

ANTONIO JOSÉ DIAS VIEIRA

**IDENTIFICAÇÃO DE QTLs ASSOCIADOS À FOTOSSÍNTESE E A
CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO EM SOJA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de “Doctor Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2003

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

V658i
2003

Vieira, Antonio José Dias, 1971-
Identificação de QTLs associados á fotossíntese e a ca-
racterísticas de crescimento de soja / Antonio José Dias
Vieira.- Viçosa: UFV, 2003.
73p.: il

Orientador: Maurilio Alves Moreira.
Tese (mestrado) – Universidade Federal de Viçosa.

1. Soja – Análise de QTLs. 2. Soja – Aspectos fisioló-
gicos. 3. Soja – Marcadores moleculares. I. Universidade
Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 19.ed. 583.3220413342

CDD 20.ed. 583.3220413342

ANTONIO JOSÉ DIAS VIEIRA

**IDENTIFICAÇÃO DE QTLs ASSOCIADOS À FOTOSSÍNTESE E A
CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO EM SOJA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de “Doctor Scientiae”.

APROVADA : 28 de abril de 2003

Prof. Marco Antonio Oliva Cano

Prof. Marcelo Ehlers Loureiro

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros
(Conselheiro)

Prof. Carlos Alberto Martínez y Huamán
(Conselheiro)

Dr. Maurílio Alves Moreira
(Orientador)

A memória de meu Pai José de Souza Dias Vieira

A minha mãe Francisca Dias Vieira

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo.

À Universidade Federal de Viçosa, especialmente ao Instituto de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária (BIOAGRO) e Unidade de Crescimento de Plantas (UCP), pertencente ao Departamento de Biologia Vegetal, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao professor Maurílio Alves Moreira pela sua coerente e competente orientação, zelo incansável pelas condições de pesquisa, pela confiança e amizade.

Ao professor Carlos Alberto Martínez y Huamán pela sua amizade e sugestões ao projeto de pesquisa e sobre sua indispensável orientação na tomada dos dados ecofisiológicos.

Ao professor Everaldo Gonçalves de Barros pela sua amizade e sugestões ao projeto de pesquisa.

Ao professor Marco Oliva Cano, pela sua amizade, seus ensinamentos, pelos conselhos que influenciaram positivamente minha formação científica e como docente.

Ao amigo Newton Deniz Piovesan pela sua valiosa contribuição ao projeto de pesquisa e na manutenção das plantas nas casas de vegetação.

Ao amigo Ivan Schuster pela sua grande contribuição ao projeto de pesquisa e à análise estatística dos dados.

A amiga Inês Chamel pela sua colaboração nas análises de teor de nitrogênio foliar específico e proteína das sementes.

Aos amigos Taís Cristina Bastos Soares, Dario Alves de Oliveira e Fabio Demolinari de Miranda pelos dados moleculares utilizados no presente estudo.

Ao amigo Gerardo Cervigni pela sua valiosa colaboração às análises estatísticas.

A técnica de Nível Superior, Mercês Bustamante, pela sua amizade e preciosa colaboração à determinação da taxa de fotossíntese potencial, no segundo ano de coleta de dados.

Ao técnico de laboratório da UCP, Rogério Gomide, pela sua amizade e colaboração às coletas de dados de partição de biomassa e de área foliar.

Aos amigos Reginaldo, Tadeu, Marcos e João Paulo pela colaboração aos tratamentos culturais das plantas na casa de vegetação.

Ao amigo Jander, pela sua colaboração nas análises de teor de nitrogênio foliar específico e proteína das sementes.

A amiga Rita Maria Alves de Moraes, pelo convívio, companheirismo e conselhos durante a execução deste projeto.

A todos os colegas do BIOAGRO e da UCP.

A meu Pai, José de Souza (*in memoriam*) e a minha mãe Francisca, pelo apoio e compreensão.

E a todos aqueles que, de alguma forma, colaboraram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

ANTONIO JOSÉ DIAS VIEIRA, filho de José de Souza Dias Vieira e Francisca Dias Vieira, nasceu em Belém, estado do Pará, em 27 de maio de 1971.

No período de 1991 a 1995 foi bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica – PIBIC / Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), em convênio com a Faculdade de Ciências Agrárias do Pará (FCAP), desenvolvendo atividades em vários projetos de pesquisa.

Graduou-se em Engenharia Agrônômica pela Faculdade de Ciências Agrárias do Pará, estado do Pará, em 1995.

Obteve o título de mestre em Ciências, por meio do curso de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas, estado do Rio Grande do Sul, em 1998.

CONTEÚDO

	Página
Resumo	viii
Abstract	x
1 Introdução	1
2 Revisão de Literatura	7
2.1 Produtividade da soja como resultado da expressão gênica modificada pelo ambiente	7
2.2 Uso de plantas transgênicas na busca do entendimento das associações entre características fisiológicas	11
2.3 Uso de isótopos radioativos no estudo das associações entre características fisiológicas	12
2.4 Ressalvas sobre as correlações entre características fisiológicas determinadas em ambientes estressantes e por meio de plantas transgênicas	12

	Página	
2.5	A análise da coincidência de QTLs como metodologia tanto para o estudo de associação de características fisiológicas quanto no estudo de respostas das plantas a estresses ambientais	14
3	Material e Métodos	18
3.1	Material genético	18
3.2	Condições de cultivo e critérios para as mensurações dos dados fenotípicos	18
3.3	Mapeamento de QTLs	21
4	Resultados e Discussão	23
4.1	Análise da distribuição de frequência dos dados fenotípicos e comparação dos dados obtidos nas populações RILs F ₇ e F ₈ com aqueles apresentados na literatura	23
4.2	Análises de variância e estimativas de parâmetros genéticos	41
4.3	Análise da coincidência de QTLs e das correlações entre as características mensuradas na população de RILs na geração F ₇ submetida à adubação nitrogenada	46
4.4	Análises da coincidência de QTLs e correlações entre as características mensuradas na população de RILs na geração F ₈ . Esta população não foi submetida à adubação nitrogenada	49
4.5	Considerações Finais	52
5	Conclusões	54
6	Referências bibliográficas	56
7	Anexo	64

RESUMO

VIEIRA, Antonio José Dias, D.S., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2003. **Identificação de QTLs associados à fotossíntese e a características de crescimento em soja.** Orientador: Maurílio Alves Moreira. Conselheiros: Carlos Alberto Martínez y Huamán e Everaldo Gonçalves de Barros.

A identificação de locos controladores de características quantitativas (QTLs - "Quantitative Trait Loci") é importante para elucidar funções fisiológicas complexas em plantas. Em soja (*Glycine max* (L.) Merrill), foram identificados QTLs associados à altura; "resistência à seca"; eficiência do uso da água; massa específica foliar; área foliar; teor de proteínas e óleo na semente. Existem poucas informações sobre os genes que controlam características fisiológicas como taxa de fotossíntese e sobre a base genética da associação entre tais características. Entre os propósitos desta pesquisa, está a Identificação de QTLs associados à fotossíntese e características de crescimento da soja e o estudo de possíveis associações entre estas características pela análise da coincidência de QTLs em grupos de ligação. Objetivou-se também avaliar o potencial de uso de uma população de linhagens endogâmicas recombinantes (RILs - "Recombinant Inbreed Lines") para a identificação de locos associados a caracteres da soja. Neste estudo, foi analisada uma população composta de 118 linhagens RILs nas gerações F₇ e F₈, respectivamente, derivada do cruzamento entre as variedades BARC-8 e a Garimpo, em dois ambientes diferentes, caracterizados pelo uso ou omissão de adubação nitrogenada para as gerações F₇ e F₈, respectivamente. Foram coletados dados sobre a taxa de assimilação líquida de CO₂, taxa de fotossíntese potencial, área foliar, área foliar específica, nitrogênio foliar

específico e para características de partição de massa seca das plantas (massa seca de raízes, nódulos, caules, folhas e vagens). Foram determinadas também características ligadas a produtividade (número de sementes e massa de sementes por planta, massa fresca de cem sementes) e teor de proteína das sementes. Os valores fenotípicos destas características foram associados ao mapa molecular composto por 24 grupos de ligação somando 523,17 cM com 75 marcadores moleculares. Dentre esses, 54 marcadores são do tipo microssatélites e 21 do tipo RAPD. Observou-se um padrão quase constante de separação espacial dos QTLs, considerando as duas gerações / ambientes, a saber: independência dos QTLs relacionados às características foliares (área foliar específica, taxa de assimilação líquida de CO₂ em luminosidade saturante e nitrogênio foliar específico), em relação a QTLs associados aos componentes a biomassa das plantas (massa seca de raízes, caule, folhas, total e vagem por planta) e em relação ao terceiro grupo de QTLs, relacionado a produtividade (massa fresca de cem sementes, número de sementes e de vagens). A coincidência de QTLs no mesmo grupo de ligação indica prováveis associações entre estas características, que foram ratificadas por elevadas correlações fenotípicas. As populações RILs estudadas apresentaram um grande potencial para o mapeamento de loci associados a diferentes características da soja.

ABSTRACT

VIEIRA, Antonio José Dias, D.S., Universidade Federal de Viçosa, April 2003.
Identification of QTLs associated with photosynthesis and growth traits in soybean. Adviser: Maurílio Alves Moreira. Committee Members: Carlos Alberto Martínez y Huamán e Everaldo Gonçalves de Barros.

The identification of controlling loci of quantitative characteristics (QTLs - "Quantitative Trait Loci") presents potential use to study complex physiological functions in plants. In soybean (*Glycine max* (L.) Merrill), it has been identified QTLs associated with plant height; drought resistance; water use efficiency; specific leaf weight; leaf size; seed protein and oil content. Few information exist on the loci that control physiological characteristics as photosynthesis rate and the genetic base of the association among such traits. The purpose of this study was to identify QTLs associated with physiological traits in soybean (*Glycine max* L. Merrill) and to study the possible associations among these traits, by analysing the coincidence of QTLs. Besides, this work aimed at evaluating the potential of utilization of a Recombinant Inbred Lines (RILs) population for mapping loci associated with physiological characters. In this study two soybean generations of RILs were used. These populations consisted of 118 RILs F_7 and F_8 derived lines from the cross BARC-8 x "Garimpo". Which were submitted to the two different environments characterized by the use or not of manuring nitrogen for the generations F_7 and F_8 , respectively. In these populations/environment there were obtained data for photosynthetic carbon assimilation; potential photosynthesis, leaf area; specific leaf area; leaf nitrogen content, as well for traits of partition of dry mass of the plants (roots, nodules,

stems, leaves and pod dry mass) and for productivity (number of seeds, number of pods and mass of seeds per plant, fresh mass of a hundred seeds) and seed protein content. The genetic linkage map is composed by 24 linkage groups adding 523,17cM with 75 molecular markers, being 54 microsatellite and 21 RAPD markers. It was observed, an almost constant pattern of space separation of QTLs, considering the two generations / environment, as such: Independence of QTLs related to leaf traits (specific leaf area, photosynthetic carbon assimilation; specific leaf nitrogen) of those QTLs associated to the components of the partition of biomass of the plants (roots, stems, leaves, plants and pod dry mass) and a third group of related QTLs the productivity (fresh mass of a hundred seeds; fresh mass of seeds, number of seeds and number of pods of plants). The coincidence of QTLs in the same linkage groups indicates probable genetic associations among these characteristics, which were ratified by the high phenotypic correlations. The RILs populations studied presented a great potential for mapping loci associated with different traits in soybean.

IDENTIFICAÇÃO DE QTLs ASSOCIADOS À FOTOSSÍNTESE E A CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO EM SOJA

1. INTRODUÇÃO

O primeiro passo da genética clássica na identificação de genes é a estimativa da herdabilidade do caráter de interesse, em seguida, determinar a localização em mapas genéticos ou nos grupos de ligação do mapa genético. Todavia, a habilidade para tanto depende da precisão em classificar os fenótipos em grupos discretos (variáveis discretas) e do uso de técnicas estatísticas baseadas no teste qui-quadrado (χ^2).

No estudo de variáveis contínuas (caracteres quantitativos), por outro lado, a natureza dessas variáveis torna necessário o estudo da variância, e assim, o uso de uma escala. Independente da natureza da distribuição, contínua ou descontínua, a variação de ambas tem propriedades comuns de segregação, dominância, interação e ligação. Além disto, seguem a genética Mendeliana visto que apresentam a mesma origem cromossômica (Thoday, 1961).

A maioria das características fisiológicas apresenta uma natureza genética quantitativa, o que torna difícil mensurar a contribuição gênica específica para a variação fenotípica. Observa-se que a variância da característica aumenta proporcionalmente com o número de locos envolvidos, e que a contribuição de um determinado loco para a variância fenotípica torna-se, relativamente, pequena e os efeitos de fatores ambientais e de desenvolvimento torna difícil o manuseio independente de um loco (Thoday, 1961).

Recentemente, entretanto, tem sido refutada a suposição de que um grande número de genes por meio de um efeito aditivo com pequenas e similares ações, modulados pelo ambiente, determinam a expressão fenotípica de uma característica quantitativa. Desta forma, atualmente, assume-se que um pequeno número de locos segregantes possa definir a grande parte da distribuição Gaussiana observada para muitas das características quantitativas. O restante da variabilidade fenotípica é verdadeiramente condicionado por numerosos genes com pequenos efeitos. Em relação às características

fisiológicas, pode-se somar centenas de etapas bioquímicas e biofísicas envolvidas em rotas de assimilação de carbono e nitrogênio, nos movimentos de nutrientes das raízes para a parte aérea e no acúmulo de óleo e proteína nas sementes. Entretanto, nem todos os passos são igualmente efetivos no controle dessas rotas. Assim, a importância de cada passo pode variar, dependendo de sua posição na rota e de fatores externos (Prioul *et al.*, 1997).

Durante muito tempo, o estudo dos poligenes apresentou como principal limitação prática a baixa disponibilidade de marcadores polimórficos que estivessem distribuídos ao longo de grandes regiões do genoma. Tal limitação foi gradualmente ultrapassada pelo uso de isoenzimas (Edwards *et al.*, 1987), RFLP (“restriction fragment length polymorphism”), o qual tem provido um número quase ilimitado de marcadores com muitos atributos desejáveis (Paterson *et al.*, 1988).

Mais recentemente, Kolchinsky & Gresshoff (1995) ressaltaram as vantagens de seqüências simples repetitivas (SSR) de DNA, ou microsátélites, como marcadores para a construção de mapas de ligação para a soja [*Glycine max* L. (Merrill)]. Primeiramente, seqüências de DNA repetitivas em *tandem* apresentam elevada variabilidade e assim podem ser utilizadas como marcadores para *fingerprinting*. Em segundo lugar, a facilidade para a sua identificações por meio de hibridização *in situ*. Em terceiro lugar, em alguns casos, as SSR são espécie-específicas, variedade-específicas ou até cromossoma-específicas. A última vantagem está relacionada à posição das seqüências repetitivas nas áreas dos cromossomos que merecem atenção particular, principalmente a dos centrômeros e telômeros. Isto é particularmente importante, devido à predominante localização dos genes vegetais nos segmentos teloméricos dos cromossomos.

Segundo Prioul *et al.* (1997), os pré-requisitos para a detecção de QTLs são: (i) estabelecer uma população de mapeamento que apresente variabilidade genética para a característica de interesse, (ii) estabelecer grupos de ligação genética para a população pela análise da taxa de recombinação entre os marcadores moleculares e (iii) determinar valores fenotípicos para a característica de interesse em cada indivíduo da população. O método mais simples para a identificação de QTLs é uma análise de variância unifatorial. Para cada alelo do marcador é testada a diferença entre as respectivas médias

fenotípicas. Se o teste for significativo, o marcador estaria ligado a um provável QTL que estaria associado a uma determinada característica.

O material vegetal derivado de uma geração F_2 por meio de SSD ("single seed descent"), dará origem às linhagens endogâmicas recombinantes ou RILs ("Recombinant Inbred Lines") que se aproximam da homozigidade após 5 a 6 gerações de auto-polinização. Do ponto de vista prático e genético, as populações RILs são "imortais". Assim, há a possibilidade do acúmulo de dados e novos marcadores no tempo e espaço. Adicionalmente, as plantas da população RIL podem ser multiplicadas em diferentes locais para testar o efeito do meio ambiente (Prioul *et al.*, 1997).

Para *Glycine max*, já foram identificados QTLs associados a diversas características, como a relatadas a seguir: teor protéico na semente (Lee *et al.*, 1996^a; Soares, 2000; Miranda, 2002); teor de óleo na semente (Lee *et al.*, 1996^a e Lee *et al.*, 1996^b); altura da planta, hábito ereto e precocidade (Oliveira, 2002; Lee *et al.*, 1996^b); eficiência do uso da água (Mian *et al.*, 1996); massa específica foliar e área foliar (Mian *et al.*, 1998); características ontogenéticas relacionadas a estádios reprodutivos e produção de sementes (Mansur *et al.*, 1993). Vale ressaltar que dos trabalhos citados, somente os trabalhos de Soares (2000) e Oliveira (2002) utilizaram marcadores microssatélites e RAPD (Miranda, 2002) na avaliação das gerações RILs, enquanto os demais utilizaram RFLP.

Poucos estudos até o momento foram realizados visando identificar quais são os QTLs associados a importantes características fisiológicas, como por exemplo, para a taxa fotossintética. Esse fato pode ser devido à elevada variância definida por vários fatores, como aos efeitos de fatores ambientais, momento diurno de tomada de dados, estágio de desenvolvimento da planta e posição da folha na copa (Lugg & Sinclair, 1981).

Sabe-se que existe elevada variabilidade genética em populações naturais para taxa fotossintética (Curtis *et al.*, 1969 e Dornhoff & Shibles, 1970). A coleta de dados fotossintéticos em genótipos que estão em diferentes estádios de desenvolvimento, provavelmente, influencia negativamente no processo de seleção de linhagens divergentes para esse caráter (Ford *et al.*, 1983).

No estágio reprodutivo de desenvolvimento existem evidências de que

há uma maior demanda de fotoassimilados para a produção de sementes. Conseqüentemente, faz-se necessário que a tomada dos dados seja realizada entre R5 e R6 (Fehr & Caviness, 1977), período que corresponde ao enchimento do grão. Adotando o critério de tomada de dados somente no período de enchimento do grão, Harrison *et al.* (1981), verificaram uma herdabilidade de 0,41, no sentido amplo, para fotossíntese aparente da planta, bem como uma correlação fenotípica positiva de 0,55 com a produção de sementes. Todavia, nesse experimento, as técnicas utilizadas para as medidas de trocas gasosas requereram elevado tempo e custo, pois as mensurações foram efetuadas na copa vegetal como um todo, o que torna inviável sua utilização em programas de melhoramento, onde o número de unidades experimentais é bastante elevado.

Por outro lado, Wiebold *et al.* (1981) observaram uma herdabilidade, no sentido amplo, de baixa a moderada (0,36 a 0,56) para a fotossíntese líquida de folhas individuais, nas gerações iniciais F₃ e F₄, utilizando sistema de análise de gás no infravermelho com temperatura variando de 29 a 31°C e luminosidade saturante. As baixas herdabilidades e os baixos ganhos de seleção (em torno de 5%), obtidas nesse trabalho, foram atribuídos pelos autores, à utilização de gerações iniciais de melhoramento. Conseqüentemente, utilizando-se isolinhas de gerações avançadas será possível melhorar o potencial de seleção para o incremento em fotossíntese.

Vários estudos têm demonstrado que o conteúdo de nitrogênio foliar específico está mais relacionado com a taxa fotossintética do que com seu conteúdo expresso na base de massa seca (Lugg & Sinclair, 1981; Evans, 1983; Suan-Chin *et al.*, 1985 e Sinclair & Horie, 1989). Além disso, Del Pozo *et al.* (2000), confirmaram que a concentração de nitrogênio em órgãos vegetativos (principalmente nas folhas) de leguminosas contribui para a capacidade da planta em suprir a elevada demanda de nitrogênio para a produção das sementes. Esses resultados indicam que a manutenção de um conteúdo protéico crítico em folhas é importante para a manutenção de uma elevada capacidade fotossintética, o que sugere que a seleção de genótipos que acumulem altos conteúdos protéicos nas folhas possa aumentar as suas capacidades em manter a fotossíntese máxima durante o desenvolvimento da semente tendo em vista que uma parte desse nitrogênio é exportada das folhas

para as sementes.

A característica área foliar específica (**SLA**), possivelmente, está correlacionada positivamente tanto com conteúdo de nitrogênio quanto com a taxa fotossintética. Assim, decréscimos na **SLA** estariam correlacionados com a perda de proteínas (teor de nitrogênio) nas folhas com conseqüente diminuição da fotossíntese líquida (Lugg & Sinclair, 1981). Entretanto, não está claro o papel da **SLA** como uma característica, embora exista uma tendência de sua correlação com a suculência das folhas e, em alguns casos, com a fotossíntese foliar, em função de expressar o número total de células do mesófilo foliar por unidade de profundidade (Beadle, 1993). A investigação da base genética para estas características pode ajudar a elucidar essas dúvidas.

Em estudos fisiológicos tradicionais, as relações entre as características fisiológicas são verificadas observando-se alterações correlacionadas entre duas variáveis, ou com o tempo ou em resposta a um determinado fator. Assim, qualquer inconsistência nessas associações, não pode ser explicada em termos de compartimentalização ou interações. Além do mais, não pode ser determinado se tais correlações são induzidas por relações causais entre as características ou por outros fatores, tais como proximidade de ligação entre genes que tem ações contrárias (Prioul *et al.*, 1997).

O estudo da coincidência de QTLs para características correlacionadas é uma excelente ferramenta para a análise da base genética da associação de características fisiológicas (Prioul *et al.*, 1997). Por exemplo, em plantas de milho (*Zea mays* L.), o estudo da coincidência de QTLs para conteúdo de ABA no xilema e para condutância estomática indicaram a associação significativa entre tais características (Lebreton *et al.*, 1995). Portanto, uma determinada característica X apresenta uma relação causa-efeito sobre a característica Y, tais como teor de nitrogênio foliar e taxa fotossintética. Para os QTLs mais significativos associados à característica X, pode-se mensurar seus efeitos na característica Y. Se o controle genético da característica Y (por exemplo taxa fotossintética) é mais complexo do que o da característica X (por exemplo teor de nitrogênio foliar), então a característica Y poderá ter alguns QTLs não coincidentes com aqueles da característica X.

Assim, estudos fisiológicos podem ser beneficiados pelos aspectos do controle genético complexo de características que são obstáculos para o

melhoramento. Para isso é necessário a identificação de vários QTLs ao longo do genoma para teste simultâneo de coincidência entre várias características. Bem como, a existência de QTLs significativos para as características em diferentes condições ambientais. Se duas características estão correlacionadas, existe uma grande chance de termos QTLs associados a uma mesma região cromossômica (Prioul et al., 1997).

Conseqüentemente, para os fisiologistas vegetais, a identificação e análise de QTLs constitui uma poderosa ferramenta para dissecar as bases genéticas que são *a priori* relacionadas. Se as taxas de assimilação líquida de CO₂ (A_{sat}), de fotossíntese potencial (P_{max}) e conteúdo de nitrogênio foliar específico (N) apresentam uma função regulatória sobre o teor de proteína da semente, então, uma vez mapeados QTLs de efeitos significativos para as características A_{sat} , P_{max} e N , poder-se-ia mensurar os seus efeitos na característica teor de proteína da semente. Quando se fizer a identificação de QTLs coincidentes para duas características distintas em um mesmo grupo de ligação a associação fisiológica entre tais fenótipos poderá ser inferida.

O presente trabalho teve como objetivos: (i) identificar QTLs associados à fotossíntese e características de crescimento da soja; (ii) identificar possíveis associações entre caracteres da soja, utilizando a análise da coincidência de QTLs e (iii) avaliar as populações RILs visando sua utilização como população de mapeamento de locos associados a diferentes características da soja.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Esta revisão trata das principais metodologias utilizadas atualmente na busca do entendimento da associação entre características fisiológicas tanto, por fisiologistas quanto por geneticistas e, ou melhoristas vegetais. A principal associação apresentada seria a da produção com outra variável resposta de fácil mensuração e, ou com herdabilidade mais elevada do que a produtividade. O caráter complexo de produtividade da soja é destacado bem como são apresentadas ressalvas aos resultados obtidos em estudos que tentam relacionar características fisiológicas complexas em condições não ordinárias visto que não refletem processos adaptativos. A análise da coincidência de QTLs é apresentada como mais uma ferramenta que pode ser utilizada no estudo dessas associações.

2.1. Produtividade da soja como resultado da expressão gênica modificada pelo ambiente.

A produção de uma cultura depende da quantidade total de fotossíntese durante a fase de crescimento, entretanto há somente evidências limitadas para alguma relação direta entre a performance fotossintética e a produtividade da cultura. A seleção de variedades com alta taxa fotossintética não produziu significativo incremento na produção. Em algumas espécies, como para soja (*Glycine max* (L.) Merrill), existe uma boa correlação entre a fotossíntese total durante o período de crescimento e produção. Em função, neste caso, de um contínuo ajustamento do descarregamento do dreno, simultaneamente com a fotossíntese (Christy e Williamson, 1985).

A produtividade da soja representada pela produção de grãos é o último passo de uma série de processos ao longo do ciclo de vida da cultura. Embora a produção de grãos esteja intimamente relacionada à biomassa produzida, isto é também dependente de processos de iniciação floral, desenvolvimento e enchimento do grão. Durante o ciclo de vida, a cultura passa por vários estádios de desenvolvimento, tais como germinação e estabelecimento da planta, crescimento vegetativo, iniciação e desenvolvimento floral, antese e

desenvolvimento do grão (Fehr e Caviness, 1977).

