n.3, p.1249-1253, 1993.
- MAHALINGAM, R., SKORUPSKA, H.T. DNA markers for resistance to *Heterodera glycines* I. race 3 in soybean cultivar Peking. **Breeding Science**, v.45, n.2, p.435-443, 1995.
- MARTIN, G.B., WILLIAMS, C.G.K., TANKSLEY, S.D. Rapid identification of markers linked to a Pseudomonas resistance gene in tomato by using random primers and near-isogenic lines. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.88, p.2336-2340, 1991.
- MATHER, K. Variation and selection of polygenic characters. **J. Genetics**, v.41, n.12, p. 159-193, 1941.
- MATSON, A.L., WILLIAMS, L.F. Evidence of four genes for resistance to the soybean cyst nematode. **Crop Sci.**, v.22, n.1, p.588-590, 1965.

- MELOTTO, M., ALFANADOR, L., KELLY, J.D. Development of SCAR marker linked to the *I* gene in common bean. **Genome**, v.39, n.4, p.1216-1219, 1996.
- MENDES, M.L. O nematóide do cisto da soja. ARANTES, N. E., SOUZA, P.I.M.(Eds.). In: **Cultura da soja nos cerrados**. Piracicaba: POTAFOS, 1993. p.35.
- MENDES, M.L., DICKSON, D.W. Detections of *Heterodera glycines* in Brazil. **Plant Dis.**, v.77, n.5, p.499-500, 1993.
- MONTEIRO, W.F., MORAIS, S.R.A.C. **Ocorrência do nematóide de cisto da soja, *Heterodera glycines*, Ichinohe, 1952, prejudicando a cultura da soja no Mato Grosso do Sul**. In: Congresso Brasileiro de Nematologia, 16, Lavras, 1992.
- MUDGE, J., CREGAN, P.B., KENWORTHY, J.P., KENWORTHY, J.W., ORF, J.H., YOUNG, N. D. Two microsatellite markers that flank the major soybean cyst nematode resistance locus. **Crop Sci.**, v.37, n.3, p.1611-1615, 1997.
- MULLIS, K., FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods Enzymol.**, v.55, p.335-350, 1987.
- MYERS, G.O., ANAND, S.C., RAO-ARELI, A.P. Inheritance of resistance to race 5 of *Heterodera glycines* in soybeans. **Agronomy Abstracts**, v.80, p.90, 1988.
- NAKAMURA, Y, LEPPERT, M., O'CONNELL, P., WOLFF, R., HOLM, T., CULVER, M., MARTIN, C., FUJIMOTO, E., HOFF, M., KUMLIN, E., WHITE, R. Variable number tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. **Science**, v.235, n.4796, p.1616-1622, 1987.
- NIBLACK, T.L., NORTON, D.C. Soybean yield losses due to *Heterodera glycines* in Iowa. **Plant Dis.**, v.76, n.3, p.943-948, 1992.
- NOEL, G.R., MENDES, M.L., MACHADO, C.C. Distribution of *Heterodera glycines* races in Brazil. **Nematrópica**, v.24, n.1, p.63-68, 1994.
- PARAN, I., MICHELMORE, R.W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theor. Appl. Genet.**, v.85, n.3, p.985-993, 1993.
- PATERSON, A.H., LANDER, E.S., HEWITT, J.D., PATERSON, S., LINCOLN, S.E., TANKSLEY, S.D. Resolution of quantitative traits into mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphism. **Nature**, v.335, n.6193, p.721-726, 1988.
- RIGGS, R.D., SCHMIDT, D.P., NOEL, G.R. Variability in race tests with *Heterodera glycines*. **J. Nematology**, v.20, n.4, p.565-572, 1988.
- RIGGS, R.D.; HAMLIN, M.L.; RAKES, L. Development of *Heterodera glycines* pathotypes as affected by soybean cultivars. **J. Nematology**, v.9, n.1, p.312-318, 1977.

- ROESSING, A.C., GUEDES, L.C.A. Aspectos econômicos do complexo soja: sua participação na economia brasileira e evolução na região central. In: ARANTES, N. E., SOUZA, P. I. M. (Eds.). **A cultura da soja nos cerrados**. Piracicaba: Potafos, 1993. p.1-69.
- RONGWEN, J., AKKAYA, M.S., BHAGWAT, A.A., LAVI, U., CREGAN, P.B. The use the microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. **Theor. Appl. Genet.**, v.90, n.1, p.43-48, 1995.
- ROSS, J.P. Crop rotation effects on the soybean cyst nematode population and soybean yields. **Phytopathology**, v.52, n.2, p.815-818, 1962.
- ROSS, J., BRIM, C.A. Resistance of soybean on the soybean-cyst nematode as determined by a double-row method. **Plant Dis. Rep.**, v.41, n.19, p.923-924, 1957.
- SAIKI, R.K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K.B., HORN, G.T., ERLICH, H.A., ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v.230, n.4725, p.1350-1354, 1985.
- SASSER, J.N., UZZELL JÚNIOR, G. Control of the cyst nematode by crop rotation in combination with a nematicide. **J. Nematology**, v.23, n.3, p.344-347, 1991.
- SCHMITT, D.P., FERRIS, H., BARKER, K.R. Response of soybean to *Heterodera glycines* races 1 and 2 in different soil types. **J. Nematology**, v.19, n.1, p.240-250, 1987.
- SCHMITT, D.P. Management of *Heterodera glycines* by cropping and cultural practices. **J. Nematology**, v.23, n.3, p.348-352, 1991.
- SCHUSTER, I. **Identificação de QTL para a resistência a Nematóide de Cisto da Soja e capacidade de combinação de genitores**. Viçosa, MG: UFV, 1999. 86p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- SILVA, M.A. **Resistência ao cancro do haste da soja: herança e identificação de marcadores moleculares**. Viçosa, MG: UFV, 1998. 43p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- TANKSLEY, D.S., YOUNG, N.D., PATERSON, A.H., BONIERBALE, M.W. Review. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. **Bio/Technology**, v.7, n.1, p.257-264, 1989.
- THOMAS, J.D., CAVINES, C. E., RIGGS, R.D., HARTWIG, E.E. Inheritance of reaction to race 4 of soybean cyst nematode. **Crop Sci.**, v.15, n.1, p.208-210, 1975.

- TIHOHOD, D. Os nematóides formadores de cistos gêneros: *Heterodera* e *Globodera*. In: TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola aplicada**. São Paulo: FUNEP/FCAV, 1993. p.334-339.
- TINGEY, S.V., RAFALSKI, J.A., WILLIAMS, G.K. Soybean genome analysis: DNA polymorphisms are identified by oligonucleotide primers of arbitrary sequence. In: NATO ADVANCED STUDY INSTITUTE ON PLANT MOLECULAR BIOLOGY, 1990, Elmeu, Bavaria, Germany. **Proceedings...** New York: Plenum, 1991. p.263-268.
- TRANTAPHYLLOU, A.C and HIRSCHMANN, H. Oogenesis and mode of reproduction in the soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*. **Nematologica** v.7, n.1, p.235-241, 1962.
- WAIN, A.L.; SILVA, J.F.V. Levantamento da ocorrência de raças de *Heterodera glycines* no Brasil. In: **Congresso Brasileiro de Nematologia, XX**, Gramado, RS. Resumos. p.58, 1997.
- WAUGH, R., POWELL, W. Using RAPD markers for crop improvement. **Focus**, v.10, n.1, p.186-191, 1992.
- WEBB, D.M., BALTAZAR, B.M., RAO-ARELLI, A.P., SCHUPP, J., CLAYTON, K., KEIM, P., BEAVIS, W.D. Genetics mapping of soybean cyst nematode race-3 resistance loci in the soybean PI 437.654. **Theor. Appl. Genet.**, v.91, n.1, p.574-581, 1995.
- WELSH, J., McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, v.18, n.24, p.7213-7218, 1990.
- WEISEMANN, J.M., MATTHEWS, B.S., DEVINE, T.E. Molecular markers located to the soybean cyst nematode resistance gene, *Rhg4*. **Theor. Appl. Genet.**, v.85, n.1, p.36-138, 1992.
- WILLIAMS, J.G.K., KBELIK, 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**, v.18, n.22, p.6531-6535, 1990.
- WRATHER, J.A., ANAND, S.C., DROPKIN, V.H. Soybean cyst nematode control. **Plant Dis.**, v.68, n.9, p.829-833, 1984.
- WRATHER, J.A., ANAND, S.C.; KOENNING, S.R. Management by cultural practices. In: RIGGS, R.; WRATHER, J.A., ed. **Biology and management of the soybean cyst nematode**. APS, 1992, p. 125-131.
- YORINORI, J.T., CHARCHAR, M.J.D., NASSER, L.C.B., HENNING, A.A. Doenças da soja e seu controle. In: ARANTES, N. E., SOUZA, P. I.M. (Eds.). **Cultura de soja nos cerrados**. Piracicaba: POTAFOS, 1994. p. 535.
- YORINORI, J.T. Principais doenças da cultura de soja e estratégias de controle. **Fitopatologia Brasileira**, v.20, n.1, p.276-277, 1995. (Suplemento).

- YORINORI, J.T., GALERANI, P.R., GARCIA, A. **Manejo da cultura para controle do nematóide de cisto da soja.** Londrina, PR: EMBRAPA-CNPSO, 1994. 26p. (EMBRAPA-CNPSO. Documento, 83).
- YOUNG, L.D. Yield loss in soybean caused by *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology**, v.24, n.45, p.604-607, 1996. Supplement.
- YU, K.F., DEYNZE, A.V., PAULS, K.P. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. In: Yu, K.F., DEYNZE, A.V., PAULS, K.P. **Methods in plant molecular biology and biotechnology**, New York: CRC, 1993. p.287-301.
- ZENG, Z.-B. Theoretical basis for separation of multiple linked gene effects in mapping quantitative trait loci. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.90, p.10972-10976, 1993
- ZENG, Z.-B. Precision mapping of quantitative trait loci. **Genetics**, v.136, n.9, p.1457-1468, 1994.

CAPÍTULO 1

HERDABILIDADES DA RESISTÊNCIA ÀS RAÇAS 3 E 9 DO NEMATÓIDE DE CISTO DA SOJA

RESUMO

Heterodera glycines Ichinohe, o nematóide de cisto da soja (NCS) é um dos parasitas mais prejudiciais da soja. A herdabilidade da resistência às raças 3 e 9 do NCS foi estudada numa população de linhagens endogâmicas recombinantes derivadas do cruzamento entre Hartwig (genitor resistente) e Y23 (genitor suscetível). A resposta a raça 3 foi avaliada em 157 linhagens, e à raça 9 em 147 linhagens. A contagem de cistos realizou-se após 28 dias da inoculação. Foi observada segregação transgressiva para ambas as raças. Significativa variabilidade genética foi detectada pelo teste F em nível de 5% de significância. A herdabilidade no sentido amplo para a raça 3 foi estimada em 80,97%, e para a raça 9 em 80,39%. Esses altos valores de herdabilidade indicam que os genes de resistência segregando na população são poucos e de efeito maior. Ainda, as altas herdabilidades da resistência indicam possibilidade de seleção fenotípica eficiente.

INTRODUÇÃO

O nematóide de cisto da soja (*Heterodera glycines* Ichinohe - NCS) foi detectado no Brasil pela primeira vez na safra 1991/92 no estado de Minas Gerais, infectando cerca de 10 mil hectares (LORDELLO 1992; LIMA 1992; MONTEIRO 1992). Na safra seguinte, já infectava lavoura em 5 estados e promovia perdas da ordem de US\$ 24 milhões (MENDES 1993). Na atualidade, estima-se que o NCS infecte mais de 2 milhões de hectares e tem sido relatado a ocorrência de onze raças no Brasil (NOEL 1994, WAIN 1997, DIAS 1997, DIAS 1998), tornando o NCS um dos parasitas mais importante da soja na atualidade.

O uso de variedades resistentes incluídas na rotação de culturas é a forma mais segura e econômica de controle. Entretanto, a grande variabilidade genética do NCS é grande obstáculo no desenvolvimento de variedades resistentes (FAGHIHI 1986a, 1986b). A resistência ao NCS foi relatada pela primeira vez por ROSS (1957). Pouco mais tarde, CALDWELL (1960) reportou que a variedade Peking possuía três genes recessivos para a resistência à raça 1 do NCS. MATSON (1965) propôs a existência de um gene dominante, *Rhg4*, para a raça 3 em Peking. THOMAS (1975) também propôs a existência de um gene dominante para o controle da resistência à raça 4 (atualmente raça 14). HANCOCK (1975) reportou um gene recessivo associado à resistência a raça denominada "raça X". RAO-ARELLI (1992) propôs que a resistência à raça 3 na PI 88788 era condicionada por um gene recessivo e dois dominantes e em Peking e na PI 90763 a resistência era condicionada por um gene dominante e dois recessivos. Ainda, Peking e PI 90763 parecem carregar os mesmos genes de resistência para a raça 3. Assim, a resistência ao NCS dependeria de genes recessivos e dominantes, com vários alelos por loco gênico.

A herdabilidade de um caráter métrico é uma das mais importantes de suas propriedades. Ela expressa a proporção da variância total que é atribuída à variação genética. A mais importante função da herdabilidade é seu papel preditivo, expressando a confiança do valor fenotípico como um guia para o valor genético (FALCONER 1981).

Diferentes autores têm conduzido estudo sobre a herdabilidade da resistência ao NCS, usando diferentes metodologias para sua estimação. Altas herdabilidades

no sentido amplo foram informadas para a raça 3 através da análise de médias (MANSUR 1993) e da análise de variância (WEBB 1995). HANCOCK (1987) regredindo valores fenotípicos F_3-F_2 , estimou valores de herdabilidade restrita altos para a resistência a “raça X”. YUE (2001) estimaram altas herdabilidades restritas para a resistência às raças 1, 2, 3, 5 e 14 do NCS. Segundo FALCONER (1981) e RAMALHO (1993) a herdabilidade não é uma propriedade somente do caráter, mas da população e das condições ambientais em que os dados foram obtidos. Portanto, existe a necessidade de se estimar a herdabilidade do caráter em estudo sob as condições específicas nas quais são conduzidas as pesquisas.

O presente trabalho foi conduzido para estimar a herdabilidade da resistência às raças 3 e 9 do NCS, em uma população de RILs derivada do cruzamento entre Hartwig (genitor resistente) e Y23 (genitor suscetível).

MATERIAL E MÉTODOS

Material Genético

A população de linhagens endogâmicas recombinantes (*Recombinant Inbred Lines – RIL*) (geração F₆) foi obtida do cruzamento entre Hartwig (genitor resistente) x Y23 (genitor suscetível). Plantas F₂ derivadas de 5 plantas F₁ foram conduzidas pelo método do descendente de uma única semente, (*Single Seed Descent - SSD*), em casa de vegetação, conforme sugerido por BRIM (1966), sem ter sido praticado seleção durante a sua obtenção.

Inoculação e Avaliação do NCS

A resposta à raça 3 e 9 foi avaliada em 157 e 147 RILs, respectivamente. Nos ensaios de avaliação foram incluídas as linhagens, seus genitores (Hartwig e Y23), os hospedeiros diferenciadores (Peking, Pickett, PI 90763 e PI 88788) e a testemunha suscetível Lee. O cultivar Embrapa-20, suscetível, foi utilizado para manter e multiplicar os inóculos das raças, usando-se vasos de argila com capacidade para 5 litros mantidos em casa de vegetação com temperatura de 25-30°C. Sementes das linhagens, dos hospedeiros diferenciadores (Pickett, Peking, PI 90763 e PI 88788), do padrão suscetível Lee e dos genitores foram germinadas em areia. Quando as plântulas atingiram 2 a 3 dias de idade foram transplantadas para vasos de argila com capacidade de 0,5 litros (uma planta por vaso), contendo a mistura de solo e areia, na proporção 1:2. Simultaneamente ao transplântio, 6 plantas de cada RIL, dos hospedeiros diferenciadores, dos genitores e do padrão suscetível Lee, foram inoculadas com 4 mL de uma suspensão contendo 1000 ovos/mL. As plantas foram mantidas em casa de vegetação (25-30°C) por 30 dias, quando se realizou a avaliação. Para a avaliação, o sistema radicular de cada planta foi retirado do vaso e lavado sob jato de água em peneira com malha de 20 mesh, acoplada sobre outra de 60 mesh. Os cistos retidos sobre a peneira foram contados sob lupa estereoscópica. Para cada hospedeiro diferenciador, foi calculado um Índice de Parasitismo (IP), e cada raça foi identificada conforme o esquema de RIGGS (1988).

