

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA EM
POPULAÇÕES SEGREGANTES DE SOJA**

Franco Romero Silva Muniz

Engenheiro Agrônomo

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

2007

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA EM
POPULAÇÕES SEGREGANTES DE SOJA**

Franco Romero Silva Muniz

Orientador: Prof. Dr. Antonio Orlando Di Mauro

Co-Orientador: Prof. Dr. Todd Pfeiffer (University of Kentucky/EUA)

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal – UNESP, para obtenção do Título de Doutor em Agronomia – Área de Concentração em Genética e Melhoramento de Plantas.

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Setembro de 2007

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

FRANCO ROMERO SILVA MUNIZ – nascido em 10 de maio de 1976, em Rondonópolis - MT, é Engenheiro Agrônomo formado pela Universidade Federal de Mato Grosso, em março de 2001. Tornou-se Mestre em Genética e Melhoramento Plantas pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal – UNESP, em julho de 2003. Em setembro de 2007, obteve o título de doutor em Genética e Melhoramento de Plantas, também pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal – UNESP. No período de agosto/2006 à julho de 2007 desenvolveu parte de sua tese na University of Kentucky – EUA. Exerceu também o cargo de representante discente por três anos, no período corrente de mestrado e doutorado, e, fez parte da comissão organizadora do curso de inverno de genética nos anos 2005 e 2006, oferecido pela FCAV/UNESP.

A minha mãe

Darcy de Souza Silva e a minha

avó Osvaldina de Souza Silva

Dedico

*Ao meu pai Herculano Muniz,
ao meu avô Marcionílio “maçu”
(in memória) e ao meu tio
Adílson “pepé” (in memória).*

Ofereço

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela fé e força de vontade que me proporcionou durante toda minha vida e me fez concretizar este trabalho.

As minhas tias Alzira, Nazira, Zanira e Elma e aos meus tios Adenilson “lengo”, Pedro, Emílio “polaco”, Gutemberg e Uir, pelos incentivos e apoio familiar.

À Universidade Estadual Paulista – UNESP – Campus de Jaboticabal, pela estrutura excepcional que possui para a formação do aluno.

À University of Kentucky – EUA, pela oportunidade de execução do trabalho em parceria com a UNESP.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

Ao Prof. Antonio Orlando Di Mauro, pela orientação, amizade e companherismo, e, pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Prof. Todd Pfeiffer, pela disposição, orientação e grande contribuição para realização deste trabalho.

A todos os professores do Departamento de Produção Vegetal pela companhia e pela prontidão em ajudar.

Aos meus primos, Fred, Fernando, Felipe, Fernanda, Sarah, Maria Emília, Heliana, José Henrique, Otávio e João Vitor pelo companheirismo e amizade.

Aos funcionários da UNESP, Geraldo, Rubens, Sebastião, Mauro, Nice, Marisa e Luís pela fundamental ajuda durante os anos de convivência.

A todos os colegas do Departamento de Produção Vegetal “Fitotecnia” pelos anos de convivência e amizade.

Aos colegas que colaboraram na execução deste trabalho, Marcelo, Sandra, Daniela, André e Julio.

À todos os amigos de Jaboticabal, Cuiabá e Poxoréo.

SUMÁRIO

	“Página”
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	01
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1. A cultura da soja.....	03
2.1.1. <i>Origem</i>	03
2.1.2. Importância.....	04
2.1.3. Modo de Reprodução.....	05
2.1.4. Características da Planta.....	06
2.2. Aspectos relacionados ao melhoramento de soja.....	07
2.3. Melhoramento genético visando resistência a doenças.....	09
2.4. Variabilidade genética da soja.....	10
2.5. Conceito de hibridização e sua utilização no aumento da variabilidade.....	11
2.5.1. Técnica de hibridização.....	12
2.5.2. Hibridização na formação das populações segregantes.....	13
2.6. Permuta Genética ou <i>Crossing-over</i> e Mapa Genético.....	13
2.7. PCR - Reação em cadeia da polimerase.....	15
2.7.1. Marcadores Moleculares.....	16
2.7.2. Marcadores moleculares “Microsatélites”.....	17
2.8. Estudo de populações.....	18
2.9. Parâmetros genéticos.....	19
2.9.1. Herdabilidade.....	20
2.9.2. Ganho genético ou resposta a seleção.....	22
3. REFERÊNCIAS.....	23

CAPÍTULO 2

ARTIGO – CROSSING-OVER COMO FONTE DE VARIABILIDADE EM

CRUZAMENTOS DE SOJA	31
RESUMO.....	31
ABSTRACT.....	32
1. INTRODUÇÃO.....	33
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
2.1. <i>Hibridizações e Material Genético</i>	34
2.2. <i>Análises moleculares</i>	37
2.3. <i>Análise dos resultados</i>	39
3. RESULTADOS.....	41
3.1. <i>Detecção de crossing-over</i>	42
3.2. <i>Grupo de ligação G</i>	44
3.3. <i>Grupo de ligação J</i>	47
4. DISCUSSÃO.....	49
5. CONCLUSÕES.....	53
6. REFERÊNCIAS.....	54

CAPÍTULO 3

ARTIGO – VARIABILIDADE GENÉTICA EM SOJA EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE GENITORES CONSTITUINTES DA POPULAÇÃO AVALIADA.....

.....	59
RESUMO.....	59
ABSTRACT.....	60
1. INTRODUÇÃO.....	61
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	62
2.1. <i>Local e ambiente experimental</i>	62
2.2. <i>Análise estatística</i>	65
2.3. <i>Estimativa dos componentes de variância</i>	66

2.4. <i>Estimativa do coeficiente de herdabilidade</i>	69
2.5. <i>Estimativa do ganho genético</i>	70
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70
4. CONCLUSÕES.....	83
5. REFERÊNCIAS.....	84

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

A grande importância adquirida pela soja na agricultura brasileira nas últimas três décadas, deve-se a fatores como as condições edafo-climáticas favoráveis, pela grande extensão de áreas planas, pelo bom manejo do solo e, particularmente, pelo alto número de cultivares melhorados. Este número vem aumentando ano após ano, com cultivares novas e mais produtivas, resistentes a patógeno e com grande adaptação e consolidação em novas áreas de plantio (EMBRAPA, 2006).

Os programas de melhoramento de soja em nosso país destacam-se pela busca incessante de novas variedades que sejam mais resistentes a doenças, com alto potencial produtivo, com período juvenil longo e ciclos adequados à exploração em ambientes específicos. Materiais superiores e estáveis representam um equilíbrio genético muito delicado, que uma vez atingido, ganhos adicionais de produtividade e estabilidade, tornam-se mais difíceis de serem conseguidos e, em geral, cultivares adaptados ou selecionados para determinada região de produção acabam tendo similaridade genética. Como consequência desse equilíbrio, a maioria dos cultivares, dentro de uma região, é geneticamente similar, portanto com uma base genética mais restrita (GIZLICE et al., 1993). Estimativas sobre a variabilidade genética da soja têm destacado que o germoplasma brasileiro provém de base genética restrita, tendo se originado de poucas linhagens ancestrais.

Portanto, nosso país mesmo estando entre aqueles com maior biodiversidade de flora e fauna do mundo, é extremamente dependente de germoplasmas de outros países, pois a maior parte das espécies cultivadas, possui variabilidade genética limitada, decorrente principalmente da utilização de germoplasmas muito similares como genitores nos programas de melhoramento, proporcionando o estreitamento da base genética (NASS et al., 2001; COOPER et al., 2001).

Mais de 500 cultivares de soja em todo o mundo são avaliados exaustivamente em programas de melhoramento. No entanto, alguns estudos mostraram que a diversidade genética entre estes cultivares é baixa (GIZLICE et al., 1994; DELANNEY et al., 1983).

No Brasil, BONETTI (1983) estimou que cerca de 70% dos cultivares desenvolvidos para o Rio Grande do Sul, na década de 60, descendiam das cultivares americanas Hill, Hood ou ambas. HIROMOTO & VELLO (1986), utilizando coeficiente de parentesco de Malécot, determinaram a base genética do germoplasma da soja e relataram que 100% do conjunto gênico de soja existente no Brasil na época era originário da contribuição de apenas 26 ancestrais, tendo 11 linhagens asiáticas ancestrais contribuindo com mais de 90%. Quatro ancestrais com maior contribuição para o germoplasma brasileiro são os mesmos que dão maior contribuição para o germoplasma do sul dos Estados Unidos, evidenciando que, possivelmente, os cultivares brasileiros foram desenvolvidos com a utilização de genótipos oriundos daquela região. Os autores discorreram também sobre a necessidade de aumentar a base genética dos cultivares brasileiros, para evitar o perigo da vulnerabilidade do germoplasma e o estabelecimento de patamares baixos na produção de grãos. Resultados constatados por PRIOLLI et al., (2002), indicaram também, alta similaridade genética entre 186 cultivares de soja testadas no Brasil.

Nos Estados Unidos, APUYA et al., (1988) e KEIM et al., (1989), através de estudos de pedigrees e marcadores genéticos, observaram que os cultivares de soja utilizados nos Estados Unidos são também de base genética estreita, devido ao baixo número de linhas ancestrais utilizadas como fontes de genes. GIZLICE et al., (1994), constatou que apenas 13 cultivares ancestrais eram responsáveis por 80% dos genes relatados nos cultivares de soja, publicados de 1947 a 1988 nos EUA.

Desta forma, mesmo os maiores produtores de soja do mundo, Estados Unidos e Brasil, respectivamente, primeiro e segundo lugares, são dependentes em maior ou menor grau de germoplasmas exóticos, o que confirma que nenhum país é auto-suficiente em termos de recursos genéticos vegetais (NASS et al., 2001).

A ampliação da base genética dos cultivares de soja é de extrema importância, para diminuir os riscos de vulnerabilidade genética e elevar os patamares de produção. Tal situação é decorrente do reduzido número e da alta similaridade entre parentais empregados no desenvolvimento de cultivares, como também do cultivo de extensas áreas com genótipos uniformes, levando ao estabelecimento de patamares limitados de produtividade de grãos e vulnerabilidade a pragas, doenças e condições ambientais estressantes (VELLO, 1992).