Cada estágio de desenvolvimento é importante e contribui para a produção final. As sementes são denominadas “drenos”, enquanto as folhas e outras partes da planta que são capazes de realizar fotossíntese são denominadas “fontes”. Em outras culturas, tubérculos, caules, fibras, etc. podem ser drenos, enquanto o caule, frutos e outras estruturas com cloroplastos podem servir como fontes, o que pode ser essencial para a complementação como fonte para o sustento dos drenos.

A produtividade de uma cultura ou ecossistema natural pode ser expressa em termos de componente de interesse ou pela produção de biomassa total acima e abaixo do solo. Para soja, por exemplo, a produtividade é normalmente expressa em termos de índice de colheita (IC):

$$IC = (\text{produto econômico/biomassa total}) \times 100$$

O IC tem sido manipulado para inúmeras culturas. No entanto, existem limitações (físicas e fisiológicas) para atingir este objetivo, pois as plantas requerem um mínimo de suporte e área foliar para realizar a fotossíntese, respectivamente, por meio do caule e folhas.

Apesar dessas limitações, a cultura da soja que, no início do século, era primariamente utilizada como forragem (Em 1929, 60% do total de soja produzida era armazenada como forragem), a partir de 1945, ocorreu uma mudança e somente 15% da produção é destinada para forragem, devido ao melhoramento com o desenvolvimento de cultivares que permitiram a transição para a produção de grãos (Burton, 1997).

Passados 30 anos, a produção da soja nas Américas Central e do Sul aumentou dramaticamente devido, principalmente, a adaptação da cultura a novas regiões geográficas. As cultivares dos Estados Unidos da América e Canadá proveram material para os programas de melhoramento da soja nas Américas, o que pode ocasionar o estreitamento da base genética, e por conseguinte da variabilidade genética que é um pré-requisito básico para programas de melhoramento. Outros fatores que contribuíram para o incremento da produção de sementes da soja foram à incorporação de genes de resistência a doenças e a nematóides (Burton, 1997).

Todavia, o IC oferece poucas informações sobre as mudanças que ocorrem durante o crescimento da cultura. A análise da taxa de assimilação de

CO₂ fotossintético em folhas e copa, pode descrever as respostas das plantas ao meio ambiente. No entanto, nenhuma destas técnicas providencia informações acerca da partição de massa seca para uma nova área foliar (que pode ter uma considerável influência na produção), ou sobre a competição entre drenos que determinam de fato se o carbono fixado durante a fotossíntese será convertido, por exemplo, para óleo, proteína ou carboidratos (Beadle, 1993).

A modificação genética do metabolismo vegetal surgiu durante a década de 90, propiciando informações novas sobre o controle do metabolismo vegetal. O conceito de enzimas chaves tem sido recentemente modificado. Enzimas que catalisam reações praticamente irreversíveis e sujeitas a um mecanismo complexo de *controle fino* representam os melhores alvos porque elas exercem a maior parte do controle do fluxo metabólico (Matthew *et al.*, 2001).

No ciclo de Calvin, pelo qual carbono entra nas reações fotossintéticas, existem quatro enzimas irreversíveis chaves: na fase de carboxilação, existe a Rubisco e na fase de regeneração, a frutose-1,6-bifosfatase, sedoheptulose-1,7-bifosfatase e a fosforibulocinase (Matthew *et al.*, 2001).

O acúmulo de massa seca na planta é determinado pelo balanço entre a fotossíntese e respiração para manutenção das estruturas existentes e da respiração de crescimento para produzir novos componentes estruturais. Uma porção substancial da respiração de crescimento envolve a oxidação de fotosintetizados necessários para produzir esqueletos de C requeridos para a assimilação de N (Lewis *et al.*, 2000).

A taxa de fotossíntese foliar depende, fundamentalmente, do suprimento de dióxido de carbono e luz, como energia para o processo fotossintético no cloroplasto e da demanda para os produtos da assimilação de carbono. Em *G. max*, Foyer (1988) mediu a taxa fotossintética máxima foliar em condições de radiação fotossinteticamente ativa (PAR) constante e saturante de CO₂, observando-se incremento da taxa fotossintética nas primeiras horas de iluminação, seguindo-se de um período de declínio, não sendo este devido a fotoinibição. A possível inibição da fotossíntese nestas condições possivelmente foi devido a um mecanismo de inibição por retroalimentação pela limitação no processo de exportação de sacarose do mesófilo foliar, visto

que a taxa de exportação estaria correlacionada positivamente com a taxa fotossintética e com a atividade da sacarose fosfato sintase e negativamente correlacionada com os níveis de frutose-2,6-bifosfato. Em muitos casos, a remoção dos drenos pode aumentar a concentração de sacarose nas folhas e uma severa limitação da fotossíntese (Foyer, 1988).

O acúmulo de sacarose no mesófilo foliar pode resultar em um incremento de sua hidrólise que acoplado a refosforilação de hexoses livres produz glicose-P e frutosefosfato, resultando num seqüestro de fosfato inorgânico (Pi) citosólico, incrementando a síntese de frutose-2,6-bifosfato e decréscimo na fotossíntese total.

O mecanismo pelo qual a modulação por retroalimentação afeta a fotossíntese, preconizado por Foyer (1988) explica que durante a quebra de uma molécula de sacarose, via atividade de invertase, e subsequente metabolismo de glicose e frutose pode requerer duas moléculas de adenosina trifosfato (ATP) para produzir duas moléculas de frutose-6-fosfato. Este incremento na concentração pode estimular a síntese de frutose-2,6-bifosfato o que, por sua vez, pode ter dois efeitos. Primeiro, a frutose-1,6-bifosfatase citoplasmática pode ser inibida. Segundo, a enzima fosfofrutocinase dependente de pirofosfato pode ser ativada e uma alta concentração de frutose-6-fosfato pode favorecer a produção de frutose-1,6-bifosfato. Isto pode retroalimentar o aumento do conteúdo de trioses fosfatos. O efeito final destes eventos seria o incremento da taxa triose fosfato/Pi no citosol diminuindo, assim o nível de ortofosfato no cloroplasto.

Foi proposta por Pollock e Farrar (1996), uma extensão à hipótese apresentada por Foyer (1988), a qual preconiza que a sacarose pode regular o “metabolismo fonte” *silenciando* genes que codificam proteínas envolvidas na fotossíntese, e no “metabolismo dreno” ativando genes que codificam proteínas envolvidas na hidrólise da sacarose e crescimento. Por exemplo, Pollock e Gallagher (2002) verificaram uma relação positiva entre o acúmulo de sacarose e a abundância de transcritos de genes codificadores de invertases tanto nas células da bainha do feixe vascular quanto nas células do mesófilo foliar.

2.2. Uso de plantas transgênicas na busca do entendimento das associações entre características fisiológicas.

A modificação genética do metabolismo vegetal surgiu durante a década de 90, propiciando informações novas sobre o controle do metabolismo vegetal. A possibilidade de silenciar ou sobre-expressar determinados genes associados a uma determinada característica e ao mesmo tempo medir o efeito deste procedimento sobre outra característica vem sendo utilizada por vários pesquisadores interessados no entendimento das associações entre características fisiológicas.

Galtier *et al.* (1993) observaram que em plantas de tomate super-expressando genes de milho para sacarose fosfato sintase (SPS), a taxa sacarose/amido nas folhas aumentou, porém sem alterar a taxa fotossintética. Os autores concluíram que os aumentos na concentração de sacarose a um decréscimo desprezível da fotossíntese.

Heineke *et al.* (1999) descreveram que em plantas com a expressão anti-senso da rubisco ativase, tanto a sua quantidade quanto sua atividade foram reduzidas. Isto possivelmente influencia a indução da senescência foliar no início do processo de aclimatação, com somente moderados decréscimos na taxa de assimilação de CO₂. Estes autores concluíram que o acúmulo de carboidratos, especialmente sacarose, em folhas desempenharia um papel reduzido na aclimatação da fotossíntese ao CO₂, pois a síntese de amido funciona como um eficiente tampão de fotoassimilados.

Foram obtidas plantas transgênicas de tabaco, senso e anti-senso, para uma proteína de ligação de sacarose (SBP) em *G. max* relacionada ao transporte de sacarose das células companheiras para o floema. Observou-se nas plantas anti-senso que apresentaram inibição do gene do transportador H⁺/sacarose, decréscimo no crescimento e desenvolvimento, diminuição da taxa fotossintética, do teor de sacarose, e da razão sacarose/amido, indicando que a partição de fotoassimilados favorece o acúmulo de amido (Pedra *et al.*, 2000). Tais dados ratificam as conclusões descritas por Heineke *et al.* (1999).

Existem também evidências de que hexoses, como a glicose, seja sinalizadora no controle da expressão gênica, metabolismo e processos de desenvolvimento em plantas. A rota genética para o estudo de plantas

mutantes para etileno que originalmente era considerada como linear agora incorpora a rota de sinalização da hexocinase dependente de glicose em mutantes de *Arabidopsis* (Sheen *et al.*, 1999).

2.3. Uso de isótopos radioativos no estudo das associações entre características fisiológicas.

Recentemente, a partição de fotoassimilados tem sido monitorada utilizando isótopos radioativos o que permite a mensuração contínua e *não invasiva* da distribuição de traços radioativos entre os órgãos vegetais, enquanto pulsos repetidos de $^{14}\text{CO}_2$ são administrados para a planta (Thorpe *et al.*, 1998). De maneira semelhante, o metabolismo do nitrogênio também pode ser estudado utilizando isótopos radioativos (Shearer *et al.*, 1982).

Estudou-se o efeito da exposição do sistema radicular a uma atmosfera com 100% de O_2 e 100% de N_2 , sobre a partição de fotoassimilados medido pela atividade relativa do ^{14}C . Foi observado que quando a respiração do nódulo foi inibida (tratamento 100% de N_2) a partição de carbono foi alterada, direcionando-a para a parte aérea em detrimento ao nódulo (Thorpe *et al.*, 1998).

Pausch *et al.* (1996) utilizando o método de diluição de ^{15}N para estudar partição de nitrogênio fixado simbioticamente em plantas de *G. max* submetidas a pressões parciais de O_3 crescentes também notaram o efeito desse fator ambiental sobre a partição desse elemento químico.

2.4. Ressalvas sobre as correlações entre características fisiológicas determinadas em ambientes estressantes e por meio de plantas transgênicas.

Segundo Geiger (1987), três doutrinas são importantes para entender a complexa interação entre fotossíntese, partição e translocação de carbono. Primeiro, durante o curso destes processos, sistemas se adaptam aos requisitos do meio ambiente. Segundo, em resposta a essas influências externas, regras simples governam o modo como os componentes interagem para produzir um comportamento complexo. Terceiro, o complexo

comportamento resultante emerge das interações que são uma propriedade do sistema como um todo.

Geiger (1987) faz ressalvas aos resultados obtidos em estudos que tentam relacionar o acúmulo de certos solutos ou compostos armazenadores de carbono na folha com a inibição da fotossíntese, visto que em plantas intactas as reais condições não são conhecidas. As respostas a estresse são interessantes, porém talvez não sejam idênticas a respostas adaptativas.

A fim de aumentar as respostas de um mecanismo de resposta potencial, utiliza-se tratamentos drásticos (estresse ambiental), porém a resposta deste modo determinada não reflete o mecanismo de controle do metabolismo vegetal que opera em circunstâncias mais ordinárias. Assim sendo, as associações entre determinadas características fisiológicas determinadas em condições de estresse ambiental podem não ser as mesmas daquelas observadas nas condições normais da vida vegetal. De forma semelhante às associações entre características fisiológicas inferidas por meio das técnicas de repressão *anti-senso* ou *senso*, pois o *silenciamento* ou sobre-expressão de um determinado gene implica em uma condição de estresse metabólico e não expressa as condições ordinárias na célula. Por exemplo, muitas vezes, as alterações dos genes ocasionam mudanças drásticas no processo de crescimento e desenvolvimento das plantas (Pedra *et al.*, 2000 e Heineke *et al.*, 1999). De forma semelhante, Bevan *et al.* (2002) descrevem que alterações da expressão de “genes regulados por açucares” (*ApL3*, *At4g39210*) que codificam uma subunidade grande da ADP glicose pirofosforilase (AGPase, a enzima catalizadora do primeira reação para a síntese do amido) ocasionaram tanto mudanças fisiológicas, metabólicas e de desenvolvimento. Portanto, as características fisiológicas são medidas em linhagens transgênicas que estão em estádios distintos de desenvolvimento o que complica a interpretação dos dados obtidos.

A tecnologia anti-senso tem sido utilizada para o estudo de passos específicos no processo de resposta ao estresse, mediado por ácido abscísico (ABA) um hormônio vegetal (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 1997). No entanto, as estratégias utilizadas de biologia molecular para a transformação de plantas são muito complexas, especialmente, para muitas espécies de cereais que não são fáceis de transformar. Outra limitação é que somente um

(excepcionalmente dois) gene(s) e, ou característica(s) pode(m) ser estudada(s) ao mesmo tempo. Estes fatos explicam os baixos resultados de programas de melhoramento vegetal visando conferir resistência a estresses abióticos. Pois, sabe-se que as respostas das plantas a estresses abióticos são reguladas por poligenes que muitas vezes são afetados indiretamente por epistasia ou pleiotropia.

2.5. A análise da coincidência de QTLs como metodologia tanto para o estudo de associação de características fisiológicas quanto no estudo de respostas das plantas a estresses ambientais.

A identificação de locos controladores de características quantitativas (QTLs - "Quantitative Trait Loci") também pode ser mais uma ferramenta para contribuir para o entendimento dos processos de partição de fotoassimilados em plantas. Por causa da baixa herdabilidade de caracteres como a produção, os melhoristas sempre observam outras características associadas que apresentem altas herdabilidades, no entanto o maior problema nestes estudos é o de descobrir o grau de associação da característica com a produção (Quarrie, 1996).

Com o desenvolvimento de novos marcadores moleculares de DNA é possível construir mapas genéticos saturados de um particular genoma usando uma apropriada população de plantas. Se nestas plantas são também mensuradas específicas características fisiológicas, por exemplo, teor de sacarose nas folhas, taxa de assimilação de CO₂ foliar e produtividade, pode-se identificar o número mínimo e a provável localização dos genes que controlam tais características bem como estudar as possíveis interações entre tais características por meio da análise da coincidência dos QTLs.

A introdução da teoria dos fatores limitantes à fotossíntese tem sido uma doutrina em fisiologia vegetal que define que somente poucos passos podem limitar uma função complexa. Evidentemente, isto somente se torna válido se a "rota" de inferência entre a variável independente e a fotossíntese seja a mais curta possível.

As características fisiológicas são definidas por poligenes e assim tendem para uma natureza genética quantitativa, o que torna difícil mensurar a contribuição gênica específica para a variação fenotípica. Nota-se que a

variância da característica aumenta proporcionalmente com o número de locos envolvidos, e que a contribuição de um determinado loco para a variância fenotípica torna-se, relativamente, pequena e o efeito de fatores ambientais e de desenvolvimento torna difícil o manuseio independente de um loco (Thoday, 1961).

Recentemente, entretanto, tem sido refutada a suposição de que um grande número de genes por meio de um efeito aditivo com pequenas e similares ações, modulados pelo ambiente determinam a expressão fenotípica. Assim sendo, atualmente, assume-se que um pequeno número de locos segregantes pode definir grande parte da distribuição Gaussiana observada para muitas características quantitativas como, por exemplo, para a taxa de assimilação de CO₂. O resto da variabilidade fenotípica é, verdadeiramente, condicionada por numerosos genes com pequenos efeitos.

A localização de QTLs pode ser efetuada por meio do estudo da segregação de marcadores simples e um mapa de ligação saturado dá a oportunidade de rastrear todo o genoma em busca de QTLs com efeitos significativos. Atualmente, estão disponíveis softwares que possibilitam a construção de mapas a partir de taxas de recombinação entre marcadores de locos. O mais popular software usado em genética vegetal é o MAPMAKER (Lander *et al.*, 1987). Para muitos genomas, 100-150 marcadores de locos espaçados uniformemente podem ser suficientes para cobrir o genoma, permitindo a elaboração de um mapa genético, onde pelo menos algum ponto do genoma é geneticamente ligado a pelo menos um marcador.

A detecção de um QTL é o primeiro passo para atingir a meta de identificação de um gene que participa do controle da característica quantitativa. A precisão da localização do QTL depende do tamanho do efeito do QTL, do tamanho da população e do nível de saturação do mapa.

Em plantas de *Zea mays* L., realizou-se um estudo da coincidência de QTLs controladores do conteúdo de ABA no xilema e dos associados a condutância estomática, bem como de várias outras características associadas ao estresse hídrico. A comparação da coincidência de QTLs para o conteúdo de ABA e condutância estomática mostrou que o conteúdo de ABA no xilema teria um papel regulatório sobre a condutância estomática foliar mais do que o conteúdo de ABA foliar. O conteúdo de ABA no xilema e nas folhas foi

associado, significativamente, com importantes características da raiz para a regulação da resposta ao estresse (Lebreton *et al.*, 1995).

De Vienne *et al.* (1999) estudaram locos controladores de quantidades proteicas (PQLs - "Protein Quantity Loci") associados a proteínas induzidas por seca (pl 5,5 e MM 39 KDa) observando que os PQLs estavam ligados a três QTLs de crescimento em condições de estresse, nos cromossomos 1, 4 e 8. Os alelos de efeito positivo dos PQLs estavam associados com os alelos de efeito negativo para o crescimento. Isto é, quanto mais proteína, menor será o crescimento em condições de estresse por seca, pois a tríplice coincidência de locos é muito improvável ser por simples acaso, sugerindo uma forte ligação fisiológica entre a proteína e a característica.

Ao identificar QTLs associados a características da raiz de *Zea mays* e de *Oriza sativa*, por interpolação da localização dos marcadores, foi possível considerar que as características da raiz são reguladas por genes homólogos entre as duas espécies (Vienne *et al.*, 2001).

O pré-requisito fundamental em estudos que visem o entendimento de respostas integradas é o da tomada de dados de vários parâmetros por um período extenso dentro de condições reais (Geiger, 1987). Não é suficiente testar possíveis associações entre características fisiológicas e bioquímicas por comparação de fenótipos e pela análise de suas correlações. O desenvolvimento da tecnologia de marcadores moleculares oferece uma poderosa ferramenta alternativa para examinar as relações entre as características (Prioul *et al.*, 1997).

Estudos coordenados a nível molecular são necessários para um entendimento prático do funcionamento de plantas intactas. O estudo das interações entre fotossíntese, translocação e partição de carbono pode ser realizado pela aplicação de análises a nível molecular em partes isoladas das plantas, impondo condições bem definidas e observando respostas diretas.

A utilização de isótopos radioativos provém informações sobre a dinâmica dos processos. As informações, assim obtidas, poderão ser ratificadas pela análise das relações entre as características ao nível de DNA, oferecida pelo estudo de QTLs, clonagem e sequenciamento de genes. Adicionalmente, poder-se-ia testar a expressão destes QTLs transferindo estas regiões cromossômicas para plantas transgênicas, originando informações que

poderão ser utilizadas para incrementar o rendimento econômico da soja.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material genético

Neste estudo foram utilizadas como material vegetal 118 linhagens endogâmicas recombinantes (RILs - "Recombinant Inbred Lines") derivadas do cruzamento entre as variedades BARC-8 e Garimpo.

A variedade BARC-8, obtida de "Beltsville Agriculture Experiment Station-USDA", Beltsville, MA, EUA, apresenta alto teor de proteína nas sementes, em torno de 50%; enquanto que a variedade Garimpo apresenta um teor de proteína de cerca de 36% (Soares, 2000).

A geração F₆ das RILs foi obtida por Soares (2000), pela descendência, a partir da geração F₂, de uma única semente de cada planta. A partir da geração F₆, por autopolinização, foram obtidas as gerações F₇ e F₈ que conjuntamente com os parentais constituíram o material genético utilizado neste trabalho. Cada RIL foi representada por cinco plantas.

3.2. Condições de cultivo e critérios para as mensurações dos dados fenotípicos

As gerações RILs F₇ e F₈ e os parentais foram cultivadas em casa de vegetação. Os plantios foram realizados no mês de dezembro dos anos de 1999 e 2000, para as gerações F₇ e F₈, respectivamente. Para tanto, foram utilizados vasos plásticos contendo 2,5 L de uma mistura de solo:esterco:areia (3:1:1). Em 1999, durante o preparo da mistura de solo, esterco e areia foi incorporado aproximadamente 330kg de N ha⁻¹, 64 kg de P₂O₅ ha⁻¹ e 141 kg de K₂O ha⁻¹. Porém, em 2000 a adubação nitrogenada foi omitida enquanto a incorporação de fósforo e potássio foi mantida.

As coletas dos dados fenotípicos foram realizadas no período entre a segunda semana do mês de fevereiro e segunda semana de março, nos anos de 2000 e 2001, respectivamente.

Em janeiro de 2000, um ensaio preliminar foi realizado para definir qual a posição da folha e o nível de radiação fotossinteticamente ativa (PAR, "Photosynthetically Active Radiation") saturante, para a determinação da

fotossíntese líquida em luminosidade saturante (A_{sat}) em toda a população. As plantas dos parentais BARC-8 e Garimpo, no estágio de desenvolvimento entre R5 e R6 (Fehr & Caviness, 1977) foram utilizadas em um ensaio preliminar para escolher o nível de PAR saturante entre zero e $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e a posição da folha na copa. Para tanto, foi utilizado um IRGA, sistema para análise de gases no infravermelho, Li-6400 (Li-Cor, Lincoln, NE) com uma fonte luminosa de luz vermelha/azul, Li-Cor 6400-02B LED Red/Blue light source (Li-Cor Inc., Lincoln, NE) e temperatura fixa de 25°C como descrito por Griffin & Luo (1999).

Além dos critérios (i) posição da folha, (ii) PAR e (iii) temperatura, a tomada de dados sobre as características taxa de fotossíntese líquida de CO_2 em luminosidade saturante (A_{sat}); fotossíntese potencial (P_{max}) e do nitrogênio foliar específico, g N m^{-2} (N), foi restrita às folhas totalmente expandidas que continham, pelo menos, uma vagem associada no estágio de enchimento dos grãos (entre R5 e R6).

Nas mesmas folhas que foram selecionadas para a medição da fotossíntese líquida, determinou-se a taxas de evolução de O_2 em condições saturantes de CO_2 e luminosidade, ou seja, fotossíntese potencial (P_{max}), expressa em $\mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, utilizando um eletrodo de oxigênio *Hansatech* (Hansatech Ltda, King's Lynn, Reino Unido), regulado para que, sobre uma amostra de disco foliar de 10 cm^2 , a intensidade de radiação se mantivesse entre 1.500 a $1.800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; em condição saturante de CO_2 , mediante utilização de uma solução 2 M de carbonato de potássio e submetido a temperatura de 25°C . Em seguida, para a geração F_8 , retirou-se uma amostra adicional de disco foliar que, em conjunto com a primeira, foram utilizadas para as coletas de dados de N , utilizando o método Kjeldahl, como descrito por Lugg & Sinclair (1981).

No estágio de enchimento dos grãos (entre R5 e R6) em duas plantas de cada RIL, após a coleta da amostra de discos foliares, a área foliar (A) foi estimada, utilizando-se um integrador de área foliar ΔT , area meter, modelo MK2 (AT Delta-T Devices Ltda). Após um período de 48 h de secagem a 70°C , até massa constante, foram determinadas as massas secas, utilizando-se balança de precisão, expressas em gramas, dos seguintes órgãos: caule (W_C), folhas (W_F), raízes (W_R), vagens (W_V) e total (W_T). Adicionalmente, na geração

F_8 , a massa seca dos nódulos das raízes (W_N) e o número de nódulos por planta (N_N) também foram obtidos. Baseando-se nos dados primários de massa seca foliar e área foliar, foi calculada a área foliar específica (**SLA**) que representa a área foliar (m^2) por unidade de peso foliar, Kg. Nas três plantas restantes, no estágio de desenvolvimento R8 mais 10 dias (Fehr & Caviness, 1977), foram obtidas características de produtividade, expressas em massa fresca de sementes por planta em gramas (W_S) e massa fresca de cem sementes em gramas (W_{CS}) e de qualidade de produção expressa em teor de proteínas (**%P**), utilizando-se o método Kjeldahl, segundo o procedimento descrito em Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (Instituto Adolfo Lutz, 1985).

Para cada caráter foram construídos gráficos de distribuição de frequência e efetuado o teste de Lilliefors visando verificar se os dados apresentavam-se normalmente distribuídos, segundo proposto por Demétrios (1978). Adicionalmente, foram calculados os valores médios, o intervalo de confiança da média, desvios padrões e registrados os valores máximos e mínimos.

Em seguida, foi efetuada a análise de variância individual dos dados coletados nos dois ambientes considerados, ambientes A e B, respectivamente. O delineamento considerado foi o inteiramente casualizado (Tabela 1). A variância fenotípica ($\hat{\sigma}_f^2$) foi estimada pela razão entre o quadrado médio dos tratamentos ou genótipos (QMG) e número de repetições (k) consideradas para cada característica. Enquanto a variância genotípica ($\hat{\sigma}_g^2$) foi estimada utilizando a seguinte equação: $\hat{\sigma}_g^2 = (QMG - QMR) / k$. Em que QMR, representa o quadrado médio do resíduo.

A herdabilidade no sentido amplo (h^2_A) foi estimada pela equação: $(\hat{\sigma}_g^2 / \hat{\sigma}_f^2) \times 100$.