Estimativas das herdabilidades

Para estimar as herdabilidades de ambas as raças do NCS foi usado o

delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições (plantas) por RIL (tratamento). Os efeitos dos tratamentos foram considerados aleatórios, uma vez que as RILs usadas representariam uma amostra de uma população de RILs, teoricamente infinita, derivadas do cruzamento entre Hartwig e Y23.

O modelo estatístico adotado foi:

$$Y_{ij} = \bar{m} + G_i + E_{ij}$$

Em que:

\bar{m} é a média geral,

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

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

No quadro 1 encontra-se o esquema da análise de variância desse modelo.

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

FV	GL	QM	E(Q.M.)	F
Genótipos	$g - 1$	QMG	$s_e^2 + rs_g^2$	QMG/QME
Erro	$g(j - 1)$	QME	s_e^2	

Parâmetros genéticos analisados e seus estimadores

$$\text{Média} - \hat{m} = \frac{\sum_{i,j} Y_{ij}}{gr}$$

$$\text{Variância genética } (\hat{s}_g^2) = \frac{\text{QMG} - \text{QMR}}{r}$$

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

$$\text{Variância residual } \hat{s}_e^2 = \frac{\text{QME}}{r}$$

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

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

$$\text{Coeficiente de variação genético - CVg (\%)} = \frac{\sqrt{\hat{S}_g^2}}{\bar{x}} \times 100$$

A correlação fenotípica entre a resistência às raças 3 (X) e 9 (Y) do NCS foi estimada como segue: $r_f = \frac{\text{Côv}_f(\mathbf{X}, \mathbf{Y})}{\sqrt{\hat{S}_f^2(\mathbf{X}) \cdot \hat{S}_f^2(\mathbf{Y})}}$. A hipótese de nulidade, coeficiente de

correlação fenotípica igual a zero ($H_0: r_f = 0$) foi testada pela estatística t, dada por:

$$t = \frac{r_f}{\sqrt{1 - r_f^2}} \sqrt{n - 2}, \text{ associada a } n - 2 \text{ graus de liberdade, em nível de significância de}$$

5% (CRUZ 1997)

A análise de variância, e estimação dos parâmetros genéticos e de correlação foram obtidas com o auxílio do programa GENES (CRUZ 1997).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise de variância e estimativas de parâmetros

Nas Figuras 1A e 1B estão apresentadas as distribuições do número de cistos de cada raça do NCS. A distribuição dos dados fenotípicos indica que a resposta comportou-se como uma característica quantitativa, mostrando uma distribuição contínua, como reportada por vários pesquisadores (MANSUR 1993, CONCIBIDO 1994, WEBB 1995, YUE 2001).

A média do número de cistos nos genitores, assim como a média, valores mínimos, máximos e variância fenotípica da população de RIL são indicadas no Quadro 2. A média da população mostrou-se mais próxima à média do genitor suscetível Y23 para ambas as raças. Foi observada segregação transgressiva para valores fenotípicos altos nas duas raças do NCS, mas não valores baixos (dados não mostrados).

A normalidade dos dados foi rejeitada para as duas raças segundo o teste de Shapiro-Wilk, $W=0,9428$, $P=0,0000$ para a raça 3, e $W=0,8269$, $P=0,0000$ para a raça 9. A transformação $\sqrt{x + 0,5}$ como sugerida por MANSUR (1993) foi utilizada para a normalização dos dados, porém não foi eficiente e a análise de variância foi realizada com os dados como originalmente coletados.

Quadro 2 – Número médio de cisto nos genitores, média, amplitude e variância fenotípica da população.

Raças do NCS	Hartwig	Y23	População de RIL			
	Média	Média	Média	Minímo	Máximo	Variância
Raça 3	4,60	39,33	39,33	0,00	278,5	4511,73
Raça 9	8,40	59,25	32,89	0,00	163,5	1034,71

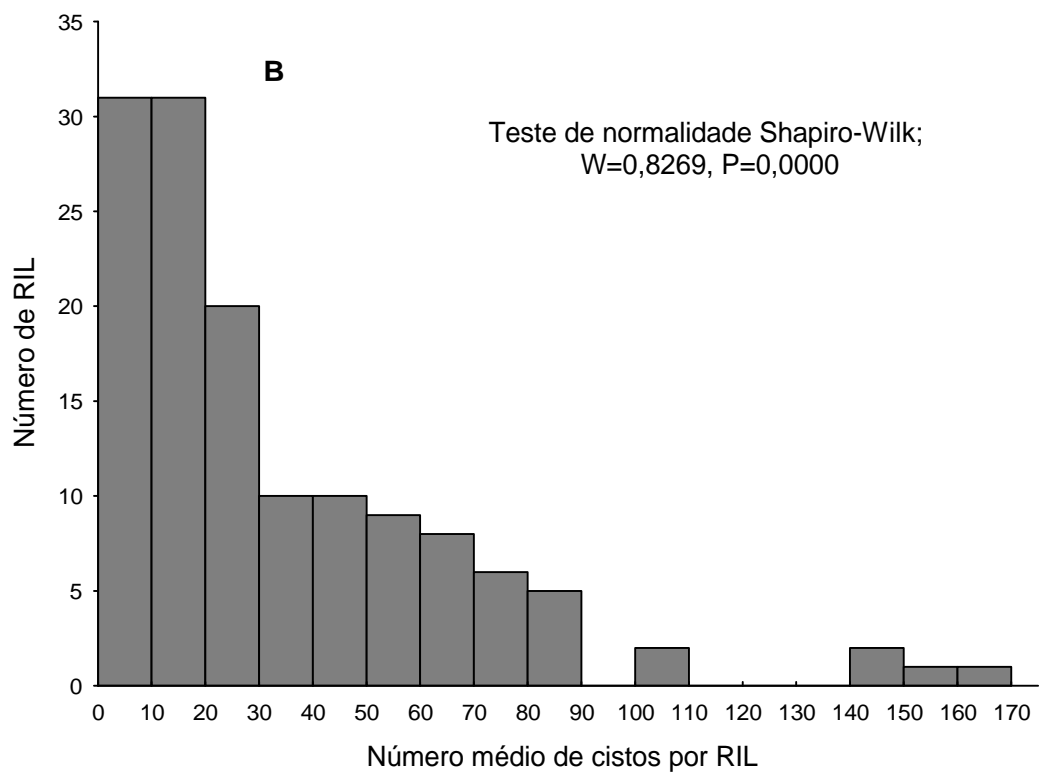
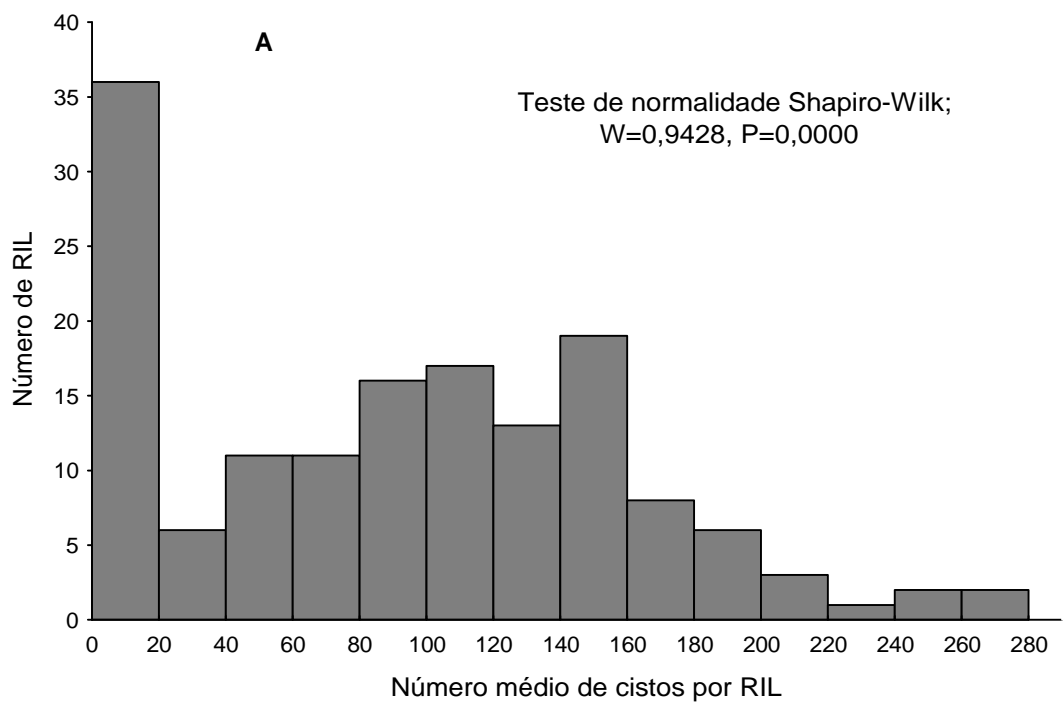


Figura 1 - Distribuição dos valores fenotípicos (número médio de cistos por RIL) obtidos para a raça 3 (A) e 9 (B).

A distribuição normal dos dados é esperada apenas quando muitos genes de efeitos menores fazem parte da base genética do caráter. Mas a resistência ao NCS depende de poucos genes, como informados por diferentes autores (CALDWELL 1960, MATSON 1965, HANCOCK 1975, MANSUR 1993). Portanto, a falta de normalidade dos dados observada no presente trabalho, e como informado por outros pesquisadores (MANSUR 1993; WEBB 1995; YUE 2001), se deve aos poucos genes de resistência para o NCS que estão segregando na população.

Os resultados da análise de variância das duas raças do NCS, seus quadrados médios e estimativas dos diferentes parâmetros genéticos estão apresentados no Quadro 3. O teste F a 5% de probabilidade indicou a existência de significativa variação genética entre as RILs para as duas raças (P = 0,0000).

Quadro 3 - Quadrado médio de genótipos (QMG) e do erro (QME), estimativa da variância genética (\hat{s}_g^2), fenotípica (\hat{s}_f^2) e ambiental média (\hat{s}_e^2), herdabilidade no sentido amplo h_a^2 (%), coeficientes de variação experimental (CVe) e genético (CVg), e média do número de cistos da população para ambas as raças.

Estimativas	Raça 3	Raça 9
QMG	25878,20	5576,40
QME	4923,19	1093,37
Valor F	5,2564	5,1002
\hat{s}_g^2	3492,50	744,67
\hat{s}_f^2	4313,03	926,29
\hat{s}_e^2	820,53	181,61
h_a^2 (%)	80,97	80,39
CVe	81,78	106,36
CVg	68,24	87,78
Média	39,33	32,89

*** F significativo a 0,1% de probabilidade

Altas herdabilidades no sentido amplo foram estimadas por MANSUR (1993) para a raça 3 usando análise de médias em três cruzamentos envolvendo os genótipos resistentes A20, Jack e Cordell. WEBB (1995) relatou herdabilidade no sentido amplo para a raça 3 de 97% usando como fonte de resistência a PI 437654. HANCOCK (1987) estimou herdabilidades restritas de 64%, 61% e 61% para a “raça X”, regredindo médias F_3 - F_2 , para os cruzamentos PI 90763 x PI 887888, PI 90763 x R74-1001 e PI 90763 x PI 209332, respectivamente. O método de regressão de

médias F_3-F_2 também foi usado por SCHUSTER (2001) que relataram herdabilidade no sentido restrito de 15,59% para a raça 14 no cruzamento Hartwig x BR-92-31983. Altas herdabilidades restritas foram estimadas por YUE (2001), tendo como genitor resistente a PI 438489B. Usando famílias F_2-F_3 esses autores relataram herdabilidades de 55% para a raça 1, 68% para a raça 2, 59% para a raça 3, 88% para a raça 5 e 73% para a raça 14.

No presente trabalho a variação entre as RILs foi altamente determinada por causas genéticas em nível de médias para ambas as raças. Para a raça 3 a herdabilidade no sentido amplo foi estimada em 80,97% e para a raça 9 em 80,39% (Quadro 3). Embora as estimativas das herdabilidades dependam do material genético usado e do método de estimação utilizado (FALCONER 1981), existe uma boa concordância entre as herdabilidade informadas na literatura com as obtidas no presente trabalho. As altas herdabilidades encontradas indicam que poucos genes de efeito maior estão segregando na população, e que a seleção fenotípica para resistência seria alta para estas duas raças do NCS.

Os coeficientes de variação ambiental (C_{Ve}), os quais permitem avaliar a variabilidade dos dados dentro de cada tratamento, foram estimados em 81,78% e de 106,36%, para as raça 3 e 9 respectivamente. Esses valores são muito superiores aos desejados em programas de melhoramento genético, porém podem ser considerados próprios de características que sofrem alta influência ambiental como a resposta ao NCS.

Com base em 114 RIL avaliadas para respostas a ambas as raças foi estimado o coeficiente de correlação fenotípica de 0,17, significativo pelo teste *t* a 1% de significância. Este coeficiente indica que os componentes genéticos associados à resistência para uma e outra raça do NCS são herdados de forma conjunta.

BIBLIOGRAFIA

- BRIM, C.A. 1966. A modified pedigree method of selection in soybeans. **Crop Science**, 6: 220.
- CALDWELL, B.E., BRIM, C.A., ROSS, J.P. Inheritance of resistance to soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*. **Agron. J.**, v.52, n.6, p.635-636, 1960.
- CONCIBIDO, V.C., DENNY, R.L., BOUTIN, S.R., HAUTEA, R., ORF, J.H. & N.D., YOUNG. 1994. DNA marker analysis of loci underlying resistance to soybean cyst nematode (*Heterodera glycines* Ichinohe). **Crop Sci.**, 34:240-246.
- CRUZ, C.D. **Programa Genes: aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: UFV, 1997. 442p.
- DIAS, W.P.; SILVA, J.F.V.; KIHL, R.A.S., HIROMOTO, D.M. & R.V., ABDELNOOR. 1998. Quebra da resistência da cv. Hartwig por populações de campo do nematóide de cisto d soja. **Pesq. Agrp. Bras.**, 33: 971-974.
- DIAS, W.P.; SILVA, J.F.V. & J.E., PEREIRA. 1997. Monitoramento de raças de *Heterodera glycines* no Brasil (safra 1997/98). In: **Reunião de pesquisa de soja da região central do Brasil**, 1998. Londrina. Ata e Resumos. Londrina: EMBRAPA-CNPSo. p. 241.
- FAGHIHI, J., FERRIS, J.M. & V.R., FERRIS. 1986a. *Heterodra glycines* in Indiana. I. Reproduction of geographic isolates on soybean differentials. **J. Nematology**, 18:169-172.
- FAGHIHI, J., FERRIS, J.M. & V.R., FERRIS. 1986b. *Heterodra glycines* in Indiana. II. Morphology of geographic isolates. **J. Nematology**, 18:173-177.
- FALCONER, D.S. 1981. **Introdução à genética quantitativa**. New York: Longam. 279 p.
- HANCOCK, J.A., HANCOCK, F.G., CAVINESS, C.E. & R.D., RIGGS. 1987. Genetics of resistance in soybean to race X of soybean cyst nematode. **Crop Sci.**, v.27, n.1, p.704-707.
- LIMA, R.D., FERRAZ, S. & J.M., SANTOS. 1992. Ocorrência de *Heterodera* sp. em soja no Triângulo Mineiro. **Nematologia Brasileira**, 16:101-102.
- LORDELLO, A.I.L., LORDELLO, R.R.A. & J.A., QUAGGIO. 1992. Ocorrência do nematóide de cisto da soja (*Heterodera glycines*) no Brasil. **Revista de Agricultura**, 67:223-225.
- MANSUR, L.M., CARRIQUIRY, A.L. & A.P., RAO-ARELLI. 1993. Generation mean analysis of resistance to race 3 of soybean cyst nematode. **Crop Sci.**, 33:1249-1253.