Assim, os objetivos deste estudo foram: i) Analisar a variabilidade genética em populações F_2 de soja, obtidas através de cruzamentos entre dois, quatro e oito parentais com reações divergentes ao nematóide do cisto (raça-3) e ao oídio. Esta variabilidade foi avaliada através de marcadores moleculares “microsatélites”, detectando o incremento ou não, do número de *crossing-over* nas populações avaliadas, quando se utiliza dois ou mais parentais na realização dos cruzamentos. ii) Analisar a variabilidade genética dessas populações no campo, através de parâmetros genéticos em características agronômicas relevantes para o melhoramento genético.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A cultura da soja

2.1.1. Origem

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) pertence à família Fabaceae, sub-família Papilonoideae, tendo como centro de origem a China e, deste país, expandiu-se para outras partes da Ásia, por volta do século XI a.C. Domesticada em latitudes compreendidas entre 30 e 45°N, foi disseminada, posteriormente, para a América do

Norte, Europa e América do Sul. No Brasil, a primeira referência de plantio experimental de soja foi no fim do século XIX no ano de 1882, através da introdução de genótipos na Bahia. No século XX, principalmente a partir da década de 60, a cultura passou a adquirir importância econômica no País, inicialmente na Região Sul (latitudes 30 a 22°S), onde apresentou melhor adaptação, devido à semelhança com as regiões tradicionais de cultivo no mundo. Com a crescente demanda por matéria-prima protéica nos países desenvolvidos, foram observados o aumento da produção e a rápida expansão da área de cultivo desta leguminosa da Região Sul rumo ao Cerrado, latitudes 20 a 5°S (URBEN FILHO & SOUZA, 1993), levando o Brasil de uma posição inexpressiva no cenário mundial para a de segundo maior produtor de soja no mundo.

2.1.2. Importância

As leguminosas estão entre as espécies cultivadas mais importantes no mundo, principalmente devido aos elevados teores de proteína (40%), óleo (20%) e pelo alto rendimento de grãos, além de possuir teores consideráveis de vitaminas como tiamina e riboflavina, além de cálcio e ferro (EMBRAPA, 2006). A produção nacional de grãos na safra 2006/07 foi de aproximadamente 133,0 milhões de toneladas, destes, 58 milhões de toneladas foram representados pela soja, com um percentual de 43,6% da produção nacional. Os elevados ganhos produtivos, proporcionados pelo alto desenvolvimento tecnológico na produção brasileira de grãos foram proporcionados pelo melhoramento genético e ciências associadas, como a fitopatologia, entomologia e biotecnologia. No decorrer das últimas décadas, o elevado avanço tecnológico proporcionou melhorias tanto no complexo ambiental, como no potencial genético dos cultivares. Esses avanços se refletiram na evolução da produtividade média da soja no país, que era de 1748 kg/ha, na safra de 1976/77, e na safra 2006/07 passou à aproximadamente 2800 kg/ha (CONAB, 2007).

2.1.3. Modo de reprodução

Os métodos de melhoramento adotados no desenvolvimento de novas variedades de plantas dependem, em parte, do modo de reprodução da espécie, que pode ser sexuada ou assexuada. A reprodução sexuada envolve a união de gametas masculinos e femininos derivados do mesmo parental ou de parentais diferentes. A reprodução assexuada ocorre pela multiplicação de partes das plantas ou pela produção de sementes sem o envolvimento de gametas masculinos e femininos (FEHR, 1993). Na soja, a reprodução é do tipo sexuada, sendo baseada no processo meiótico de divisão celular, em que o número de cromossomos nas células reprodutivas é reduzido a metade para formar os gametas. O restabelecimento da condição diplóide ocorre com a fusão dos gametas (BORÉM & MIRANDA, 2005).

A soja é essencialmente uma espécie autógama, com flores perfeitas, e os órgãos masculinos e femininos encontram-se protegidos dentro da corola, sendo sua taxa de polinização cruzada menor que 1% (BORÉM, ALMEIDA & KIIHL, 1999). Entretanto, AHRENT & CAVINESS (1994) investigaram a taxa de alogamia em diversos genótipos de soja e concluíram que a taxa de fecundação cruzada pode atingir até 2,5%, em condições específicas no campo, como também a presença de insetos polinizadores.

A autopolinização, que é a transferência do pólen de uma antera para o estigma da mesma flor ou de outra flor da mesma planta, proporciona a autofecundação. Alguns fenômenos podem favorecer a autopolinização, como a cleistogamia (pseudocleistogamia), que ocorre na soja, e constitui-se de grãos de pólen que atingem a maturidade e polinizam o estigma antes da abertura do botão floral (BORÉM & MIRANDA, 2005).

2.1.4. Características da planta

O conhecimento das características da planta e da flor e o comportamento de cada genótipo, em determinado ambiente, são importantes para a programação dos cruzamentos. Características como ciclo vegetativo e reprodutivo, altura da planta, qualidade da semente, produção, etc., possuem grande variabilidade, por serem muito influenciadas pelo ambiente (BORÉM, ALMEIDA & KIIHL, 1999).

A soja é uma planta herbácea, anual, ereta e de crescimento morfológico diversificado, podendo ser determinado, semideterminado e indeterminado. A espécie cultivada possui $2n = 40$ cromossomos. A altura varia de 0,3 a 2,0 metros, podendo ser muito ou pouco ramificada, sendo à altura média dos cultivares comerciais entre 60 e 120cm. Dependendo da cultivar e condições ambientais, o ciclo da soja varia de 80 a 200 dias (SEDIYAMA et al. 1985). Para o caráter número de vagens, uma planta pode produzir até 400 vagens, mas em média os cultivares nacionais desenvolvem 30 a 80 vagens por planta (CÂMARA, 1998).

O número de flores produzidas é maior do que a quantidade que a planta pode converter efetivamente em vagens. VAN SCHAİK & PROBST (1958) reportam que uma planta pode emitir até 800 flores, com uma taxa de fertilização de 13 a 57%, dependendo do genótipo e das condições ambientais. O período total de florescimento também pode durar de três a mais de cinco semanas, dependendo do genótipo e do ambiente.

Durante o desenvolvimento da planta, aparecem quatro tipos distintos de folhas: (a) dois cotilédones, constituindo o primeiro par; (b) um par de folhas simples, ou primárias, unifolioladas, que se sucedem aos cotilédones; (c) as folhas trifolioladas que seguem as primárias e constituem todas as demais; (d) os prófilos, pequenos e pouco diferenciados, que se encontram nas bases dos ramos laterais (MULLER, 1981).

FEHR & CAVINESS (1981) caracterizaram os estádios de crescimento das plantas, baseados no número de nós, no desenvolvimento das folhas e das flores (Quadro 1).

Quadro 1. Estádios de desenvolvimento da planta de soja, FEHR & CAVINESS (1981).

Estádio vegetativo	
Vê	Emergência – Cotilédones acima da superfície do solo.
Vc	Estádio Cotiledonar – Folhas unifolioladas não desenvolvidas completamente.
V1	1° Nó – Folha completamente desenvolvida nó unifoliolado.
V2	2° Nó – Trifólios completamente desenvolvido acima do nó unifoliolado.
V3	3° Nó – Trifólios completamente desenvolvido acima do segundo nó.
V4	4° Nó – Trifólio completamente desenvolvido acima do terceiro nó.
Vn	n – número de nós da haste principal com trifólios completamente desenvolvidos.
Estádio Reprodutivo	
R1	Uma flor em qualquer nó.
R2	Floração completa.
R3	Início da formação de vagem (± 5 mm)
R4	Formação de vagens completas (± 2 cm)
R5	Início da formação de sementes (± 3 mm)
R6	Formação de sementes completas.
R7	Início da maturação (50% das folhas amareladas ou maturação fisiológica).
R8	95% dos legumes de cor palha a marrom (maturação completa ou ponto de colheita).

2.2. Aspectos relacionados ao melhoramento de soja

O progresso no melhoramento de plantas é dependente da habilidade em selecionar genótipos superiores, dentro de progênies homozigotas e heterozigotas oriundas de cruzamentos entre parentais divergentes. As populações de melhoramento são de tamanho finito e diferentes processos seletivos são adotados para que o genótipo superior seja obtido (FEHR, 1993).

Uma vez lançado no mercado como cultivar, este genótipo, devido à sua alta concentração de alelos favoráveis pode ser utilizado como parental em programa de melhoramento. Esta prática tem influência direta na estrutura genética das populações

em melhoramento, pois, aumenta o coeficiente de endogamia e reduz a base genética dos programas de melhoramento. Diante disso, aumenta-se a probabilidade de se atingir platôs de produtividade e vulnerabilidade genética a estresses bióticos e abióticos (HOISINGTON et al., 1999). Vários autores têm constatado que apesar das altas intensidades de seleção aplicadas e da prática de se cruzar “bom x bom”, tanto a taxa de melhoramento quanto a variabilidade genética estão se mantendo no decorrer dos ciclos seletivos (DUDLEY & LAMBERT, 1992; RASMUSSEN & PHILLIPS, 1997; PINTO et al., 2003; PRIOLLI et al., 2004; YU & BERNARDO, 2004). Diversas hipóteses têm sido sugeridas para a manutenção da variabilidade genética, tais como: a recombinação gênica, epistasia, recombinação intragênica, metilação do DNA, paramutação e amplificação gênica.

Contribuem para uma alta estabilidade de uma cultivar, a introdução de resistência a doenças, nematóides e insetos, assim como o conhecimento e a seleção de genótipos com características agrônomicas desejáveis (KIIHL & ALMEIDA, 2000). Grande parte dos programas de melhoramento envolvem quatro etapas principais: escolha dos parentais, cruzamentos entre os mesmos e obtenção de genótipos segregantes, avanço das gerações iniciais através de autofecundações naturais, teste de desempenho agrônomico e seleção das linhagens experimentais. A etapa intermediária correspondente ao avanço das gerações de endogamia feita de forma rotineira, com a desvantagem do aumento do número de anos de cada ciclo do programa de melhoramento e a demanda adicional de recursos humanos e financeiros. Essas limitações poderiam ser contornadas pela eficiente escolha dos parentais e pela avaliação e seleção dos genótipos promissores logo nas gerações iniciais. Essa estratégia consegue eliminar ou reduzir, já nas gerações iniciais, problemas de incompatibilidade híbrida e diferenças na capacidade de combinação que levam a ocorrência de cruzamentos inferiores (BORÉM & MIRANDA, 2005).