Foi efetuada a análise de variância conjunta dos dados fenotípicos para as características avaliadas em ambas gerações e ambientes, visando avaliar a existência de variabilidade genética significativa entre as linhagens e da interação com o meio ambiente. O esquema da análise de variância é apresentado na Tabela 1.

Também foram construídas matrizes de correlação fenotípicas entre todos os caracteres avaliados. As correlações fenotípicas entre as características foram comparadas com a coincidência, ou não, de QTLs identificados para os respectivos fenótipos em cada ambiente.

Tabela 1. Esquema da análise de variância e esperanças dos quadrados médios para a análise simples e conjunta dos ensaios.

Fonte de variação	Grau de liberdade	Esperança do quadrado médio	Quadrado médio	F
Genótipo	$g-1$	$S^2 + kS_g^2$	QMg	QMg / QMr ₁
Resíduo	$g(k-1)$	S^2	QMr ₁	
Ambiente	$a-1$	$S^2 + kS_{ga}^2 + gkS_a^2$	QMa	QMa / QMr ₂
Genótipo	$g-1$	$S^2 + kS_{ga}^2 + akS_g^2$	QMg	QMg / QMr ₂
Ambiente x Genótipo	$(a-1)(g-1)$	$S^2 + kS_{ga}^2$	QMag	QMag / QMr ₂
Resíduo	$a(k-1)(g-1)$	S^2	QMr ₂	

QMg representa o quadrado médio associado aos genótipos; QMa o quadrado médio relacionado ao fator ambiental; QMag o quadrado médio da interação entre o genótipo e ambiente; QMr₁, o quadrado do resíduo utilizado na análise de variância simples e o QMr₂ o quadrado médio referente ao resíduo utilizado na análise de variância conjunta.

3.3. Mapeamento de QTLs

Para o mapeamento de QTLs ligados às características fisiológicas, os valores fenotípicos das características foram associados a um mapa de ligação molecular. O mapa molecular, definido inicialmente por Soares (2000) utilizando marcas de microssatélites foi posteriormente saturado parcialmente com marcas de microssatélites (Oliveira, 2002) e com outras marcas de RAPD (Miranda, 2002). Este mapa utilizou, como referência, a nomenclatura para os grupos de ligação descrita por Cregan *et al.* (1999) que trabalharam com populações F₂ de um cruzamento interespecífico *G. soja* e *G. max*.

O mapa utilizado neste estudo possui 24 grupos de ligação (GL) somando 523,17cM contendo 75 marcadores moleculares. Desses, 54 marcadores são do tipo microssatélites e 21, tipo RAPD.

Os marcadores microssatélites e RAPD foram codificados como “A” para os alelos vindos de Garimpo e como “B” para os alelos vindos de BARC-8. As falhas foram codificadas com o sinal (-). Como os dados foram codificados para RILs, heterozigotos eventuais foram descartados. A segregação de cada fragmento polimórfico foi testada na população por meio do teste qui-quadrado. Apenas os fragmentos cuja segregação se ajustou à proporção esperada 1:1 ($P < 0,05$) foram utilizados nas análises posteriores.

O mapeamento dos marcadores microssatélites e RAPD e o estabelecimento dos grupos de ligação foram feitos com o uso do programa GQMol (Cruz & Schuster, 2000). Os marcadores foram agrupados, utilizando-se *LOD score* mínimo de 3,0 e frequência máxima de recombinação de 0,40. A distância de mapeamento de Kosambi foi utilizada para a conversão da frequência de recombinação para centiMorgans (cM).

As informações do mapa de ligação foram utilizadas para mapear os QTLs ao longo dos grupos de ligação por meio do mapeamento por intervalo composto (Zeng *et al.*, 1993; 1994), empregando-se o programa Windows QTL Cartographer version 2.0 (Basten *et al.*, 2002).

A significância de um QTL é atribuída pela razão de máxima verossimilhança entre a hipótese de existência do QTL e a hipótese de que nenhum QTL existe em determinada posição do mapa (grupo) de ligação

O ponto de corte da razão de máxima verossimilhança para considerar a presença de um QTL pelo método de mapeamento por intervalo composto foi obtido a partir de um teste de permutação como relatado por Deorge *et al.* (1996).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise da distribuição de frequência dos dados fenotípicos e comparação dos dados obtidos nas populações RILs F₇ e F₈ com aqueles apresentados na literatura.

Na Figura 1, estão representadas as relações entre a taxa de assimilação líquida de CO₂ e densidade de fluxo de fótons para os parentais, na terceira folha a partir do topo das plantas. Nesta posição foram verificadas as maiores taxas fotossintéticas (dados não mostrados). A densidade de fluxo de fótons de 1.500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foi considerada como saturante. Este valor é idêntico ao utilizado por Griffin & Luo (1999) e está de acordo com o preconizado por Harrison *et al.* (1981), que estimou a A_{sat} somente quando a PAR atingia valores superiores a 1.420 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ em condições de campo. Também há relatos na literatura do uso de outros valores de PAR para a estimativa de A_{sat} . Por exemplo, 1.200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Earl, 2002), 1.400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Wielbold *et al.*, 1981), 1.420 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Boo-Long *et al.*, 1983), 1.675 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Dornhoff & Shibles, 1970). Provavelmente, esses autores obtiveram diferentes curvas de resposta entre a taxa de assimilação líquida de CO₂ e irradiância, devido à variação de vários fatores nesses experimentos, como por exemplo, a variação da base genética do material vegetal, temperatura de medida da A_{sat} , estádios de desenvolvimento da planta e ou foliar.

A natureza dos caracteres quantitativos pressupõe uma distribuição normal dos dados (Thoday, 1961). Na Figura 2 são apresentadas algumas das distribuições de frequências construídas para os dados fenotípicos medidos na geração F₇, enquanto que na Figura 3 são apresentadas algumas distribuições para dados colhidos na geração F₈. Pode-se notar nas Figuras 2 e 3 que é razoável estudar os dados através da distribuição normal, o que também é verdadeiro para as demais variáveis analisadas neste experimento (ANEXO, Figuras 11 e 12). Este fato ratifica que as características estudadas são herdadas quantitativamente.

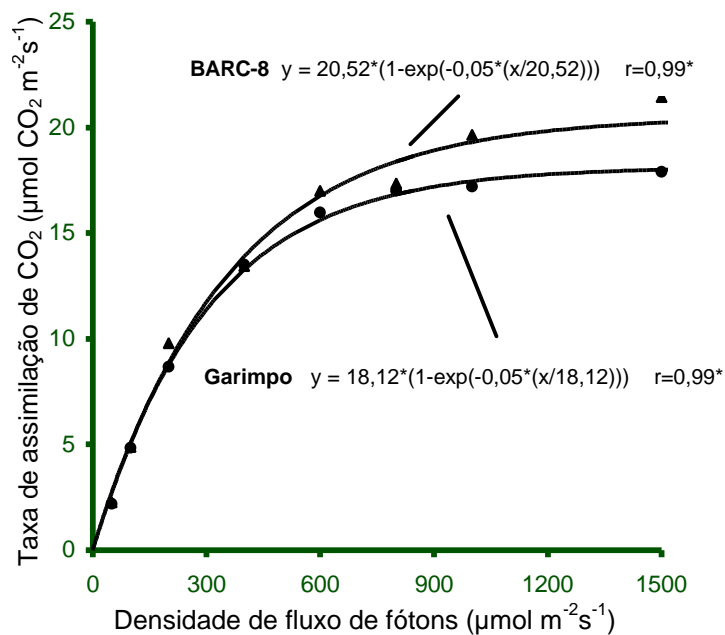


Figura 1. Relação entre a densidade de fluxo de fótons e a taxa de assimilação de CO_2 medida nos parentais, BARC-8 (?) e Garimpo(?), das gerações RILs. Os dados foram obtidos de folhas jovens totalmente expandidas posicionadas no terceiro nó a partir do topo de plantas no estágio de desenvolvimento entre R5 e R6, com temperatura de câmara do analisador de gases no infravermelho ajustada para 25°C .

Observou-se na geração F_8 que os valores de N variaram entre 0,36 e $3,42\text{ g N m}^{-2}$ nas folhas em foram medidas a taxa fotossintética, com valor médio de $1,63\text{ g N m}^{-2}$ para a população de RILs (Tabela 3). Este dado é semelhante a média de $1,57\text{ g N m}^{-2}$ que é razoavelmente constante para espécies domesticadas, gramíneas, árvores decíduas e espécies arbóreas da floresta equatorial (Schulze, 1994) e também é semelhante ao valor de $1,60\text{ g N m}^{-2}$ observado por Pengelly *et al.* (1999) para plantas de *G. max* no estágio reprodutivo de desenvolvimento.

Segundo Medlyn (1996) a taxa fotossintética pode ser controlada pela taxa de regeneração da ribulose-1,5-bisfosfato, atividade da enzima fixadora de CO_2 , ou seja, da ribulose -1,5 - bifosfato carboxilase – oxigenase ou Rubisco, e pela taxa de regeneração do fosfato inorgânico. Esses processos dependem, em algum nível, do conteúdo de nitrogênio foliar, tendo em vista que em folhas de plantas C_3 , a Rubisco representa 50% ou mais da quantidade total de proteínas solúveis (Sinclair & Horie, 1989). Por outro lado, em condições de estresse ambiental ou de ciclo de vida longo, em que o crescimento é reduzido e a razão C/N é alta, o nitrogênio foliar específico em g N m^{-2} (Pengelly *et al.*,

1999) pode aumentar em função da concentração de nitrogênio de tecidos não fotossintéticos ou daqueles requeridos para a proteção do vegetal (Schultz *et al.*, 1994).

Sabe-se também que há um declínio do teor de nitrogênio foliar a partir do topo da planta em direção à base (Medlyn, 1996). Esse fator foi considerado neste trabalho padronizando a coleta de dados somente em folhas completamente expandidas contendo pelo menos uma vagem associada e posicionada, geralmente, no terceiro nó a partir do ápice da planta.

Para *G. max*, em condições de luminosidade saturante, Sinclair & Horie (1989) verificaram que o N variou entre 1,0 e 3,0 g N m⁻². Enquanto que, entre os estádios R5 e R6, o N atingiu o valor máximo de 2,8 g N m⁻². Já no estágio de abscisão foliar detectou-se o valor mínimo de 0,82 g N m⁻² (Boon-Long *et al.*, 1983). Valores de 1,12 a 4,0 g N m⁻² foram observados para folhas posicionadas no terço superior para duas cultivares de *G. max* (Lugg & Sinclair, 1981). Ainda, em plantas de *G. max*, verificou-se que os teores de nitrogênio foliar específico são estáveis durante o período reprodutivo variando de 1,60 a 1,04 g N m⁻² (Pengelly *et al.*, 1999).

A **SLA** (m² Kg⁻¹) pode decrescer sistematicamente com o estágio fisiológico vegetal e com a idade das folhas, mas incrementa do ápice para a base da planta, pois as folhas posicionadas em nós inferiores já atingiram teoricamente a maturidade, ou seja, atingem a área foliar máxima com decréscimo da interceptação luminosa (Beadle, 1993).

No presente estudo, a **SLA** foi determinada em todas as folhas da planta, desconsiderando-se o efeito da posição da folha no caule. Portanto foi obtido um valor integral de **SLA** para a planta no estágio reprodutivo entre R5 e R6.

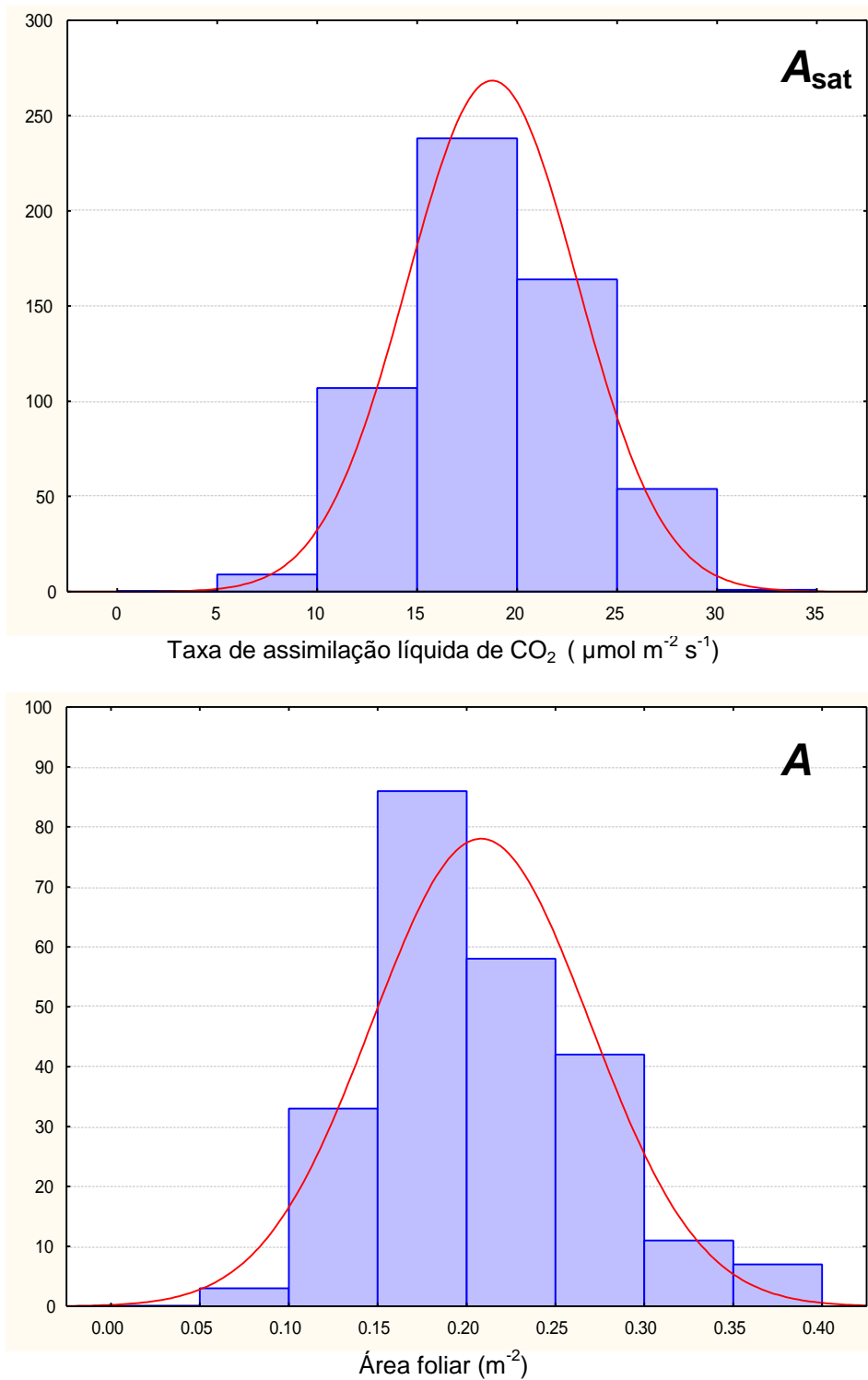


Figura 2. Distribuição de freqüência dos dados fenotípicos de algumas características mensuradas na geração F₇ das RILs, submetida à adubação nitrogenada. No eixo das ordenadas, observa-se a frequência em cada classe fenotípica. No eixo das abscissas são apresentadas as classes dos dados fenotípicos para a taxa de assimilação líquida de CO₂, µmol m⁻² s⁻¹ (**A_{sat}**); área foliar, m² (**A**); massa seca total, g (**W_T**); massa seca de vagem, g (**W_V**); massa fresca de cem sementes, g (**W_{CS}**) e número de sementes por planta (**N_S**). A linha contínua representa a distribuição normal esperada.

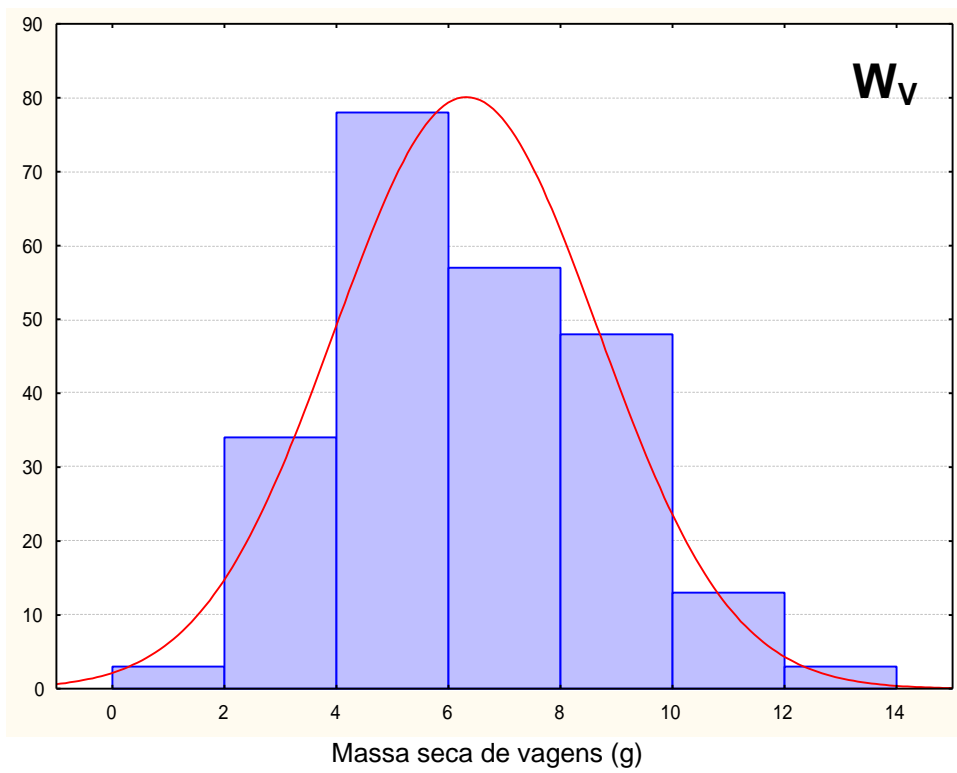
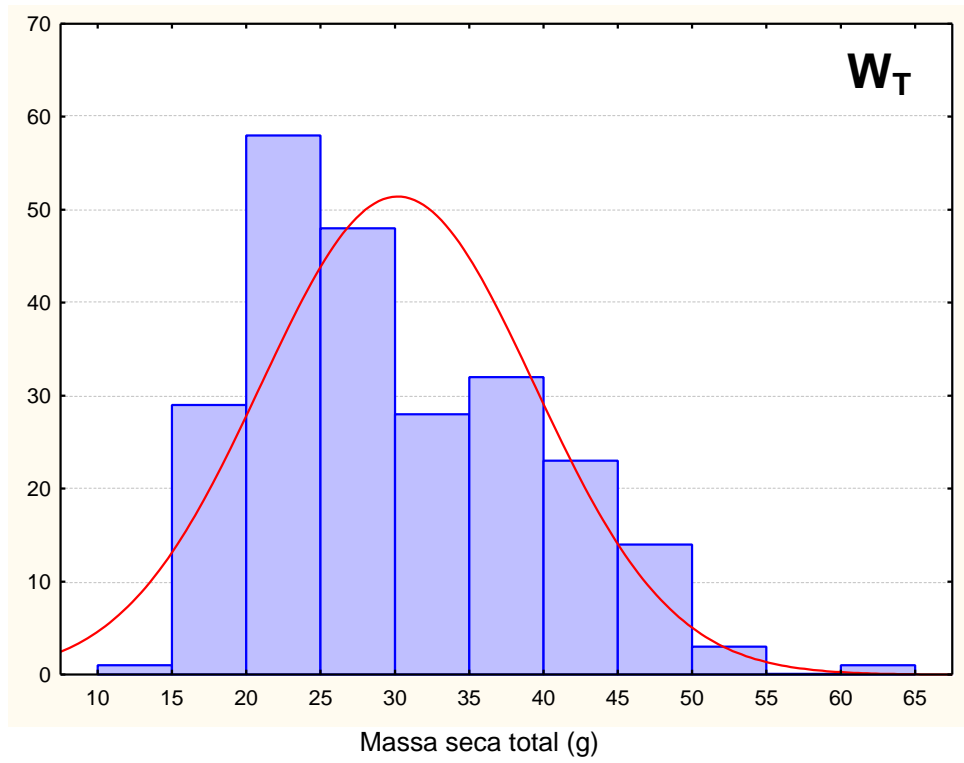


Figura 2. Continuação.

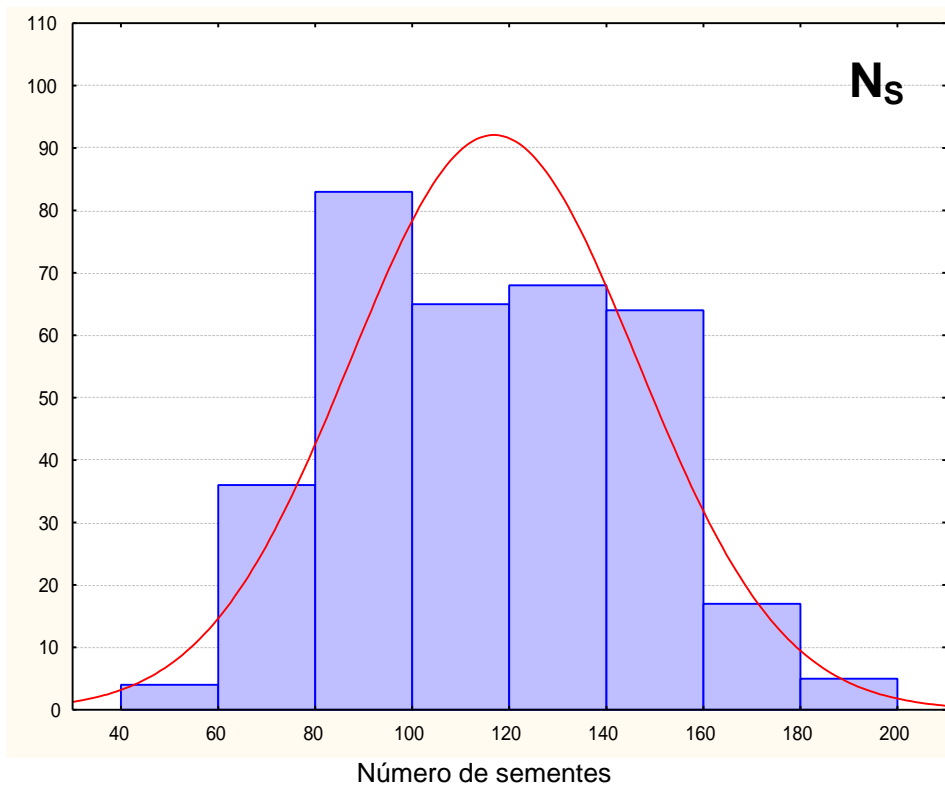
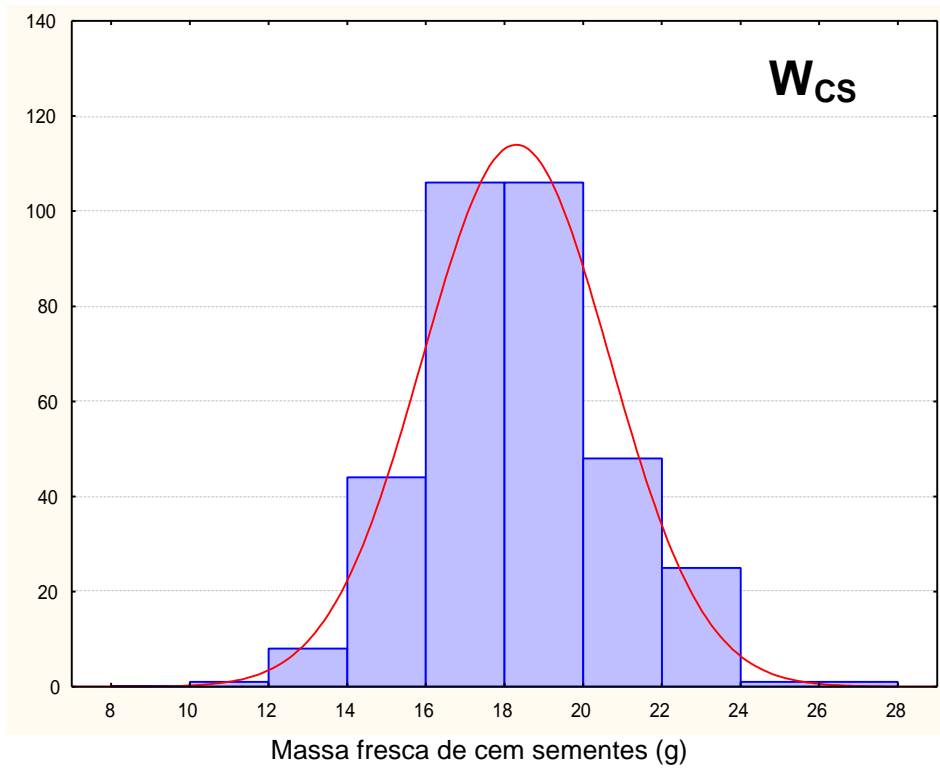


Figura 2. Continuação.

Segundo Beadle (1993) os valores para **SLA** podem variar entre 2 m² Kg⁻¹ (folhas extremamente “grossas” de coníferas) a valores acima de 50 m² Kg⁻¹. Os dados obtidos para a população de RILs variaram de 17,54 a 51,16 m² Kg⁻¹ na geração F₇ (Tabela 2). Enquanto que na geração F₈, o intervalo observado foi de 9,00 a 52,30 m² Kg⁻¹ (Tabela 3).