- MATSON, A.L. & L.F., WILLIAMS. 1965. Evidence of four genes for resistance to the soybean cyst nematode. **Crop Sci.**, 22:588-590.
- MENDES, M.L. & D.W., DICKSON. 1993. Detections of *Heterodera glycines* in Brazil. **Plant Dis.**, 77:499-500.
- MONTEIRO, W.F. & S.R.A.C MORAIS. 1992. Ocorrência do nematóide de cisto da soja, *Heterodera glycines*, Ichinohe, 1952, prejudicando a cultur da soja no Mato Grosso do Sul. In: **Congresso Brasileiro de Nematologia**, 16, Lavras.
- NOEL, G.R., MENDES, M.L. & C.C., MACHADO. 1994. Distribution of *Heterodera glycines* races in Brazil. **Nematrópica**, 24:63-68.
- RAMALHO, M.A.P., SANTOS, J.B., ZIMMERMANN, M.J.O. **Genética quantitativa em plantas autógamas; aplicações ao melhoramento do feijoeiro**. Goiânia, GO: UFG, 1993. 271p.
- RAO-ARELLI, A.P., ANAND, S.C. & J.A., WRATHER. 1992. Soybean resistance to soybean cyst nematode race 3 is conditioned by an additional dominant gene. **Crop Sci.**, 32:862-864.
- ROSS, J. & C.A., BRIM. 1957. Resistance of soybean o the soybean-cyst nematode as determined by a double-row method. **Plant Dis. Rep.**, 41:923-924.
- SCHUSTER, I., ABDENoor, R.V., MARIN, S.R.R., CARVALHO, V.P., KIIHL, R.A.S., SILVA, J.F.V., SEDIYAMA, C.S., BARROS, E.G. & M.A., MOREIRA. 2001. Identification of a new QTL associated with resistance to soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*). **Theor. Appl. Genet.**, 102:91-96.
- THOMAS, J.D., CAVINES, C. E., RIGGS, R.D. & E.E., HARTWIG. 1975. Inheritance of reaction to race 4 of soybean cyst nematode. **Crop Sci.**, 15:208-210.
- WAIN, A.L. & J.F.V., SILVA. 1997. Levantamento da ocorrência de raças de *Heterodera glycines* no Brasil. In: **Congresso Brasileiro de Nematologia XX**, Gramado, RS. Resumos. p.58.
- WEBB, D.M., BALTAZAR, B.M., RAO-ARELLI, A.P., SCHUPP, J., CLAYTON, K., KEIM, P. & W.D., BEAVIS. 1995. Genetics mapping of soybean cyst nematode race-3 resistance loci in the soybean PI 437.654. **Theor. Appl. Genet.**, 91:574-581.
- YUE, P., ARELLI, P.R. & D.A. SLEPER. 2001a. Molecular characterization of resistance to *Heterodera glycines* in soybean PI 438489B. **Theor. Appl. Genet.**, 102:921-928.

CAPÍTULO 2

MARCADORES MICROSSATÉLITES LIGADOS A UM LOCO DE RESISTÊNCIA ÀS RAÇAS 3 E 9 DE *Heterodera glycines* EM SOJA

RESUMO

Heterodera glycines Ichinohe (Nematóide de Cisto da Soja - NCS) tem-se convertido em uma das doenças mais prejudiciais para a cultura da soja [*Glicine max* (L) Merrill], promovendo grandes perdas por safra. O método de controle mais eficaz e econômico é a utilização de variedades resistentes incluídas na rotação de culturas. O desenvolvimento dessas variedades, através da seleção clássica, é extremamente complicado e demorado. A tecnologia dos marcadores moleculares, principalmente aqueles com base na técnica de reação em cadeia da polimerase (*Polimerase Chain Reaction* –PCR), tem sido muito útil tanto no mapeamento dos locos de resistência, assim como ferramenta de auxílio na seleção de genótipos desejáveis. Este trabalho foi conduzido com o objetivo de identificar marcadores microsatélites (*Simple Sequence Repeat* –SSR) ligados a regiões genômicas associadas à resistência às raças 3 e 9 do NCS. A resposta às raças do NCS e a identificação de SSRs foi avaliada em uma população de linhagens endogâmicas recombinantes (*Recombinant Inbred Lines* – RIL) derivada do cruzamento entre Hartwig (genitor resistente) e Y23 (genitor suscetível). Quarenta iniciadores polimórficos de microsatélites foram amplificados na população gerando três grupos de ligação. A técnica de regressão linear simples mostrou que 6 e 2 marcadores estavam associados à resposta das raças 3 e 9 do NCS, respectivamente. Porém, quando analisados em conjunto, utilizando a regressão múltipla, apenas o marcador Satt038 permaneceu no modelo explicando 25,38% ($P > F = 0,0001$) e 12,60% ($P > F = 0,0001$) da variância fenotípica das respectivas raças.

INTRODUÇÃO

As doenças são os fatores limitantes mais sérios da produção de soja no mundo. Em 1994, as perdas mundiais devido às doenças foram estimadas em 14,99 milhões de toneladas, correspondentes a U\$3,31 bilhões, sendo *Heterodera glycines* Ichinohe (Nematóide de Cisto da Soja - NCS) a principal causa destes prejuízos (WRATHER 1997). O NCS foi relatado pela primeira vez no Brasil na safra 1991/1992 (LORDELLO 1992; LIMA 1992; MONTEIRO 1992). Na atualidade, infecta cerca de 2 milhões de hectares, tornando-se um dos parasitas mais prejudiciais para a produção de soja no País. O uso de cultivares resistentes, incluídos na rotação de culturas, é a forma mais efetiva de controle do NCS. Embora anatureza oligogênica da resistência (FAGHIHI 1986a, 1986b) facilita a seleção fenotípica para obtenção de variedades resistentes, devido à grande variabilidade genética do NCS (NIBLACK 1992), essa forma de seleção é extremamente complicado devido a que os resultados de testes subseqüentes para resistência a uma mesma raça não são reproduzíveis.

Os estudos de genética clássica têm sido muito úteis na identificação de fontes de resistência, porém, o número de genes e tipo de ação gênica predominante na resistência permanecem pouco conhecidos até o momento. Considerando o modelo genético qualitativo, genes recessivos e dominantes têm sido amplamente relatados (CALDWELL 1960; MATSON 1965; RAO-ARELLI 1988; RAO-ARELLI 1988; RAO-ARELLI 1994).

A tecnologia dos marcadores moleculares de DNA vem sendo usada freqüentemente nas pesquisas para elucidar a base genética da resistência ao NCS. No genoma da soja, duas regiões foram estabelecidas como responsáveis pela resistência ao NCS. Uma localizada no grupo de ligação (GL) A2 (WEISEMANN 1992), e outra no GL G (BOUTIN 1992 e CONCIBIDO 1994). Esta última explica até 50% da variação na resistência nas PIs 209332, 90763, 88788 e em Peking.

Além da utilidade que os marcadores moleculares apresentam para identificação e mapeamento de QTLs, em face do fenótipo não ser afetado pelo ambiente, esses marcadores são extremamente úteis na seleção de genótipos desejáveis, eliminando os efeitos de interação genótipo x ambiente durante a seleção fenotípica (TANKSLEY 1989).

A seleção auxiliada por marcadores moleculares (SAM) pode acelerar os programas de melhoramento, devido a sua alta eficiência de seleção e por diminuir o intervalo de tempo entre gerações (YOUNG 1989). A seleção indireta pode, ainda, permitir a seleção positiva ou negativa dependendo se o marcador estiver ligado em acoplamento ou repulsão ao QTL associado à característica (TANKSLEY 1989).

Este trabalho teve como objetivo identificar gene(s) de resistência às raças 3 e 9 do NCS, com o uso de marcadores SSR, usando uma população de linhagens endogâmicas recombinantes (*Recombinant Inbred Lines* - RIL), derivada do cruzamento Hartwig (genitor resistente) x Y23 (genitor suscetível).

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

A população de linhagens endogâmicas recombinantes (*Recombinant Inbred Lines – RIL*) (geração F_{4:6}) foi obtida do cruzamento entre Hartwig (genitor resistente) x Y23 (genitor suscetível). Plantas F₂ derivadas de 5 plantas F₁ foram conduzidas pelo método do descendente de uma única semente, (*Single Seed Descent - SSD*), em casa de vegetação, conforme sugerido por BRIM (1966), sem ter sido praticado seleção durante a sua obtenção.

Inoculação e Avaliação do NCS

A resposta à raça 3 e 9 foi avaliada em 154 e 140 RILs, respectivamente. As linhagens, seus genitores (Hartwig e Y23), os hospedeiros diferenciadores (Peking, Pickett, PI 90763 e PI 88788) e a testemunha suscetível (Lee) foram incluídos nos ensaios. Os inóculos das raças foram mantidos em vasos de argila com capacidade para 5 litros, em casa de vegetação, com temperatura de 25-30°C. O cultivar Embrapa-20, suscetível, foi utilizado para multiplicar os inóculos e instalar os ensaios. Sementes da população de mapeamento, dos hospedeiros resistentes diferenciadores (Pickett, Peking, PI 90753 e PI 88788), do padrão suscetível Lee e dos genitores foram germinadas em areia. Quando as plântulas atingiram 2 a 3 dias de idade foram transplantadas para vasos de argila com capacidade de 0,5 litro (uma planta por vaso), contendo mistura de solo e areia, na proporção 1:2. Simultaneamente ao transplântio, 6 plantas de cada RIL, hospedeiros diferenciadores, genitores e do padrão suscetível Lee, foram inoculadas com 4000 ovos. As plantas foram mantidas em casa de vegetação (25-30°C) por 30 dias, quando se realizou a avaliação. Para a avaliação, o sistema radicular de cada planta foi retirado do vaso e lavado sob jato de água em peneira com malha de 20 mesh, acoplada sobre outra de 60 mesh. Os cistos foram contados sob lupa estereoscópica e a raça do NCS foi confirmada conforme o esquema de RIGGS (1988).

Para a seleção de RILs resistentes, a resposta de cada RIL foi avaliada transformando a média de cistos desenvolvidos nas 6 plantas de cada família, em Índice de Parasitismo (IP) estimado como segue:

IP (%)= Média de cistos e fêmeas desenvolvidos sobre cada RIL / (Média de cisto e fêmeas desenvolvidos sobre o genitor suscetível Y23) x 100.

Extração do DNA e análise dos marcadores moleculares

A extração de DNA de folhas de soja foi feita com base no protocolo descrito por KEIM (1988), com algumas modificações. Entre 200 a 300 mg de folhas foram trituradas na presença de N₂ líquido, sendo o pó resultante transferido para microtubos. Após a adição de 650-800 µL de tampão de extração, constituído de Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; EDTA 50 mM, pH 8,0; NaCl 0,7 M; CTAB 1% (p/v); PVP 2% (p/v); e β-mercaptoetanol 1% (v/v), sendo este último separado dos demais componentes, as amostras foram incubadas em banho-maria a 65°C, durante 20 a 40 minutos.

Após a incubação, as proteínas foram removidas pela extração com um volume de clorofórmio:álcool-isoamílico (24:1) e centrifugação a 14.000 RPM em uma centrífuga Eppendorf®, modelo 5415 C. Os ácidos nucleicos foram precipitados da fase aquosa pela adição de 2/3 do volume obtido, com isopropanol gelado, lavados em etanol 90% gelado por 20 minutos, secos ao ambiente e ressuspensos em TE, pH 8,0 (Tris-HCl 10 mM e EDTA 1mM), seguindo-se um tratamento com RNAase A, na concentração final de 40 µg/mL a 37°C, por 30 minutos. O DNA foi recuperado por precipitação, mediante a adição de um volume de etanol 95%, seguido de centrifugação a 14.000 RPM em uma centrífuga Eppendorf®, modelo 5415 C, por 15 minutos. Após a lavagem do precipitado com etanol 90% gelado e seco ao ambiente, o DNA foi ressuspense em 200-300 µL de TE.

A concentração do DNA foi estimada espectrofotometricamente por leitura da absorvância a 260 nm, sendo cada unidade de absorvância correspondente a 50 µg/mL de DNA fita dupla.

A coleção de iniciadores de SSR para soja ("Research Genetics", Huntsville, AL, EUA), no total de 600 pares, foi testada nos genitores Hartwig e Y23. Quarenta iniciadores claramente polimórficos foram amplificados em cada planta da população de mapeamento. As amplificações foram realizadas em 25 µL, contendo Tris-HCl 10 mM, pH 8,3; KCl 50 mM; MgCl₂ 2,4 mM; 100µM de cada um dos desoxinucleotídios (dATP, dTTP, dCTP, dGTP); 0,6 µM de cada iniciador, uma unidade de *Taq* polimerase e 30 ng de DNA. As reações de amplificação ocorreram em um termociclador Perkin Elmer® modelo 9600 programado para 30 ciclos de um minuto a 94°C, um minuto a 50°C e 2 minutos a 72°C, seguidos de uma etapa de sete minutos a 72°C.

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

Análise de Ligação e Mapeamento de QTLs.

Para identificar marcadores ligados ao QTL de resistência, a co-segregação entre os marcadores amplificados na população e o fenótipo de cada RIL (número médio de cistos por RIL) foi analisado estatisticamente através da regressão linear simples e múltipla, utilizando o método *stepwise* para seleção do modelo, com auxílio do programa JMP, versão 3.1.6.2 (SAS 1990). Na análise de regressão múltipla *stepwise* o nível de significância usado foi de 5% para entrada e saída das variáveis independentes. As distâncias genéticas entre os marcadores foram estabelecidas usando o programa GQMol (desenvolvido pelo DBG/BIOAGRO/UFV) com LOD score mínimo de 3, porcentagem de recombinação máxima de 50% e a função de mapeamento de KOSAMBI (1944). A segregação individual dos marcadores moleculares foi testada usando o teste do qui-quadrado.

A posição do putativo QTL foi inferida quando os valores da razão da máxima verossimilhança (*Likelihood Ratio* – LR), determinada pela realização de 1000 permutações (CHURCHILL 1994), excederam os valores críticos de corte ($\alpha = 0,05$) para as raças 3 e 9. O mapeamento dos QTLs aplicando o método de mapeamento por intervalo simples (LANDER 1989), as estimativas dos valores aditivos, e o coeficiente de determinação do QTL, correspondente ao pico de maior significância estatística do QTL, foram obtidos usando o software QTL Cartographer (BASTEN 1999).

A variância fenotípica foi estimada considerando a média de cistos de cada RIL. A frequência do marcador mais próximo ao QTL foi utilizada para estimar a variância aditiva (FALCONER 1981). A herdabilidade no sentido restrito de cada QTL foi obtida dividindo a variância aditiva pela variância fenotípica.

Neste trabalho, para seleção de plantas resistentes, foi usado o critério de resistência moderada proposto por SCHMITT (1992), segundo o qual são consideradas resistentes aquelas plantas com IP $\geq 30\%$.

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

ES = N° de famílias selecionadas corretamente como resistentes com base nos marcadores / (N° total de famílias selecionadas com base nos marcadores + N° de famílias resistentes sem o alelo marcador) x 100.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dados fenotípicos

Nas Figuras 1A e 1B estão apresentadas as distribuições do valor médio de cistos desenvolvidos em cada RIL. A normalidade dos dados foi rejeitada para as duas raças segundo o teste de Shapiro-Wilk ($W=0,9428$, $P=0,0000$) para a raça 3 e ($W=0,8269$, $P=0,0000$) para a raça 9. A distribuição dos dados indica tratar-se de uma característica quantitativa, mostrando uma distribuição contínua, como reportada por vários pesquisadores (MANSUR 1993; CONCIBIDO 1994; WEBB 1995; YUE 2001a). A distribuição dos valores fenotípicos indica que nas duas raças houve segregação transgressiva para valores fenotípicos altos (dados não mostrados).