2.3. Melhoramento genético visando resistência a doenças

Como toda cultura exótica, a soja iniciou sua expansão no Brasil com excelente sanidade. No entanto, em poucos anos de cultivo as doenças começaram a surgir, passando a representar um dos fatores limitantes no aumento e na estabilidade de rendimento (YORINORI, 2000). Cerca de 50 doenças já foram identificadas no país, causando sérios prejuízos e, como exemplo, destacam-se o nematóide do cisto (raça 3) - *Heterodera glycines* e o oídio - *Erysiphe diffusa*. Entretanto, a ferrugem asiática da soja, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, passou a partir de 2003 a ser a doença de maior importância na cultura, causando prejuízos relevantes nas lavouras de soja em todas as regiões produtoras do país.

O valor da resistência das plantas cultivadas no controle de suas doenças foi reconhecido a partir do início do século XX, com os progressos da genética e da fitopatologia que proporcionaram, ao melhoramento de plantas, condições para a criação de variedades resistentes às doenças, capazes de evitar os prejuízos causados pelos patógenos, pela simples substituição das variedades suscetíveis pelas resistentes. Assim, o principal objetivo da maioria dos programas de melhoramento tem sido a criação de variedades resistentes, por ser o método mais eficaz e econômico de controle das doenças, principalmente, se aliar à resistência aos parâmetros agronômicos de interesse (PEREIRA et al., 1985).

Entre as doenças de maior importância para a cultura da soja, pode-se citar o nematóide de cisto, que possui sua grande severidade aliada ao alto número de raças do patógeno existentes e grande potencial para surgimento de outras. Além disso, sua disseminação é muito facilitada por sementes, implementos ou pelo homem e sua sobrevivência é longa em áreas infectadas.

Outra doença de importância relevante é o oídio, que, apesar de ser tratado como problema secundário, na safra 1996/97 provocou perdas entre 30 e 40% na produção de vários cultivares. Possui dispersão facilitada pelo vento e trata-se de organismo policíclico. A existência de cultivares com resistência genética ao oídio forneceria maior

segurança e, conseqüentemente, menores riscos de cultivo para os produtores de soja. Deve-se destacar que a piramidização de resistência numa cultivar superior a essas doenças e à ferrugem asiática seria o ideal nesse momento crítico para a soja.

2.4. Variabilidade genética da soja

Diversos programas de melhoramento genético de plantas tem contribuído para o desenvolvimento de cultivares de alto rendimento e adaptadas à diferentes condições edafoclimáticas do País. A importância do conhecimento da variabilidade genética nos programas de melhoramento, permite expressar o potencial da população, para a seleção (RAMALHO, SANTOS & PINTO, 1996).

Para os melhoristas, interessa a obtenção de grande variabilidade genética nas plantas para a imposição de processos seletivos que efetivamente resulte em ganhos genéticos significativos (BERNARDO, 2002), suas técnicas devem ser direcionadas para o desenvolvimento de materiais genéticos superiores, mas comprometidas com a recuperação e manutenção de populações de espécies ameaçadas de extinção, e que sejam também metas prioritárias, para a própria sobrevivência da humanidade (CRUZ, 2005).

A variabilidade genética entre as progênies é criada pela segregação cromossômica independente e pela recombinação genética durante a meiose. A busca pelo aumento da variabilidade genética se torna importante e necessária e desta forma, a incorporação de ciclos de intercruzamentos nos programas de melhoramento para aumentar a recombinação intracromossomal tem produzido vários resultados teóricos (HANSON, 1959; PEDERSON, 1974) e experimentais (VERMA et al., 1979; PIPER & FEHR, 1987). Assim, a geração de intercruzamentos deve ser considerada para que se possa comprovar os valores da recombinação intracromossomal (PIPER & FEHR, 1987).

2.5. Conceito de hibridização e sua utilização no aumento da variabilidade

Hibridização é a fusão de gametas geneticamente diferentes, que resulta em indivíduos híbridos heterozigóticos para um ou mais *loci* (BORÉM & MIRANDA, 2005). Essa é uma etapa de suma importância no desenvolvimento de novos cultivares, onde, partindo-se do cruzamento de parentais geneticamente distintos, são desenvolvidas populações com variabilidade genética, para a aplicação de métodos apropriados de avaliação e seleção de caracteres superiores (BORÉM, ALMEIDA & KIIHL, 1999).

O processo de hibridização é utilizado por melhoristas como forma de recombinação gênica entre diferentes genótipos, de modo a expor a variabilidade genética. Sendo assim, recorre-se ao cruzamento de dois ou mais cultivares elites para a obtenção de plantas que reúnam novas e melhores características (BONETTI, 1983).

Nos últimos 50 anos, o método de hibridização artificial tem sido o mais utilizado e mais comum para criação de variabilidade genética intraespecífica, tendo como grande sucesso na história, a incorporação do gene contra o crescimento (semi-anão) nas culturas do trigo e arroz, além do melhoramento do milho (BAENZIGER et al., 2006).

As populações utilizadas no melhoramento de plantas são obtidas pelos melhoristas para servirem como fonte de novos cultivares. Os principais tipos de populações de melhoramento, tanto para espécies autógamas quanto para alógamas, são obtidas através de cruzamentos biparentais, tais como: populações F_2 e derivadas de retrocruzamento (BERNARDO, 2002).

De maneira geral, a maioria das hibridações artificiais em plantas autógamas envolve cruzamentos apenas entre dois genitores (biparentais). A maior limitação dos cruzamentos biparentais está na variação genética e no potencial de recombinação que são baixos devido ao “pool” gênico, ou seja, base genética inicialmente restrita e também devido ao posterior processo de autofecundação, que vai restringindo a recombinação genética na medida que a população tende à homozigose (DESTRO & MONTALVÁN, 1999).

Diversos programas de melhoramento genético têm como objetivo principal o aumento da base genética, através do estudo da similaridade dos ancestrais dos cultivares em uso (ARANTES & MIRANDA, 1993). Para a obtenção de novos cultivares, os melhoristas utilizam métodos de melhoramento, que variam de seleções fenotípicas a técnicas sofisticadas desenvolvidas pela genética molecular. Assim, na formação de cultivares melhorados, os métodos de melhoramento têm sido modificados ou adaptados, de acordo com as características de interesse.

2.5.1. Técnica de hibridização

Na cultura da soja, a hibridização é feita manualmente, utilizando-se pinça para emasculas a flor que será polinizada (feminina) e depositar o pólen no seu estigma. Apesar de ser um procedimento simples, requer habilidade no manuseio, para evitar danos às pequenas e frágeis estruturas florais. Os instrumentos utilizados para a execução da hibridização são: uma pinça de ponta fina (de relógio), etiquetas plásticas para identificação, frascos para armazenar as flores e uma lupa (10x) (BORÉM, ALMEIDA & KIIHL, 1999).

O período do dia durante o qual se realiza a emasculação são fatores importantes, aliados, às condições de umidade e temperatura, e seus efeitos sobre as flores emasculadas. Geralmente as flores são muito sensíveis a altas temperaturas e baixa umidade relativa do ar e, se emasculadas nestas condições irão secar e deixar de produzir semente, mesmo que a polinização tenha sido realizada com sucesso. Em virtude de essas condições serem variáveis de ano a ano e até mesmo de um dia para outro, o melhorista deve variar o período de emasculação de acordo com cada condição particular. Se os materiais diferem em seu ciclo, utiliza-se o escalonamento das datas de semeaduras. (BONETTI, 1983).

2.5.2. Híbridização na formação das populações segregantes

O processo para obtenção dos biparentais consiste no cruzamento entre duas cultivares ou linhagens diferentes e contrastantes. Devem ser escolhidas visando o aumento da variabilidade, bem como a complementação em relação aos caracteres de importância agrônômica (BONETTI, 1983).

Por outro lado, os cruzamentos múltiplos permitem a conjugação de genes de diversos cultivares ou linhagens que não seria possível de se obter com a combinação de apenas dois genitores, como nos biparentais. O cruzamento quádruplo (quatro genitores) é realizado através da combinação de dois híbridos simples, na geração F_1 , ou com segregantes de gerações subseqüentes. Os óctuplos (oito genitores) são realizados através da combinação de dois híbridos quádruplos, na geração F_1 , ou com segregantes de gerações subseqüentes. No Brasil, os cruzamentos múltiplos ainda são pouco estudados, mas ALLIPRANDINI (1996) considera que a avaliação correta de parâmetros inerentes a cruzamentos múltiplos, é de fundamental importância quando se objetiva estudar os mesmo em programas de seleção recorrente, bem como na ampliação da base genética do germoplasma utilizado.

2.6. Permuta Genética ou “*Crossing-over*” e Mapa Genético

Permuta genética ou “*crossing-over*”, é o mecanismo que possibilita a recombinação de genes ligados através da troca de partes entre cromátides não irmãs de cromossomos homólogos. Este fenômeno ocorre durante a prófase I da meiose, quando eles se associam de tal maneira que, no paquíteno, o pareamento ocorre ao longo de todo seu comprimento, havendo troca de alelos entre si, aumentando consideravelmente a variabilidade genética (Figura 1). A estimativa da frequência de

crossing-over pode ser obtida a partir da descendência de um cruzamento teste ou da geração F₂.

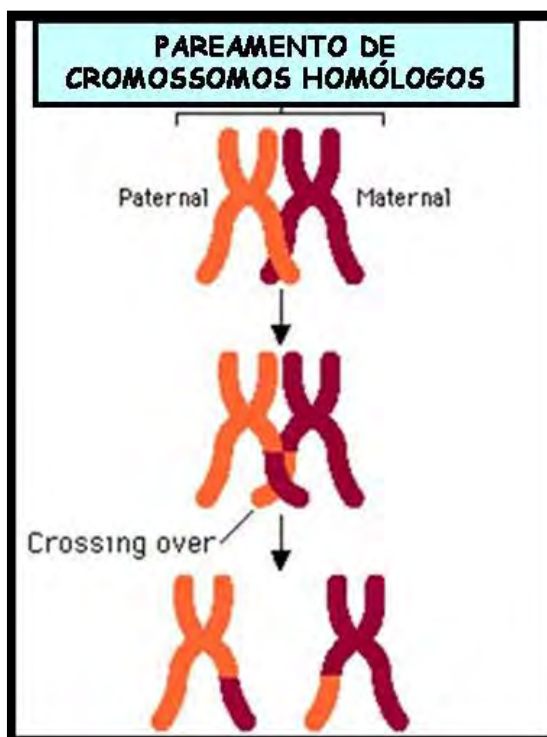


Figura 1. Ocorrência de *crossing-over* na Prófase 1 da meiose, entre cromátides não irmãs (Criada por Pearson Education, Inc 2007).