Plantas de *G. max* no estágio vegetativo V12 (Fehr & Caviness, 1977), apresentaram, em média, 29,5 m² Kg⁻¹ (Mian *et al.*, 1998). Enquanto que no estágio de desenvolvimento da semente (entre R5 e R6), o valor médio para **SLA** foi de 37,42 m² Kg⁻¹ (Wiebold *et al.*, 1981).

Um modelo de crescimento para a cultura da soja considerando uma cultivar típica em condições padrão de crescimento admite um coeficiente para a **SLA** variando entre 35,5 e 40,00 m² Kg⁻¹ (Boote *et al.*, 2001).

Schulze *et al.* (1994) observaram que 23,60 m² Kg⁻¹ é o valor médio para as culturas de folhas largas. Portanto, esse valor é semelhante às médias de 27,88 m² Kg⁻¹ (Tabela 2) e 27,21 m² Kg⁻¹ (Tabela 3), observadas para as gerações F₇ e F₈, respectivamente. Ressalta-se que as populações estudadas apresentam valores médios ligeiramente inferiores aos descritos na literatura para a cultura da soja (Wiebold *et al.*, 1981 e Boote *et al.*, 2001).

As **A_{sat}** estimadas na geração F₇ e F₈ são apresentados nas Tabelas 2 e 3 e plotados em gráficos nas Figuras 2 e 3, respectivamente. Os dados foram coletados de folhas totalmente expandidas, posicionadas no terceiro nó de plantas no estágio reprodutivo de desenvolvimento, submetidas a PAR saturante de 1.500 μmol m⁻² s⁻¹ e temperatura fixa de 25°C.

No presente estudo, a **A_{sat}** variou entre 7,15 e 30,80 μmol m⁻² s⁻¹ na geração F₇ com valor médio de 18,59 μmol m⁻² s⁻¹ (Tabela 2) enquanto que na geração F₈, estimou-se a média de 18,76 μmol m⁻² s⁻¹ e um intervalo de dados para a população de 7,77 a 92,33 μmol m⁻² s⁻¹ (Tabela 3). Estes valores estão, parcialmente, contidos no intervalo de 5,6 a 45,6 μmol m⁻² s⁻¹ relatados por Lugg & Sinclair (1981).

Os valores médios de **A_{sat}** estimados neste estudo (Tabela 2 e 3) são semelhantes ao valor médio de 21,38 μmol m⁻² s⁻¹ estimado para plantas de diferentes cultivares e linhagens de *G. max*, no estágio reprodutivo de desenvolvimento, submetidas a PAR saturante (Harrison *et al.*, 1981; Secor *et al.*, 1982; Boon-Long *et al.*, 1983; Ford *et al.*, 1983; Dornhoff & Shibles, 1970;

Wielbold *et al.*, 1981; Lugg & Sinclair, 1981; Ford & Shibles, 1988 e Boote *et al.*, 2001).

A taxa de assimilação líquida de CO₂ de plântulas de *G. max*, no estágio vegetativo de desenvolvimento, submetidas a 540 μmol m⁻² s⁻¹ de PAR, temperatura de 25 ±1 °C, em condições de casa de vegetação, para 36 variedades variou entre 7,57 e 15,15 μ mol m⁻² s⁻¹ em sistema fechado no qual a contribuição de todas as folhas da planta era considerada (Curtis *et al.*, 1969).

De maneira semelhante, Harrison *et al.* (1981) estimaram a **A_{sat}** da copa em plantas de *G. max* de uma população de 34 linhagens F₃ e seus parentais, durante o enchimento do grão (entre R5 e R6), em plantas submetidas a valores de PAR superiores a 1.420 μmol m⁻² s⁻¹ obtendo valores entre 1,20 e 22,72 μmol m⁻² s⁻¹ e valor médio de 15,15 μmol m⁻² s⁻¹.

Os valores de taxa de assimilação líquida de CO₂ da copa de plantas de *G. max* pertencentes a uma população de 110 linhagens foram estimados por meio da troca de ¹⁴CO₂, obtendo-se o valor médio de 24,1 μmol m⁻² s⁻¹ em plantas no estágio de enchimento do grão (Secor *et al.*, 1982).

O valor máximo de taxa de assimilação líquida de CO₂ em *G. max* é verificado nas fases iniciais de enchimento do grão (R5) e no início do estágio R6 o valor tende a decrescer. Entre R5 e R6, utilizando a técnica de troca de ¹⁴CO₂ e uma PAR de 1.400 μmol m⁻² s⁻¹, determinou-se o valor máximo médio de 25,38 μmol m⁻² s⁻¹ considerando duas cultivares diferentes e dois anos de medição (Boon-Long *et al.*, 1983).

Em dois grupos de *G. max*; durante três anos de medição e em dois locais diferentes, foram coletados dados sobre taxa de assimilação líquida de CO₂ total de plantas por meio da técnica de troca de ¹⁴CO₂, em condições de PAR saturante, no período entre os estádios R5 e R7, obtendo-se valores médios entre 22,9 e 25,1 μmol m⁻² s⁻¹ para os dois grupos considerados (Ford *et al.*, 1983).

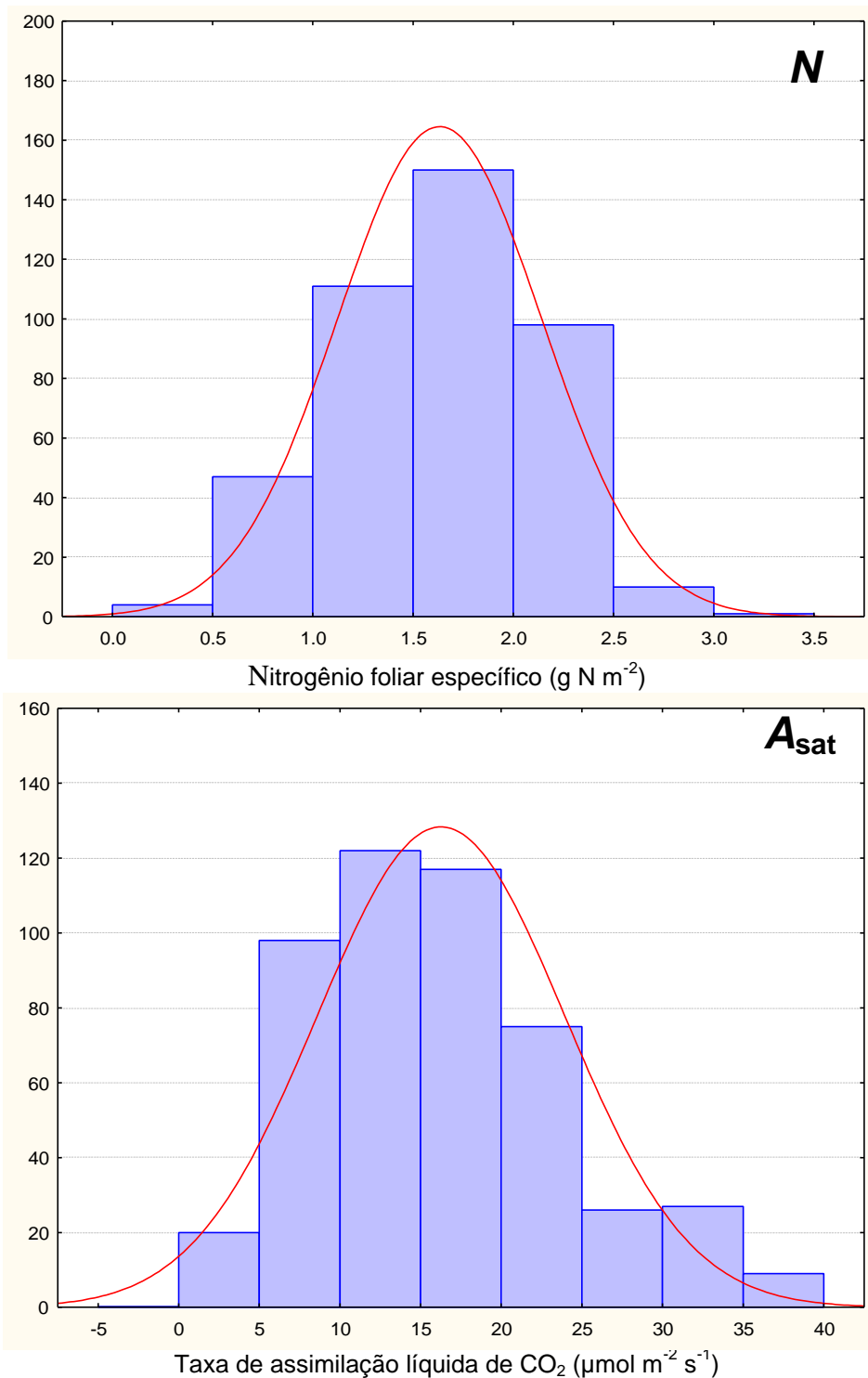


Figura 3. Distribuição de frequência dos dados fenotípicos de algumas características mensuradas na geração F₈ das RILs, não submetida à adubação nitrogenada. No eixo das ordenadas, observa-se a frequência em cada classe fenotípica. No eixo das abscissas são apresentadas as classes dos dados fenotípicos para o nitrogênio foliar específico, g N m⁻² (**N**); taxa de assimilação líquida de CO₂, μmol m⁻² s⁻¹ (**A_{sat}**); área foliar, m² (**A**); massa seca total, g (**W_T**); massa fresca de cem sementes, g (**W_{CS}**); número de sementes por planta (**N_S**). No eixo das ordenadas, observa-se a frequência em cada classe fenotípica. A linha contínua representa a distribuição normal esperada.

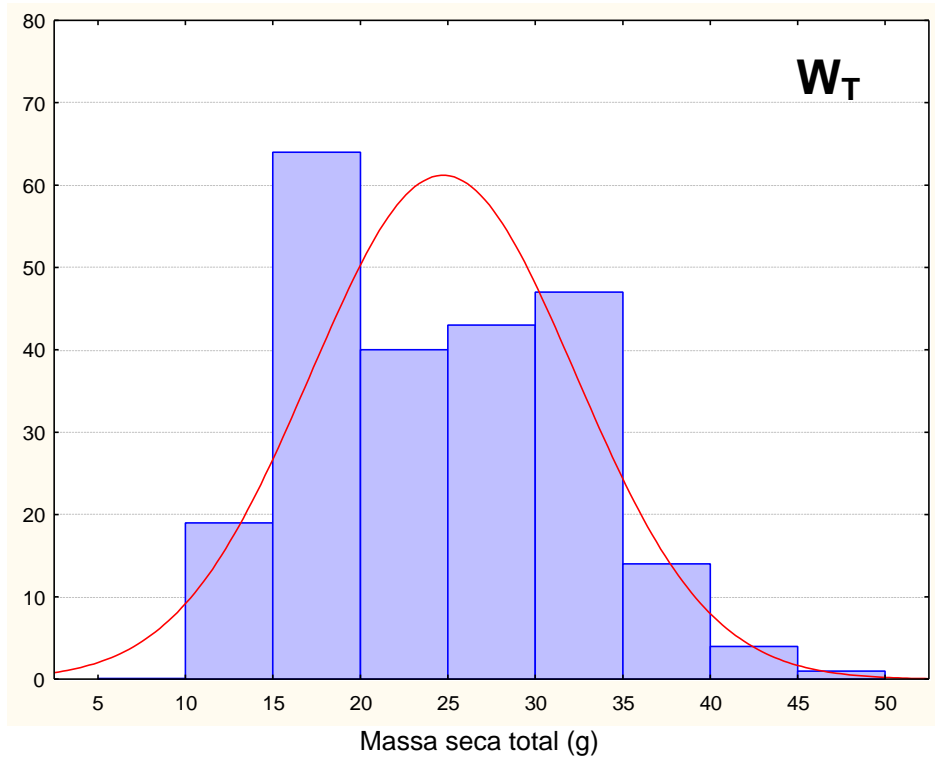
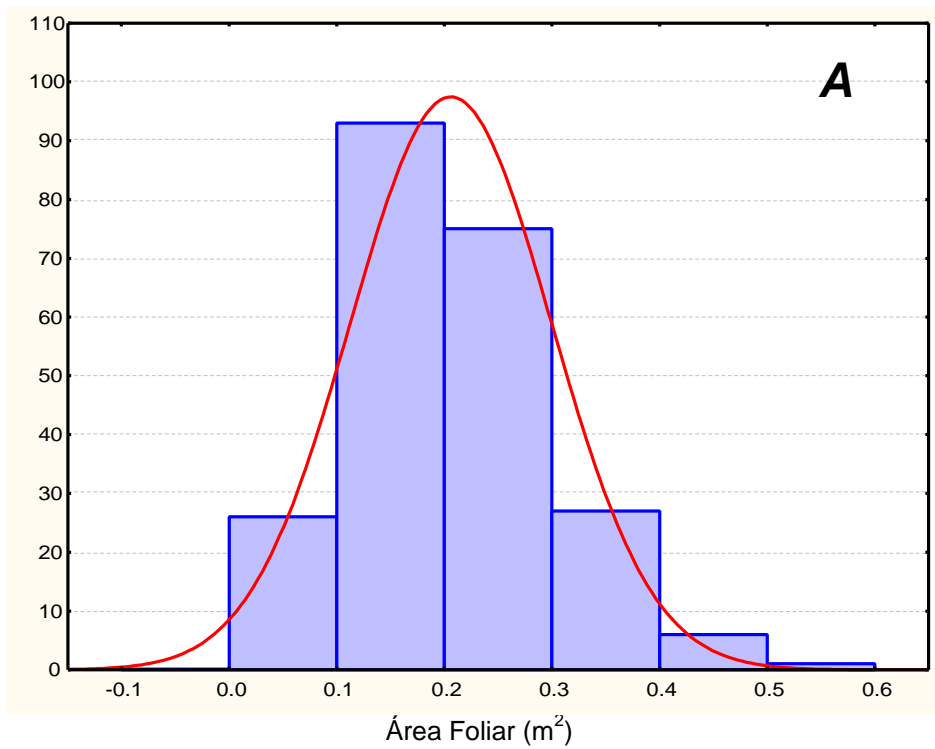


Figura 3. Continuação.

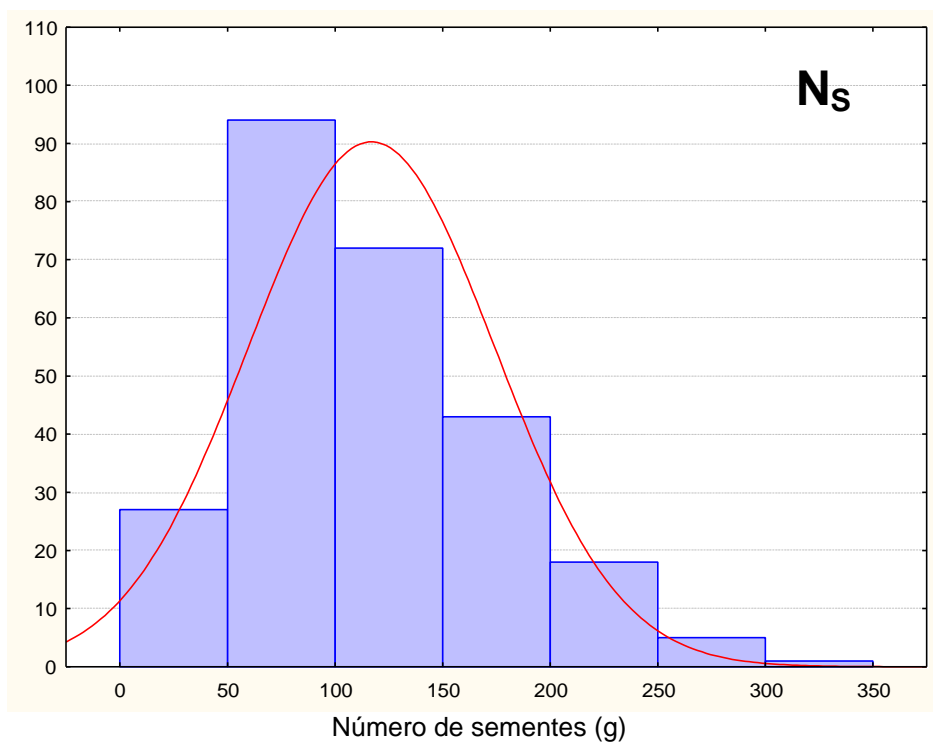
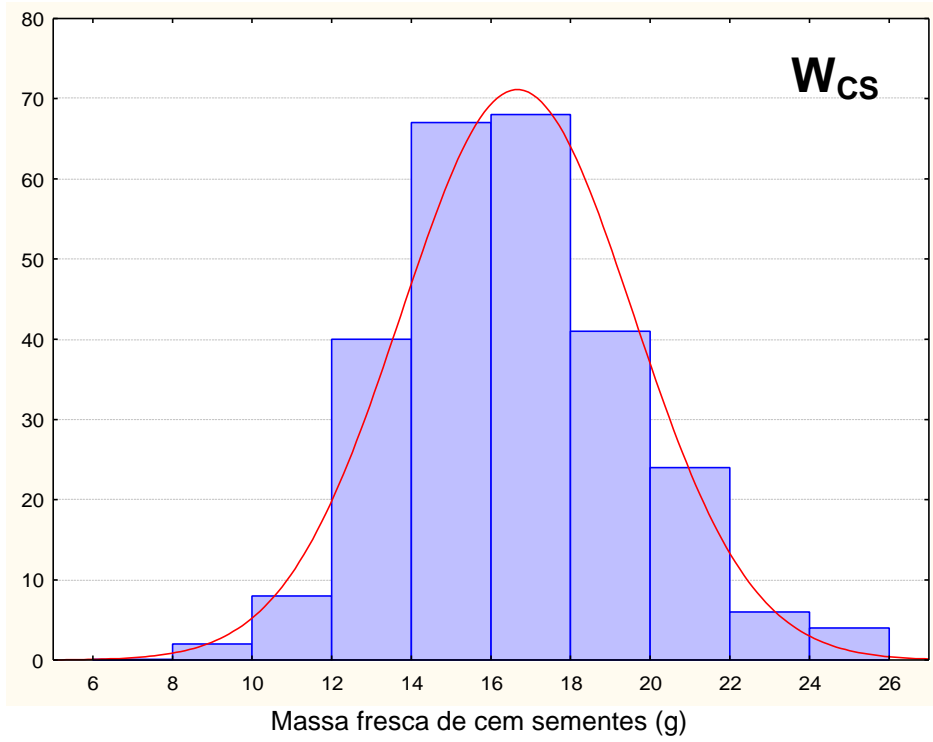


Figura 3. Continuação.

Plantas de 20 variedades de *G. max* foram submetidas a PAR saturante de $1.675 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e nas folhas jovens totalmente expandidas de nós posicionados no terço superior da planta estimou-se a A_{sat} utilizando um IRGA, observando-se o valor médio de $22,21 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e um intervalo médio de $18,55$ a $27,38 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Dornhoff & Shibles, 1970).

Em quatro populações de *G. max* a A_{sat} foi estimada em folhas totalmente expandidas posicionadas no quarto nó a partir do topo da planta, submetidas a $1.400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de PAR e temperatura variando entre 26 e 29°C , os valores obtidos com o IRGA variaram entre 11 e $31 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Wielbold *et al.*, 1981). Também em folhas posicionadas no terço superior de plantas de *G. max* de duas cultivares de *G. max* com diferentes teores de nitrogênio foliar, foi estimado o intervalo de $5,6$ a $45,4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Lugg & Sinclair, 1981).

Em seis cultivares de *G. max* em condições de campo a taxa de assimilação líquida de CO_2 foi estimada por meio da técnica de troca de $^{14}\text{CO}_2$ em folhas senescentes, sendo observado o valor mínimo médio de $5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e para folhas completamente expandidas, $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Ford & Shibles, 1988).

Um modelo de crescimento para a cultura da soja considerando uma cultivar típica submetida a 30°C , numa pressão parcial 35 Pa de CO_2 e alta intensidade luminosa admite um coeficiente para a A_{sat} máximo de $20,88$ a $26,55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Boote *et al.*, 2001).

Em plantas no estágio vegetativo de desenvolvimento (44 dias após a emergência) e submetidas a dois níveis de CO_2 atmosféricos foram obtidos dados de A_{sat} em folhas totalmente expandidas e em expansão em condições constantes de PAR de $1.500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e de temperatura a 25°C utilizando o sistema de análise de gases no infravermelho de fluxo aberto (Li-6400, Li-Cor, Lincoln, NE). Nesse estudo, Griffin & Luo (1999) estimaram a média de $11,1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ observado para folhas em expansão e submetidas a 35 Pa de CO_2 . Enquanto que em folhas expandidas à 70 Pa de CO_2 foi estimado o valor de $17,1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Os valores médios de $17,1$ e $19,1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foram estimados por Earl (2002) em plantas de duas cultivares *G. max* no estágio vegetativo de desenvolvimento em PAR fixa de $1.200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Tabela 2. Médias, intervalos de confiança da média, valores máximos e mínimos e desvios padrões para a área foliar específica, $\text{m}^2 \text{kg}^{-1}$ (**SLA**); taxa de assimilação líquida de CO_2 , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (**A_{sat}**); taxa de fotossíntese potencial, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (**P_{max}**); área foliar, m^2 (**A**); massa seca de folhas, g (**W_F**); caule, g (**W_C**); raízes, g (**W_R**); vagens, g (**W_V**) e total, g (**W_T**); massa fresca de sementes por planta, g (**W_S**); massa fresca de cem sementes, g (**W_{CS}**); número de sementes por planta (**N_S**); número de vagens (**N_V**) e percentagem de proteínas na semente (**%P**) medidos na geração F₇ de uma população de linhagens endogâmicas recombinantes (RILs) derivada do cruzamento entre as variedades BARC-8 e Garimpo. Esta população foi submetida à adubação nitrogenada. Os dados para as características **SLA**, **A_{sat}**, **P_{max}**, **A**, **W_F**, **W_C**, **W_R**, **W_V**, **W_T** e **N_V** foram coletados no estádio de enchimento dos grãos entre R5 e R6. Os dados para **W_S**, **W_{CS}**, **N_S** e **%P** foram medidos no estádio de desenvolvimento R₈ + 10 dias (Fehr & Caviness, 1977).

Característica	Média	Intervalo de confiança*		Valor mínimo	Valor máximo
		x ₁	x ₂		
SLA	27,88 ± 4,73	27,28	28,49	17,54	51,16
A_{sat}	18,76 ± 4,26	18,41	19,11	7,15	30,80
P_{max}	33,77 ± 11,80	32,79	34,76	4,17	68,75
A	0,208 ± 0,061	0,200	0,216	0,066	0,382
W_F	7,45 ± 2,25	7,16	7,74	0,92	14,36
W_C	8,91 ± 3,35	8,48	9,34	4,05	20,29
W_R	7,58 ± 2,78	7,22	7,93	2,91	19,32
W_V	6,32 ± 2,71	6,08	6,57	1,32	21,28
W_T	30,19 ± 9,19	29,01	31,36	14,88	60,90
W_S	20,94 ± 4,61	20,45	21,43	9,43	37,06
W_{SC}	18,33 ± 3,22	17,99	18,67	10,84	48,52
N_S	116,82 ± 29,63	113,67	119,97	55,00	186,00
N_V	51,52 ± 14,84	49,95	53,10	6,00	95,00
%P	43,30 ± 2,94	42,92	43,68	35,15	50,22

* $P(x_1 = \mu = x_2) = 95\%$. O intervalo $[x_1; x_2]$ contém o valor médio da característica com 95% de confiança.

A taxa de assimilação líquida de CO₂ é um caráter razoavelmente conservado para diferentes cultivares de uma certa cultura. Para a cultura da soja, observa-se o intervalo de 20,88 a 26,55 μmol m⁻² s⁻¹ com média de 23,88 μmol m⁻² s⁻¹ em PAR saturante (Boote *et al.*, 2001).

A taxa fotossintética é normalmente estimada por meio da análise de gases no infravermelho que estima a taxa de assimilação líquida de CO₂. Entretanto, a detecção polarográfica de oxigênio pode ser utilizada para dar informações adicionais como, por exemplo, sobre a relação entre as taxas de evolução de oxigênio e de gás carbônico fixado que nem sempre é de um para um (Walker, 1993).

Adicionalmente, as medições podem ser realizadas em condições diferentes das utilizadas nas análises feitas com IRGA. Assim, foi estimada a taxa de evolução de O₂ em condições saturantes de CO₂ e luminosidade (**P_{max}**), expressa em μmol O₂ m⁻² s⁻¹.

Em várias espécies, condições ambientais e nutricionais, os valores de **P_{max}** variam entre 5 e 60 μmol m⁻² s⁻¹ aproximadamente (Evans, 1996). Walker (1993) utilizando o método polarográfico de estimativa da **P_{max}** observou a taxa de 18 μmol O₂ m⁻² s⁻¹ em folhas de *Vitis vinifera* submetidas a PAR de 800 μmol m⁻² s⁻¹. No presente estudo, que também utilizou o método polarográfico, estimou-se valores médios de **P_{max}** de 33,77 μmol m⁻² s⁻¹ para a geração F₇ (Tabela 2) enquanto na geração F₈ o valor médio de **P_{max}** observado foi de 39,17 μmol m⁻² s⁻¹ (Tabela 3) em discos foliares amostrados de folhas totalmente expandidas, coletados em plantas na fase reprodutiva de desenvolvimento (R5 e R6) e submetidos a PAR de 1.800 μmol m⁻² s⁻¹ a 25°C. Assim sendo, os valores médios encontram-se dentro do intervalo descrito por Evans (1996) para várias espécies e condições em folhas jovens completamente expandidas.