A distinção entre RIL suscetível e resistente foi bastante clara. Com a finalidade de ampliar o banco de germoplasma, usando o critério de resistência moderada (SCHMITT 1992) foram selecionadas 39 e 63 RILs resistentes para a raça 3 e 9, respectivamente.

A média de cistos dos genitores, assim como os valores mínimos, máximos e variância fenotípica da população são indicadas no Quadro 1. A média fenotípica da população mostrou-se mais próxima ao valor do progenitor suscetível Y23.

Quadro 1 – Número médio de cisto nos genitores, média, amplitude e variância fenotípica da população.

Raças do NCS	Hartwig	Y23	População de RIL			
	Média	Média	Média	Minímo	Máximo	Variância
Raça 3	4,60	39,33	39,33	0,00	278,5	4511,73
Raça 9	8,40	59,25	32,89	0,00	163,5	1034,71

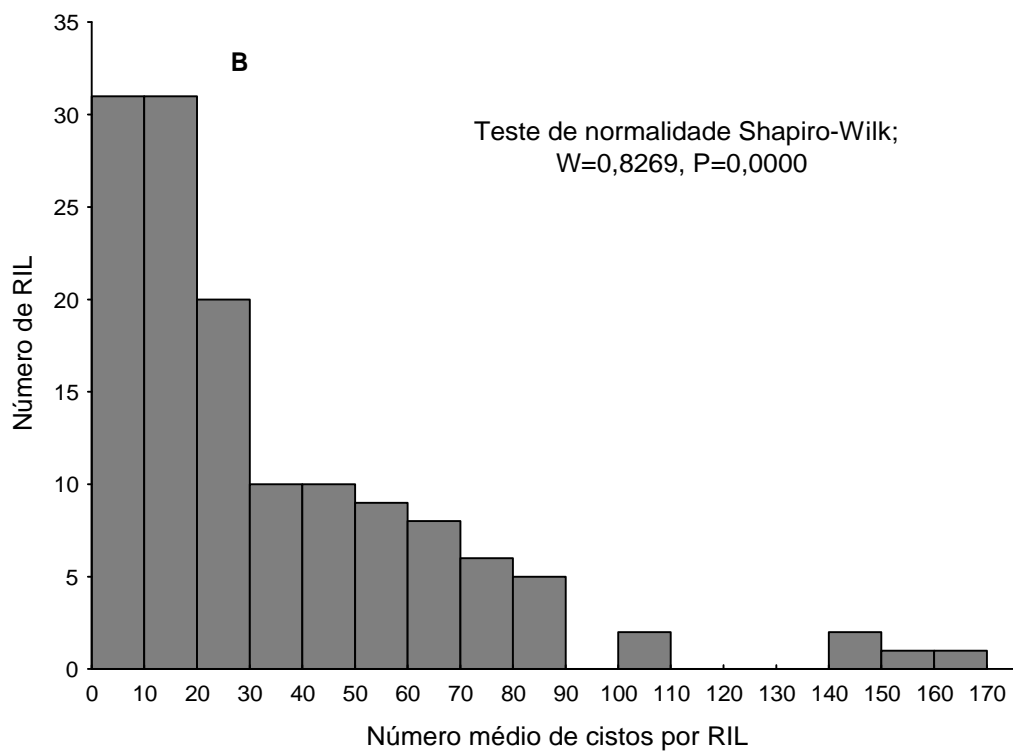
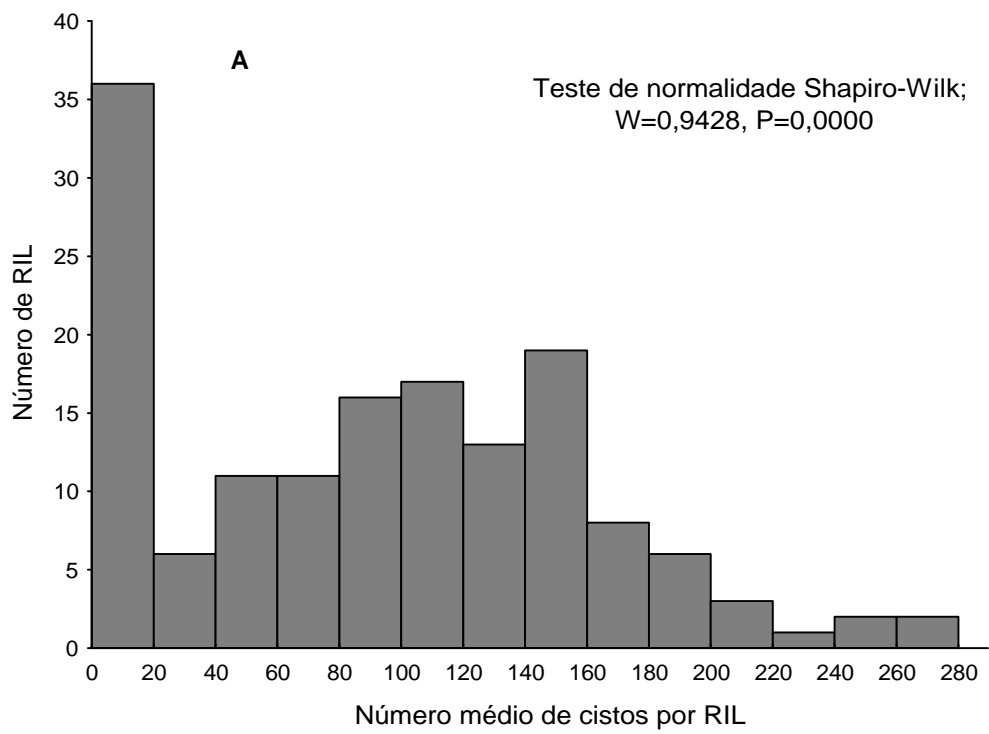


Figura 1 - Distribuição dos valores fenotípicos (número médio de cistos por RIL) obtidos para a raça 3 (**A**) e 9 (**B**).

Associação dos marcadores moleculares com a resistência ao NCS

Da coleção de 600 iniciadores SSR para soja, 170 foram identificados como polimórficos (28,33%), quando testada nos genitores. Esta alta porcentagem reflete a diferença genética entre Hartwig e Y23. Este resultado é esperado, uma vez que os genitores não são aparentados. Do total dos iniciadores polimórficos, 40 SSR foram amplificados na população. Entretanto, 8 marcadores foram descartados por não respeitar a segregação esperada de 1:1 para uma população de RIL. Sendo que em 4 deles o alelo de Hartwig foi fixado na população (Satt191, Satt 294, Satt359 e Satt552), e 3 fixaram o alelo de Y23 (Satt514, Satt532 e Satt579). Este tipo de segregação também foi observado por YAMANAKA (2001). A causa genética de tal fato é desconhecida, mas deve-se descartar a seleção, pois esta não foi praticada durante o processo de obtenção da população.

Com auxílio do aplicativo computacional GQMol (programa desenvolvido pelo DBG/BIOAGRO/UFV) 3 grupos de ligação (GL) foram formados (Quadro 2). No presente trabalho os GL foram denominados conforme a nomenclatura da Universidade Estadual de Iowa (CREGAN 1999a). O primeiro GL corresponde a um intervalo genético definido pelos SSRs Satt173 e Satt550. Este último marcador não foi mapeado por CREGAN (1999a), mas aparece posicionado a 1,0 cM do SSR Satt173 no mapa obtido por ORF (1999). Portanto, este corresponderia ao GL O. O segundo GL, definido pelos marcadores Satt163, Satt038 e Satt275, todos eles correspondem ao GL G. O terceiro GL, e um intervalo genético entre os SSRs Satt250 e Satt551, mapeados no GL M.

A análise da associação entre os marcadores e a resposta às raças do NCS foi realizada pela regressão simples (r^2) e múltipla (R^2), com o auxílio do programa JMP, versão 3.1.6.2 (SAS 1990). A análise de regressão simples indicou que 6 e 2 marcadores estão associados à resistência às raças 3 e 9 do NCS (Quadro 3). Na avaliação conjunta dos marcadores associados à resistência de ambas as raças, utilizando-se o procedimento de regressão múltipla *stepwise*, em nível de 5% de significância, apenas o marcador Satt038 permaneceu no modelo, sendo os demais eliminados pelo teste F. O marcador Satt038 explicou 25,38% ($P>F=0,0001$) e 12,60% ($P>F=0,0001$) da resistência em Hartwig, para a raça 3 e 9, respectivamente (Quadro 3). Considerando que o Satt038 foi posicionado no meio do GL G, esses resultados indicariam que este marcador encontra-se muito próximo da região de

máxima significância estatística, sendo por isto, responsável pela totalidade da variação fenotípica explicada em ambas as raças.

Quadro 2 – Distância genética entre os marcadores que formaram os três grupos de ligação (GL) na população de mapeamento

GL O ^a	cM ^b	LOD ^c	GL G ^a	cM ^b	LOD ^c	GL M ^a	cM ^b	LOD ^c
Satt550	6,73	21,28	Satt275	9,70	12,05	Satt250	13,84	9,69
Satt173	----	----	Satt038	16,70	8,67	Satt551	----	----
			Satt163	----	----			

^aGrupo de ligação denominado segundo Universidade Estadual de Iowa (GREGAN 1999a), ^btamanho do intervalo genético estimado com o programa QMol expresso em centiMorgan (cM), e ^cLOD score da distância entre os marcadores

A estratégia de mapeamento por intervalo simples (LANDER 1989) e o teste de permutação (CHURCHILL 1994) foram utilizados para mapear o loco de reposta às raças do NCS. Uma região genômica altamente significativa para as duas raças foi detectada no GL G (Figura 2 A e 2 B). Esta região apresentou um pico de maior significância estatística a 4,0 e 0,05 cM do Satt038, para as raças 3 e 9 respectivamente.

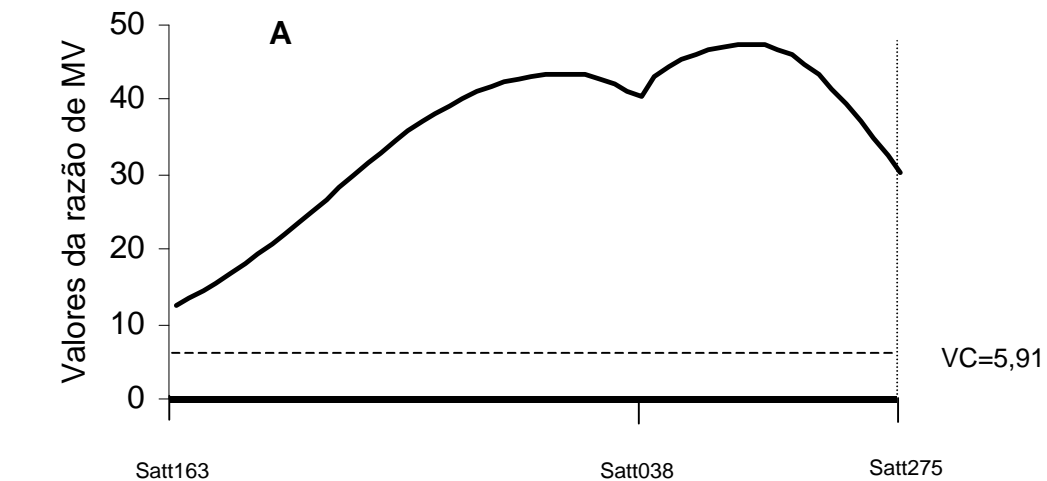
A região do GL G identificada neste estudo é uma das mais amplamente associadas à resistência a várias raças do NCS. O primeiro relato corresponde a CONCIBIDO (1994). Posteriormente, usando marcadores RFLP (WEBB 1995, CONCIBIDO 1996, CONCIBIDO 1997) e SSRs (MUDGE 1997, CREGAN 1999b, CERVIGNI 1999) têm sido confirmado que este loco corresponde ao gene *rhg1* relatado inicialmente por CALDWELL (1960), juntamente com os genes *rhg2* e *rhg3*. No presente estudo, o SSR Satt038 ligado ao gene *rhg1*, explicou 25,38% da variação da resistência à raça 3 em Hartwig (Quadro 3). Altos valores de coeficiente de determinação, com base em marcadores moleculares ligados ao gene *rhg1*, entre 26,2% a 50,9% já foram relatados (WEBB 1995, CONCIBIDO 1994, CONCIBIDO 1997, MUDGE 1997, CERVIGNI, 1999). Embora tenha sido detectado que outros GL também estão associados à resistência à raça 3, como GL A2 (WEISEMANN 1992 e MAHALINGAM 1995), GL J (CONCIBIDO 1997), GL B2, D1a e A2 (YUE 2001a) e GL E (YUE 2001b), para nenhum deles foi informada a frequência e a importância relativa para a resistência. Assim, o *rhg1* parece ser o principal gene de

resistência à raça 3 do NCS. Neste trabalho não foram amplificados SSR correspondente aos diferentes GL mencionados acima, portanto, alguns desses locos poderiam estar segregando na população e não foram detectados.

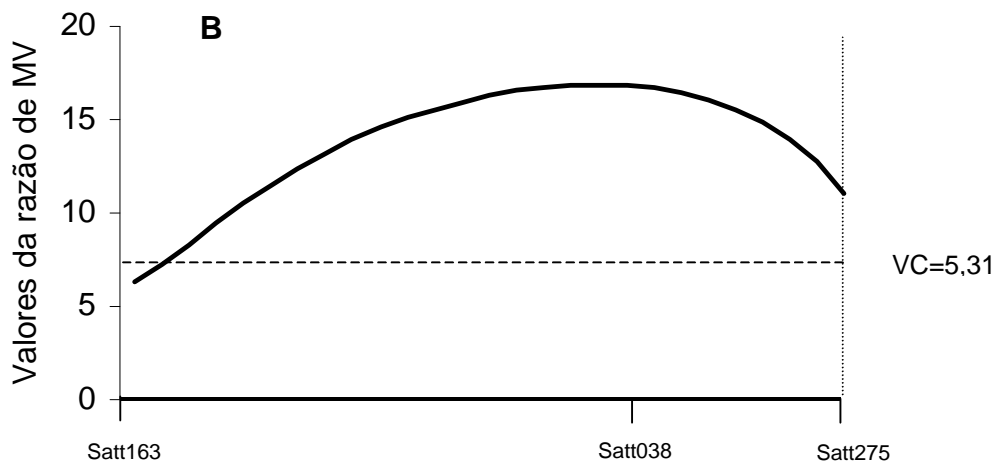
Quadro 3 - Identificação de marcadores ligados ao loco de resistência às raças 3 e 9 do NCS, usando a regressão simples e múltipla

Raça 3				
Marcador	r^2 ^a	P ^c	R ² ^b	P ^c
Satt275	22,72	0,0001	* ^d	
Satt038	25,38	0,0001	25,38	0,0001
Satt163	8,05	0,0004	*	
Satt235	3,28	0,0232	*	
Satt564	4,61	0,0117	*	
Satt316	4,10	0,0351	*	
Raça 9				
Satt038	10,50	0,0002	12,60	0,0001
Satt163	4,04	0,0130	*	

^aCoefficiente de regressão simples, ^bCoefficiente de regressão múltipla, ^cValor crítico informativo e ^dMarcadores eliminados do modelo de regressão múltipla.



A



B

Figura 2 - Identificação de um QTL de resistência às raças 3 (**A**) e 9 (**B**) do NCS no grupo de ligação G (GL G) em uma população de RILs derivada do cruzamento Hartwig x Y23. Testes de hipótese para o modelo aditivo foram realizados a cada 0,5 centiMorgam, usando o programa Cartographer e o método de mapeamento de intervalo simples. O valor da razão da máxima verossimilhança (MV) para cada teste foi considerado significativo quando superior ao valor crítico de corte (VC), obtidos para cada raça do NCS mediante a realização de 1.000 permutações.