A meiose é responsável pela segregação genética observada na progênie de indivíduos heterozigotos. A divisão meiótica é de fundamental importância para a geração de variabilidade por meio da divisão reducional e independente dos cromossomos e dos *crossing-over*. O número de gametas possíveis com n pares de cromossomos é dado por 2^n .

O conhecimento de mapas genéticos é considerado uma das aplicações de maior impacto da tecnologia de marcadores moleculares na análise genética de espécies, e, no melhoramento de plantas, seu início foi a partir do reconhecimento do fenômeno da recombinação genética. O mapeamento genético toma como base a

existência de correlação positiva entre a distância de dois genes e a frequência de “*crossing-over*” entre eles, e que a probabilidade de ocorrer *crossing-over* entre dois marcadores é menor, quanto menor for a distância entre eles, ou seja, a sua ocorrência reflete a distância genética entre os locos. Essa distância é expressa pela unidade centiMorgan (cM), e é calculada com base na frequência de recombinação por meio de funções de mapeamento, onde um centiMorgan é igual a um por cento de permuta (RAMALHO, SANTOS & PINTO, 1996).

No melhoramento de plantas, os mapas genéticos possibilitam a análise completa dos genomas, a decomposição de características genéticas complexas nos seus componentes mendelianos, a localização das regiões genômicas que controlam caracteres de importância, a quantificação do efeito destas regiões na característica estudada e a canalização de toda esta informação para uso em programas de melhoramento. Três requisitos básicos são necessários para o seu desenvolvimento: reprodução sexuada, produção de descendentes e uma fonte de marcadores moleculares com comportamento Mendeliano (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Alguns resultados utilizados em mapas genéticos foram encontrados por CREGAN et al., (1999), combinando resultados entre populações de soja, através de mapa de ligação altamente saturado no seu genoma, contendo marcadores moleculares SSR (*simple sequence repeat*) e RFLP (*restriction fragment length polymorphism*). Desta forma, este mapa pode ser usado para identificar polimorfismo através da avaliação de *crossing-over* em progênies de parentais inter cruzados.

2.7. PCR – Reação em cadeia da polimerase

A reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction – PCR*) é a amplificação enzimática de uma seqüência específica de DNA, visando a produção de milhões de cópias desta seqüência, na presença da enzima DNA polimerase. Foi descrita pela primeira vez por Kary Mullis, em meados da década de 80 (FARAH, 2000).

A reação de PCR se baseia no anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos (pequenas moléculas de DNA de fita simples) utilizados como iniciadores (primers) que delimitam a seqüência de DNA de fita dupla, alvo da amplificação. Seu ciclo envolve três etapas: desnaturação (elevação da temperatura entre 92 a 95 °C), anelamento (redução da temperatura entre 35 a 60 °C, dependendo da seqüência e do tamanho do primer) e extensão (elevação da temperatura a 72 °C, temperatura ótima para funcionamento da enzima DNA polimerase). Normalmente estas etapas são repetidas por cerca de 30 a 45 ciclos (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

2.7.1. Marcadores Moleculares

O processo de seleção de genótipos resistentes pelas técnicas convencionais é relativamente demorado e de execução laboriosa, além de não possuir muita garantia devido à dependência de condições ambientais adequadas. Técnicas de biotecnologia, como os marcadores moleculares são de grande utilidade, principalmente no processo de caracterização e seleção de genótipos resistentes. Marcadores moleculares são características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdadas geneticamente. Os distintos tipos de marcadores moleculares, hoje disponíveis, diferenciam-se pela tecnologia utilizada para revelar variabilidade em nível de DNA e, assim, variam quanto à habilidade de detectar diferenças entre indivíduos, custo, facilidade de uso, consistência e repetibilidade (MILACH, 1998).

Em termos de variabilidade genética, os marcadores moleculares, permitem compreender e organizar a variabilidade genética de um programa de melhoramento de forma única, isto é, acessando a variabilidade do DNA que não é influenciada pelo ambiente, por exemplo, os caracteres morfológicos e fenotípicos de uma planta em geral. A primeira consequência disto é a possibilidade de planejar os cruzamentos de um programa, de forma a maximizar as diferenças genéticas entre genótipos elites,

diferenças essas que muitas vezes não podem ser observadas em nível de fenótipo. A segunda é a possibilidade de organizar o germoplasma do programa em “pools” gênicos, facilitando a escolha de parentais e diminuindo o número de combinações a serem feitas pelo melhorista. Como consequência do estudo da variabilidade genética, muitas vezes é possível identificar o padrão molecular (*fingerprinting*) de genótipos de interesse, que podem ser, posteriormente, utilizados para a proteção do germoplasma (MILACH, 1998).

LANDE & THOMPSON (1990), sugeriram que os marcadores moleculares também podem ser utilizados para descobrir novos genes e alelos em germoplasmas exóticos, podendo, posteriormente, ser incorporados a germoplasmas elites para o aumento do potencial produtivo, assim como, da diversidade genética.

2.7.2. Marcadores Moleculares “Microsatélites”

Os microsatélites são seqüências de um a seis pares de bases repetidas e adjacentes, distribuídas no genoma. Esse tipo de marcador utiliza iniciadores específicos que amplificam regiões com DNA repetitivo. O desenvolvimento desses *iniciadores* é um processo elaborado e caro. Mas, uma vez disponíveis, o custo da técnica assemelha-se a de outros marcadores, como RFLPs e RAPDs, que são menos onerosos (POWELL et al., 1996; MILACH, 1998).

A estabilidade dos microsatélites resulta em marcadores altamente polimórficos, multialélicos, que são extremamente úteis em estudos de Genética. Os alelos diferem porque mostram números distintos de repetições em tandem, oriundos de *crossing-over* desigual durante a meiose ou ao deslizamento da DNA polimerase durante a duplicação da molécula (PINTO et al., 2001). A presença dessas características faz com que os microsatélites sejam marcadores ideais para mapeamento genético de genomas, para identificação e discriminação de genótipos e estudos de genética de populações.

Estudos dessa magnitude foram realizados por PRIOLLI et al., (2002), com o objetivo de caracterizar cultivares brasileiros de soja, através de marcadores microssatélites. O polimorfismo dos marcadores microssatélites é revelado pela PCR – reação em cadeia da polimerase, por amplificação do DNA genômico total, utilizando-se dois *primers* únicos, compostos de seqüências curtas de nucleotídeos, e, portanto, definem o loco de microssatélites. As reações de amplificação podem ser iniciadas com pequenas quantidades de DNA e os produtos da amplificação são visualizados em géis de agarose ou poliacrilamida. A formulação do gel exerce influência sobre o número de alelos detectados. Géis de poliacrilamida desnaturante permitem separação de fragmentos que diferem em apenas um par de bases, enquanto géis de agarose apresentam resolução acima de quatro pares de bases. Os géis de poliacrilamida levam à detecção de um número maior de alelos por loco, essencial para análise de polimorfismos de microssatélites de repetições dinucleotídicas, uma vez que as amplificações são em torno de 130 a 200pb. Por outro lado, a agarose não é capaz de resolver diferenças da ordem de 2 pb, ou seja, de um dinucleotídeo (PINTO et al., 2001).

A maior vantagem dessa técnica é o elevado polimorfismo revelado, o que a tornará uma das melhores opções para uso na caracterização de cultivares e mapeamento genético, especialmente em germoplasma aparentado e de baixa variabilidade, como é o caso de espécies como a soja. Nos últimos anos, marcadores do tipo microssatélites têm sido a ferramenta molecular mais utilizada em estudos ecológicos e genéticos (MILACH, 1998).

2.8. Estudo de populações

A estrutura de uma população é definida pela freqüência dos alelos que compõem os diferentes genótipos dos diferentes indivíduos integrantes da população. O seu conhecimento é indispensável ao melhorista para realizar e/ou, predizer,

mudanças em magnitude, além de fornecer as bases necessárias para a compreensão de como se processa a evolução (CRUZ, 2005). Segundo FALCONER (1989), uma população pode ser definida como um conjunto de indivíduos que compartilham seus genes através da reprodução.

As propriedades genéticas das populações são determinadas a partir do conhecimento de suas freqüências alélicas e genotípicas. As freqüências alélicas correspondem às proporções dos diferentes alelos de um determinado gene na população. As freqüências genotípicas, por sua vez, são as proporções dos diferentes genótipos na população de indivíduos (RAMALHO, SANTOS & PINTO, 1996).

2.9. Parâmetros genéticos

As variedades de soja diferenciam-se com relação a diversos caracteres agrônômicos, tais como: altura da planta, altura de inserção da primeira vagem, número de nós, número de vagem por plantas, número de sementes por vagem, peso de cem sementes, produtividade, resistência a doenças e pragas, etc. A importância do conhecimento da variabilidade genética nos programas de melhoramento, ou seja, o quanto desta variabilidade está relacionado a diferenças genéticas, permite conhecer o potencial da população para a seleção (RAMALHO, SANTOS & PINTO, 1996). De acordo com o mesmo autor, um dos parâmetros genéticos de maior utilidade para os melhoristas é a estimativa da herdabilidade (h^2), que permite antever a possibilidade de sucesso com a seleção, uma vez que reflete a proporção da variação fenotípica que pode ser herdada.

A avaliação de famílias sem repetições, intercaladas com testemunhas, possibilitando a estimativa do componente ambiental associado à variância fenotípica das populações em estudo, é uma alternativa para a estimativa de parâmetros genéticos quando ocorre limitado número de sementes e a possível segregação em gerações iniciais (BACKES et al., 2002).

2.9.1. Herdabilidade

A herdabilidade tem grande importância ao melhorista de plantas, uma vez que expressa a razão da variância genética pela variância fenotípica. A função mais importante da herdabilidade no estudo genético de um caráter métrico é o seu papel preditivo, expressando a confiança do valor fenotípico como um guia para o valor genético. (FALCONER, 1989).