No presente estudo, a área foliar por planta (**A**) na geração F₇ apresentou o valor médio de 0,208 m² e intervalo de 0,066 a 0,382 m² (Tabela 2) enquanto na geração F₈, observou-se em média uma **A** de 0,123 m² e o intervalo de 0,014 a 0,327 m² (Tabela 3). Estes valores estão inclusos, em parte, no intervalo médio de 0,269 a 0,419 m² observado para dois cultivares de *G. max* no estágio de desenvolvimento R5 (Nahar & Ikeda, 2002) e inferiores a média de 0,418 m² observada para as cultivares Minsoy e Noir 1 e

para os indivíduos da família F_5 derivada desse cruzamento em condições de campo, no período de enchimento dos grãos (Mansur *et al.*, 1993).

A massa seca de folhas (W_F) média das plantas no estágio entre R5 e R6 foi de 6,04 g nas RILs na geração F_7 (Tabela 2) e de 7,45 g nas RILs na geração F_8 (Tabela 3). Estes valores são semelhantes ao valor médio de 7,11 g observado por Allen *et al.* (1988) para plantas de *G. max* no estágio R4 de desenvolvimento e superiores ao valor médio aproximado de 2,8g para plantas de *G. max* de duas cultivares diferentes no estágio vegetativo de desenvolvimento (Oliveira *et al.*, 1994).

A massa seca média da parte aérea, representando o somatório de W_F e massa seca do caule (W_C) e massa seca de vagens (W_V) das plantas no estágio entre R5 e R6 foi de 22,68 g para as RILs na geração F_7 (Tabela 2) e de 19,97 g para as RILs na geração F_8 (Tabela 3). Estes valores médios são superiores ao valor médio de 10,63 g, observado para plantas de *G. max* cultivadas em solução nutritiva no estágio vegetativo de desenvolvimento (Arrese-Igor *et al.*, 1997).

Por outro lado, os valores médios medidos no presente estudo (Tabelas 2 e 3) estão abaixo do limite inferior do intervalo de 25,9 e 71,4 g observado para 40 genótipos diferentes de *G. max* em estádios de desenvolvimento entre V18 e R6 (Herridge & Betts, 1988). De modo similar, estes valores foram inferiores ao intervalo de 39,7 a 48,5 g verificado para genótipos de *G. max* sensíveis e tolerantes ao nitrato do solo, durante o período de enchimento dos grãos, em condições de campo (Herridge & Rose, 2000).

A massa seca dos nódulos (W_N) na geração F_8 (Tabela 3) foi de 0,176 g, valor este inferior aos valores médios de 0,281 g (Herridge & Danso, 1995) e 0,250 g (Herridge & Betts, 1988) medidos em cultivares tolerantes a nitrato e superiores aos valores médios de 0,064 g (Herridge & Danso, 1995) e 0,043 g (Herridge & Betts, 1988) medidos para cultivares comerciais, em condições de campo no período de enchimento dos grãos.

Tabela 3. Médias, intervalos de confiança da média, valores máximos e mínimos para o nitrogênio foliar específico, g N m^{-2} (**N**); área foliar específica, $\text{m}^2 \text{kg}^{-1}$ (**SLA**); taxa de assimilação líquida de CO_2 , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (**A_{sat}**); taxa de fotossíntese potencial, $\mu\text{mol de O}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (**P_{max}**); área foliar, m^2 (**A**); massa seca de folhas, g (**W_F**); caule, g (**W_C**); raízes, g (**W_R**); vagens, g (**W_V**); nódulos, g (**W_N**) e total, g (**W_T**); massa fresca de sementes por planta, g (**W_S**); massa fresca de cem sementes, g (**W_{CS}**); número de sementes por planta (**N_S**); número de nódulos (**N_N**); número de vagens (**N_V**) e percentagem de proteínas na semente (**%P**) medidos na geração F₈ de uma população de linhagens endogâmicas recombinantes (RILs) derivada do cruzamento entre as variedades BARC-8 e Garimpo. Nesta população foi omitida a adubação nitrogenada. Os dados para as características **N**, **SLA**, **A_{sat}**, **P_{max}**, **A**, **W_F**, **W_C**, **W_R**, **W_V**, **W_N**, **W_T**, **N_N** e **N_V** foram coletados no estágio de enchimento dos grãos entre R5 e R6. Enquanto os dados para **W_S**, **W_{CS}**, **N_S** e **%P** foram medidos no estágio de desenvolvimento R₈ + 10 dias (Fehr & Caviness, 1977).

Característica	Média	Intervalo de confiança*		Valor mínimo	Valor máximo
		x ₁	x ₂		
N	1,63 ± 0,51	1,58	1,68	0,36	3,42
SLA	27,21 ± 7,23	26,27	28,15	9,00	52,30
A_{sat}	18,59 ± 6,74	17,92	19,25	6,54	39,70
P_{max}	39,17 ± 14,34	37,82	40,53	7,77	92,33
A	0,123 ± 0,059	0,116	0,131	0,014	0,327
W_F	6,04 ± 2,21	5,76	6,33	2,16	12,10
W_C	7,61 ± 2,82	7,24	7,97	3,17	16,78
W_R	4,58 ± 1,55	4,38	4,78	2,71	17,26
W_V	6,32 ± 3,04	5,93	6,71	2,10	21,28
W_N	0,176 ± 0,247	0,144	0,207	0,0	1,366
W_T	24,73 ± 7,56	23,76	25,71	12,79	45,33
W_S	18,80 ± 8,41	17,75	19,85	5,43	41,65
W_{CS}	16,66 ± 2,92	16,31	17,02	8,86	25,37
N_S	116,98 ± 57,45	109,97	124,00	30,00	304,00
N_N	42,63 ± 56,62	35,38	49,87	0,00	280,00
N_V	52,90 ± 26,51	49,66	56,14	15,00	152,00
%P	44,05 ± 3,19	43,62	44,48	33,75	51,09

* $P(x_1 = \mu = x_2) = 95\%$ O intervalo $[x_1; x_2]$ contém o valor médio da característica com 95% de confiança.

Por outro lado, o intervalo de dados observado, zero a 1,30 g de W_N (Tabela 3) é semelhante ao intervalo de 0,54 a 1,43 g verificado para 11 cultivares diferentes em plantas na fase reprodutiva do desenvolvimento em condições de baixos níveis de nitrogênio no solo (McClure *et al.*, 1980).

O valor médio de 0,8 g para W_N (Arrese-Igor *et al.*, 1997) observado em plantas de *G. max* cv. Clarke, em condições de casa de vegetação, encontra-se no intervalo observado no presente estudo (Tabela 3).

A massa seca total média das plantas (W_T) no estádio entre R5 e R6 foi de 30,19 g nas RILs na geração F_7 (Tabela 2) e de 24,73 g nas RILs na geração F_8 (Tabela 3). Valores estes superiores ao valor médio de 19,32 g observado para a *G. max* cv. Bragg, em condições de casa de vegetação (Allen *et al.*, 1988) e ao valor de 16,8 g observado para a cultivar Wuyin9 em condições de campo no estádio de desenvolvimento R7 (Gan *et al.*, 2002).

A massa fresca de sementes por planta (W_S) variou entre 5,43 e 41,65g apresentando o valor médio de 18,80g, nas RILs na geração F_7 (Tabela 2) enquanto na geração F_8 , determinou-se uma média de 20,94 g e uma variação entre 9,43 e 37,06 g (Tabela 3). Estas médias são superiores a média de 14,87 g observada para três diferentes genótipos, no estádio de desenvolvimento R7, com hábitos de crescimento determinado e indeterminado e submetidos a cinco formas de adubação nitrogenada (Gan *et al.*, 2003). Por outro lado, Gan *et al.* (2002) mensuraram o valor médio de 41,7 g, para estas cultivares, em condições de campo.

Os valores médios de massa fresca de cem sementes (W_{CS}) foram de 18,33 e 16,66g para a geração F_7 e F_8 , respectivamente (Tabelas 2 e 3); estes valores estão inclusos nos intervalos de 13,6 a 20,9 g (Harrison *et al.*, 1981); 12,7 a 19,1 g (St. Martin & Aslam, 1986); 15,0 a 22,0 g (Boote *et al.*, 2001) e 13,4 a 18,3 g (Gan *et al.*, 2003). No entanto, são superiores ao valor médio de 11,85 g medido para plantas de *G. max*, em condições de casa de vegetação (Egli & Bruening, 2002).

A percentagem de proteína das sementes no estádio R8+10 dias (%P) apresentou um padrão de distribuição de frequência normal de maneira semelhante aos dados das outras características estudadas, tanto na geração F_7 , quanto na geração F_8 . As distribuições de frequência são apresentadas no ANEXO (Tabelas 11 e 12).

Os valores médios de %P foram de 43,30 e 44,05 % para as RILs na geração F₇ e F₈, respectivamente (Tabelas 2 e 3). Na Tabela 2, nota-se que na geração F₇ a variação dos teores de proteína, ocorreu entre 35,15 e 50,12% e na Tabela 3, o intervalo medido para teores de proteína na geração F₈ foi de 33,75 a 51,09%.

Em seis populações originadas de cruzamentos entre linhagens introduzidas e adaptadas foram verificados valores entre 39,1 e 47,0% para teor de proteína (Shannon *et al.*, 1972). Esses valores estão inclusos nos intervalos determinados no presente trabalho (Tabelas 2 e 3).

Intervalo de teores de proteína entre 38,1 a 45,7% foi medido para cinco cultivares e quatro variedades introduzidas de *G. max* (Scott & Kephart, 1997). Intervalos para teores de proteína de 43,1 a 46,9% e 42,7 a 46,2% foram verificados para a progênie F₂ e F₄, respectivamente, utilizadas para o mapeamento de QTLs para esta característica (Lee *et al.*, 1996). Enquanto que, em uma geração F₅, o teor protéico médio foi de 40,3% (Mansur *et al.*, 1993).

Para duas populações que foram avaliadas em três gerações diferentes, derivadas do cruzamento de *G. soja* e *G. max*, determinou-se o intervalo médio para teor de proteína de 45,2 a 49,2% (Openshaw & Hadley, 1984). De 39,4 a 42,4% para seis populações diferentes originadas do cruzamento de cultivares adaptadas e plantas introduzidas de *G. max* (St. Martin & Aslam, 1986). O coeficiente para conteúdo de proteína de sementes definido por Bootle *et al.* (2001) varia entre 37,0 e 43,0% para a cultura da soja.

No presente estudo, foi determinado para o parental BARC-8 o conteúdo de proteína de 52,81% na geração F₇ (Tabela 4) e para a geração F₈, verificou-se o valor médio de 49,09%. Estes valores são semelhantes à média de 52,3% mensurada em condições de campo para esta mesma cultivar (Serreti *et al.*, 1994).

A comparação dos dados das características medidas, no presente estudo, com os dados da literatura indica que existe uma elevada variabilidade intra-específica de crescimento de *G. max* que foi caracterizada até mesmo dentro das populações RILs (Figuras 2 e 3) e que os dados obtidos são compatíveis com as informações descritas *a priori* na literatura científica.

4.2. Análises de variância e estimativas de parâmetros genéticos.

As análises de variância individuais de cada caráter, em relação aos quadrados médios, bem como as estimativas de diferentes parâmetros genéticos, para a geração F_7 e para a geração F_8 são apresentadas nas Tabelas 4 e 5, respectivamente. Na Tabela 4, nota-se que existe variância genética significativa entre as RILs da geração F_7 indicado pelo teste F a 5% de probabilidade, para onze das quatorze características avaliadas. Por outro lado, na Tabela 5, pode-se observar que das dezessete características avaliadas apenas uma não apresentou variabilidade genética significativa. Isto é importante, visto que a ocorrência de variabilidade genética em uma população de mapeamento é um dos pré-requisitos para a detecção de QTLs.

É interessante observar que os caracteres **SLA**, **W_R** e **W_V** que não apresentaram variabilidades genéticas significativas e herdabilidades, em torno de 10%, na geração F_7 (Tabela 4) quando foram avaliados na geração F_8 , apresentaram herdabilidades de 67,14%, 35,42% e 53,86% para **SLA**, **W_R**, **W_V**, respectivamente, bem como variabilidades genéticas significativas (Tabela 5). Tal fato pode ser explicado, em parte, pela interação genótipo x ambiente observada para estas características (Tabela 6). Falconer (1987) e Vencovsky (1982) relatam que os principais fatores que afetam a estimativa dos parâmetros genéticos são as condições ambientais, método utilizado na estimação e material genético estudado.

Na geração F_7 as herdabilidades variaram entre 10,23%, para massa seca radicular, e 99,77% para o teor protéico nas sementes (Tabela 4). Na geração F_8 , notou-se um intervalo de 18,73%, para número de nódulos, a 99,86%, para o teor protéico na semente (Tabela 5). Portanto, as herdabilidades para **%P** foram superiores ao valor médio de 73,40% estimado para esta mesma população na geração F_6 em condições de campo (Soares, 2000).

As herdabilidades para **A_{sat}** variaram entre 51%, na geração F_7 e 50% na geração F_8 (Tabelas 4 e 5). Estes valores foram superiores ao valor de 41% estimado por Harrison *et al.* (1981) para a fotossíntese aparente da copa, no período de enchimento do grão em *G. max*. Por outro lado, Wiebold *et al.* (1981) observaram uma herdabilidade, no sentido amplo, de baixa a moderada (36% a 56%) para fotossíntese líquida de folhas individuais, nas gerações

iniciais F_3 e F_4 , utilizando sistema de análise de gás no infravermelho com temperatura variando de 29 a 31°C.

Tabela 4. Quadrado médio de genótipos (QMG) e do resíduo (QMR), estimativa da variância fenotípica ($\hat{\sigma}_f^2$), genotípica ($\hat{\sigma}_g^2$), herdabilidades (h^2) estimadas na geração F_7 da população de linhagens endogâmicas recombinantes (RILs), submetida à adubação nitrogenada e valores médios fenotípicos dos parentais BARC-8 e Garimpo.

	SLA	A_{sat}	P_{max}	A	W_F	W_C	W_R	W_V	W_T	W_S	W_{CS}	N_S	N_V	%P
QMG	240,00	30,39	212,76	6,0 x 10 ⁻⁵	7,37	59,48	85,30	45,75	143,94	41,21	12,85	1934,69	505,90	17,27
QMR	210,00	14,86	117,83	1,7 x 10 ⁻⁵	2,23	36,34	76,58	40,98	27,09	10,58	4,22	311,09	58,57	0,04
F	1,13	2,04*	1,80*	3,57*	3,30*	1,64*	0,90	1,12	5,31*	3,90*	3,04*	6,22*	8,64*	433,80*
$\hat{\sigma}_f^2$	7,94	4,34	30,39	3,0 x 10 ⁻⁵	3,68	29,74	42,65	22,87	71,97	13,74	4,28	644,90	168,63	8,63
$\hat{\sigma}_g^2$	0,92	2,22	13,56	2,2 x 10 ⁻⁵	2,57	11,57	4,36	2,38	58,43	10,21	2,88	541,20	149,11	8,61
h^2 (%)	11,62	51,09	44,62	71,99	69,69	38,90	10,23	10,41	81,18	74,33	67,15	83,92	88,42	99,77
BARC-8	30,24	16,06	27,92	0,138	6,21	9,38	7,39	9,54	46,52	13,20	16,38	65,50	28,50	52,81
Garimpo	29,35	19,46	36,18	0,187	11,73	10,04	6,88	8,51	59,15	27,22	25,04	150,75	72,75	38,85

* Valor F significativo a 5% de probabilidade. As características apresentadas são a área foliar específica, m² kg⁻¹ (**SLA**); taxa de assimilação líquida de CO₂, μmol m⁻² s⁻¹ (**A_{sat}**); taxa de fotossíntese potencial, μmol de O₂ m⁻² s⁻¹ (**P_{max}**); área foliar, m² (**A**); massa seca de folhas, g (**W_F**); caule, g (**W_C**); raízes, g (**W_R**); vagens, g (**W_V**) e total, g (**W_T**); massa fresca de sementes por planta, g (**W_S**); massa fresca de cem sementes, g (**W_{CS}**); número de sementes por planta (**N_S**); número de vagens (**N_V**) e percentagem de proteínas na semente (**%P**).

Tabela 5. Quadrado médio de genótipos (QMG) e do resíduo (QMR), estimativa da variância fenotípica ($\hat{\sigma}_f^2$), genotípica ($\hat{\sigma}_g^2$), herdabilidades (h^2) estimados na geração F₈ da população de linhagens endogâmicas recombinantes (RILs), não submetida à adubação nitrogenada e valores médios fenotípicos dos parentais BARC-8 e Garimpo.

	N	SLA	A_{sat}	P_{max}	A	W_F	W_C	W_R	W_V	W_N	W_T	W_S	W_{CS}	N_S	N_N	N_V	%P
QMG	0,43	387,00	95,58	289,45	0,01	50,50	70,65	14,34	62,50	0,37	479,55	125,78	13,68	5816,0	3481,9	1254,07	20,44
QMR	0,20	127,00	47,59	193,64	1,0x10 ⁻³	8,25	8,85	9,32	28,86	0,25	99,54	33,22	4,49	1594,8	2829,7	322,43	0,03
F	2,22*	3,04*	2,00*	1,49*	5,43*	6,12*	7,98*	1,54*	2,17*	1,47*	4,81*	3,79*	3,05*	3,65*	1,23	3,89*	739,69*
$\hat{\sigma}_f^2$	0,06	12,90	13,65	41,35	2,7x10 ⁻³	25,25	35,32	7,17	31,25	0,19	239,78	41,93	4,56	1938,6	1740,9	418,02	10,22
$\hat{\sigma}_g^2$	0,034	8,67	6,86	13,69	2,0x10 ⁻³	21,12	30,90	2,51	16,82	0,06	190,00	30,85	3,06	1407,0	326,1	310,55	10,21
h^2 (%)	55,01	67,14	50,22	33,10	81,60	83,66	87,47	35,02	53,83	32,02	79,24	73,59	67,19	72,5	18,7	74,29	99,86
BARC-8	1,33	65,30	12,52	29,54	0,016	5,22	4,52	4,30	0,50	0,38	42,99	11,99	10,52	83,0	24,0	37,50	49,09
Garimpo	1,83	70,15	22,25	44,64	0,025	11,13	8,97	9,13	3,21	1,51	55,47	22,79	14,97	116,0	349,5	49,00	40,49

* Valor F significativo a 5% de probabilidade. As características apresentadas são o nitrogênio foliar específico, g N m⁻² (**N**); área foliar específica, m² kg⁻¹ (**SLA**); taxa de assimilação líquida de CO₂, μmol m⁻² s⁻¹ (**A_{sat}**); taxa de fotossíntese potencial, μmol de O₂ m⁻² s⁻¹ (**P_{max}**); área foliar, m² (**A**); massa seca de folhas, g (**W_F**); caule, g (**W_C**); raízes, g (**W_R**); vagens, g (**W_V**); nódulos, g (**W_N**) e total, g (**W_T**); massa fresca de sementes por planta, g (**W_S**); massa fresca de cem sementes, g (**W_{CS}**); número de sementes por planta (**N_S**); número de nódulos (**N_N**); número de vagens (**N_V**) e percentagem de proteínas na semente (**%P**)

Tabela 6. Análise de variância conjunta, quanto aos quadrados médios dos genótipos, ambientes e interação (genótipo x ambiente). As características apresentadas são a área foliar específica, $\text{m}^2 \text{kg}^{-1}$ (**SLA**); taxa de assimilação líquida de CO_2 , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (A_{sat}); taxa de fotossíntese potencial, $\mu\text{mol de O}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (P_{max}); área foliar, m^2 (**A**); massa seca de folhas, g (**W_F**); caule, g (**W_C**); raízes, g (**W_R**); vagens, g (**W_V**) e da planta, g (**W_T**); massa fresca de sementes por planta, g (**W_S**); massa fresca de cem sementes, g (**W_{CS}**); número de sementes por planta (**N_S**); número de vagens (**N_V**) e percentagem de proteínas na semente (**%P**).

característica	genótipo	ambiente	Interação (genótipo x ambiente)
SLA	183,4	115347,2*	225,1*
A_{sat}	64,9*	1848,9*	59,9
P_{max}	316,6*	4680,4*	187,8
A	$2,6 \times 10^{-3}$	1,183*	$2,7 \times 10^{-3*}$
W_{F}	31,6	16855,6*	25,4*
W_{C}	83,9*	5593,3*	44,1*
W_{R}	48,4	44,5	275,1*
W_{V}	59,2	5372,0*	49,2*
W_{T}	371,7*	1775,0*	241,1*
W_{S}	93,3*	884,7*	67,0*
W_{CS}	83,9*	5593,3*	44,1*
N_{S}	4692,6*	1773,7	2701,1*
N_{V}	1101,8*	108,2	580,1*
%P	24,0*	101,7*	13,0*

* Valor F significativo a 5% de probabilidade.

4.3. Análise da coincidência de QTLs e das correlações entre as características mensuradas na população de RILs na geração F₇ submetida à adubação nitrogenada.

Foram identificados QTLs associados a 9 das 14 características listadas na Tabela 2. Os QTLs foram localizados em intervalos localizados dentro de 10 dos 24 grupos de ligação considerados (Tabela 7).

Identificou-se um único intervalo associado a **SLA**, localizado no grupo de ligação (GL) C1. Enquanto que 7,8% da variação fenotípica da **A_{sat}** foi explicada por um loco posicionado no GL O (Tabela 7).

De maneira geral, nota-se que os QTLs associados a área foliar (**A**) e às características relacionadas à partição de biomassa na fase de enchimento do grão (**W_C**, **W_R**, **W_T** e **W_V**) estão localizados em cinco intervalos, posicionados nos grupos de ligação A1, C1, C2, D1b + W e O (Tabela 7).

Estes resultados ratificam, em parte, a observação de que nos GL C1, C2 e D1 existem locos associados à área foliar e à característica maturidade da soja (Mansur *et al.*, 1993). Além disto, QTLs posicionados em outros grupos de ligação (G, O, L, F e N) também explicam uma fração da variação fenotípica de **A**, **W_C**, **W_R**, **W_T** e **W_V** (Tabela 7).

No grupo de ligação L, identificou-se um QTL associado à massa seca do caule (**W_C**) (Tabela 7). Neste mesmo GL, identificou-se a existência de um QTL associado à altura da planta de *G. max* (Lee *et al.*, 1996). As coincidências entre os QTLs associados à área foliar e às características relacionadas a partição de biomassa na fase de enchimento do grão (massas secas do caule, raiz, planta e vagem) poderiam, por exemplo, explicar as correlações fenotípicas significativas que variaram de 0,22 (entre a **W_C** e **W_V**) a 0,96 para **W_C** e **W_T**. (Tabela 8).

É oportuno notar que as inter-relações entre estas características já eram esperadas, uma vez que, quanto maior for o tamanho de uma planta, espera-se que maior será sua produção de vagens (relação entre **W_C** e **W_V**). Enquanto que, pode-se assumir que a **W_C** é um dos principais componentes da massa da planta em *G. max*.

Adicionalmente, nota-se que há uma separação dos QTLs associados à massa seca de cem sementes (**W_{CS}**) e ao número de sementes por planta (**N_S**) daqueles relacionados às demais características, com exceção de um intervalo

localizado no GL O que está associado a sete das nove características para as quais foram identificados QTLs (Tabela 7). O agrupamento dos QTLs associados ao N_s e W_{cs} pode explicar, em parte, a correlação negativa entre estas características ($r=-0,19$) (Tabela 8).

Tabela 7. Intervalos contendo locos associados a características quantitativas (QTLs) para área foliar específica (SLA); taxa de assimilação líquida de CO_2 (A_{sat}); área foliar (A); massa seca de caule (W_C), raiz (W_R), planta (W_T) e vagens (W_V); massa fresca de cem sementes (W_{cs}) e número de sementes por planta (N_s) identificados na geração F_7 de uma população de linhagens endogâmicas recombinantes (RILs), derivada do cruzamento entre as variedades BARC-8 e Garimpo. Esta população foi submetida à adubação nitrogenada.

Característica	Grupo de Ligação	Intervalo	Tamanho do intervalo (cM)	Posição do QTL (cM)	R^2 (%)	LR	
SLA	C1	Satt139 ~ Satt476	11,2	8,00	9,90	13,71	
A_{sat}	O	Satt241 ~ Satt345	2,1	0,23	7,80	10,66	
A	{	A1	Satt449 ~ Satt526	7,7	0,18	16,52	12,99
		G	Satt594 ~ Satt303	6,4	0,18	7,66	10,31
		O	Satt241 ~ Satt345	2,1	0,23	11,00	14,35
W_C	{	O	Satt241 ~ Satt345	2,1	0,23	7,30	9,78
		C2	Satt281 ~ Satt422	19,3	1,9	7,30	10,15
		L	Satt462 ~ Satt523	5,6	0,02	10,00	8,40
		F	Satt193 ~ Satt325	13,2	1×10^{-3}	7,17	10,40
W_R	O	Satt241 ~ Satt345	2,1	0,23	7,60	10,42	
W_T	{	O	Satt241 ~ Satt345	2,1	0,23	8,10	10,86
		C2	Satt281 ~ Satt422	19,3	1,8	7,50	9,12
W_V	{	A1	Satt449 ~ Satt526	7,7	0,14	11,80	8,48
		D1b + W	Satt350 ~ Satt506	4,9	0,15	12,26	14,70
		N	Satt091 ~ Satt549	5,4	0,05	13,27	18,79
		C1	OPACO2 ~ OPAN09	10,4	0,10	11,53	10,89
W_{cs}	{	G	Satt594 ~ Satt303	6,4	0,18	6,80	9,35
		O	Satt241 ~ Satt345	2,1	0,23	7,00	9,95
		K	Satt475 ~ OPAW09a	24,5	1×10^{-4}	9,40	11,67
N_s	{	O	Satt241 ~ Satt345	2,1	0,23	7,20	8,77
		K	Satt475 ~ OPAW09a	24,5	1×10^{-4}	7,70	9,24

R^2 , representa o percentual da variação fenotípica explicada pelo intervalo e LR (*Likelihood ratio*) ou razão de máxima verossimilhança, significativa a 5% de probabilidade. As chaves estão agrupando dois ou mais QTLs associados a uma mesma característica.