Resistência a outras raças do NCS também foi associada ao gene *rhg1*. As repostas às raças 1 e 6 foi associada a esse gene por CONCIBIDO (1997), às raças 1, 2 e 5 (YUE 2001a) e às raças 1, 2, 5 e 14 (YUE 2001b). Entretanto, não existem relatos que associem a resistência a raça 9 com o gene *rhg1*. O único QTL de resistência para resistência à raça 9 foi relatado por SCHUSTER (1999). Utilizando famílias RC₃F₂, este autor identificou um QTL ligado a 4 marcadores RAPD (OPAA-11, POR-07, OPY-07 e OPAE-08) e dois SSR (Sat_001 e Satt-082), os quais formaram um GL equivalente ao GL D2 do mapa genético relatado por CREGAN (1999a). Os marcadores RAPD OPAA-11 e OPY-07 explicaram até 56% da resistência em Hartwig. No presente trabalho, o Satt038 ligado ao gene *rhg1* explicou 10,50% da variação fenotípica (Quadro 3), comprovando, mais uma vez, a importância deste gene para a resistência à maioria das raças do NCS.

Herdabilidade do gene de resistência

A herdabilidade de um caráter métrico expressa a proporção da variância total que é atribuída ao efeito médio dos genes (FALCONER 1981). Entretanto, JOHNSON (1955) ressaltam que nem sempre as herdabilidades estimadas são equivalentes, já que dependem do método estatístico utilizado e do tipo de população utilizada na pesquisa.

As herdabilidades restritas estimadas neste estudo, para o gene *rhg1*, foram 23,97% para a raça 3 e 6,00% para a raça 9 (Quadro 4). As herdabilidades obtidas podem ser comparadas com as relatadas por CERVIGNI (1999) e SCHUSTER (2001), devido ao fato de que foram usados os mesmos métodos de estimativas. CERVIGNI (1999) informou que a resistência à raça 3 do NCS, devido ao gene *rhg1*, teve uma herdabilidade restrita de 51,65% e SCHUSTER (2001) de 36,57% para um QTL de resistência à raça 14 do NCS. Como se vê, os valores obtidos no presente trabalho são, significativamente, menores que os reportados anteriormente. É bom salientar que as herdabilidades para QTLs ou genes de resistência, se estimam apenas com a finalidade de uma melhor caracterização da região genômica. Este tipo de informação normalmente não é de grande interesse na seleção assistida por marcadores. A informação relevante na seleção assistida por marcadores é o coeficiente de determinação dos marcadores que flanqueiam o QTL de resistência (Quadro 3), e a eficiência de seleção desses marcadores.

Quadro 4- Estimativa do efeito aditivo, variância aditiva, herdabilidade restrita e coeficiente de regressão múltipla do gene *rhg1* para as raças 3 e 9 do NCS

Raças NCS	a ^a	\hat{S}_g^2 ^b	\hat{S}_f^2 ^c	h_a^2 (%) ^d	R ² ^e
3	46,52	1082,55	4511,73	23,97	47,90
9	11,10	177,18	1034,71	6,00	12,00

^aEfeito aditivo; ^b Variância genética; ^cVariância fenotípica; ^dHerdabilidade no sentido amplo; ^eProporção da variância fenotípica explicada pelo pico de máxima significância estatística do *rhg1*.

Eficiência da Seleção dos Marcadores Identificados

A ES estimada usando um ou dois marcadores em homozigose para as raças 3 e 9 são apresentadas no Quadro 5. Selecionando apenas com base no marcador Satt038 foi obtida uma ES de 46,15% e 56,25%, com valores de IP de 88,00% e 36,90%, para as raças 3 e 9, respectivamente. Valores similares foram obtidos quando a seleção foi praticada combinando pares de marcadores. Para a raça 3 a combinação dos marcadores Satt038 mais Satt275 e Satt038 mais Satt163 a ES foi de 56,25% e 42,55%, ao passo que a média dos IP mantiveram-se altos, 63,55% e 83,82%, respectivamente. Para a raça 9, com a mesma combinação de SSR indicada acima, a ES foi 66,66% e 55,81% com valores IP de 29,63% e 33,20% (Quadro 5).

A ES obtida não é adequada para realizar seleção indireta, pois está abaixo da realmente útil e relatada por outros autores. CONCIBIDO (1996) reportaram uma ES de 83-90% usando marcadores RFLP, MUDGE (1997) de 98% usando um par de marcadores SSR. Assim como SCHUSTER (1999) e CERVIGNI (1999) relataram ES superiores a 90%. Os baixos valores de ES obtidos neste trabalho se deveriam, fundamentalmente, ao fato de que o gene *rhg1* não está flanqueado por marcadores devidamente próximos aos extremos do QTL, os quais se desconhecem. O marcador Satt038 não garante uma boa ES, mesmo estando tão cerca do pico de máxima significância estatística para as duas raças. Recombinações simples ou duplas entre os três marcadores do GL G podem ocorrer gerando plantas recombinantes que não carregam o QTL na íntegra e, conseqüentemente suscetíveis. Esta situação certamente mudará quando outros marcadores SSR da região do gene *rhg1*, forem amplificados nesta população. Desta forma, espera-se que o loco de resistência

seja flanqueado por marcadores mais próximos a seus extremos, fazendo com que as recombinações mencionadas ocorram em menor frequência, aumentando a ES para valores comparáveis aos relatados pelos pesquisadores acima mencionados.

Quadro 5– Eficiência de seleção para as raças 3 e 9 do NCS, considerando um ou dois marcadores em homozigose ligados ao gene *rhg1*

Raça 3			
Marcadores	Plantas resistentes	IP(%) ^b	Eficiência de seleção (%)
Satt 038	30 ^a	88,00	46,15
Satt038 + Satt275	22	63,55	56,65
Satt038 + Satt163	20	83,82	42,55
Raça 9			
Satt 038	36	36,90	56,25
Satt038 + Satt275	26	29,63	66,66
Satt038 + Satt163	24	33,20	55,81

^aNúmero de plantas resistentes do total selecionadas, ^bMédia do IP (%) das plantas selecionadas

BIBLIOGRAFIA

- BASTEN, C.J., WEIR, B.S. e ZENG, Z.B. 1999. **QTL cartographer, Version 1.13**. Department of Statistics, North Carolina State University: Raleigh, NC.
- BOUTIN, S., ANSARI, H., CONCIBIDO, V., DENNY, R., ORF, J., & N., YOUNG. 1992. RFLP analysis of cyst nematode resistance in soybean. **Soyban Genetics Newsletter**, 19:123-127.
- BRIM, C.A. 1966. A modified pedigree method of selection in soybeans. **Crop Science**, 6:220.
- CALDWELL, B.E., BRIM, C.A. & J.P., ROSS. 1960. Inheritance of resistance to soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*. **Agron. J.**, 52:635-636.
- CERVIGNI, G.D.L. **Mapeamento de genes de resistência à raça 3 do nematóide de cisto da soja (*Heterodera glycines* Ichinohe)**. 1999. 52p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- CHURCHILL, G.A. & R.W., DOERGE. 1994. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. **Genetics**, 138:963-971.
- CONCIBIDO, V.C., DENNY, R.L., BOUTIN, S.R., HAUTEA, R., ORF, J.H. & N.D., YOUNG. 1994. DNA marker analysis of loci underlying resistance to soybean cyst nematode (*Heterodera glycines* Ichinohe). **Crop Sci.**, 34:240-246.
- CONCIBIDO, V.C., DENNY, R.L., LANGE, D.A., ORF, J.H. & N.D., YOUNG. 1996. RFLP mapping and marker-assisted selection of soybean cyst nematode resistance in PI 209332. **Crop Sci.**, 36:1643-1650.
- CONCIBIDO, V.C., DOUGLAS, L., DENNY, R.L., ORF, J.H. & N.D., YOUNG. 1997. Genome mapping of soybean cyst nematode resistance genes in Peking, PI 90763, and PI 88788 using DNA markers. **Crop Sci.**, 37:258-264.
- CREGAN, P., JARVIK, T., BUSH, A.L., SHOEMAKER, R.C., LARK, K.G., KAHLER, A.L., VANTOAI, T.T., LOHNES, D.G., CHUNG, J. & J.E., SPECHT. 1999a. An integrated genetic linkage map of the soybean. **Crop Sci.**, 39:1464-1490.
- CREGAN, P., MUDGE, J., FICHUS, E.W., DANESH, DENNY, D. R. & N.D., YOUNG. 1999b. Two simple sequence repeat markers to select for soybean cyst nematode resistance conditioned by the *rhg1* locus. **Theor. Appl. Genet.**, 99:811-818.
- FAGHIHI, J., FERRIS, J.M. & V.R., FERRIS. 1986a. *Heterodera glycines* in Indiana. I. Reproduction of geographic isolates on soybean differentials. **J. Nematol.** 18:169-172.

- FAGHIHI, J., FERRIS, J.M. & V.R., FERRIS. 1986b. *Heterodra glycines* in Indiana. II. Morphology of geographic isolates. **J. Nematol.** 18:173-177.
- FALCONER, D.S. 1981. **Introdução à genética quantitativa**. New York: Longam. 279 p.
- GQMol**. Viçosa: 15.03.2003. (<http://www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm>).
- JOHNSON, H.W., ROBINSON, H.F. & R.E., COMSTOCK. 1955. Genotypic and phenotypic correlations in soybeans and their implications in selection. **Agron. J.**, 47:477-483.
- KEIM, P., OLSON, T.C. & R.C., PALMER. 1988. A rapid protocol for isolation soybean DNA. **Soybean Genet. Newslett.**, 15:150-152.
- KOSAMBI, D.D. 1944. The estimation of map distances from recombination values. **Annals of Eugenics**, 12:173:175.
- LANDER, E.S. & D., BOTSTEIN. 1989. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics**, 121:185-199.
- LIMA, R.D., FERRAZ, S. & J.M., SANTOS. 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. & J.A., QUAGGIO. 1992. Ocorrência do nematóide de cisto da soja (*Heterodera glycines*) no Brasil. **Revista de Agricultura**, 67:223-225.
- MANSUR, L.M., CARRIQUIRY, A.L. & A.P., RAO-ARELLI. 1993. Generation mean analysis of resistance to race 3 of soybean cyst neamtode. **Crop Sci.**, 33:1249-1253.
- MAHALINGAM, R. & H.T SKORUPSKA. 1995. DNA markers for resistance to *Heterodera glycines* I. race 3 in soybean cultivar Peking. **Breeding Science**, 45:435-443.
- MATSON, A.L., WILLIAMS, L.F. 1965. Evidence of four genes for resistance to the soybean cyst nematode. **Crop Sci.**, 22:588-590.
- MONTEIRO, W.F., MORAIS, S.R.A.C. **Ocorrência do nematóide de cisto da soja, *Heterodera glycines*, Ichinohe, 1952, prejudicando a cultura da soja no Mato Grosso do Sul**. Em: Congresso Brasileiro de Nematologia, 16, Lavras, 1992.
- MUDGE, J., CREGAN, P.B., KENWORTHY, J.P., KENWORTHY, J.W., ORF, J.H. & N. D YOUNG. 1997. Two microsatellite markers that flank the major soybean cyst nematode resistance locus. **Crop Sci.**, 37:1611-1615.
- NIBLACK, T.L.& D.C. NORTON. 1992.Soybean yield losses due to *Heterodera glycines* in Iowa. **Plant. Dis.**, 76:943-948.

- ORF, J.H., CHASE, K., JARVIK, T., MANSUR, L.M, CREGAN, P.B., ADLER, F.R. & K.G., LARK. 1999. Genetics of soybean traits: I. Comparison of three related recombinant inbred populations. **Crop Sci.**, 39:1642-1651.
- RAMALHO, M.A.P., SANTOS, J.B., ZIMMERMANN, M.J.O. **Genética quantitativa em plantas autógamas; aplicações ao melhoramento do feijoeiro**. Goiânia, GO: UFG, 1993. 271p.
- RAO-ARELLI, A.P. & S.C ANAND. 1988. Genetics relationships among soybean plant introductions for resistance to race 3 of soybean cyst nematode. **Crop Sci.**, 28:650-652.
- RAO-ARELLI, A.P., ANAND, S.C. & J.A., WRATHER. 1992. Soybean resistance to soybean cyst nematode race 3 is conditioned by an additional dominant gene. **Crop Sci.**, 32:862-864.
- RIGGS, R.D., SCHMIDT, D.P. & G.R., NOEL. 1988. Variability in race tests with *Heterodera glycines*. **J. Nematology**, 20:565-572.
- SAS. INSTITUTE INC.1990. **SAS/STAT user's guide, version 6.0**. 3.ed. Cary, NC:1990. p.329
- SCHMITT, D.P. & G., SHANNON. 1992. Differentiating soybean to *Heterodera glycines* Races. **Crop Sci.**, 32:275-277.
- SCHUSTER, I. **Identificação de QTL para a resistência a Nematóide de Cisto da Soja e capacidade de combinação de genitores**. Viçosa, MG: UFV, 1999. 86p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- SCHUSTER, I., ABDENOOR, R.V., MARIN, S.R.R., CARVALHO, V.P., KIIHL, R.A.S., SILVA, J.F.V., SEDIYAMA, C.S., BARROS, E.G. & M.A., MOREIRA. 2001. Identification of a new QTL associated with resistance to soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*). **Theor. Appl. Genet.**, 102:91-96.
- TANKSLEY, D.S., YOUNG, N.D., PATERSON, A.H. & M.W., BONIERBALE. 1989. Review. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. **Bio/Technology**, 7:257-264.
- WEBB, D.M., BALTAZAR, B.M., RAO-ARELLI, A.P., SCHUPP, J., CLAYTON, K., KEIM, P. & W.D., BEAVIS. 1995. Genetics mapping of soybean cyst nematode race-3 resistance loci in the soybean PI 437.654. **Theor. Appl. Genet.**, 91:574-581.
- WEISEMANN, J.M., MATTHEWS, B.S. & T.E., DEVINE. 1992. Molecular markers located to the soybean cyst nematode resistance gene, *Rhg4*. **Theor. Appl. Genet.**, 85:136-138.

- WRATHER, J.A., ANDERSON, T.R., ARSYAD, D.M., GAI, J., PLOPER, L.D., PORTA-PUGLIA, A., RAM, H.H. & J.T., YORINORI. 1997. Soybean disease loss estimates for the top 10 soybean producing countries in 1994. **Plant Dis.**, 81(1):107-110.
- YAMANAKA, N., NINOMIYA, S., HOSHI, M., TSUBOKURA, Y., YANO, M., NAGAMURA, Y., SASAKI, T. & K. HARADA. 2001. An informative linkage map of soybean reveals QTLs for flowering time, leaflet morphology and regions of segregation distortion. **DNA Research**, 8:61-72.
- YOUNG, N.D. & S.D., TANKSLEY. 1989. RFLP analysis of the size of chromosomal segments retained around the *tm-2* locus of tomato during backcross breeding. **Theor. Appl. Genet.**, 77:353-359.
- YUE, P., ARELLI, P.R. & D.A. SLEPER. 2001a. Molecular characterization of resistance to *Heterodera glycines* in soybean PI 438489B. **Theor. Appl. Genet.**, 102:921-928.
- YUE, P., SLEPER, D.A. & R.P., ARELLI. 2001b. Mapping resistance to multiple races of *Heterodera glycines* in soybean PI 89772. **Crop Sci.**, 41:1589-1595.
- ZENG, Z.-B. 1993. Theoretical basis for separation of multiple linked gene effects in mapping quantitative trait loci. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 90:10972-10976.
- ZENG, Z.-B. 1994. Precision mapping of quantitative trait loci. **Genetics**, 136:1457-1468.