A herdabilidade constitui-se na proporção herdável da variabilidade fenotípica. Sua principal finalidade consiste na estimação de ganhos por seleção. A mesma, é calculada em unidade de seleção e geralmente por indivíduo ou família. A grande faixa na variação das estimativas de herdabilidade para um mesmo caráter pode ser atribuída à amostragem e às diferenças populacionais e ambientais (BACKES et al., 2002; COCKERHAM & MATZINGER, 1985).

De acordo com RAMALHO, SANTOS & PINTO (1996), é possível estimar dois tipos de herdabilidade: herdabilidade no sentido amplo e herdabilidade no sentido restrito, sendo a diferença entre ambas localizada no numerador da fração que define o coeficiente de herdabilidade. A herdabilidade no sentido amplo envolve toda variância genética, tem importância no caso de plantas que apresentam propagação vegetativa, devido o genótipo ser integralmente herdado. A herdabilidade no sentido restrito considera apenas a variância genética aditiva, aquela que é fixada pela seleção, sendo, na maioria dos casos a mais importante para os melhoristas.

A herdabilidade varia de acordo com as diversas características agronômicas, sendo os fatores que afetam na estimativa, o método utilizado para estimar o valor da herdabilidade, a diversidade na população, o nível de endogamia da população, o tamanho da amostra avaliada, o número e tipo de ambientes considerados, a unidade experimental considerada e a precisão na condução do experimento e da coleta de dados. (BORÉM & MIRANDA, 2005). Os mesmos autores afirmam que, a escolha do método de cálculo da herdabilidade, depende dos recursos genéticos disponíveis e da finalidade da estimativa.

O caráter produção, tratando-se de um caráter quantitativo, controlado por muitos genes, sofre maior influência ambiental. Normalmente, as estimativas de herdabilidade são menores em comparação aos demais caracteres agronômicos, além disso, para o mesmo caráter, destaca-se as variâncias devidas à dominância, que colaboram para a obtenção de baixas estimativas de herdabilidade no sentido restrito. Tal constatação está de acordo com os resultados obtidos por CAMPOS (1979), DESTRO et al., (1987), BACKES et al., (2002), MUNIZ et al., (2002).

Segundo HERBERT & BERNARD (1967), existe um consenso entre os melhoristas no que concerne ao número de repetições e locais que devem ser empregados como padrão para obtenção das estimativas do coeficiente de herdabilidade, sendo o ideal duas repetições dentro de dois locais. O coeficiente de herdabilidade pode variar de 0 e 1, no caso em que $H = 1$, o fenótipo é completamente determinado pelo genótipo, não tendo o ambiente influência sobre a manifestação do caráter (ALLARD, 1974).

As estimativas do coeficiente de herdabilidade podem ser obtidas por várias metodologias, sendo mais usual em testes finais, o método dos componentes de variância, proposto por HANSON et al., (1956), o método com base na geração F_2 e no retrocruzamento do F_1 com cada pai endógamo, proposto por WARNER (1952), é mais usado para as gerações iniciais. Dentre as outras metodologias pode-se destacar: a metodologia de FREY & HORNER (1956), que envolve a computação da herdabilidade em unidades-padrão, que são obtidas calculando-se a regressão sobre os dados codificados em termos de unidades de desvio padrão; e o método de SMITH & KINMAN (1965), que envolve uma modificação no uso da regressão pai-filho para estimar a herdabilidade.

2.9.2. Ganho genético ou resposta à seleção

O ganho genético ou resposta à seleção é a diferença entre a média fenotípica dos descendentes dos progenitores selecionados e a média da geração paternal (população) antes da seleção (FALCONER, 1989). Segundo o mesmo autor, a equação $R = h^2 \times S$ proporciona um meio de predição, baseado em observações feitas unicamente nos indivíduos da geração paterna antes da seleção, uma vez que R é o ganho genético, h^2 é a herdabilidade e S é o diferencial de seleção. No que se refere à predição, para uma maior acurácia, há a necessidade de se conhecer as causas que determinam a magnitude do diferencial de seleção, podendo-se destacar: a proporção do grupo selecionado e o desvio-padrão do caráter.

Desta forma, padronizando-se a equação da resposta, pode-se calcular: $R/\sigma_P = (S/\sigma_P) \times h^2$, onde o diferencial de seleção padronizado é denominado intensidade de seleção (i), e portanto, a equação $R = S \times h^2$ pode ser definida da seguinte forma: $R = (i \times \sigma_P) \times h^2$. O diferencial de seleção é estimado por $S = i \times \sigma_P$, sendo i , a intensidade de seleção, determinado por meio de tabelas das propriedades da distribuição normal, calculado através da expressão z/p , em que “ z ” é a altura da ordenada no ponto de truncamento, e “ p ” a proporção selecionada, ou seja, a proporção da população que cai além do ponto de truncamento e σ_P = desvio-padrão fenotípico (FALCONER, 1989). O diferencial de seleção padronizado (i) é obtido considerando-se o percentual de genótipos selecionados na geração atual (CRUZ, REGAZZI & CARNEIRO, 2004). Este valor é utilizado para se calcular o ganho genético predito na geração seguinte.

A obtenção de informações a respeito dos parâmetros do complexo genótipo-ambiente é, portanto, de grande importância para o melhorista. Nas espécies cultivadas, quanto mais precisas forem as estimativas, melhores serão as previsões do melhorista, possibilitando, antever melhor o ganho esperado com a aplicação de diferentes tipos e intensidades de seleção (ALLARD, 1974).

3. REFERENCIAS

AHRENT, D. K.; CAVINESS, C. E. Natural cross-pollination of twelve soybean cultivars in Arkansas. **Crop Sci**, v. 34, p. 376-378, 1994.

ALLARD, R. W. **Princípios de melhoramento genético das plantas**. Rio de Janeiro: Edgar Blücher, 1974, p.381.

ALLIPRANDINI, L. F. **Potencialidade de cruzamentos quádruplos de soja com ênfase na produtividade de grãos**. 1996. 174 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1996.

APUYA, N.; FRAZIER, B.; KEIM, P.; ROTH, E. J.; LARK, K. G. Restriction length polymorphisms as genetic markers in soybean, *Glycine max* (L.) Merr. **Theor. Appl. Genet**, v. 75, p. 889–901, 1988.

ARANTES, N. E.; MIRANDA, M. A. C. Melhoramento genético e cultivares de soja para o cerrado da região sudeste do Brasil. In: ARANTES, N. E.; SOUZA, P. I. M. (Ed.). **Cultura da soja nos cerrados**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1993, p. 209-227.

BACKES, R. L.; REIS, M. S.; SEDIYAMA, T.; CRUZ, C. D.; TEIXEIRA, R. C. de. Estimativas de parâmetros genéticos em populações F₅ e F₆ de soja. **Rev. Ceres**, Viçosa, v. 49, n. 282, p. 201-216, 2002.

BAENZIGER, P. S.; RUSSELL, W. K.; GRAEF, G. L.; CAMPBELL, B. T. Improving lives: 50 years of crop breeding, genetics, and cytology (C-1). **Crop Sci.**, v. 46, p. 2230-2244, 2006.

BERNARDO, R. Breeding for quantitative traits in plants. Woodbury: **Stemma Press**, 2002, 360p.

BONETTI, L. P. Cultivares e seu melhoramento genético. In: FUNDAÇÃO CARGILL. **Soja genética e melhoramento**, v. 2, p. 741–800. 1983.

BORÉM, A.; ALMEIDA, L. A.; KIIHL, R. A. S. Hibridização em soja. In: BORÉM, A. **Hibridização artificial de plantas**. Viçosa: UFV, 1999, p. 443-462.

BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de Plantas**. 4. ed. Viçosa: UFV, 2005, p. 525.

CAMÂRA, G. M. S. **Soja: tecnologia da produção**. Piracicaba: Publique, 1998, p. 293.

CAMPOS, L. A. C. **Estudo da heterose, da herdabilidade e de correlações de algumas características agrônômicas em cruzamentos de soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. 1979. 76 f. (Dissertação de mestrado em genética e melhoramento vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1979.

COCKERHAM, C. C.; MATZINGER, D. F. Selection response based on selfed progenies. **Crop Sci.**, v. 25, p. 483 - 488, 1985.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. CONAB. **Indicadores da agropecuária**. Estimativa de safras – levantamento safra 2006/2007. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/download/safra/boletim_safra9_06.pdf>. Acesso em: 20 de maio de 2007.

COOPER, H. D.; SPILLANE, C.; HODGKING, T. Broadening the genetic base of crops: an overview. In: COOPER, H. D.; SPILLANE, C.; HODGKING, T. (Ed.). **Broadening the genetic base of crop production**. Wallingford: CABI, 2001, p.395-399.

CREGAN, P. B; JARVIK, T; BUSH, A. L; SHOEMAKER, R. C; LARK, K. G; KAHLER, A. L; KAYA, N; VANTOAI, T. T; LOHNES, D. G; CHUNG, J.; SPECHT, J. E. An integrated genetic linkage map of the soybean genome. **Crop Sci**, v. 39, p.1464-1490, 1999.

CRUZ, C. D. **Princípios de genética quantitativa**. Viçosa: UFV, 2005, 394 p.

CRUZ, C. D; REGAZZI, A. J; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 3ed. Editora UFV, Viçosa, v.1, 2004, 480 p.

DELANNEY, X. RODGERS, D. M.; OALMER, R. G. Relative contribution among ancestral lines to North American soybean cultivars. **Crop Sci.**, v. 23, p. 944-949, 1983.

DESTRO, D.; MONTALVÁN, R. Seleção recorrente em plantas autógamas. In: DESTRO, D.; MONTALVÁN, R. **Melhoramento genético de plantas**. Londrina: UEL, 1999, p. 271-281.

DESTRO, D.; SEDIYAMA, T.; SILVA, J. C.; SEDIYAMA, C. S.; THIÉBAUT, J. T. L. Estimativas de herdabilidade de alguns caracteres, em dois cruzamentos de soja. **Pesquisa Agropec. Bras.**, v. 22, p. 291-304, 1987.

DUDLEYM H. W.; LAMBERT, R. J. Ninety generations of selection for oil and protein in maize. **Maydica**, Bergamo, v. 37, p. 81-87, 1992.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa de Soja. **Tecnologia de produção de soja - região central do Brasil 2007**. Londrina: Embrapa Soja - Embrapa Cerrados - Embrapa Agropecuária Oeste, 2006, 225 p.