Tabela 8. Matriz de correlação fenotípica para as características medidas na geração F₇ das RILs (linhagens endogâmicas recombinantes), derivada do cruzamento entre as variedades BARC-8 e Garimpo. Submetida à adubação nitrogenada. Área foliar específica, m² kg⁻¹ (**SLA**); taxa de assimilação líquida de CO₂, μmol m⁻² s⁻¹ (**A_{sat}**); taxa de fotossíntese potencial, μmol m⁻² s⁻¹ (**P_{max}**); área foliar, m² (**A**); massa seca de folhas, g (**W_F**); caule, g (**W_C**); raízes, g (**W_R**); vagens, g (**W_V**) e total, g (**W_T**); massa fresca de sementes por planta, g (**W_S**); massa fresca de cem sementes, g (**W_{CS}**); número de sementes por planta (**N_S**); número de vagens (**N_V**) e percentagem de proteínas na semente (**%P**). Os dados para as características SLA, **A_{sat}**, **P_{max}**, **A**, **W_F**, **W_C**, **W_R**, **W_V**, **W_T** e **N_V** foram coletados no estágio de enchimento dos grãos entre R5 e R6. Enquanto que os dados para **W_S**, **W_{CS}**, **NS** e **%P** foram medidos no estágio de desenvolvimento R₈ + 10 dias (Fehr & Caviness, 1977).

	SLA	A_{sat}	P_{max}	A	W_F	W_C	W_R	W_T	W_V	W_S	W_{CS}	N_S	N_V
%P	-0,01	0,02	0,01	0,04	-0,01	0,00	0,03	0,02	0,08	-0,01	-0,05	0,00	0,01
N_V	0,03	0,54*	0,47*	0,55*	0,54*	0,63*	0,62*	0,61*	0,22*	0,88*	-0,18	0,96*	
N_S	0,07	0,57*	0,53*	0,57	0,54*	0,62*	0,62*	0,62*	0,23*	0,89*	-0,19*		
W_{CS}	0,20*	0,13	0,07	-0,02	0,04	-0,04	-0,02	-0,02	-0,27*	0,18*			
W_S	0,05	0,55*	0,50*	0,54*	0,55*	0,61*	0,62*	0,60*	0,14*				
W_V	-0,08	0,04	0,13	0,28*	0,23*	0,22*	0,24*	0,33*					
W_T	0,31*	0,46*	0,45*	0,88*	0,95*	0,96*	0,93*						
W_R	0,27*	0,51*	0,45*	0,82*	0,85*	0,92*							
W_C	0,23*	0,42*	0,41*	0,85*	0,92*								
W_F	0,32*	0,39*	0,36*	0,90*									
A	0,51*	0,40*	0,31*										
P_{max}	0,13	0,59*											
A_{sat}	0,42*												

*, Índica correlações significativas a 5% de probabilidade.

4.4. Análises da coincidência de QTLs e correlações entre as características mensuradas na população de RILs na geração F₈. Esta população não foi submetida à adubação nitrogenada.

Na população de RILs na geração F₈, foram identificados QTLs associados a 10 das 17 características listadas na Tabela 3. Os QTLs foram localizados em intervalos localizados dentro de 8 dos 24 grupos de ligação considerados (Tabela 9).

No GL A1 foi identificado o único intervalo molecular associado ao nitrogênio foliar específico (**M**). Enquanto que 14,72% da variação fenotípica da **A_{sat}** foi explicada pelo locus posicionados no GL J (Tabela 9).

As características **A**, **W_F**, **W_C**, **W_T** e **W_{CS}** apresentam QTLs coincidentes, posicionados no GL M, que explicam 10,47; 8,86; 8,43; 13,78 e 20,73% das variações fenotípicas dessas características, respectivamente (Tabela 9).

A coincidência de QTLs no GL M, associados à área foliar e às características relacionadas a partição de biomassa (**W_F**, **W_C** e **W_T**), bem como à massa seca de cem sementes (**W_{CS}**), poderia explicar as correlações significativas entre estas características apresentadas na Tabela 10, variando entre 0,96 (**W_C** x **W_T**) e 0,39 (**W_C** x **W_{CS}**).

Por outro lado, caracteres relacionadas à produtividade (**W_S**, **NS** e **NV**), em geral, não apresentaram QTLs comuns com aqueles identificados para as demais variáveis, com exceção daquele presente no GL M associado a **W_{CS}**, como já foi discutido anteriormente. Porém, entre eles foi identificada a coincidência de um intervalo, localizado no GL K, que explica 13,23; 24,51 e 7,6% da variação fenotípica de **W_S**, **N_S** e **N_V**, respectivamente (Tabela 9). Correlações significativas, acima de 0,88, foram observadas entre estas características (Tabela 10) que podem ser explicadas pela coincidência de QTLs no GL K. No entanto, deve-se considerar que a natureza dessa correlação é fenotípica, portanto uma porção desta pode ter uma base ambiental.

Tabela 9. Intervalos contendo locos associados a características quantitativas (QTLs) para o nitrogênio foliar específico (**N**); taxa de assimilação líquida de CO₂ (**A_{sat}**); área foliar (**A**); massa seca de folha (**W_F**), caule (**W_C**) e total (**W_T**); massa fresca de sementes por planta (**W_S**); massa fresca de cem sementes (**W_{CS}**); número de sementes por planta (**N_S**) e número de vagens (**N_V**) identificados na geração F₈ de uma população de linhagens endogâmicas recombinantes (RILs), derivada do cruzamento entre as variedades BARC-8 e Garimpo. Esta população não foi submetida à adubação nitrogenada.

Característica	Grupo de Ligação	Intervalo	Tamanho do intervalo (cM)	Posição do QTL (cM)	R ² (%)	LR
N	A1	Satt449 ~ Satt526	7,7	1,70	16,85	10,73
A_{sat}	J	Satt215 ~ Satt183	4,4	2,00	14,72	12,82
A	{ D1b + W M	Satt350 ~ Satt506	4,9	0,12	11,33	8,39
		OPAPO4a ~ OPAPO4b	16,1	0,02	10,47	10,48
W_F	M	OPAPO4a ~ OPAPO4b	16,1	1 x 10 ⁻⁴	8,86	11,28
W_C	M	OPAPO4a ~ OPAPO4b	16,1	0,01	8,43	9,97
W_T	{ N M	Sat-091 ~ Satt594	5,4	0,05	7,30	8,46
		OPAPO4a ~ OPAPO4b	16,1	0,03	13,78	11,93
W_S	K	Satt475 ~ OPAW09a	24,5	0,20	13,23	8,68
W_{CS}	M	OPAPO4a ~ OPAPO4b	16,1	0,09	20,73	11,11
N_S	K	Satt475 ~ OPAW09a	24,5	0,24	24,51	10,87
N_V	{ C1 K	Satt139 ~ Satt476	11,2	5,00	7,30	9,71
		Satt475 ~ OPAW09a	24,5	0,24	7,60	9,48

R², representa o percentual da variação fenotípica explicada pelo intervalo e LR (*Likelihood ratio*) ou razão de máxima verossimilhança, significativa a 5% de probabilidade. As chaves estão agrupando dois QTLs associados a uma mesma característica.

Tabela 10. Matriz de correlação para as características medidas na geração F₈ das RILs (linhagens endogâmicas recombinantes), derivada do cruzamento entre as variedades BARC-8 e Garimpo. Não submetida à adubação nitrogenada. Nitrogênio foliar específico, g m⁻² (**M**); área foliar específica, m² kg⁻¹ (**SLA**); taxa de assimilação líquida de CO₂, μmol m⁻² s⁻¹ (**A_{max}**); taxa de fotossíntese potencial, μmol m⁻² s⁻¹ (**P_{max}**); área foliar, m² (**A**); massa seca de folhas, g (**W_F**); caule, g (**W_C**); raízes, g (**W_R**); vagens, g (**W_V**); nódulos, g (**W_N**) e total, g (**W_T**); massa fresca de sementes por planta, g (**W_S**); massa fresca de cem sementes, g (**W_{CS}**); número de sementes por planta (**N_S**); número de nódulos (**N_N**); número de vagens (**N_V**) e percentagem de proteínas na semente (**%P**)

	N	SLA	A_{sat}	P_{max}	A	W_F	W_C	W_R	W_V	W_N	W_T	W_S	W_{CS}	N_S	N_N	N_V
%P	0,16	0,18	0,41*	0,27*	0,28*	0,30*	0,32*	0,31*	0,22*	0,21*	0,31*	0,50*	0,67*	0,52*	0,18	0,52*
N_V	0,41*	0,37*	0,34*	0,44*	0,59*	0,62*	0,62*	0,42*	0,36*	0,39*	0,57*	0,88*	0,43*	0,99*	0,31*	
N_N	0,27*	0,30*	0,20*	0,13	0,34*	0,32*	0,31*	0,42*	0,22*	0,86*	0,35*	0,36*	0,21*	0,31*		
N_S	0,44*	0,39*	0,37*	0,44*	0,60*	0,63*	0,64*	0,43*	0,36*	0,38*	0,59*	0,89*	0,43*			
W_{CS}	0,28*	0,37*	0,56*	0,45*	0,36*	0,38*	0,39*	0,44*	0,30*	0,20*	0,43*	0,53*				
W_S	0,41*	0,41*	0,34*	0,41*	0,61*	0,60*	0,61*	0,42*	0,42*	0,43*	0,59*					
W_T	0,68*	0,74*	0,32*	0,42*	0,89*	0,94*	0,96*	0,82*	0,67*	0,41*						
W_N	0,29*	0,26*	0,08	0,07	0,39*	0,38*	0,38*	0,46*	0,31*							
W_V	0,28*	0,33*	0,15	0,15	0,47*	0,45*	0,53*	0,34*								
W_R	0,69*	0,71*	0,37*	0,47*	0,71*	0,78*	0,76*									
W_C	0,71*	0,72*	0,29*	0,44*	0,92*	0,96*										
W_F	0,70*	0,72*	0,29*	0,44*	0,92*											
A	0,65*	0,82*	0,22*	0,38*												
P_{max}	0,58*	0,46*	0,52*													
A_{sat}	0,43*	0,40*														
SLA	0,74*															

*, Índica correlações significativas a 5% de probabilidade.

4.5. Considerações Finais

No presente estudo não foi possível identificar QTLs coincidentes entre alguns caracteres com associações fisiológicas descritas *a priori* na literatura, a saber:

(i) Foram observadas correlações significativas entre $A_{\text{sat}} \times P_{\text{max}}$ de 0,59 e 0,52 na geração RILs F_7 e F_8 , respectivamente (Tabela 8 e 10);

(ii) A correlação significativa de 0,43 entre $N \times A_{\text{sat}}$ ratifica a observação de vários autores (Lugg & Sinclair, 1981; Evans, 1983; Suan-Chin *et al.*, 1985 e Sinclair & Horie, 1989);

(iii) A correlação entre o $N \times \%P$ ($r = 0,16$) não foi significativa a 5% de probabilidade (Tabela 10). Estando assim em desacordo com Del Pozo *et al.* (2000) que afirmaram que a concentração de nitrogênio em órgãos vegetativos (principalmente nas folhas) de leguminosas contribui para a capacidade de suprir a elevada demanda de nitrogênio para a produção das sementes. No entanto, existe a necessidade de esqueletos carbônicos para a exportação do nitrogênio foliar para as sementes (Bootle *et al.* 2001) que deve ser suprida por meio de um incremento proporcional da taxa de assimilação líquida de CO_2 bem como pela taxa respiratória.

(iv) As características $N \times \text{SLA}$ apresentaram uma correlação significativa positiva de 0,74 na população F_8 (Tabela 10), de forma semelhante ao destacado por Lugg & Sinclair (1981);

(v) As características $\text{SLA} \times A_{\text{sat}}$ foram positivas e significativamente correlacionadas em ambas as populações estudadas, observando-se correlações de 0,40 e 0,42 para a geração F_7 e F_8 , respectivamente (Tabelas 8 e 10). Assim, decréscimos na SLA estariam correlacionados com a perda de proteínas (teor de nitrogênio) nas folhas com conseqüente diminuição da fotossíntese líquida (Lugg & Sinclair, 1981). Entretanto, não está claro o papel da SLA como uma característica, embora exista uma tendência de sua correlação com a suculência das folhas e, em alguns casos, com a fotossíntese foliar, em função de expressar o número total de células do mesófilo foliar por unidade de profundidade (Beadle, 1993).

(vi) A característica A_{sat} apresentou, em ambas as gerações, correlações positivas e significativas tanto com o número de sementes (N_S) quanto com a massa fresca de sementes por planta (W_S). Na geração F_7 , as correlações observadas foram de 0,57 e 0,55 para N_S e W_S , respectivamente. Enquanto, na geração F_8 , correlações de 0,37 e 0,34 foram observadas para $N_S \times A_{\text{sat}}$ e $A_{\text{sat}} \times W_S$, respectivamente (Tabelas 8 e 10). Esta diferença pode ser atribuída à interação significativa entre genótipo versus ambiente verificada para estas três variáveis (Tabela 6). A correlação de 0,55 entre a A_{sat} e a massa fresca de sementes por planta (W_S) (Tabela 8) é semelhante aos valores de 0,55 e 0,54 observados para a correlação de taxa de fotossíntese aparente da copa versus produção de sementes em duas populações F_3 diferentes de *G. max* (Harrison *et al.*, 1981)

A não detecção de QTLs coincidentes para estas características fisiológicas, citadas acima nos itens i a vi, pode ser explicada pela fase inicial de saturação do mapa de ligação utilizado no presente estudo.

Outro fato que deve ser salientado diz respeito às correlações entre o %P que, na geração F_7 foram significativas para várias características (Tabela 8). Todavia, na geração F_8 , estas correlações não foram observadas (Tabela 10). Este fato pode ser explicado, em parte, pela interação significativa genótipo x ambiente observada para esta característica (Tabelas 8 e 10). Pode-se considerar que as correlações não significativas entre a %P e os demais caracteres apresentadas na geração F_7 (Tabela 7) estão mais de acordo com a literatura.

Pode-se notar comparando as Tabelas 7 e 9 que a localização dos QTLs pode variar em função da interação significativa entre o genótipo x ambiente (Tabela 6). Assim, dos 34 QTLs detectados, 33 foram considerados ambiente específicos. Isto também foi observado por Lee *et al.* (1996) quando identificou QTLs relacionados com teores de proteína e óleo nas sementes, em três locais diferentes. Por outro lado, apenas um QTL foi detectado em ambos os ambientes. Este estaria associado ao número de sementes por planta (N_S) e localizado no GL K (Tabelas 7 e 9).

Observou-se um padrão quase constante de separação espacial dos QTLs, considerando as duas gerações / ambientes, a saber: Independência dos QTLs relacionados às características foliares (**SLA**, **A_{sat}** e **M**), em relação a QTLs associados aos componentes da partição de biomassa das plantas (**W_R**, **W_C**, **W_F**, **W_T** e **W_V**) e em relação ao terceiro grupo de QTLs, relacionado a produtividade (**W_{CS}**, **W_S**, **N_S** e **N_V**).

A separação espacial dos QTLs pode indicar que a manipulação das características destes três grupos pode ser realizada independentemente. Por outro lado, modelos que visem prever a produtividade de *G. max*, utilizando como variável independente, por exemplo a **SLA**, podem apresentar baixa eficiência.

A identificação de QTLs relacionados a produção e, principalmente, das condições em que não existe esta associação, poderá ajudar no desenvolvimento de modelos de simulação de produção baseados em genes para uma determinada cultura (Boote *et al.*, 2001).

Assim, existe um grande potencial para a melhor integração de estudos fisiológicos com programas de melhoramento, onde modelos matemáticos para predição da produção da soja serão baseados, principalmente, na coincidência de QTLs associados à produção e às características fisiológicas, como por exemplo, taxa de assimilação líquida de CO₂.

5. CONCLUSÕES

Nas condições em que foi realizado o experimento, pode-se concluir que:

- a) Identificar QTLs associados à fotossíntese e características de crescimento da soja: área foliar específica, taxa de assimilação líquida de CO₂ em luminosidade saturante, nitrogênio foliar específico, massa seca de raízes, caule, folhas, total e de vagens por planta; massa fresca de cem sementes, número de sementes e de vagens por planta.

- b) As correlações entre os caracteres da soja foram ratificadas parcialmente pela coincidência de QTLs.

- c) As populações RILs avaliadas apresentam um grande potencial para o mapeamento de locos associados a varias características da cultura da soja.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARRESE-IGOR, C.; MINCHIN, F. R.; GORDON, A. J.; NATH, A. K Possible causes of the physiological decline in soybean nitrogen fixation in the presence of nitrate. **Journal of Experimental Botany**, **48**: 905 – 913, 1997.
- BASTEN, C. J; ZENG, Z. B.; WANG, S. (Raleigh, USA). **Windows QTL Carthographer, version 2.0**. Raleigh, NC: Department of Statistics; North Carolina State University, 2002.
- BEADLE, C. L. Growth analysis In: Hall, D. O.; SCURLOCK, J. M. O.; BOLHÁR-NORDENKAMPF, R. C. L.; LONG, S. P., ed. **Photosynthesis and production in a changing environment: a field and laboratory manual**. London: Chapman & Hall, 1993. p.36-46
- BEVAN, M. W.; ROOK, F.; BAIER, M.; HEMMANN, G.; HADINGHAM, S.; HOLMAN, R. Genetic analysis of sugar-mediated gene expression in *Arabidopsis*. In: **Abstracts / Comparative Biochemistry and Physiology Part A** 132, 2002. S101–S114
- BOON-LONG, P.; EGLI, D. B.; LEGGETT, J. E. Leaf N and photosynthesis during reproductive growth in soybeans. **Crop Science**, **23**: 617 – 620, 1983.
- BOOTE, K.J.; KROP, M.J.; BINDRABAN, P.S. Physiology and modelling of traits in crop plants: implications for genetic improvement. **Agricultural Systems**, **70**: 395-420, 2001.
- BURTON, J. W. Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). **Field Crops Research**, **53**:171-186, 1997.
- BUSCHER, N.; ZYPRIAN, E.; BACHMANN, O.; BLAICH, R. On the origin of the grapevine variety Muller-Thurgau as investigated by the inheritance of random amplified polymorphic DNA (RAPD). **Vitis**, **33** (1): 15-17, 1994.
- CHRISTY, A. L.; WILLIAMSON, D. R. Characteristics of CO₂ fixation and productivity of corn and soybeans In: LUDDEN, P. W.; BURRIS, J. E. ed. **Nitrogen fixation and N₂ metabolism**. Amsterdam: Elsevier Science Publishing Co, 1985. p.379-387
- COLLINS, G.G.; SYMONS, R. H. Polymorphism's in grapevine DNA detected by the RAPD PCR technique. **Plant Molecular Biology Report**, **11**(2): 105-112, 1993.
- CREGAN, P. B.; JARVIK, T.; BUSH, A. L.; SHOEMAKER, K. C.; LARK, K. G.; KAHLER, A. L.; KAYA, N.; VAN TOAI, T. T.; LOHNES, D. G.; CHUNG, J.;

- SPECHT, J. E. An integrated genetic linkage map of the soybean genome. **Crop Science**, **39**: 1464 - 1490, 1999.
- CURTIS, P. E.; OGREN, W. L.; HAGEMAN, R. H. Varietal effects in soybean photosynthesis and photorespiration. **Crop Science**, **9**:323-327, 1969.
- CRUZ, C. D.; SHUSTER, I. **Programa Gqmol** (Viçosa, Brasil). Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- DE VIENNE, D.; BOST, B.; FIÉVET, J.; ZIVY, M.; DILLMANN, C. Genetics variability of proteome expression and metabolic control. **Review**, **39**: 271-283, 2001.
- DE VIENNE, D.; LEONARDI, A.; DAMERVAL, C.; ZIVY, M. Genetics of proteome variation for QTL characterization: application to drought-stress responses in maize. **Journal of Experimental Botany**, **50**: 303-309, 1999.
- DEMÉTRIO, C. G. B. Transformação de dados. Efeitos sobre a análise de variância. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, 1978. 100p. Dissertação Mestrado.
- DEORGE, R. W.; CHURCHILL, G. A. Permutation tests for multiple loci affecting a quantitative character. **Genetics**, **142**: 285 – 294, 1996.
- DORNHOFF, G. M.; SHIBLES, R. M. Varietal differences in net photosynthesis of soybean leaves. **Crop Science**, **10**:42-45, 1970.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, **12**:13-15, 1990.
- EARL, H. J. Stomatal and non-stomatal restrictions to carbon assimilation in soybean (*Glycine max*) lines differing in water use efficiency. **Environmental and Experimental Botany**, **48**: 237-246, 2002.
- EDWARDS, M. D.; STUBER, C. W.; WENDEL, J. F. Molecular marker facilitated investigations of quantitative trait loci in maize. I. Number, distribution and types of gene action. **Genetics**, **116**:113-125, 1987.
- EGLI, D. B.; BRUENING, W. P. Increasing sink size does not increase photosynthesis during seed filling in soybean. **European Journal of Agronomy**, **19**:289-298, 2003.
- ELLEUCH, H.; BELBAHRI, L.; BOETTI, H.; DAVID, H.; THOMASSET, B.; DAVID, A. Rice *saT* promoter is activated in *Papaver somniferum* and *Nicotiana tabacum* transgenic cells in the absence of exogenous ABA. **Plant Physiology**

- Biochemistry**, **39**: 271-283, 2001.
- EVANS, J. R. Developmental constraints on photosynthesis: effects of light and nutrition *In*: BAKER, N. R., ed. **Photosynthesis and the environment**. Kluwer Academic Publishers, 1996. p.281-304.
- EVANS, J. R. Nitrogen and photosynthesis in the flag leaf of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Plant Physiology**, **72**:297-302, 1983.
- FALCONER, D. S. **Introdução à genética quantitativa**. Viçosa: Imprensa Universitária, 1987. 279p.
- FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stage of soybean development. Special Report 80**. Ames, Iowa, Cooperative Extension Service. Iowa State University, 1977. 11p.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares RAPD e RFLP em genética**. 2. ed. Brasília: EMBRAPA - CENARGEN, 1995. 220p.
- FORD, D. M.; SHIBLES, R.; GREEN, D. E. Growth and yield of soybean lines selected for divergent leaf photosynthetic ability. **Crop Science**, **23**:517-520, 1983.
- FOYER, C. H. Feedback inhibition of photosynthesis through source-sink regulation in leaves **Plant Physiology Biochemistry**, **26**: 483-492, 1988.
- GALTIER, N.; FOYER, C.; HUBER, J.; VOELKER, T.; HUBER, S. C. Effects of elevated sucrose-phosphate synthase activity on photosynthesis, assimilate partitioning, and growth in tomato (*Lycopersicon esculentum* var UC82B). **Plant Physiology**, **101**:535-543, 1993.
- GAN, Y.; STULEN, I.; van KEULEN, H.; KUIPER, P. J. C. Effect of N fertilizer top-dressing at various reproductive stages on growth, N₂ fixation and yield of three soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) genotypes. **Field Crops Research**, **80**: 174-155, 2003.
- GAN, Y.; STULEN, I.; van KEULEN, H.; KUIPER, P. J. C. Physiological response of soybean genotypes to plant density. **Field Crops Research**, **74**: 231-241, 2002.
- GEIGER, D. R. Understanding interactions of source and sink regions of plants. **Plant Physiology Biochemistry**, **25**: 659-666, 1987.
- GRANDO, M.S.; MICHELI, L. de; BIASETTO, L.; SCIENZA, A.; DeMICHELI, L. RAPD markers in wild and cultivated *Vitis vinifera*. **Vitis**, **34**(1):37-39, 1995.