CAPÍTULO 3

MAPEAMENTO DE CARACTERES AGRONÔMICOS USANDO LINHAGENS ENDOGÂMICAS RECOMBINANTES

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo desenvolver e avaliar uma população de 134 linhagens endogâmicas recombinantes (*Recombinant Inbred Lines* – RIL) de soja [*Glicine max* (L) Merrill], visando sua utilização como população de mapeamento de locos associados a diferentes características de interesse agrônomo. A qualidade da RIL como população de mapeamento foi avaliada por meio da estimação de diferentes parâmetros genéticos, utilizando o modelo experimental de famílias com testemunhas intercalares. A população segregante foi obtida pelo método do descendente de uma única semente (*Single Seed Descent* - SSD), a partir do cruzamento inicial entre o cultivar norte-americano Hartwig e a linhagem brasileira Y23. Verificou-se considerável variabilidade genética entre as linhagens endogâmicas recombinantes para todos os treze caracteres avaliados. As estimativas de herdabilidades foram altas para todos os caracteres com variabilidade genética significativa. A genotipagem da população foi realizada com 40 marcadores microsatélites (*Simple Sequence Repeat* –SSR) gerando três grupos de ligação. A técnica de mapeamento de contraste entre médias e a análise de regressão linear simples foram utilizadas para mapeamento dos QTLs. Foram identificados QTLs de efeito menores para os treze caracteres avaliados, localizados nos GL B2, O, G, E e H. A alta variabilidade genética detectada nas RILs sugere que a população é útil para realizar estudos genéticos e de mapeamento de QTLs para as características avaliadas e outras que possam ser consideradas.

INTRODUÇÃO

Em todas as culturas, incluindo a soja [*Glycine max* (L.) Merrill], as características agronômicas resultam da ação conjunta de muitos genes e do ambiente. SAX (1923) usou genes controladores de caracteres qualitativos para localizar genes de efeitos menores controlando características quantitativas. THODAY (1961) usou um marcador morfológico determinado por um gene para conduzir detalhados estudos de caracteres quantitativos em *Drosophila melanogaster*. O uso de genes de efeito maior para elucidar a base genética de caracteres quantitativos viu-se limitado por não existirem caracteres qualitativos polimórficos suficientes para conseguir uma cobertura ampla do genoma. Estas limitações, primeiramente foram superadas pelo uso de isoenzimas (TANKSLEY 1982, EDWARDS 1987) e mais tarde pelos marcadores moleculares de DNA tais como o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) ou aqueles com base na técnica da PCR (*Polimerase Chain Reaction*) como os microssatélites (*Simple Sequence Repeats* – SSR) e o RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*), os quais têm fornecido quantidade praticamente ilimitada de marcadores, com muitos atributos desejáveis (PATERSON 1988, 1991).

Muitos trabalhos de pesquisas têm usado marcadores moleculares de DNA para identificar e mapear regiões genômicas associadas a características quantitativas (*Quantitative Trait Loci* – QTL), usando-se vários tipos de populações. Entre essas populações, merecem especial destaque as linhagens endogâmicas recombinantes (*Recombinant Inbred Lines* – RIL). Cada linhagem é derivada de uma planta F₂ que, por autofecundações sucessivas, torna-se quase homocigota. As RILs possuem atributos que as tornam particularmente úteis. Constituem uma população de mapeamento permanente que pode ser avaliada ao longo do espaço e do tempo, permitindo a redução do erro experimental fazendo com que as diferenças genéticas pequenas possam ser estabelecidas (MATHER 1977). RILs podem ser usadas indefinidamente, facilitando o intercâmbio de material genético, acumulação e compartilhamento da informação genética adquirida.

Devido às vantagens mencionadas, este tipo de população tem sido amplamente usada. CARRILLO (1990) e ROUSSET (1990) usaram 48 RILs para mapear alelos de gluteninas de alto peso molecular em trigo. Em soja têm sido usadas por KEIM (1994) para comparar a variabilidade existente entre

diferentes populações de RILs. QTLs para características reprodutivas, morfológicas e qualidade de sementes têm sido mapeados por vários autores (MANSUR 1995, MANSUR 1996, ORF 1999, SOARES 2000, OLIVEIRA 2002, MIRANDA 2002) usando populações RILs.

Uma estratégia usada no mapeamento de QTLs é o desenvolvimento de populações segregantes, derivadas de cruzamentos interespecíficos (TANKSLEY 1982, GREF 1989, PATERSON 1988). Entretanto, algumas características de interesse para o melhorista, podem comportar-se de forma diferente em cruzamentos interespecíficos do que quando avaliadas em cruzamentos intraespecíficos. Este último tipo de cruzamento, considerando genitores contrastantes para as características consideradas, é uma boa alternativa para gerar conhecimento ou soluções genéticas aos mesmos problemas agrônômicos. Contudo, existe a necessidade de avaliar variabilidade genética da população desenvolvida e assim, sua utilidade como germoplasma para estudos genéticos e construção de mapas genéticos saturados para mapeamentos de QTLs. Com esta informação disponível, seria possível considerar estudos genéticos mais extensivos, assim como o desenvolvimento e análise de maiores populações de mapeamento.

Este trabalho relata a avaliação de uma população de RILs de soja, derivada do cruzamento entre Hartwig e Y23, em relação a sua utilidade como população de mapeamento.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Genético

Foi utilizada uma população de 134 linhagens endogâmicas recombinantes (*Recombinat Inbred Lines – RIL*) (geração F₇) obtida do cruzamento entre Hartwig (cultivar norte-americano) x Y23 (linhagem brasileira). Plantas F₂ derivadas de 5 plantas F₁ foram conduzidas pelo método do descendente de uma única semente (*Single Seed Descent - SSD*), em casa de vegetação, conforme sugerido por BRIM (1966), sem ter sido praticado seleção durante o processo de obtenção.

Experimento de campo

O experimento foi conduzido no Campo Experimental *Prof. Diogo Alves de Mello*, no campus da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. Viçosa localiza-se na Zona da Mata do estado de Minas Gerais, à latitude de 20°45'S, longitude de 42°51'W, altitude de 650m, com precipitação anual média de 1342mm. O solo foi preparado por meio de aradura e duas gradagens prévio à instalação do experimento. A adubação foi realizada no sulco de plantio, aplicando-se 70 kg/ha de P₂O₅ e 35 kg/ha de K₂O. O plantio do experimento foi realizado no dia 12/01/2001.

O modelo experimental foi o de famílias com testemunhas intercaladas, devido ao limitado número de sementes, o que dificultou a utilização de delineamentos estatísticos com repetição, com o tamanho de parcela usualmente empregado. O esquema experimental foi o seguinte: as 134 RILs foram dispostas em quatro grupos, iniciando e acabando cada um deles com as testemunhas Hartwig, Y23 e CAC-1. Estas três testemunhas foram repetidas a cada 14 RILs.

Cada parcela foi constituída de uma linha de 2 metros, no espaçamento de 70 centímetros entre linhas. Foram utilizadas sementes em excesso no plantio, sendo que 15 a 20 dias após a emergência foi feito o desbaste, deixando-se apenas 20 plantas por metro. Para avaliação foram etiquetadas 7 plantas competitivas dentro de cada parcela. Este procedimento ocorreu antes do florescimento, para que não houvesse tendenciosidade na escolha das plantas a serem avaliadas.

Características quantitativas

Treze características foram mensuradas: R1, número de dias para florescimento, contados a partir da emergência até que 50% das plantas da

fileira tivessem floridos; R8, número de dias para maturação, contados a partir da emergência até que 95% das vagens atingissem a coloração típica de maturação; PR, período reprodutivo, como sendo a diferença R8 – R1. APF, altura da planta no florescimento, expressa em centímetros, do nível do solo até o último nó da haste principal, por ocasião da abertura da primeira flor; NNF, número de nós no florescimento, contados na haste principal após o nó cotiledonar, por ocasião da abertura da primeira flor; APM, altura da planta na maturação, em centímetros, do nível do solo até o último nó da haste principal, no estágio R8; NNM, número de nós na maturação contados na haste principal a partir do nó cotiledonar, no estágio R8. NVP, número total de vagens com sementes formadas; APV, altura da primeira vagem; NSP, número total de sementes produzidas por planta; NSV, número total de sementes produzidas por vagem, PRO, produção de grãos, peso médio das sementes das 7 plantas, em gramas por planta, PCS, peso em gramas de cem sementes.

Correção de dados

O uso de testemunhas intercaladas, conseqüentemente com repetições, permitiu obter estimativas do efeito ambiental e com este corrigir as diferenças entre famílias que tinham como causa diferenças de ambiente local.

O efeito ambiental foi estimado a partir do desvio das testemunhas em relação a sua média geral. Como as testemunhas respondem de forma diferenciada às diferenças de condições ambientais, a correção com base na média destas é mais coerente do que considerar apenas um dos progenitores. Assim, primeiramente, obteve-se a média entre as repetições equivalentes às testemunhas 1, 2 e 3 que se encontravam em seqüência no campo:

$$\bar{X}_k = \frac{\bar{Y}_{1.k} + \bar{Y}_{2.k} + \bar{Y}_{3.k}}{3}$$

em que:

\bar{X}_k é a média das testemunhas na posição k;

$\bar{Y}_{1.k}$, $\bar{Y}_{2.k}$ e $\bar{Y}_{3.k}$ são as médias das testemunhas 1, 2 e 3 respectivamente, na repetição k;

O efeito ambiental corresponde ao desvio do grupo das três testemunhas em relação à sua média geral, ou seja:

$$EA_k = \bar{X}_k - m$$

onde:

EA_k é o efeito ambiental na posição k ;

m é a média geral das testemunhas.

Os valores corrigidos foram obtidos subtraindo-se do valor observado a campo o efeito ambiental, de modo a anular as diferenças entre RILs que são devidas à localização. A correção foi feita em gradiente com base em dois efeitos ambientais seqüenciais, de modo a obter uma correção gradual, de acordo com a distância entre parcela a ser corrigida e os dois efeitos ambientais estimados, um antecedente e o outro subseqüente à RIL a ser corrigida. A correção foi realizada com base na seguinte equação:

$$Y_c = Y_o - EA_k + \frac{q}{t+1} (EA_k - EA_{k+t})$$

em que:

Y_c e Y_o são os valores corrigido e observado, respectivamente,

q é a posição da RIL entre os dois grupos de testemunhas, sendo que a primeira RIL a ser corrigida assumiu a posição 1.

t é o total de parcelas entre os dois grupos de testemunhas, $t = 14$.

EA_k e EA_{k+t} são os efeitos antecedente e subseqüente à RIL a ser corrigida.

Assim, o efeito ambiental entre os grupos de testemunhas foi usado para corrigir, de forma gradual, os valores fenotípicos das RILs entre os grupos de testemunhas mencionadas.

Análise de variância

A análise de variância foi feita para cada uma das características avaliadas. O modelo estatístico adotado foi:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij},$$

em que:

Y_{ij} = valor da característica da i -ésima testemunha na j -ésima repetição;

μ = média geral das testemunhas;

T_i = efeito da i -ésima testemunha ($i = 1, 2, 3$);

ε_{ij} = erro aleatório que incide sobre as testemunhas, $\varepsilon_{ij} \sim \text{NID}(0, \sigma^2)$.

Para as RILs $Y_i = \mu + G_i + \varepsilon_i$,

em que:

Y_i = valor da característica da i -ésima RIL;

μ = média geral das RILs;

G_i = efeito da i -ésima RIL ($i = 1, 2, \dots, g$);

ε_i = erro aleatório que incide sobre as RILs, $\varepsilon_i \sim \text{NID}(0, \sigma^2)$.

No Quadro 1, encontra-se o esquema da análise de variância dos modelos estatísticos para testemunhas e RILs mencionados acima.

Quadro 1 - Esquema da análise de variância do modelo de famílias com testemunhas intercalares

FV	GL	QM	E(Q.M.)	F
Genótipos	$g - 1$	QMG	$s^2 + s_g^2$	QMG/QME
Testemunhas	$t - 1$	QMT	$s^2 + rf_t$	QMT/QME
Erro	$t(r - 1)$	QME	s^2	

Parâmetros genéticos analisados e seus estimadores

Média - No cálculo da média, foram considerados os valores das características das 7 plantas avaliadas por RIL.

Variância genética - $(\hat{s}_g^2) = \mathbf{QMG} - \mathbf{QME}$

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

Herdabilidade no sentido amplo - $(h^2_a) (\%) = \frac{\hat{s}_g^2}{\mathbf{QMG}} \times 100$

Coeficiente de variação genético - $\text{CVg} (\%) = \frac{\sqrt{\hat{s}_g^2}}{\bar{x}} \times 100$

Coeficiente de correlação genotípica - $r_g = \frac{\mathbf{Cov}_g(\mathbf{X}, \mathbf{Y})}{\sqrt{\hat{s}_g^2(\mathbf{X}) \cdot \hat{s}_g^2(\mathbf{Y})}}$

A hipótese de nulidade, coeficiente de correlação genotípica igual a zero ($H_0: r_g = 0$) foi testada pela estatística t , dada por:

$$t = \frac{r_g}{\sqrt{1-r_g^2}} \sqrt{n-2}, \text{ associada a } n-2 \text{ graus de liberdade, em nível de}$$

significância de 5% (CRUZ 1997).

A correção de dados fenotípicos, análise de variância e a estimação dos parâmetros genéticos foram feitas com o auxílio do programa GENES (CRUZ 1997).

Extração do DNA e amplificação de marcadores microssatélites

A extração de DNA de folhas de soja foi feita com base no protocolo descrito por KEIM (1988), com algumas modificações. Entre 200 a 300 mg de folhas foram trituradas na presença de N_2 líquido, sendo o pó resultante transferido para microtubos. Após a adição de 650-800 μ L de tampão de extração, constituído de Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; EDTA 50 mM, pH 8,0; NaCl 0,7 M; CTAB 1% (p/v); PVP 2% (p/v); e β -mercaptoetanol 1% (v/v), sendo este último separado dos demais componentes, as amostras foram incubadas em banho-maria a 65°C, durante 20 a 40 minutos.

Após a incubação, as proteínas foram removidas por extração com um volume de clorofórmio:álcool-isoamílico (24:1) e centrifugação a 14.000 rpm em uma centrífuga Eppendorf®, modelo 5415C. Os ácidos nucléicos foram precipitados da fase aquosa pela adição de 2/3 do volume obtido, com isopropanol gelado, lavados em etanol 90% gelado por 20 minutos, secados ao ambiente e ressuspensos em TE, pH 8,0 (Tris-HCl 10 mM e EDTA 1mM), seguindo-se um tratamento com RNAase A, na concentração final de 40 μ g/mL a 37°C, por 30 minutos. O DNA foi recuperado por precipitação, mediante a adição de um volume de etanol 95%, seguido de centrifugação a 14.000 rpm em uma centrífuga Eppendorf®, modelo 5415C, por 15 minutos. Após a lavagem do precipitado com etanol 90% gelado e secado ao ambiente, o DNA foi ressuspensão em 200-300 μ L de TE.

A concentração do DNA foi estimada espectrofotometricamente por leitura da absorvância a 260 nm, sendo cada unidade de absorvância correspondente a 50 μ g/mL de DNA fita dupla.

A coleção completa de iniciadores de SSR ("Reserach Genetics", Huntsville, AL, EUA), no total de 600 pares, foi testada nos genitores Hartwig e Y23.

Quarenta iniciadores que resultaram claramente polimórficos nos genitores foram amplificados em cada planta da população de mapeamento. As amplificações foram realizadas em 25 µL, contendo Tris-HCl 10 mM, pH 8,3; KCl 50 mM; MgCl₂ 2,4 mM; 100µM de cada um dos desoxinucleotídios (dATP, dTTP, dCTP, dGTP); e 0,6 µM de cada iniciadores, uma unidade de Taq polimerase e 30 ng de DNA. As reações de amplificação ocorreram em um termociclador Perkin Elmer[®] modelo 9600 programado para 30 ciclos de um minuto a 94°C, um minuto a 50°C e 2 minutos a 72°C, seguidos de uma etapa de sete minutos a 72°C.