FALCONER, D. S. **Introduction to quantitative genetics**. London: Oliver and Boyd, 1989, p.365.

FARAH, S. B. DNA no diagnóstico das doenças humanas. In: _____. **DNA segredos & mistérios**. São Paulo: Sarvier, 2000. Cap. 5, p. 103-140.

FEHR, W. R. **Principles of cultivar development**. 3. ed. Ames: Macmillian Publishing Company, 1993, v. 1, p. 527.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stages of soybean development**. Ames: Iowa State University. Iowa Cooperative Extensive Service, 1981, 12 p. (Special Report, 80).

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA, CENARGEM, 1998, p. 220.

FREY, K. J.; HORNER, T. Heritability in standart units. **Agronomy Journal**, v. 48, p. 268 – 272, 1956.

GIZLICE, Z.; CARTER Jr, T. E.; BURTON, J. W. Genetic diversity in North America soybean: I. Multivariate analysis of founding stock and relation to coefficient of parentage. **Crop Sci.**, v. 33, p. 614 - 20, 1993.

GIZLICE, Z.; CARTER Jr, T.E.; BURTON, J. W. Genetic base for North American public soybean cultivars released between 1947 and 1988. **Crop Sci.**, v. 34, n. 5, p. 1143 – 1151, 1994.

HANSON, W. D. The breakup of initial linkage blocks under selected mating systems. **Genetics**, v. 44, p. 857 – 868, 1959.

HANSON, C. H.; ROBINSON, H. F.; COMSTOCK, R. E. Biometrical studies of yield in segregating populations of *Korean lespedeza*. **Agronomy Journal.**, v. 48, n. 6, p. 68 – 72, 1956.

HERBET, W. J.; BERNARD, R. L. Genetics of quantitative characters. In: NORMAN, A. G. (Ed.). **The soybean**. London: Academic Press, 1967, p. 24 – 47.

HIROMOTO, D. M.; VELLO, N. A. The genetic base of Brazilian soybean (*Glycine Max* (L.) Merrill) cultivars. **Revista Brasileira de Genética**, v. 9, p. 295 - 306, 1986.

HOISINGTON, D.; KHAIRALLAH, M.; REEVES, T.; RIBAUT, J. M.; SKOVMAND, B.; TABA, S.; WARBURTON, M. Plant genetic resources: what can they contribute toward increased crop productivity? **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 96, p. 5937 - 5943, 1999.

KEIM, P.; SHOEMAKER, R. C.; PALMER, R. G. Restriction fragment length polymorphism diversity in soybean. **Theor. Appl. Genet.**, v. 77, p. 786 – 792, 1989.

KIHL, R. A. S.; ALMEIDA, L. A. O futuro do melhoramento genético como agregador de tecnologia via semente. In: TECNOLOGIA E COMPETITIVIDADE DA SOJA NO MERCADO GLOBAL, 2000, Cuiabá. **Anais**. Cuiabá: Fundação Mato Grosso, 2000, p. 45 – 47.

LANDE, R.; THOMPSON, R. Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. **Genetics**, v. 124, p. 743 – 756, 1990.

MILACH, S. C. K. Marcadores de DNA. **Biociência**, v. 1, n. 5, p. 14 – 17, 1998.

MULLER, L. Morfologia, anatomia e desenvolvimento. In: MIYASAKA, S.; MEDINA, J. C. (Ed.). **A soja no Brasil**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1981, p. 73 - 104.

MUNIZ, F. R. S.; MAURO, A. O. DI.; UNÊDA-TREVISOLI, S. H.; OLIVEIRA, J. A.; BÁRBARO, I. M.; ARRIEL, N. H. C.; COSTA, M. M. Parâmetros genéticos e fenotípicos em populações segregantes de soja. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, v. 6, n. 3, p. 609 – 616, 2002.

NASS, L. L.; MIRANDA-FILHO, J. B.; SANTOS, M. X. Uso de germoplasma exótico no melhoramento. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**, 2001, p.101-122.

PEARSON EDUCATION, **Crossing-over**. Disponível em: <http://phschool.com/.../labbench/lab3/crossovr.html> Acesso em: 10 de junho de 2007.

PEDERSON, D.G. Arguments against intermating before selection in a self-fertilizing species. **Theor. Appl. Genet.**, v. 45, p. 157 – 162, 1974.

PEREIRA, A. A.; ZAMBOLIM, L.; CHAVES, G. M. Melhoramento visando a resistência a doenças. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 11, n. 122, p. 82-92, 1985.

PINTO, L. R.; VIEIRA, M. L. C.; SOUZA, A. P.; SOUZA JUNIOR, C. L. Isoenzimas e microssatélites em plantas. **Biotecnologia Ciencia & Desenvolvimento**. Brasília, n. 20, p. 16 – 19, 2001.

PINTO, L. R. ; VIEIRA, M. L. C. ; SOUZA JUNIOR, C. L. ; SOUZA, A. P. Reciprocal recurrent selection effects on the genetic structure of tropical maize populations assessed at microsatellite loci. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 26, n. 3, p. 355-364, 2003.

PIPER, T. E.; FEHR, W. R. Yield improvement in a soybean population by utilizing alternative strategies of recurrent selection. **Crop Sci.**, v. 27, p.172-178, 1987.

PRIOLLI, R. H. G.; MENDES-JUNIOR, C. T.; ARANTES, N. E.; CONTEL, E. P. B. Characterization of Brazilian soybean cultivars using microsatellite markers. **Genetic and Molecular Biology**, v. 25, n. 2, p. 185-193, 2002.

PRIOLLI, R. H. G.; MENDES-JÚNIOR, C. T.; SOUSA, S. M. B; SOUSA, N. E. A; CONTEL, E. P. B. Diversidade genética da soja entre períodos e entre programas de melhoramento no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 10, p. 967-975, 2004.

POWELL, W.; MACHRAY, G. C.; POVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends Plant. Science**, v. 1, p. 215-222, 1996.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B. dos; PINTO, C. B. **Genética na agropecuária**. 5. ed. São Paulo: Globo, 1996.

RASMUSSEN, D. C.; PHILLIPS, R. L. Plant breeding progress and genetic diversity from de novo variation and elevated epistasis. **Crop Sci.**, Madison, v. 37, p. 303-310, 1997.

SEDIYAMA, T.; PEREIRA, M. G.; SEDIYAMA, C. S.; GOMES, J. L. **Cultura da soja**. Viçosa: UFV, 1985, 96p.

SMITH, J. D.; KINMAN, M. L. The use of parent – offspring regression as an estimator of heritability. **Crop Sci.**, v. 5, n. 6, p. 595 – 596, 1965.

URBEN FILHO, G.; SOUZA, P. I. M. de. Manejo da cultura da soja sob cerrado: época, densidade e profundidade de semeadura. In: ARANTES, N.E.; SOUZA, P.I. M. de (Ed.). **Cultura da soja nos cerrados**. Piracicaba: Potafos, 1993, p.267-298.

VAN SCHAIK, P. H.; PROBST, A. H. Effects of some environmental factors on flower production and reproductive efficiency in soybeans. **Agronomy Journal**, v. 50, p. 192-197, 1958.

VELLO, N. A. Ampliação da base genética do germoplasma e melhoramento de soja na ESALQ/USP. In: CÂMARA, G. M. S., MARCOS FILHO, J.; OLIVEIRA, E. A. M., (Ed.) **Simpósio sobre cultura e produtividade da soja**. Piracicaba, FEALQ, 1992, p. 60-81.

VERMA, M. M.; KOCHHAR, S.; KAPOOR, W. R. The assessment of biparental approach in a wheat cross. **Pflanzenzuecht**, v. 82, p. 174-181, 1979.

WARNER, J. N. A method for estimating heritability. **Agronomy Journal**, v. 44, n. 8, p. 427 – 430, 1952.

YORINORI, J. T. Riscos de surgimento de novas doenças na cultura da soja. In: CONGRESSO DE TECNOLOGIA E COMPETITIVIDADE DA SOJA NO MERCADO GLOBAL, 1., 2000, Cuiaba. **Anais...**, p. 165-169.

YU, J.; BERNARDO, R. Changes in Genetic Variance during Advanced Cycle Breeding in Maize. **Crop Sci.**, Madison, v. 44, p. 405-410, 2004.

CAPÍTULO 2 - CROSSING-OVER COMO FONTE DE VARIABILIDADE EM CRUZAMENTOS DE SOJA

RESUMO

A variabilidade entre progênies é criada pela segregação cromossômica independente dos genes e pela recombinação genética intracromossomal durante a meiose. O objetivo deste estudo foi analisar a variabilidade derivada de crossing-overs em cruzamentos biparentais (G2 e J2), quádruplos (G4 e J4) e óctuplos (G8 e J8), avaliados em populações segregantes derivadas de parentais contrastantes para resistência ao nematóide de cisto da soja (raça 3) – NCS – e ao oídio - O. A análise foi realizada em populações F₂, através de marcadores SSR (*single sequence repeat*) concentrados em uma região de 55 cM ao redor do gene *rmd* (resistência ao oídio) e *rhg1* (resistência ao NCS). Após o teste dos marcadores, quanto ao polimorfismo, apenas marcadores polimórficos foram utilizados para detectar crossing-over. Todos os marcadores analisados foram não significativos pelo teste de qui-quadrado ($P > 0,05$), indicando que os valores observados se ajustam à proporção genotípica esperada em F₂ (1:2:1). As maiores médias de *crossing-over* por genótipo foram obtidas para G4 (4,00), no grupo G, e J8 (2,91), no grupo J. Por outro lado, as maiores médias de crossing-over considerando o número de gerações para formar cada população, foram para G2 (2,02) e J8 (0,97). A recombinação entre alelos ocorreu em algumas populações, entretanto para G4 e J8 em 1,89% dos genótipos não ocorreram. Em geral, nos cruzamentos com maior número de parentais envolvidos a ocorrência de crossing-over foi maior, sendo satisfatórios na criação de variabilidade. O progresso no melhoramento de soja tem sido alcançado em partes pela criação de novas combinações alélicas dentro dos cromossomos.