- GRIFFIN, K. L.; LUO, Y. Sensitivity and acclimation of *Glycine max* (L.) Merr. Leaf gas exchange to CO₂ partial pressure. **Environmental and Experimental Botany**, **42**:141-143, 1999.
- HARRISON, S. A.; BOERMA, H. R.; ASHLEY, D. A. Heritability of canopy-apparent photosynthesis and its relationship to seed yield in soybeans. **Crop Science**, **21**:222-226, 1981.
- HEINEKE, D.; KAUDER, F.; FROMMER, W.; KUHN, C.; GILLISSEN, B.; LUDEWIG, F.; SONNEWALD, U. Application of transgenic plants in understanding responses to atmospheric change. **Plant, Cell and Environment**, **22**:623-628, 1999.
- HERRIDGE, D. F.; BETTS, J. H. Field evaluation of genotypes selected for enhanced capacity to nodulate and fix nitrogen in the presence of nitrate. **Plant and soil**, **110**:129-135, 1988.
- HERRIDGE, D. F.; DANSO, S. K. A. Enhancing crop legume N₂ fixation through selection and breeding **Plant and Soil**, **174**:51-82, 1995.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**; métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3.ed., São Paulo, 1985. v.1, 533p.
- KOLCHINSKY, A.; GRESSHOFF, P. M. A major satellite DNA of soybean is a 92-pairs tandem repeat. **Theoretical Applied Genetics**, **90**:621-623, 1995.
- LANDER, E. S.; GREEN, P.; ABRAHAMSON, J.; BARLOW, A.; DALY, M. J.; LINCOLN, S. E.; NEWBURG, L. Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. **Genomics**, **1**:147-181, 1987.
- LEBRETON, C.; LAZIC-JANCIC, V.; STEED, A.; PEKIC, S.; QUARRIE, S. A. Identification of QTL for drought responses in maize and their use in testing causal relationships between traits. **Journal of Experimental Botany**, **46**:853-865, 1995.
- LEE, S. H.; BAILEY, M. A.; MIAN, M. A. R.; CARTER Jr., T. E.; SHIPE, E. R.; ASHLEY, D. A.; PARROTT, W. A.; R. S. HUSSEY; BOERMA, H. R. RFLP loci associated with soybean seed protein and oil content across populations and locations. **Theoretical Applied Genetics**, **93**:649-657, 1996a.
- LEE, S. H.; BAILEY, M. A.; MIAN, M. A. R.; SHIPE, E. R.; ASHLEY, D. A.; PARROTT, W. A.; R. S. HUSSEY; BOERMA, H. R. Identification of quantitative

- trait loci for plant height, lodging and maturity in a soybean population segregating for growth habit. **Theoretical Applied Genetics**, **92**:516-523, 1996b.
- LEWIS, C. E.; NOCTOR, G.; CAUSTON, D.; FOYER, C. H. Regulation of partitioning in leaves. **Australian Journal Plant Physiology**, **27**:507-519, 2000.
- LODHI, M. A.; WEEDEN, N. F.; REISCH, B. I. Characterization of RAPD markers in *Vitis*. **Vitis**, **36**(3):133-140, 1997
- LUGG, D. G.; SINCLAIR, T. R. Seasonal changes in photosynthesis of field-grown soybean leaflets 2. relation to nitrogen. **Photosynthetica**, **15**(1):138-144, 1981.
- MANSUR, L. M.; LARK, K. G.; KROSS, H.; OLIVEIRA, A. Interval mapping of quantitative trait loci for reproductive, morphological, and seed traits of soybean (*Glycine max* L.). **Theoretical Applied Genetics**, **86**:907-913, 1993.
- MATTHEW, P.; PELINY, T.; GODDIJN, O. Enhancing photosynthesis with sugar signals, **Trends in Plant Science**, **6**(5):197-200, 2001.
- McCLURE, P. R.; ISRAEL, D. W.; VOLK, R. J. Evaluation of the relative ureide content of xylem sap as an indicator of N₂ fixation in soybeans. **Plant Physiology**, **66**:720-725, 1980.
- MEDLYN, B. E. Interactive effects of atmospheric carbon dioxide and leaf nitrogen concentration on canopy light use efficiency: a modeling analysis. **Tree Physiology**, **16**:201-209, 1996.
- MIAN, M. A. R; BAILEY, M. A.; ASHLEY, D. A.; WELLS, R.; CARTER Jr., T. E.; PARROTT, W. A., BOERMA, H. R. Molecular markers associated with water use efficiency and leaf ash in soybean. **Crop Science**, **36**:1252-1257, 1996.
- MIAN, M. A. R; WELLS, R.; CARTER Jr., T. E.; ASHLEY, D. A., BOERMA, H. R. RFLP tagging of QTLs conditioning specific leaf weight and leaf size in soybean. **Theoretical Applied Genetics**, **96**:354-360, 1998.
- MIRANDA, F. D. de. Uso de marcadores RAPD para mapeamento de QTLs que determinam teor de proteína em soja. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2002. 56p. Dissertação Mestrado.
- MORENO, S.; GOGORCENA, Y.; ORTIZ, J. M. The use of RAPD markers for identification of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L.). **Scientia Horticulture**, **62**(4): 237-243, 1995.
- NAHAR, B. S; IKEDA, T. Effect of different concentrations of fagon on production and abscission of reproductive organs, growth, and yield in soybean (*Glycine max* L.). **Field Crop Research**, **78**:41-50, 2002.

- NOCTOR, G.; FOYER, C. H. A re-evaluation of the ATP:NADPH budget during C₃ photosynthesis: a contribution from nitrate assimilation and its associated respiratory activity? **Journal of Experimental Botany**, **49**:1895-1908, 1998.
- OLIVEIRA, D. A. de. Mapeamento de QTLs para características agronômicas e relação entre lipoxigenases e teor linolênico com a qualidade fisiológica de sementes de soja. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2002. 100p. Tese Doutorado.
- OLIVEIRA, J. A.; OLIVA, M. A.; CAMBRAIA, J. Effects of cadmium on chlorophyll contents and on peroxidase activity in soybean. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, **6**(2):97-101, 1994.
- OPENSHAW, S. J.; HADLEY, H. H. Selection indexes to modify protein concentration of soybean seeds. **Crop Science**, **24**(1):1-4, 1984.
- 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 polymorphisms. **Nature**, **335**:721-726, 1988.
- PAUSCH, R. C.; MULCHI, C. L.; LEE, E. H.; MEISINGER, J. J. Use de ¹³C and ¹⁵N isotopes to investigate O₃ effects on C and N metabolism in soybeans. Part II. Nitrogen uptake, fixation, and partitioning. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, **60**:61-69, 1996.
- PEDRA, J. H. F.; DELÚ-FILHO, N.; PIROVANI, C. P.; CONTIM, L. A. S.; DEWEY, R. E.; OTONI, W. C.; FONTES, E. P. B. Antisense and sense expression of a sucrose binding protein homologue gene from soybean in transgenic tobacco effects plant growth and carbohydrate partitioning in leaves. **Plant Science**, **152**:87-98, 2000.
- PENGELLY, B.C.; BLAMEY, F.P.C.; MUCHOW, R. C. Radiation interception and the accumulation of biomass and nitrogen by soybean and three tropical annual forage legumes. **Field Crops Research**, **63**: 99-112, 1999.
- POLLOCK, C. J.; FARRAR, J. F. Source-sink relations:the role of sucrose In: BAKER, N. R. ed. **Photosynthesis and the environment**: kluwer Academic Publishers, 1996. p.261-279.
- POWELL, W.; BAIRS, E.; BOOTH, A.; LAWRENCE, P.; MacAULAY, M.; BONAR, N.; YOUNG, G.; THOMAS, W. T. B., McNICOL, J. W.; WAUGH, R. Single locos and multi-locos assays for barley breeding and research. **Proc. VIOC and VIII BGS**. p. 174-181. Saskatoon, CA., 1996.
- PRIOUL, J. L.; QUARRIE, S.; CAUSSE, M.; VIENNE, D. Dissecting complex

- physiological through the use of molecular quantitative genetics. **Journal of Experimental Botany**, **48**:1151-1163, 1997.
- POLLOCK, C.; GALLAGHER, J. Spatial and temporal control of assimilate partitioning in grass and cereal leaves at the level of gene expression. In: **Abstracts / Comparative Biochemistry and Physiology Part A** 132, 2002. S101-S114
- QU, XIANPING; LU, JIANG; LAMIKANRA, O.; QU, X. P.; LU, J. Genetic diversity in muscadine and American bunch grapes based on randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. **Journal of the American Society Horticultural Science**, **121**(6):1020-1023, 1996.
- QUARRIE, S. A. New molecular tools to improve the efficiency of breeding for increased drought resistance. **Plant Growth Regulation**, **20**: 167-178, 1996.
- SAMBROOK, R. C.; FRITSCH, E. F.; MANIATS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, v.3, p.8
- SCHNEIDER, S.; REUSTLE, G.; ZYPRIAN, E. Detection of somaclonal variation in grapevine regenerants from protoplasts by RAPD-PCR. **Vitis**, **35** (2): 99-100, 1996.
- SCHULZE, E. D.; KELLIHER, F. M.; KÖRNER, C.; LLOYD, J.; LEUNING, R. Relationships among maximal stomatal conductance, ecosystem surface conductance, carbon assimilation rate, and plant nitrogen nutrition: A global ecology scaling exercise. **Annual Review Ecology and Systematics**, **25**:629-660, 1994.
- SCOTT, R. A.; KEPHART, K. D. Selection for yield, protein, and oil in soybean crosses between adapted and introduced parents. **Field Crops Research**, **49**:177-185, 1997.
- SERRETI, C.; SCHAPAUGH JUNIOR, W. T.; LEFFEL, R., C. Amino acid profile of high seed protein soybean. **Crop Science**, **34**:207-209, 1994.
- SHEARER, G.; FELDMAN, L.; BRYAN, B. A.; SKEETERS, J. L.; KOHL, D. H.; AMARGER, N.; MARIOTTI, F.; MARIOTTI, A. ¹⁵N abundance of nodules as an indicator of N metabolism in N₂ -fixing plants. **Plant Physiology**, **70**:465-468, 1982.
- SHEEN, J.; ZHOU, L.; JYUN-CHYUN, J. Sugar as signaling molecules. **Current Opinion in Plant Biology**, **2**:410-418, 1999.
- SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene expression and signal transduction in water-stress response. **Plant Physiology**, **115**: 327-334, 1997.

- SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; LIU, Q.; KASUGA, I.; ICHIMURA, K.; MIZOGUCHI, T.; URAO, T.; MIYATA, S.; NAKASHIMA, K.; SHINWARI, Z. K.; ABE, H.; SAKUMA, Y.; ITO, T.; SEKI, M. Molecular responses to drought stress in plants: regulation of gene expression and signal transduction In: SMALLWOOD, M. F.; CALVERT, C. M.; BOWLES, D. J. ed. **Plant Responses to environmental stress**. Oxford: BIOS Scientific Publishers Limited, 1999. p.133-143
- SINCLAIR, T. R.; HORIE, T. Leaf nitrogen, photosynthesis, and crop radiation use efficiency: a review. **Crop Science**, **29**:90-98, 1989.
- SOARES, T. C. B. Mapeamento de locos que controlam o conteúdo de proteína em soja. Viçosa; Universidade Federal de Viçosa, 2000. 67p. Dissertação Mestrado.
- SUAN-CHIN, W.; COWAN, I. R.; FARQUIAR, G. D. Leaf conductance in relation to rate of CO₂ assimilation. **Plant Physiology**, **78**:821-825, 1985.
- THODAY, J. M. Location of polygenes. **Nature**, **191**:368-370, 1961.
- THORPE, M. R.; WALSH, K. B.; MINCHIN, P. E. H. Photoassimilate partitioning in nodulated soybean III. The effect of changes in nodule activity shows that carbon supply to the nodule is not linked to nodule nitrogen metabolism. **Journal of Experimental Botany**, **49**:1827-1834, 1998.
- VENCOVSKY, R. ; P., BARRIGA. **Genética biométrica no fitomelhoramento**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 496p.
- WALKER, D. A. Polarographic measurement of oxygen *In*: Hall, D. O.; SCURLOCK, J. M. O.; BOLHÁR-NORDENKAMPF, R. C. L.; LONG, S. P., ed. **Photosynthesis and production in a changing environment: a field and laboratory manual**. London: Chapman & Hall, 1993. p.168-180.
- WELLS, R.; SCHULZE, L. L.; ASHLEY, D. A.; BOERMA, H. R.; BROWN, R. H. Cultivar differences in canopy apparent photosynthesis and their relationship to seed yield in soybeans. **Crop Science**, **22**:886-890, 1982.
- WIEBOLD, W. J.; SCHIBLES, R.; GREEN, D. E. Selection for apparent photosynthesis and related leaf traits in early generations of soybean. **Crop Science**, **21**:969-973, 1981.
- WILLIAMS, J. G.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, L. A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, **18**:6531-6535, 1990.
- ZENG, Z. B. Precision mapping quantitative trait loci. **Genetics**, **136**:1457-1468, 1994.

7. ANEXO

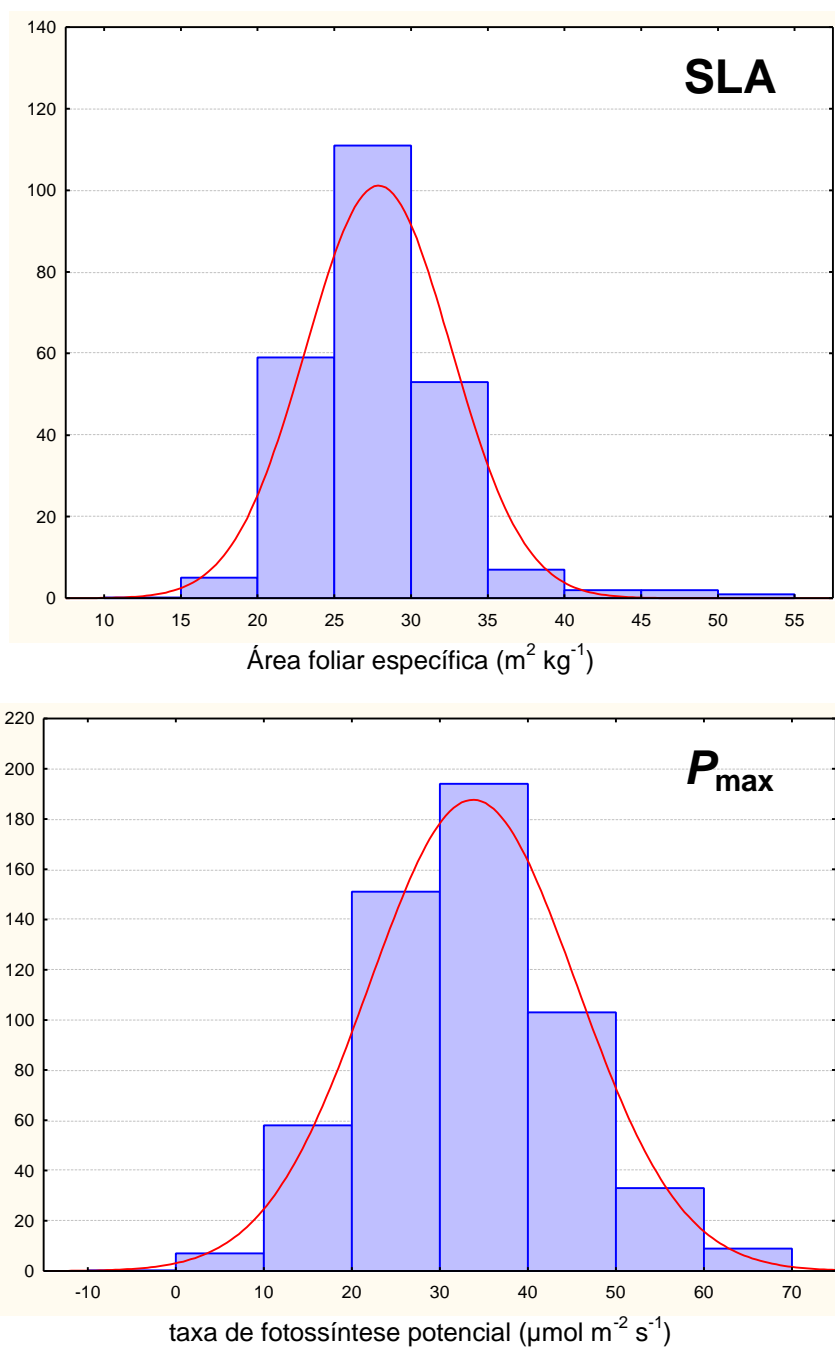


Figura 11. Distribuição de frequência dos dados fenotípicos de algumas características mensuradas na geração F_7 das RILs, submetida à adubação nitrogenada. No eixo das ordenadas, observa-se a frequência em cada classe fenotípica. No eixo das abscissas são apresentadas as classes dos dados fenotípicos para a Área foliar específica, $m^2 kg^{-1}$ (**SLA**); taxa de fotossíntese potencial, $\mu mol m^{-2} s^{-1}$ (**P_{max}**); massa seca de folhas, g (**W_F**); caule, g (**W_C**); raízes, g (**W_R**); massa fresca de sementes por planta, número de vagens (**N_V**) e percentagem de proteínas na semente (**%P**). A linha contínua representa a distribuição normal esperada.

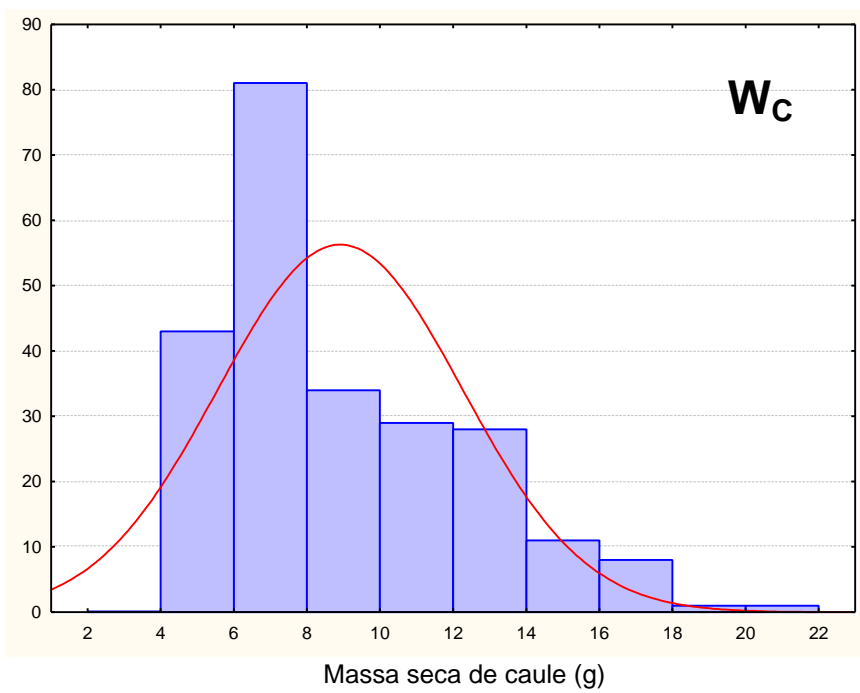
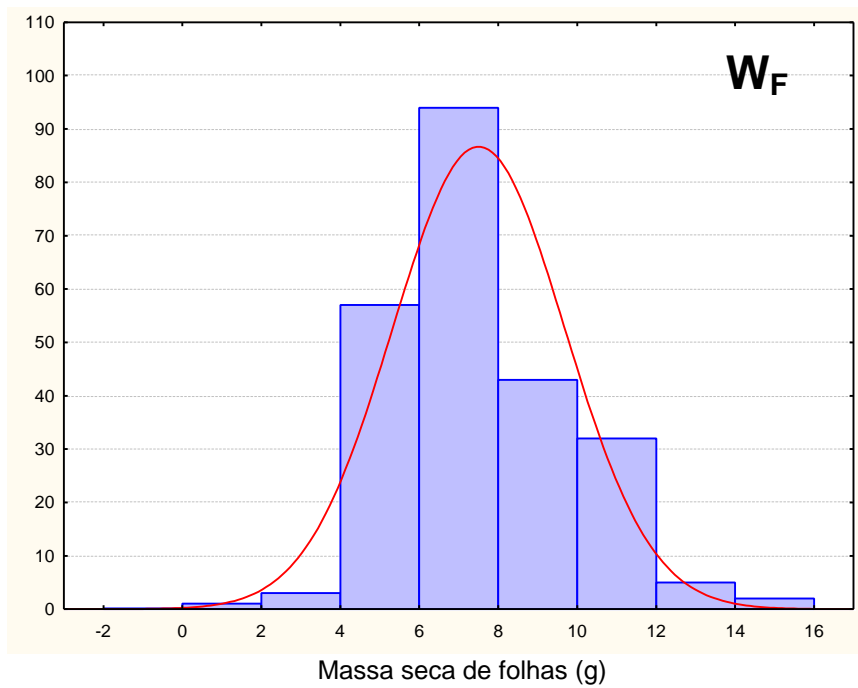


Figura 11. Continuação

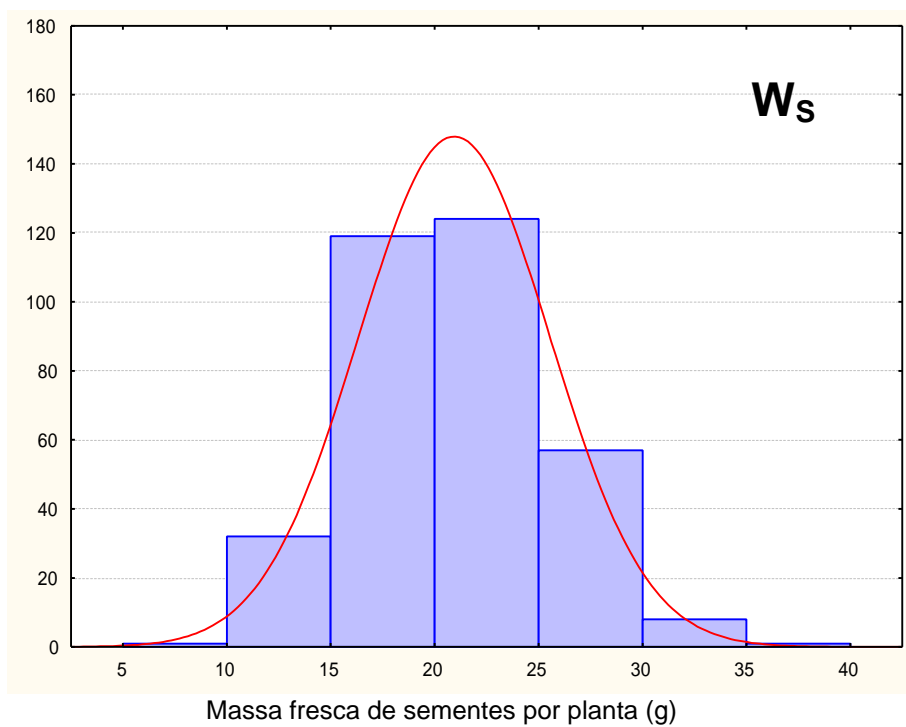
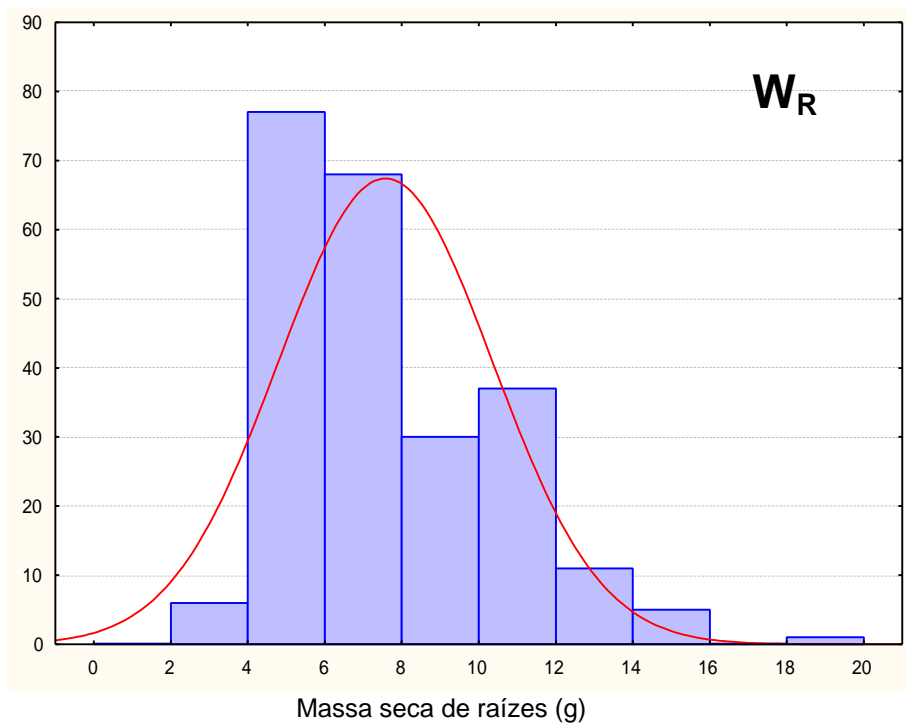