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

Análise de ligação e associação marcadores-QTLs

As distâncias genéticas entre os marcadores foram estabelecidas com LOD score mínimo de 3, porcentagem de recombinação máxima de 50% e a função de mapeamento de KOSAMBI (1944). A segregação individual dos marcadores foi testada usando o teste do qui-quadrado. Para identificação dos QTLs ligados a cada característica foi utilizada a análise de variância. A associação marcadores-QTLs foi analisada através do teste de médias associadas aos alelos de cada marcador, utilizando a estatística *t* em nível de significância de 5%. A frequência de recombinação entre o marcador e o QTL foi estimada com base na estatística F (LIU 1998). A proporção da variância fenotípica explicada por cada marcador identificado na análise de variância, foi determinada pela regressão linear simples. Todas as análise e testes foram realizado com auxílio do programa GQMol (programa desenvolvido no DBG/BIOAGRO/UFV).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise de variância e estimativa de parâmetros

Os resultados da análise de variância de cada característica, seus quadrados médios e estimativas dos diferentes parâmetros genéticos estão apresentados no Quadro 2. O teste F a 1% de probabilidade indicou a existência de significativa variação genética entre as RILs para todas as características. Esta variabilidade genética é fundamental para o êxito de um programa de melhoramento, permitindo a seleção de genótipos superiores (ALLARD 1971). No mesmo sentido, a variabilidade genética presente na população é indício da boa qualidade do germoplasma como população de mapeamento.

Altas herdabilidades, variando de 74,82% a 98,23, foram obtidas para todos caracteres. (Quadro 2). A menor estimativa foi obtida para o caráter número de semente por vagens, (NSV), 38,19%. Embora a característica NSV possua uma herdabilidade que pode ser considerada baixa, tal vez por se tratar de um caracter complexo, evidenciou variabilidade genética significativa (Quadro 2). Isto significa que seria difícil identificar na população genótipos superiores ou mapear QTLs a ela associados.

As altas herdabilidades estimadas para cada caráter indicam que o processo seletivo teria uma alta eficiência. Entretanto, devido a fato de que o experimento não permitiu a estimativa da variação da interação genótipo x ambiente, este componente poderia estar inflacionando as estimativas da variância genética e, assim, superestimando todas as herdabilidades.

Em relação aos coeficientes de variação ambiental (C_{Ve}), os quais permitem avaliar a precisão do experimento, suas estimativas oscilaram de 2,00% a 19,35% (Quadro 2). Segundo o critério de classificação de GOMES (1985), sete caracteres apresentaram C_{Ve} baixo e seis apresentam C_{Ve} alto. Os caracteres que apresentaram maior coeficiente de variação foram APV, NVP e PRO. Segundo FALCONER (1987) e VENCOVSKY (1992) tais variações podem ser conseqüência dos métodos usados para estimação, dos materiais genéticos analisados e das condições ambientais.

Quadro 2 - Quadrado médio de genótipos (QMG) e do erro (QME), estimativa da variância genotípica ($\hat{\sigma}_g^2$), fenotípica ($\hat{\sigma}_f^2$) e ambiental ($\hat{\sigma}_e^2$), heredabilidade no sentido amplo (h_a^2), coeficientes de variação experimental (CVe) e genético (CVg), e média (\bar{x}) de cada caráter avaliado nas 134 RILs.

Estimativas	R1	R8	PR	NNF	NNM	APF	APM	APV	NVP	NSP	NSV	PCS	PRO
QMG	75,14	309,36	127,07	5,80	10,54	190,55	468,66	17,33	1172,5	5515,3	0,08	10,88	112,33
QME	4,47	5,47	8,13	0,79	1,28	27,60	53,16	4,36	143,45	704,05	0,05	2,39	17,84
Valor F	16,78*	56,56*	15,62*	7,32*	8,22*	6,90*	8,98*	3,97*	8,17*	7,83*	1,61**	4,54**	6,29*
$\hat{\sigma}_g^2$	70,66	303,89	118,94	5,01	9,26	162,94	415,50	12,96	1029,0	4811,2	0,03	8,49	84,49
$\hat{\sigma}_f^2$	75,14	309,36	127,07	5,80	10,54	190,55	468,66	17,33	1172,5	5515,3	0,08	10,88	112,33
$\hat{\sigma}_e^2$	4,47	5,47	8,13	0,79	1,28	27,60	53,16	4,36	143,45	704,05	0,05	2,39	17,84
h_a^2 (%)	94,05	98,23	93,60	86,34	87,84	85,51	88,65	74,82	87,76	87,23	38,19	78,01	84,12
CVe	5,00	2,00	3,80	8,69	3,75	12,76	12,70	19,35	17,64	16,74	9,75	9,91	18,95
CVg	20,37	15,01	14,55	22,09	22,39	31,00	35,52	32,63	44,54	43,76	7,65	18,68	40,85
Média	41,25	116,57	74,92	10,24	13,40	42,64	57,37	11,03	72,01	149,53	2,24	15,43	23,79

*Valor F significativo em nível de 5%, ** significativo em nível de 1%, e ^{ns} não existe diferença entre os tratamentos.

R1 número de dias para florescimento; R8 número de dias para maturação; PR período reprodutivo; NNF número de nós no florescimento; NNM número de nós na maturação contados na haste principal; APF altura da planta no florescimento; APM, altura da planta na maturação; APV altura da primeira vagem; NVP número total de vagens com sementes formadas; NSP número total de sementes produzidas por planta; NSV número total de sementes produzidas por vagem; PCS peso médio em gramas de cem sementes e PRO produção de grãos.

Segregação das Características Quantitativas

No Quadro 3 compara-se a população de RILs com seus genitores. É apresentada a média, desvio padrão, amplitude de valores fenotípicos e as herdabilidades das treze características avaliadas. Também são apresentadas as médias dos genitores Hartwig e Y23.

Quadro 3 - Caracteres mensurados, unidades, valores das médias, desvios padrões e amplitudes dos valores obtidos na população e médias dos genitores Hartwig e Y23 para cada caráter.

Caráter	Unidade	População				Média dos Genitores	
		Média	Desvio	Amplitude	h^2	Hartwig	Y23
R1	dias	41,18	8,76	28,66	94,05	30,57	60,67
R8	dias	116,10	17,51	56,91	98,23	94,35	144,00
PR	dias	74,97	11,17	55,67	93,60	63,79	86,33
NNF	n . p ⁻¹	10,24	2,40	11,74	86,34	8,51	13,29
NNM	n . p ⁻¹	13,40	3,24	19,37	87,83	8,49	17,67
APF	cm	41,18	13,80	61,89	85,51	23,36	64,64
APM	cm	57,18	21,32	97,32	88,65	23,13	76,53
APV	cm	10,89	6,94	18,43	74,82	6,84	13,77
NVP	n . p ⁻¹	71,12	33,91	133,26	87,76	33,42	85,77
NSP	n . p ⁻¹	156,80	73,75	300,58	86,91	75,42	187,08
NSV	n . v ⁻¹	2,24	0,29	1,72	38,19	2,25	2,20
PCS	mg	15,59	1,54	19,00	78,01	15,10	14,00
PRO	g . p ⁻¹	23,51	10,46	43,69	83,46	11,27	24,90

Os genitores apresentam médias diferentes para todas as características avaliadas, exceto para os caracteres NSV e PCS. Os valores fenotípicos extremos da população ultrapassaram os valores fenotípicos extremos dos genitores entre 2 a 3 vezes, evidenciando segregação transgressiva para todas as características, mas não para R1 (dados não mostrados).

Dois exemplos podem ilustrar o significado potencial da variação transgressiva. Para altura da planta na maturação (APM) existem genótipos que superaram em 43 cm a altura do genitor de maior altura. Esta observação é importante, pois nenhuma RIL apresentou tendência ao acamamento. O caráter produção (PRO) também apresentou variação transgressiva, mostrando que existem genótipos que produziram até 30 g . p⁻¹ a mais que o genitor de maior rendimento,

Y23. Portanto, seria possível combinar o incremento em altura com os genes favoráveis à produção, com boas chances de obter genótipos superiores sem problemas de acamamento.

O Quadro 4 mostra que os coeficientes de correlação genotípicos variaram de -0,11 a 0,99. Valores absolutos acima de 0,11 foram significativos a 5% para o teste t , indicando que a maioria dos coeficientes são significativos ou altamente significativos.

A alta correlação de APF com APM, de R1 com R8 e de NNF com NNM, indica a viabilidade de avaliar apenas um de cada par destes caracteres, como forma de reduzir o dispêndio de recursos, sem prejudicar significativamente o processo de seleção nestes caracteres. A avaliação no florescimento apresenta a vantagem de, em geral, estar associada a herdabilidades maiores do que a avaliação na maturação. Altas correlações entre estes caracteres também foram relatadas por SANTOS (1994).

Os caracteres agronômicos apresentam valores de correlação alta e positiva com PRO, com exceção do caráter NSV e PCS cujas correlações foram atipicamente negativas (Quadro 4). Portanto, estes são bons auxiliares para a seleção indireta das famílias mais produtivas. Eles são capazes de informar sobre as alterações que podem ocorrer na população em consequência da seleção para a produção. As possíveis alterações devem ser avaliadas, pois podem comprometer a aceitação, como cultivar, de materiais selecionados apenas pela sua boa produção. A altura excessiva, por exemplo, é uma característica que pode comprometer o valor de uma linhagem.

A correlação de NVP, NSV e PCS com a PRO mostraram sinais diferentes, positiva para NVP e negativa para NSV e PCS. Estes dados mostram a utilidade do caráter NVP para o processo de seleção de genótipos superiores quanto à produtividade. Primeiro, deve-se considerar que a seleção das famílias com maior NVP terá boa correspondência com a seleção das famílias também genotipicamente superiores para tal caráter, como é expresso pela alta herdabilidade deste. E em função da alta correlação entre o valor genotípico para NVP e PRO, a seleção das famílias genotipicamente superiores para NVP corresponderam a famílias com genótipos superiores para PRO, de acordo com a magnitude da correlação genética entre estes caracteres. Já a correlação negativa entre PRO com NSV e PCS indica

que as famílias selecionadas com altos valores genotípicos para estes caracteres corresponderiam a famílias pouco produtivas. Esta situação pouco comum dificultaria o processo de seleção, pois o NSV e o PCS são dois componentes primários da produção.

Quadro 4 - Coeficientes de correlação genotípica entre todas as características mensuradas

	R8	NPF	APF	PR	NNM	APM	APV	NVP	NSP	NSV	PRO	PCS
R1	0,87	0,85	0,90	0,64	0,96	0,95	0,87	0,92	0,89	-0,55	0,81	-0,49
R8		0,82	0,85	0,93	0,85	0,88	0,76	0,87	0,84	-0,46	0,82	-0,28
NPF			0,81	0,67	0,83	0,82	0,76	0,78	0,77	-0,46	0,74	-0,30
APF				0,65	0,85	0,94	0,80	0,86	0,85	-0,41	0,86	-0,24
PR					0,61	0,67	0,53	0,68	0,66	-0,30	0,68	-0,11
NNM						0,89	0,84	0,88	0,87	-0,45	0,79	-0,46
APM							0,86	0,91	0,89	-0,46	0,87	-0,35
APV								0,80	0,80	-0,25	0,67	-0,57
NVP									0,99	-0,43	0,95	-0,42
NSP										-0,38	0,93	-0,46
NSV											-0,44	-0,13
PRO												-0,16

R1 número de dias para florescimento; R8 número de dias para maturação; PR período reprodutivo; NNF número de nós no florescimento; NNM número de nós na maturação contados na haste principal; APF altura da planta no florescimento; APM altura da planta na maturação; APV altura da primeira vagem; NVP número total de vagens com sementes formadas; NSP número total de sementes produzidas por planta; NSV número total de sementes produzidas por vagem; PRO produção de grãos e PCS peso médio em gramas de cem sementes.

Análise de ligação e mapeamento de QTLs

Dos 600 pares de iniciadores SSR testados nos genitores Hartwig e Y23, 170 deles (28,33%) foram claramente polimórficos, indicando a grande dissimilaridade genética existente entre eles.

Quarenta pares de iniciadores polimórficos foram amplificados na população, sendo que quatro fixaram o tipo parental Y23 e três o tipo parental Hartwig. No Quadro 5 está indicado os iniciadores que fixaram um dos alelos e seus respectivos grupos de ligação (GL). Regiões genômicas com este tipo de segregação, também foram detectadas por outros autores (YAMANAKA 2001). Embora se descarte a seleção, a causa genética deste fenômeno ainda permanece desconhecida.

Quadro 5 – Marcadores microssatélites que fixaram um dos alelos parentais

niciadores	Tipo de clase parental	Grupo de Ligação [§]
Satt077	Hartwig	D1a
Satt191	Hartwig	G
Satt354	Y23	I
Satt359	Y23	B1
Satt514	Hartwig	D2
Satt579	Y23	D1b
Satt594	Y23	G

[§]Os Grupos de ligação foram denominados segundo o mapa genético gerado pela USDA/Iowa State University (CREGAN et al., 1999)

Para estimar a distância genética entre os SSR e definir os diferentes GL foi adotado *LOD score* mínimo de 3 e uma distância genética máxima de 50 centiMorgan (cM). Apenas sete marcadores mostraram-se ligados formando três grupos de ligação (Quadro 6). O primeiro GL corresponde a um intervalo genético de 6,73 cM formado pelos marcadores Satt173 e Satt550. O segundo GL definido por três SSR, Satt163, Satt038 e Satt275, possui um comprimento total de 26,40 cM, e o terceiro GL consiste do par de SSR, Satt250 e Satt551, com uma distância genética de 13,84 cM.

Quadro 6 – Distância genética entre os marcadores que formaram os três grupos de ligação (GL) na população de mapeamento

GL O ^a	cM ^b	LOD ^c	GL G ^a	cM ^b	LOD ^c	GL M ^a	cM ^b	LOD ^c
Satt550	6,73	21,28	Satt275	9,70	12,05	Satt250	13,84	9,69
Satt173	----	----	Satt038	16,70	8,67	Satt551	----	----
			Satt163	----	----			

^aGrupo de ligação denominados segundo Universidade Estadual de Iowa (GREGAN 1999a), ^btamanho do intervalo genético estimado com o programa QMol expresso em centiMorgan (cM), e ^cLOD score da distância entre os marcadores

No Quadro 7 estão a localização genética dos QTLs associados a doze características, a estimativa da frequência de recombinação entre o marcador e o QTL, a probabilidade da diferença entre médias (teste *t*), do coeficiente de regressão linear simples e o coeficiente de determinação dos marcadores SSR ligados aos QTLs.

As estimativas da frequência de recombinação entre o marcador e o QTL para cada caráter foram altas variando de 25,62 a 34,59. Estas estimativas são pouco precisa pois são influenciada por uma série de fatores tais como: tamanho da população, herdabilidade do caráter e número de genes que controlam a característica. Entretanto os marcadores identificados poderão ser considerados como critério inicial para estudo mais aprimorado de análise de QTLs associados aos caracteres considerados neste estudo.

Para as características dias para floração (R1) e dias para maturação, (R8) foram identificados três QTLs de efeito menor. Para R1 nos GL B2, O e G, e para R8 nos GL O, E e G. QTLs de efeito maior e menor para as características R1 e R8 foram identificados por MANSUR (1993, 1996) nos GL C2, M e L, posteriormente confirmados por ORF (1999) para R8. Entretanto, três QTLs associados a R8 foram relatados por OLIVEIRA (2002) nos GL K, C2 e J. O QTL no GL K foi reportado inicialmente por LEE (1996).

Para a característica período reprodutivo (PR) foram identificados QTLs nos GL B2, E e G. MANSUR (1993) posicionaram dois QTLs de efeito maior nos GL C2 e M, posteriormente MANSUR (1996) reportou dois QTLs de efeito menor nos GL M e L. Os três QTLs dos GL C2, M e L foram confirmados por ORF (1999), como sendo QTL ambientes específicos.