Palavras-chave: *Glycine max*, *crossing-over*, cruzamentos múltiplos, SSR

CROSSOVER AS SOURCE OF VARIABILITY IN SOYBEAN CROSSES

ABSTRACT

The variability among the progenies is created by chromosome segregation, independent assortment of genes, and intra-chromosomal genetic recombination during meiosis. The objective of this study was to analyze the variability derived from crossovers in soybean biparental (G2 and J2), quadruple (G4 and J4) and octuple (G8 and J8) crosses, measured in segregant population derived from contrasting parental regarding their resistance to cyst nematode (race 3) – SCN and powdery mildew – PM. The analyses were made in F₂ population through SSR (single sequence repeat) markers located in a 55CM region around Rmd (powdery mildew) and Rhg1 (cyst nematode) resistance genes. After screening markers for their polymorphism, only polymorphic markers were used to detect crossovers. All markers were not significant by chi-square test ($P > 0.05$), showing that observed values corroborates to genotypic inheritance ratio expected in F₂ population (1:2:1). Thus, the higher average of crossovers for some populations were observed for G4 (4.00), at linkage group G and J8 (2.91), at linkage group J. On the other hand, the higher average of crossovers considering the generation number to form each population, was found for G2 (2.02) and J8 (0.97). The recombination between alleles occurred in some populations, however, to G4 and J8, in 1.89% of the genotypes not showing crossover. In general, the crosses with larger numbers of parents showed higher number of crossovers, being very satisfactory for the creation of genetic variability. Soybean breeding progress has been accomplished in part by creating on new within_chromosome allele combinations.

Key words: *Glycine max*, crossing-over, multiple crosses, SSR

1. Introdução

O progresso no melhoramento de plantas é baseado na habilidade de selecionar genótipos superiores em progênes heterogêneas, obtidas através de cruzamentos entre parentais divergentes para caracteres agrônômicos. Estudos sobre a variabilidade genética da soja têm destacado que o germoplasma brasileiro (BONETTI, 1983; DELANNEY et al., 1983; HIROMOTO & VELLO, 1986; PRIOLLI et al., 2002) e o americano (APUYA et al., 1988; KEIM et al., 1989; GIZLICE et al., 1994), provêm de base genética restrita, tendo se originado de poucas linhagens ancestrais.

A variabilidade entre as progênes é criada pela segregação cromossômica independente dos genes e pela recombinação genética intracromossomal durante a meiose. A divisão meiótica é de fundamental importância para a geração de variabilidade por meio da divisão reducional independente dos cromossomos e dos *crossing-overs*. A mesma é responsável pela segregação genética observada na progênie de indivíduos heterozigotos. A ampliação da base genética dos cultivares de soja é de extrema importância, para diminuir os riscos de vulnerabilidade genética a pragas, doenças e condições ambientais estressantes, bem como elevar os patamares de produção. A base genética estreita é decorrente do reduzido número de parentais empregados no desenvolvimento de cultivares, bem como do cultivo de grandes áreas com genótipos uniformes (VELLO, 1992).

Dentre os vários métodos para se obter variabilidade genética, destaca-se, na cultura da soja, o processo de hibridização. As hibridizações são feitas na forma de cruzamentos simples (entre dois cultivares) ou múltiplos (acima de dois cultivares) e servem para recombinar a variabilidade genética intra-específica ou para aumentar essa variabilidade, pela introgressão de genes em cruzamentos interespecíficos (BORÉM, ALMEIDA & KIIHL, 1999). Nos últimos 50 anos, o método de hibridização artificial tem sido o mais utilizado e o mais comum para criação de variabilidade genética intra-específica, tendo como grande sucesso na história, a incorporação do

gene contra o crescimento (semi-anão) nas culturas do trigo e arroz, além do melhoramento do milho (BAENZIGER et al., 2006).

Os marcadores moleculares permitem compreender e organizar a variabilidade genética de um programa de melhoramento de forma única, acessando a variabilidade do DNA, que não é influenciada pelo ambiente como os caracteres morfológicos e fenotípicos em geral de uma planta (MILACH, 1998). Nesse caso, os marcadores microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeat*), sendo altamente polimórficos e multialélicos, são extremamente úteis em estudos de Genética, ideais para mapeamento genético de genomas, identificação e discriminação de genótipos e estudos de genética de populações. Os alelos diferem porque mostram números distintos de repetições em *tandem*, oriundos de *crossing-over* desigual durante a meiose ou de erros da DNA polimerase durante a duplicação do DNA (PINTO et al., 2001).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi analisar a variabilidade genética, através de marcadores moleculares microssatélites, utilizando a frequência de *crossing-overs* em populações F₂, derivadas da combinação entre dois, quatro ou oito parentais de soja, com reação divergente ao nematóide de cisto (raça 3) e ao oídio.

2. Material e Métodos

2.1. Hibridizações e Material Genético

As hibridizações foram realizadas em casa de vegetação do Departamento de Produção Vegetal, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal/SP. Os parentais utilizados nos cruzamentos (Tabela 1), foram semeados em vasos de polietileno (5L) contendo substrato (terra + adubo). A semeadura foi escalonada no mês de novembro, com plantios realizados a cada dez

dias, para que o florescimento fosse coincidente entre os diferentes parentais. As condições ambientais de umidade, fotoperíodo, controle de doenças e irrigação foram totalmente controladas para o desenvolvimento da cultura da soja.

Os cultivares escolhidos como parentais (Tabela 1) foram contrastantes para resistência à raça 3 do nematóide de cisto da soja – *Heterodera glycines* (grupo de ligação G) e ao oídio – *Erysiphe diffusa* (grupo de ligação J). No grupo G, apenas o parental Hartwig foi utilizado como fonte de resistência e, no grupo J, os parentais Conquista, BRS – 137 (atualmente considerado moderadamente resistente ao oídio), Coodetec 201, Tainung-3 e Embrapa-59 (EMBRAPA, 2006).

Tabela 1. Genealogia dos parentais envolvidos nos cruzamentos e reação às doenças nematóide do cisto da soja - raça 3 (NCS) e oídio (O).

Código	Parentais	Genealogia	Reação à doença ¹	
			NCS	O
1	Hartwig	Forrest x PI 437654	R	SA
2	BRS – 134	BR 83-147 x BR 84-8309	S	S
3	FT – Estrela	M – 2 x FT – 1	S	S
4	Conquista	Lo 75-4484 x Numabaira	S	R
5	Coodetec – 204	Soc 81-216 x Ocepar 3	S	S
6	Cac – 1	Seleção em IAC-8	S	S
7	BRS – 137	Dourados-1 x Ocepar 9	S	MR
8	Coodetec – 201	Ocepar 4 (iguaçu-5) x W 20	S	R
9	BRSMS – Bacuri	FT – 2 x Braxton	S	SA
10	BR – 16	D69 - B10 – M58 x Davis	S	S
11	Tainung – 3	Nungshih h-11 x PI 200492	SA	R
12	Embrapa 59	FT – abyara x BR 83 – 147	S	R
13	FT – 2	Seleção em IAS – 5	SA	S

¹ R – resistente; S – suscetível; MR – moderadamente resistente; SA – sem avaliação

Para cada grupo de ligação, foram realizados três tipos de cruzamentos (biparental, quádruplo e óctuplo). Todos os cruzamentos (Tabela 2) foram realizados no mesmo período (dezembro a janeiro). Os biparentais (cruzamentos simples) no ano de 2002/03, os quádruplos (entre F_1 's dos biparentais) em 2003/04, e os óctuplos (entre F_1 's dos quádruplos) em 2004/05. Posteriormente, todos os F_1 's remanescentes dos biparentais e quádruplos, assim como os óctuplos, foram semeados individualmente para multiplicação e obtenção das sementes $F_{2:1}$. A partir dessas sementes foram obtidos os genótipos F_2 , sendo coletadas amostras de tecido foliar para extração do DNA. Foram analisados seis cruzamentos distintos, com 53 genótipos para cada cruzamento, com exceção do cruzamento J2, com 33 genótipos (Tabela 2).

Tabela 2. Tipos de cruzamentos (Cz) com as respectivas genealogias e número de genótipos avaliados (#Gen), junto aos grupos de ligação molecular (GLM) G e J (CREGAN et al., 1999).

GLM G	Cz	Genealogia [¶]	#Gen
G2	Biparental	(1 x 2)	53
G4	Quádruplo	[(1 x 2) x (1 x 3)]	53
G8	Óctuplo	{[(1 x 2)(8 x 9)] x [(6 x 7)(4 x 5)]}	53
GLM J			
J2	Biparental	(10 x 11)	33
J4	Quádruplo	[(10 x 11) x (6 x 7)]	53
J8	Óctuplo	{[(10 x 11)(6 x 7)] x [(12 x 13)(4 x 5)]}	53

[¶]Ver Tabela 1

O baixo número de genótipos analisados pode ser justificado pela dificuldade de realização dos cruzamentos, limitada a pouca quantidade de sementes colhidas em F_1 e que, muitas vezes, pode inviabilizar o estudo nas gerações iniciais, como em F_2 . Aliado a isso, tem-se a baixa porcentagem de pegamento, que raramente ultrapassa 40%, e o fenômeno da pseudocleistogamia existente na soja (autofecundação no momento da abertura da flor), que torna necessária a realização dos cruzamentos no estágio de botão floral (BORÉM & MIRANDA, 2005).

2.2. Análises moleculares

As amostras de tecido foliar dos genótipos F_2 , compostas por trifólios jovens, foram coletadas e mantidas em ultrafreezer (-80°C) até o momento da extração de DNA. A extração do DNA genômico dos genótipos parentais e dos indivíduos da geração F_2 foi realizada a partir do tecido foliar coletado, pelo método CTAB descrito por KEIM et al., (1989). O DNA foi quantificado por análise espectrofotométrica (SAMBROOK et al., 1989) e diluído para uma concentração final de 10 ng/ μl . A integridade desse DNA foi verificada em gel de agarose (1,5 % p/v), corado com brometo de etídio. As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Genética e Melhoramento de Plantas da Universidade de Kentucky - EUA.

Foram utilizados marcadores microssatélites concentrados numa distância de até 55cM ao redor do gene de resistência ao oídio (*Rmd*), localizado no grupo de ligação J, e ao redor do gene de resistência ao nematóide de cisto da soja (*rhg1*), localizado no grupo G (CREGAN et al., 1999). Esta estratégia permitiu conferir a recombinação genética nas regiões significantes ao redor dos genes, para os quais foram feitas as combinações.