Figura 11. Continuação

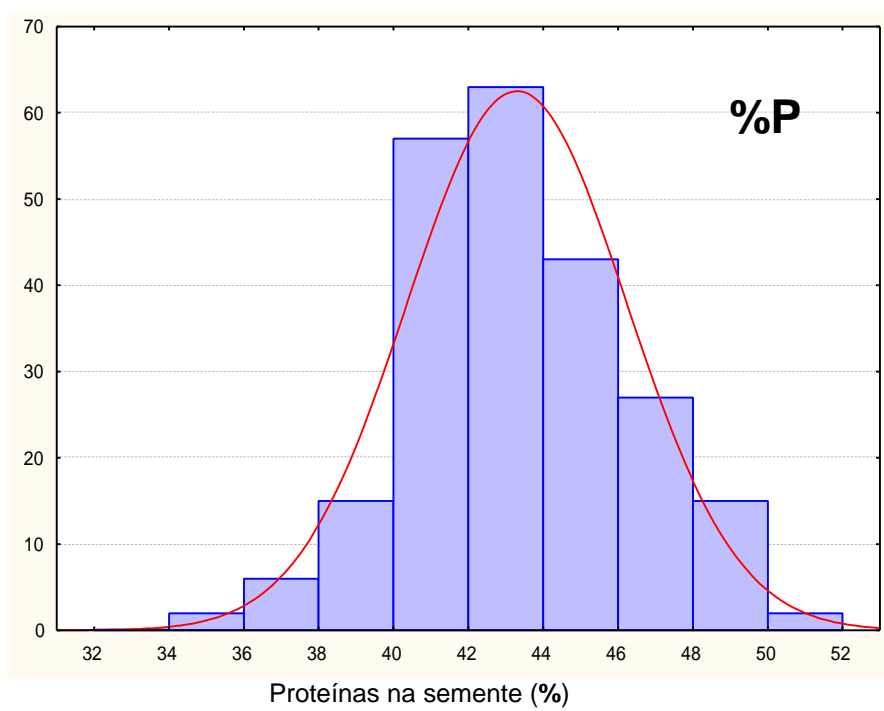
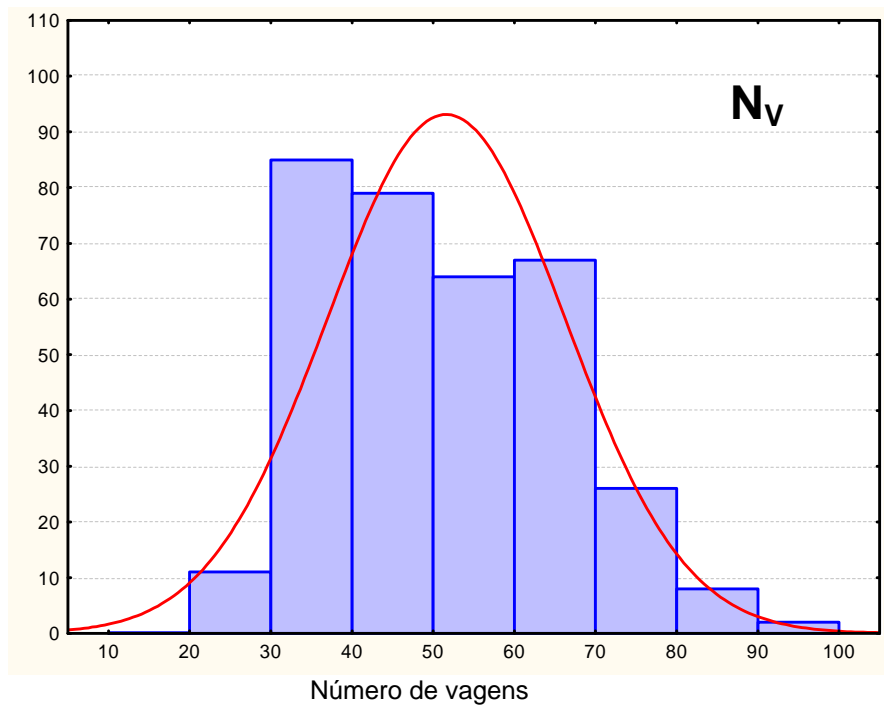


Figura 11. Continuação

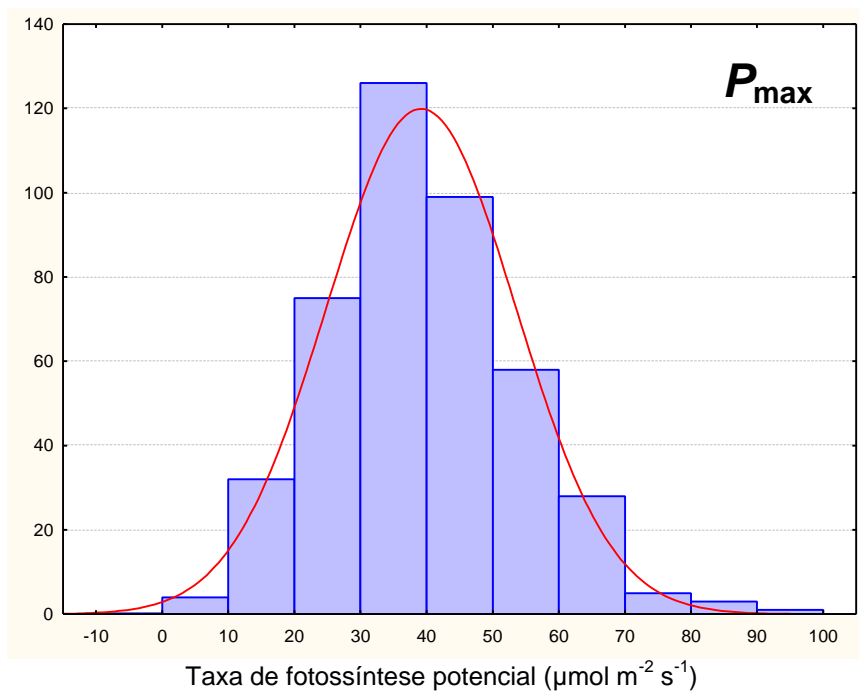
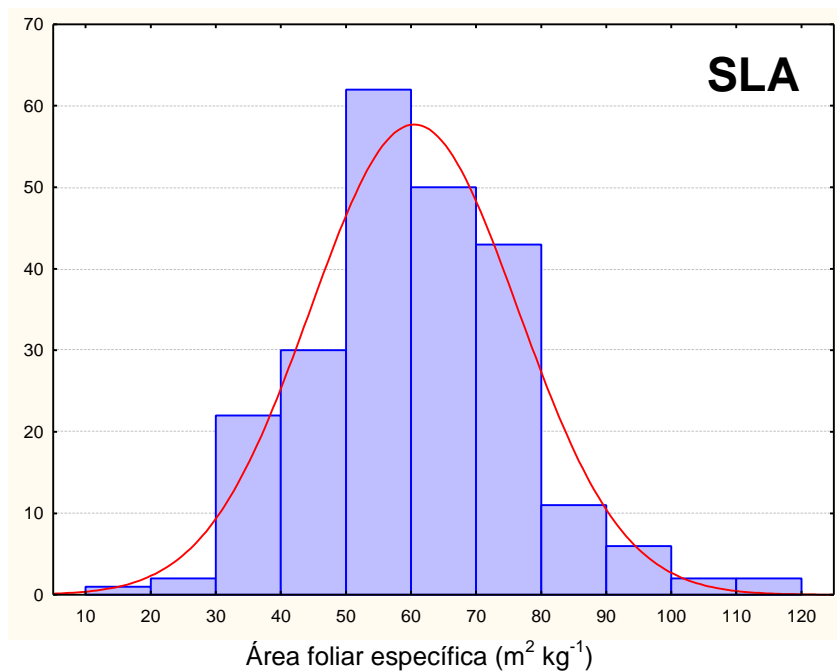


Figura 12. Distribuição de frequência dos dados fenotípicos de algumas características mensuradas na geração F_8 das RILs, não submetida à adubação nitrogenada. No eixo das ordenadas, observa-se a frequência em cada classe fenotípica. No eixo das abscissas são apresentadas as classes dos dados fenotípicos para a área foliar específica, $\text{m}^2 \text{kg}^{-1}$ (**SLA**); taxa de fotossíntese potencial, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (**P_{\max}**); massa seca de folhas, g (**W_F**); caule, g (**W_C**); raízes, g (**W_R**); vagens, g (**W_V**) e nódulos, g (**W_N**); massa fresca de sementes por planta, g (**W_S**); número de nódulos (**N_N**); número de vagens (**N_V**) e percentagem de proteínas na semente (**%P**). A linha contínua representa a distribuição normal esperada.

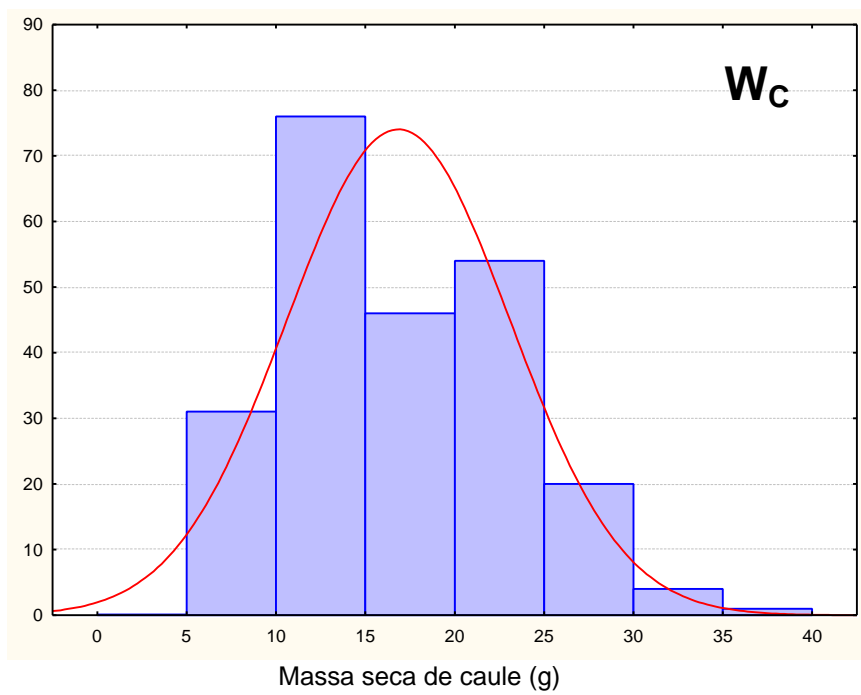
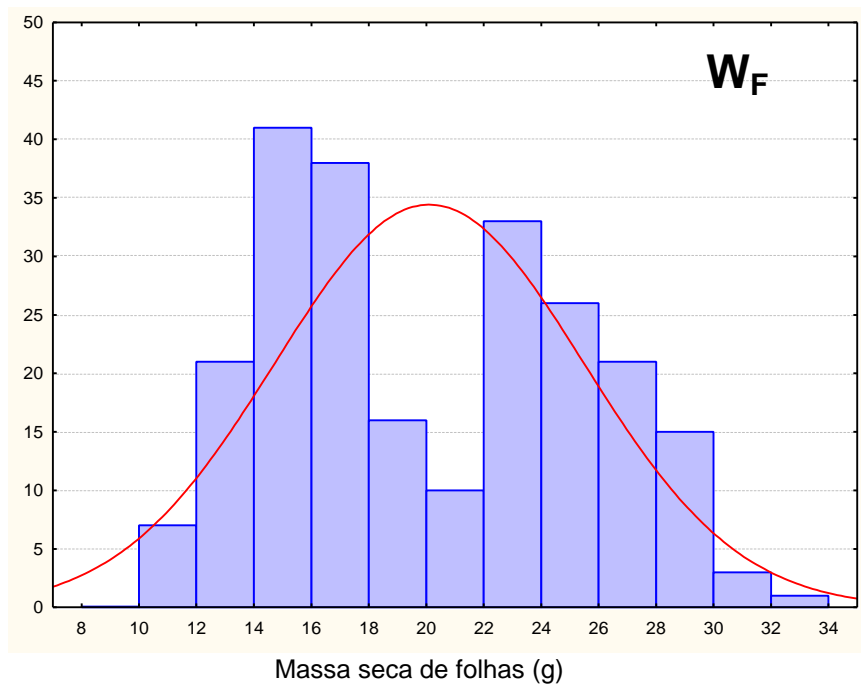


Figura 12. Continuação

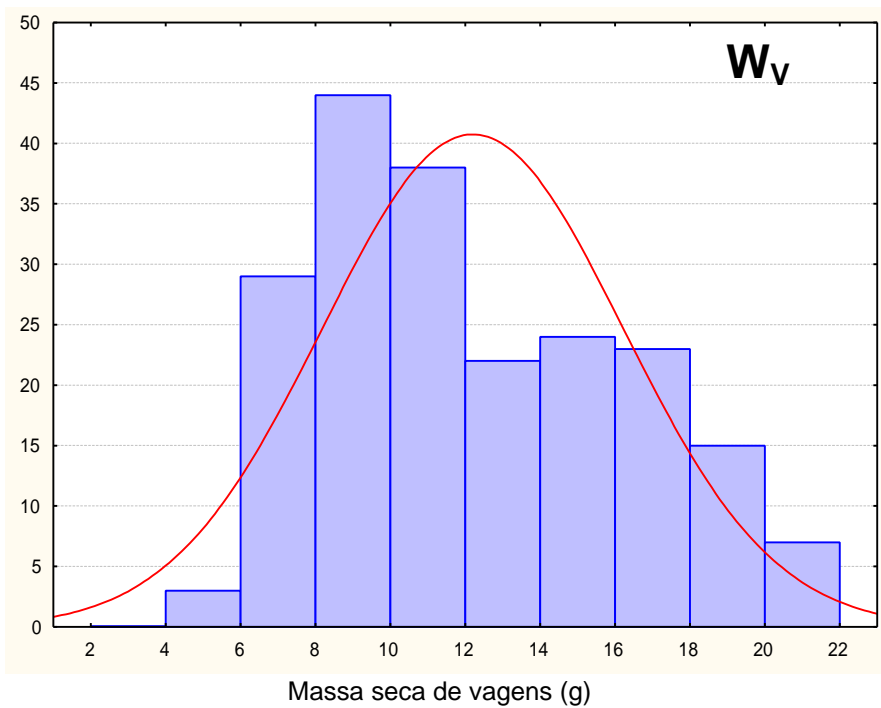
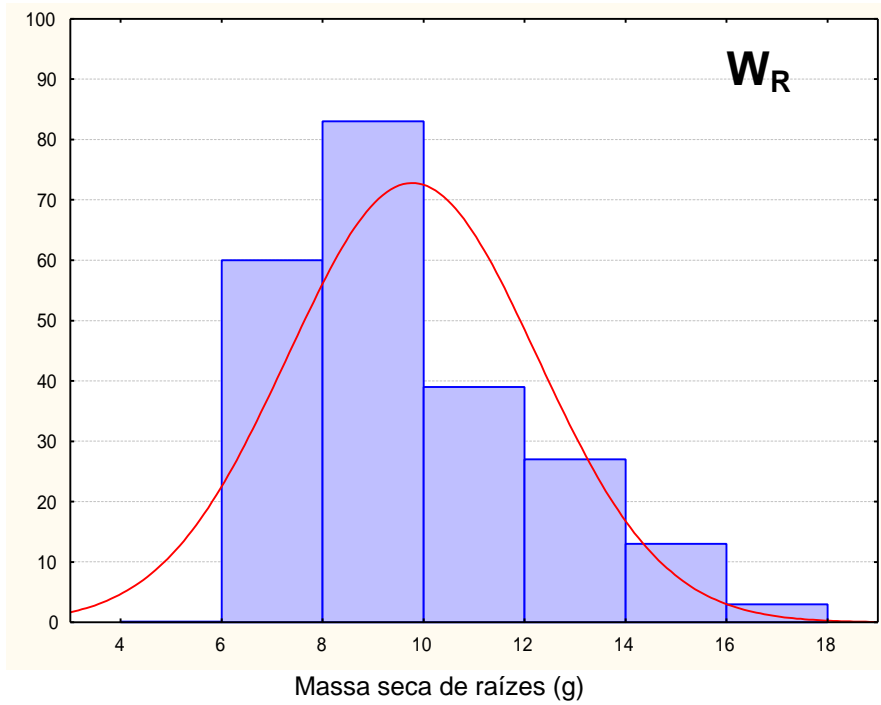


Figura 12. Continuação

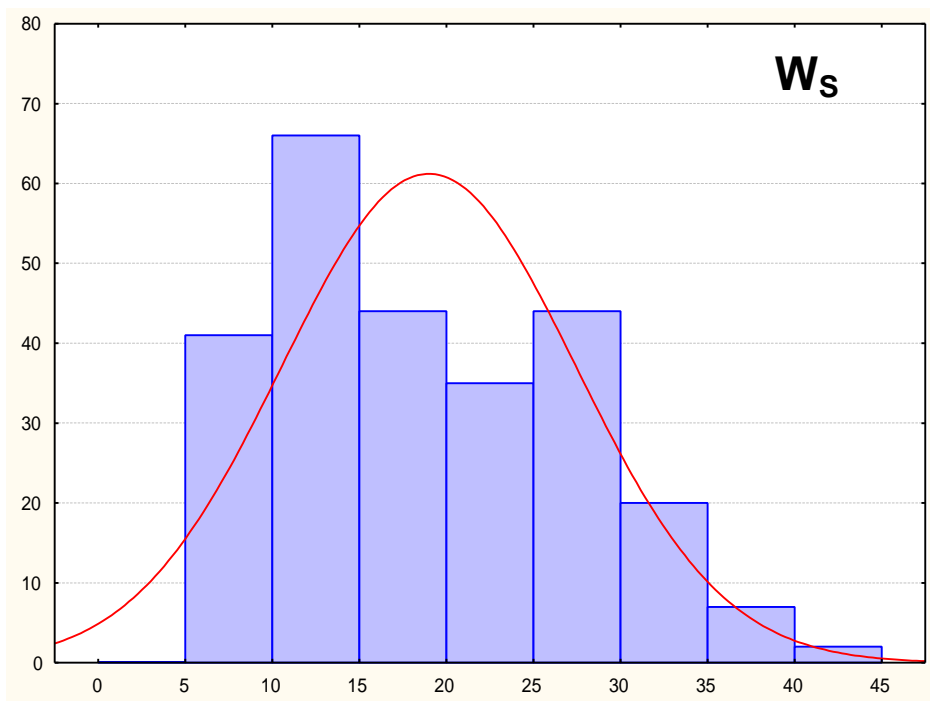
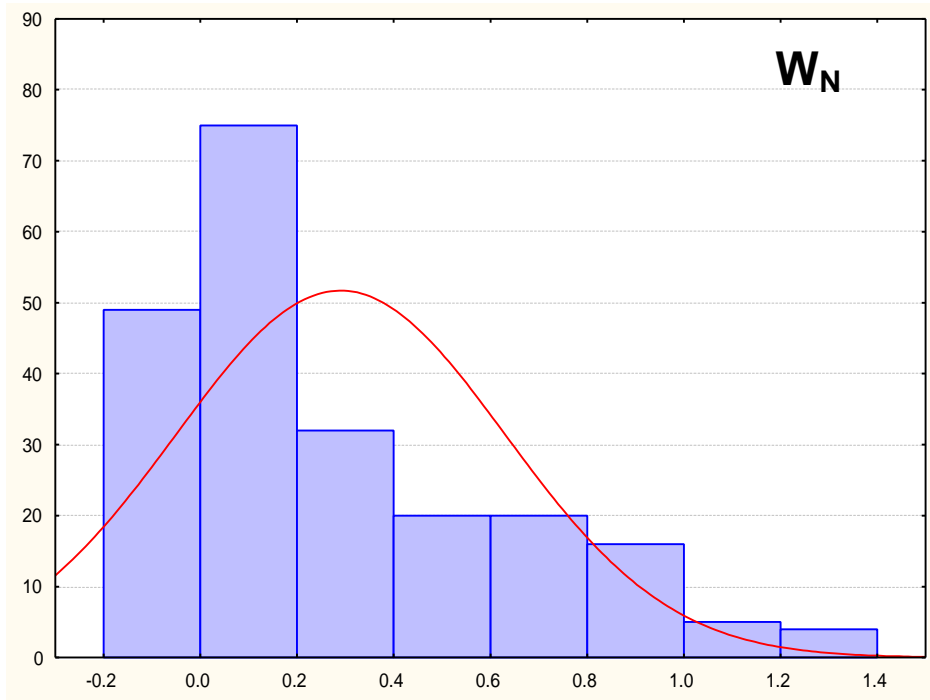


Figura 12. Continuação

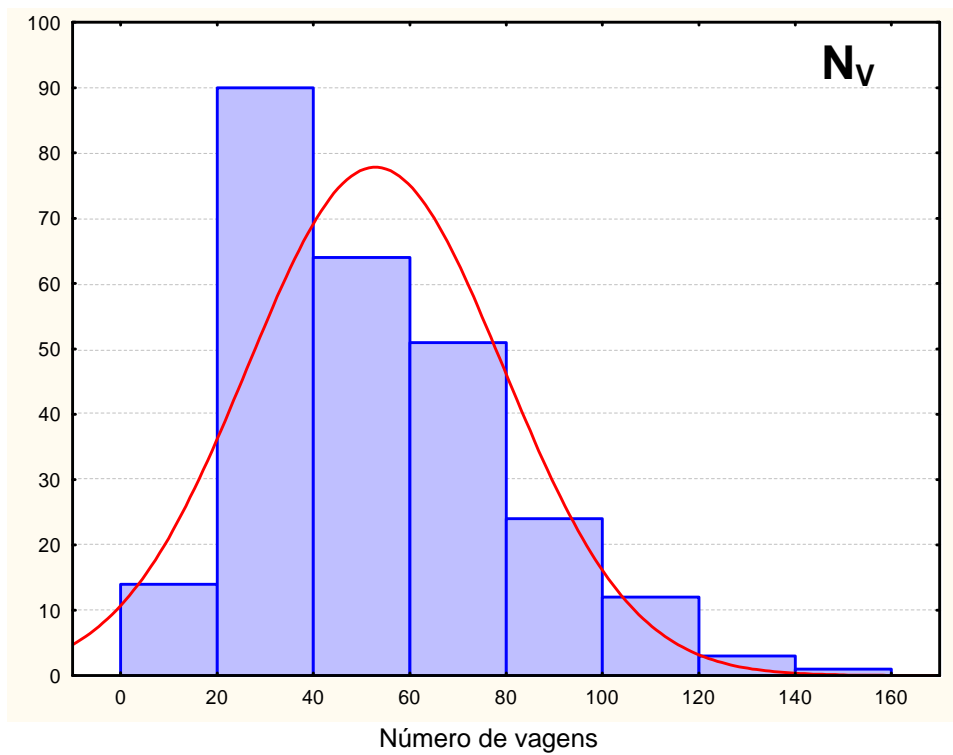
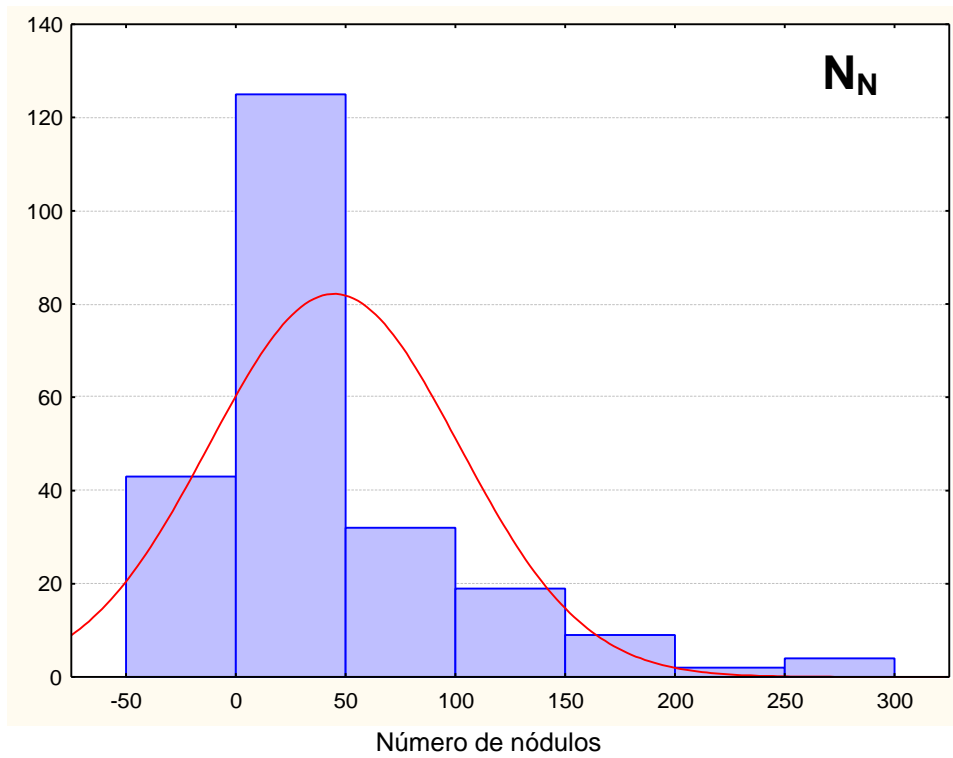


Figura 12. Continuação

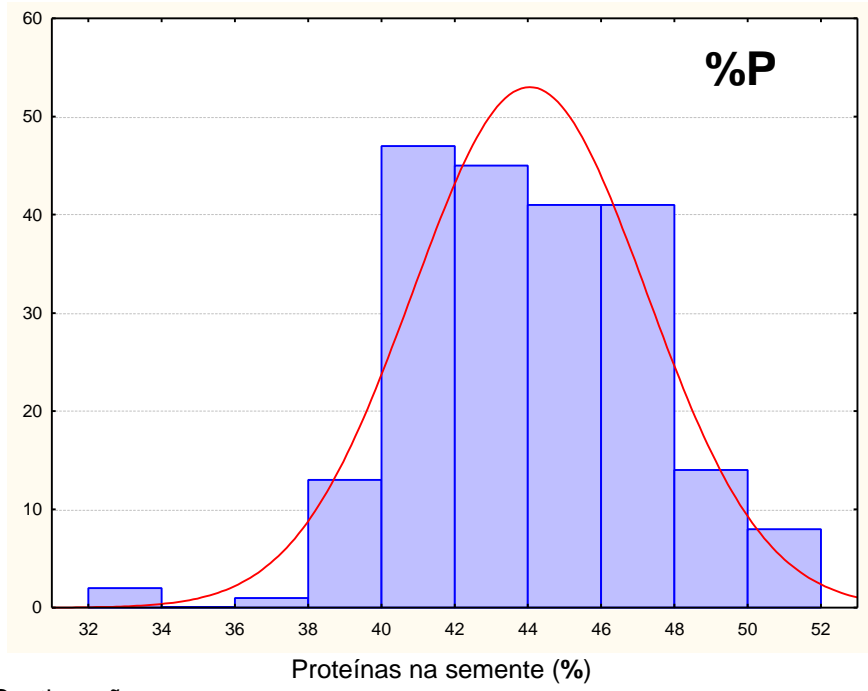


Figura 12. Continuação