Quadro 7 – Distância dos marcadores SSR aos QTLs de doze caracteres de soja identificados através do contraste entre as médias dos alelos e regressão linear simples

Caráter	Marcador	GL ^d	ANOVA	r ^e	Regressão Linear Simples	
			P ^a		P ^b	r ^{2c}
R1	Sat_009	B2	0,0100	31,09	0,0402	3,15
	Satt173	O	0,0400	34,10	0,0382	3,84
	Satt235	G	0,0017	27,23	0,0041	7,37
	Satt564	G	0,0080	29,22	0,0327	4,66
R8	Satt173	O	0,0406	34,00	0,0402	3,74
	Satt235	G	0,0021	27,58	0,0042	7,32
	Satt263	E	0,0480	34,22	0,0488	3,61
	Satt564	G	0,0089	29,43	0,0325	4,67
PR	Sat_009	B2	0,0129	31,62	0,0403	2,64
	Satt235	G	0,0053	28,13	0,0053	6,95
	Satt263	E	0,0496	34,30	0,0489	3,57
	Satt564	G	0,0095	29,56	0,0325	4,67
NPF	Sat_009	B2	0,0143	31,83	0,0463	3,40
	Satt235	G	0,0076	29,85	0,0142	5,43
	Satt564	G	0,0053	28,42	0,0230	5,26
APF	Sat_009	B2	0,0138	31,76	0,0410	3,07
	Satt173	O	0,0404	33,98	0,0388	3,82
	Satt235	G	0,0040	28,83	0,0092	6,10
NNM	Sat_009	B2	0,0094	30,98	0,0364	3,76
	Satt235	G	0,0017	27,23	0,0320	7,02
	Satt564	G	0,0101	29,68	0,0361	2,99
APM	Sat_009	B2	0,0094	31,72	0,0364	3,71
	Satt235	G	0,0017	27,64	0,0051	7,02
	Satt564	G	0,0101	29,70	0,0361	3,94
APV	Satt235	G	0,0004	28,87	0,0012	5,67
	Satt263	E	0,0487	34,25	0,0480	3,57
	Satt564	G	0,0023	26,95	0,0267	5,00
NVP	Satt235	G	0,0004	25,26	0,0028	7,91
NSP	Satt235	G	0,0012	25,63	0,0032	7,74
	Satt550	O	0,0110	38,15	0,0276	4,14
	Satt564	G	0,0053	32,17	0,0301	4,80
PCS	Satt235	G	0,0165	31,44	0,0019	4,95
	Satt353	H	0,0178	32,46	0,0018	4,64
	Satt564	G	0,0019	26,59	0,0014	6,02
PRO	Satt235	G	0,0006	25,62	0,0034	7,64
	Satt353	H	0,0490	34,59	0,0480	3,23

^aProbabilidade para o contraste de média entre os alelos SSR usando a estatística *t*, ^bprobabilidade para análise de regressão linear simples, ^cvalor do coeficiente de regressão simples do marcador SSR, ^dnome do grupo de ligação correspondente ao marcador identificado, conforme mapa genético gerado pela USAD/ Iowa State University (CREGAN et al., 1999) e ^efreqüência de recombinação marcador-QTL estimada com auxílio do programa QMol.

Para as características número de nós na floração (NNF) e número de nós na maturação (NNM) foram identificados dois QTLs nos GL B2 e G. OLIVEIRA (2002) reportou três QTLs de efeito menor para NNM nos GL D2, K e D1a+W. Para altura da planta na floração (APF) detectaram-se QTLs nos GL B2, G e O, e para altura da planta na maturação (APM) nos GL B2 e G. Para a característica APM, OLIVEIRA (2002) detectou dois QTLs no GL D2 e um QTL no GL J. LEE (1996) relatou um QTL de efeito maior no GL L e QTLs de efeito menores nos GL H e N. Entretanto, ORF (1999) identificou QTLs associados a APM nos GL C2, M, L e D1b.

Para altura da primeira vagem (APV) foram detectados dois QTLs nos GL G e B2. Diferentemente, OLIVEIRA (2002) relatou um QTL no GL D2. Para as características número de vagem por planta (NVP) e número de semente por planta (NSP) foi identificado um QTL comum no GL G e um segundo QTL no GL O para NSP. Para NVP, OLIVEIRA (2002) obteve dois QTLs nos GL F e J, ambos de efeito menores. O mesmo autor detectou dois QTLs para NSP nos GL F, C1 e K. ORF (1999) relataram QTLs nos GL A2, B1, C2, M e F.

Para o caráter peso de cem semente (PCS) foram identificados três QTLs, dois no GL G e um no GL H. Para esse caráter OLIVEIRA (2002) informou da presença de um QTL ambiente específico no GL C1 e dois QTLs ambientes não específicos no GL K e G.

Para produção de grãos (PRO) foi identificado um QTL no GL G e um segundo no GL H. MANSUR (1993, 1996) mapeou dois QTLs, nos GL C2 e M. ORF (1999) detectaram QTLs associados à produção no GL M, C2, D2 e F.

Os QTLs associados às diferentes características encontram-se localizados em cinco GL diferentes B2, O, G, E e H. Este número é menor do que os 16 GL reportados por MANSUR (1993, 1996), os 20 GL obtidos por ORF (1999) e os 9 GL informado por OLIVEIRA (2002). Além disto, apenas 7 dos 32 marcadores utilizados nas análises mostraram ser úteis na identificação de QTLs (Quadro 7). Portanto poderiam existir regiões do genoma que não foram devidamente amostradas, deixando-se de identificar QTLs associados a algumas características mensuradas.

Os efeitos dos diferentes *background* utilizados e do ambiente são fatores que sabidamente influenciam a posição e os coeficientes de determinação dos QTLs. Os efeitos de *background* na posição do QTL pode ser evidenciado pela melhor correlação entre os dados obtidos por MANSUR (1993, 1996) e ORF (1999), do

que entre esses autores com o informado por OLIVEIRA (2002). MANSUR (1993, 1996) trabalhou com uma população de RILs derivada do cruzamento entre Minsoy e Noir 1. Esta mesma população foi incluída, junto a outras duas RILs, cujos genitores foram Minsoy ou Noir 1, no trabalho de ORF (1999). O efeito de ambiente na identificação de QTLs pode ser comprovado também nos trabalhos anteriores, uma vez que esses autores relatam QTLs ambientes específicos e não específicos.

Por último, as técnicas de mapeamento utilizadas neste trabalho como testes de médias e regressão linear simples, embora úteis, possuem limitações não apenas para posicionamento do QTL como também na estimativa do coeficiente de determinação dos marcadores. Espera-se que com a obtenção de um mapa genético suficientemente saturado, se possam aplicar técnicas de mapeamento mais poderosas como o mapeamento por intervalo composto (ZENG 1993, 1994), tornando possível a separação em componentes mendelianos dos QTLs associados a cada caráter, assim como estimativas dos efeitos genéticos epistáticos e a causa genética (ligação fatorial ou epistasia) da correlação genética entre caracteres.

A população RIL desenvolvida apresentou variabilidade genética significativa para quase todas as características avaliadas (Quadro 2). Portanto esta população deve ser considerada em futuros estudos de mapeamento genéticos e de melhoramento, envolvendo as características avaliadas neste trabalho e outras a serem consideradas.

BIBLIOGRAFIA

- ALLARD, R.W. 1971 **Princípios do melhoramento genético das plantas**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, p.381.
- BRIM, C.A. A modified pedigree method of selection in soybeans. **Crop Science**, v. 6, p. 220, 1966.
- CARRILLO, J.M.; ROUSSET, M.; QUALSET, C.O.; & D.D., KASARDA. 1990. Use of recombinant inbred lines of wheat for study of association of high molecular weight gluten subunit alleles to quantitative traits. 1. Grain yield and quality predictions tests. **Theor. Appl. Genet.**, 79: 321-330.
- CREGAN, P., JARVIK, T., BUSH, A.L., SHOEMAKER, R.C., LARK, K.G., KAHLER, A.L., VANTOAI, T.T., LOHNES, D.G., CHUNG, J. & J.E., SPECHT. 1999. An integrated genetic linkage map of the soybean. **Crop Sci.**, v.39, p.1464-1490.
- CRUZ, C.D. **Programa Genes: aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: UFV, 1997. 442p.
- CRUZ, C.D., & A..J., REGAZZI. 1997. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2^a.ed. Viçosa: UFV, 390p.
- EDWARDS, M.D., STUBER, C.S., & J.F., WENDEL. 1987. Molecular-marker-facilitated investigations of quantitative-trait loci in maize. I - Numbers, genomic distribution and types of gene action. **Genetics**, 130:113-125.
- FALCONER, D.S. **Introdução à genética quantitativa**. Viçosa: Imprensa Universitária, 1987. 279p.
- GQMol**. Viçosa: 15.03.2003. (<http://www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm>).
- GRAEF, G.; FEHR, W.R.; & S.R., CIANZIO. 1989. Relation of isoenzyme genotypes to quantitative characters in soybeans. **Crop Sci.**, 29:683-688.
- KEIM, P., OLSON, T.C. & R.C., PALMER. 1988. A rapid protocol for isolation soybean DNA. **Soybean Genet. Newslett.**, 15:150-152.
- KEIM, P.; BEAVIS, W.D.; SHUPP, J.M.; BALTAZAR, B. M.; MANSUR, L.; FREESTONE, R.E.; VAHEDIAN, M. & D.M., WEBB. 1994. RFLP analysis of soybean breeding population: 1. Genetic structure differences due to inbreeding methods. **Crop Sci.**, 34:55-61.
- KOSAMBI, D.D. 1944. The estimation of map distances from recombination values. **Annals of Eugenics**, 12:173:175.
- LEE, S.H.; BAILEY, M.A.; MIAN., M.A.R.; SHIPE, E.R., ASHLEY, D.A PARROT, W.A., HUSSEY, R.S, BOERMA, H.R. 1996. Identification of quantitative trait loci for plant heigh, loding and maturity in a soybean population segregation for growth habit. **Theor. Apl. Genet.**, 92:516-523.

- LIU, H.L. 1998. **QTL mapping: single-marker analysis**. In: Statistical Genomics: linkage, mapping and QTL analysis. Ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, EUA, p. 387-416.
- MANSUR, L.M.; LARK, K.G.; KROSS, H. & A., OLIVEIRA 1993. Interval mapping of quantitative trait loci for reproductive, morfological, and seed traits of soybean (*Glycine max* L.). **Theor. Appl. Genet.** 86:907-913.
- MANSUR, L.M.; ORF, J.H.; CHASE, K.; JARVIK, P.B.; CREGAN, P.B. & K.G. LARK. 1996. Genetic mapping of agronomic traits using recombinant inbred lines of soybean. **Crop Sci.**, 36:1327-1336.
- MATHER, K. & J.C.L., JINKS. 1977. Introduction to biometrical genetics. Cornell University Press, Ithaca, New York.
- MIRANDA, F.D. **Uso de marcadores RAPD para mapeamento de QTLs que determinam teor de proteína em soja. Viçosa, MG: UFV, 2002 56 p. Dissertação** (Mestrado em Genética e Melhoramento). Universidade Federal de Viçosa, 2002.
- OLIVEIRA, D.A. **Mapeamento de QTLs para características agronômicas e relação entre lipoxigenases e teor de ácido linolênico com qualidade fisiológica de sementes de soja. Viçosa, MG: UFV, 2002 100 p. Dissertação** (Doutorado em Fitotecnia). Universidade Federal de Viçosa, 2002.
- ORF, J.H., CHASE, K., JARVIK, T., MANSUR, L.M, CREGAN, P.B., ADLER, F.R. & K.G., LARK. 1999. Genetics of soybean traits: I. Comparison of three related recombinant inbred populations. **Crop Sci.**, 39:1642-1651.
- PATERSON, A.H., DAMN, S., JAD, J.D., ZAMIR, D., RABINOWITCH, H.D., LINCOHN, S.E., LANDER, E. & S.D., TANKSLEY. 1991. Mendelian factors underlying quantitative traits in tomato: comparison across species, generations, and environments. **Genetics**, 127:181-197.
- PATERSON, A.H.; LANDER, E.S.; HEWITT, J.D.; PETERSON, S.; LINCOLN, S.E. & S.D., TANKSLEY. 1988. Resolution of quantitative, traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragments polymorphisms. **Nature**, 325:721-726.
- ROUSSET, M.; CARRILLO, J.M.; QUALSET, C.O. & D.D., KASARDA. 1990. Use of recombinant inbred lines of wheat for study of association of high molecular weight gluten subunit alleles to quantitative traits. 2. Milling and bread making quality. **Theor. Appl. Genet.**, 79:403-412.
- SANTOS, C.A.F. **Análise de trilha e estimativas de parâmetros genéticos em progênies F₆ de um cruzamento de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). Viçosa, MG: UFV, 1994. 71p. Dissertação** (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 1994.

- SAX, K. 1923. The association of size differences with seed coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. **Genetics**, 8:552-560.
- SOARES, T.C.B. **Mapeamento de locos que controlam o conteúdo de proteína em soja**. Viçosa, MG: UFV, 2000 58p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento). Universidade Federal de viçosa, 2000.
- TANKSLEY, S.D., MEDINA-FILHO, H. & D.M., RICK. 1982. Use of naturally occurring enzyme variation to detect and map genes controlling quantitative traits in an interspecific backcross of tomato. **Heredity**, 49:11-25.
- THODAY, J.M. 1961. Location of polygenes. **Nature**, 191:368-370.
- VENCOVSKY, R., & P., BARRIGA. **Genética biométrica no fitomelhoramento**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 496p.
- YAMANAKA, N., NINOMIYA, S., HOSHI, M., TSUBOKURA, Y., YANO, M., NAGAMURA, Y., SASAKI, T. & K. HARADA. 2001. An informative linkage map of soybean reveals QTLs for flowering time, leaflet morphology and regions of segregation distortion. **DNA Research**, 8:61-72.
- ZENG, Z.-B. 1994. Precision mapping of quantitative trait loci. **Genetics**, 136:1457-1468.
- ZENG, Z.-B. 1993. Theoretical basis for separation of multiple linked gene effects in mapping quantitative trait loci. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 90:10972-10976.

RESUMO E CONCLUSÕES GERAIS

Para o presente trabalho foi utilizada uma população de linhagens recombinantes endogâmicas, obtida do cruzamento entre Hartwig (genitor resistente ao NCS) e Y23 (genitor suscetível). Relata-se estudo sobre a herdabilidade das raças 3 e 9 do nematóide de cisto da soja (NCS), assim como o mapeamento de locos de resistência a elas associadas, e os resultados obtidos sobre a variabilidade genética presente na população.

Altas herdabilidades no sentido amplo foram estimadas para as duas raças, 80,97% para a 3, e 80,39% para a raça 9, indicando a alta eficiência que teria a seleção fenotípica para esta característica.

A co-segregação entre os valores fenotípicos (número médio de cistos por RIL) e os marcadores microssatélites (SSR) amplificados na população foram analisados por meio da regressão simples e múltipla. Embora a regressão simples tenha identificado 6 e 2 SSR como associados à resposta à raça 3 e 9, respectivamente, apenas o marcador Satt038 permaneceu no modelo de regressão múltipla. Este marcador explicou 25,38% ($P < F = 0,0001$) da variação fenotípica da raça 3 e 12,60% ($P < F = 0,0001$) da raça 9. Aplicando o método de mapeamento por intervalo múltiplo, um QTL de resistência foi identificado na extremidade do grupo de ligação (GL) G.

A variabilidade genética da população foi avaliada para treze caracteres agrônômicos. Para identificação de QTLs foi utilizado o contraste entre médias dos alelos de cada um dos marcadores amplificados na população. Posteriormente, a técnica de regressão linear simples foi utilizada para determinar o coeficiente de determinação de cada marcador. Foram identificados QTLs para os treze caracteres considerados. Os QTLs foram posicionados nos grupos de ligação B2, O, G, E e H. A variabilidade genética detectada na RIL foi significativa para todas as características, sugerindo que a população é útil para realizar estudos genéticos e de mapeamento de QTLs.