A seqüência dos marcadores foi obtida pelo site <http://soybase.com>. O número de marcadores utilizados para verificar o polimorfismo entre os parentais foi de 29 no grupo G e de 25 no grupo J. Destes, apenas os marcadores polimórficos foram selecionados para o estudo, totalizando seis polimórficos no grupo G (Sat_210, Satt 217, Sat_315, Satt 324, Satt 394 e Satt115) e sete no grupo J (Satt 431, Sat_224, Satt 547, Sat_366, Satt 215, Satt 380 e Sat_165) e foram utilizados na obtenção dos resultados de *crossing-over* (Figura 2).

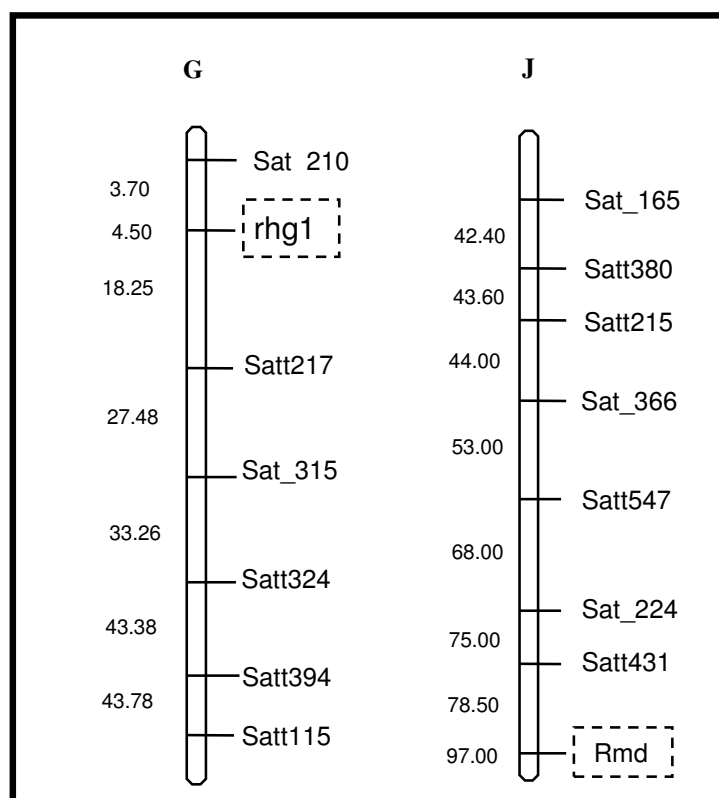


Figura 2. Esquema representativo da posição relativa, em aproximadamente, 55cM dos seis marcadores “SSR” do grupo de ligação G (rhg1) e dos sete marcadores “SSR” do grupo de ligação J (Rmd), usados para identificação da região de *crossing-over* nos genótipos F₂, dos cruzamentos biparentais, quádruplos e óctuplos.

As reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foram realizadas para identificação dos marcadores polimórficos, em volume final de 21µL, contendo: Tampão PCR 1X (10 mM Tris-HCl pH 8,3 e 50 mM KCl), 1,50 mM MgCl₂, 0,15 mM de dNTP's, 0,15µM de cada iniciador, 30 ng de DNA genômico, 1 U Taq polimerase e Água Milli-Q. A termociclagem consistiu de um período inicial de desnaturação do DNA por dois minutos a 94°C, seguido de quarenta ciclos térmicos, cada um deles incluindo as etapas: desnaturação do DNA, por 25 segundos a 94°C, pareamento dos iniciadores, por 25 segundos a 47°C, e extensão pela enzima Taq DNA polimerase, por 25 segundos a 68°C. Após os ciclos térmicos, um período final de extensão de sete minutos a 68°C foi realizado.

Os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose metaphor (3%), a 70V por 4 horas, ou em gel de poliacrilamida, a 200V por 6 horas, dependendo do tamanho da marca polimórfica encontrada previamente entre os parentais. Os géis foram corados com brometo de etídio, visualizados sob luz ultravioleta e a captação de imagem foi realizada utilizando o sistema Kodak de fotodocumentação.

2.3. Análise dos resultados

Após a obtenção dos resultados da reação das populações F₂ ao nematóide de cisto (raça 3) e ao oídio, que as caracterizaram em homozigóticas resistentes, heterozigóticas e homozigóticas suscetíveis, foi realizado nos cruzamentos biparentais G2 e J2 (Tabela 3), o teste de conformidade do modelo qui-quadrado, para verificar se a segregação genotípica observada nos marcadores microssatélites testados diferia da proporção esperada (1:2:1). A variabilidade genética foi analisada pela ocorrência de *crossing-overs*, que são determinados pela frequência gênica entre os marcadores. Os *crossing-overs* foram caracterizados pela troca de alelos entre os marcadores (Figura

3), em função da reação aos patógenos em estudo e visualizados através de bandas polimórficas em géis de agarose ou poliacrilamida.

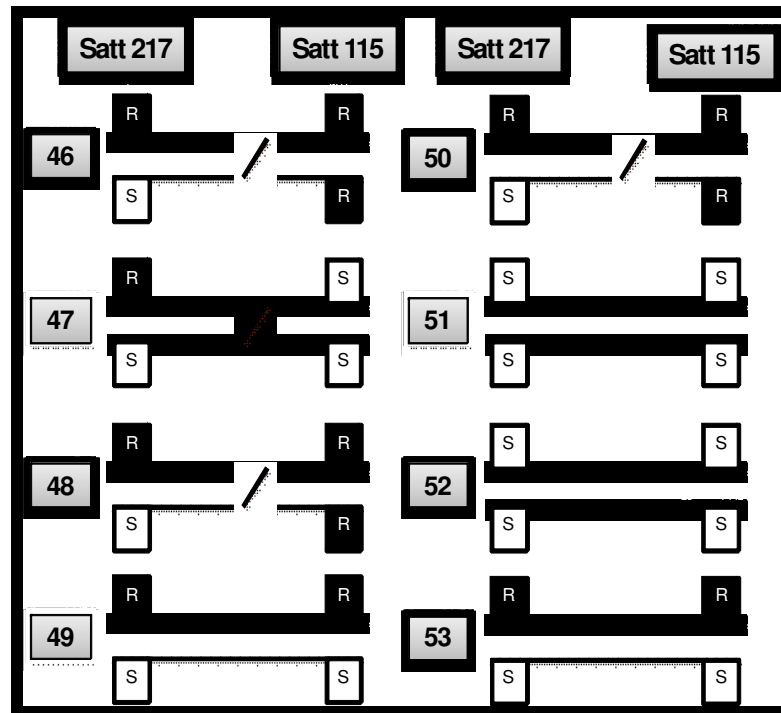


Figura 3. Esquema representativo da ocorrência de *crossing-over* durante a meiose na criação de genótipos segregantes F_2 (46 a 53), entre dois marcadores do grupo de ligação G (CREGAN et al., 1999).

Os resultados foram analisados através dos seguintes parâmetros descritivos:

a) média (\bar{X}) = estimada por genótipo e em função do número de gerações

correspondentes para cada tipo de cruzamento, calculada pela expressão: $\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n Xi}{n}$,

onde, Xi = valor genérico da observação; n = número de observações;

b) desvio-padrão (σ), dado por: $\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$, onde, X_i = valor genérico da observação; n = número de observações; \bar{X} = valor da média da população;

c) variância (σ^2), calculado por: $\sigma^2 = \sum_{i=1}^n X_i^2 - \frac{\left(\sum_{i=1}^n X_i\right)^2}{n-1}$, sendo, X_i = valor genérico da observação; n = número de observações.

A média obtida em função do número de gerações (\bar{X}) foi calculada dividindo-se a média dos genótipos pelo número de gerações possíveis para ocorrência de *crossing-over*, sendo uma geração para os cruzamentos biparentais, duas para os quádruplos e três para os óctuplos.

3. Resultados

Na Tabela 3, podem ser observados os valores de qui-quadrado (χ^2) calculados para os seis marcadores do grupo G e os sete do grupo J, respectivamente com 53 e 33 genótipos do cruzamento biparental. Para os demais cruzamentos, não foi efetuado o teste de qui-quadrado, visto que estes tendem a não apresentar uma proporção esperada de 1:2:1, já que são provenientes da recombinação entre quatro ou oito parentais diferentes.

Todos os marcadores analisados para o qui-quadrado foram não significativos ($P > 0,05$) nos dois grupos, indicando que os valores observados se ajustam à proporção genotípica esperada em F_2 de 1:2:1 (Tabela 3). Valores significativos de qui-quadrado para taxa de segregação esperada em marcadores moleculares têm sido relatados em soja (ZHANG et al., 2004; STEFANIAK et al., 2006).

Tabela 3. Valores de qui-quadrado (χ^2), considerando a proporção 1:2:1 e a proporção genotípica em cada microssatélite, quanto a reação as doenças nematóide do cisto da soja – raça 3 (NCS-3) e ao oído (O).

GLM [§] microssatélite	χ^2	Proporção genotípica		
		G (NCS-3)	R(13,25)	H(26,50)
Sat_210	3,79	8	33	12
Satt 217	5,60	8	35	10
Sat_315	1,53	11	31	11
Satt 324	2,13	13	31	9
Satt 394	4,28	10	34	9
Satt 115	4,28	9	34	10
J (O)		R(8,25)	H(16,50)	S(8,25)
Satt 431	1,79	5	18	10
Sat_224	1,79	5	18	10
Satt 547	2,45	6	15	12
Sat_366	0,52	8	15	10
Satt 215	1,30	8	14	11
Satt 380	1,55	6	16	11
Sat_165	1,55	6	16	11

[§]grupo de ligação molecular (CREGAN et al., 1999) R – resistente, H – heterozigoto, S - suscetível

3.1. Detecção de crossing-over

Para os dois grupos de ligação estudados, G e J, os marcadores microssatélites não se apresentaram altamente polimórficos para os parentais, o que dificultou a

confirmação da ocorrência de *crossing-over* nas populações. Nas Figuras 4 e 5, podem ser observadas a ocorrência de *crossing-over*, com a mudança de alelos entre os marcadores, para cada genótipo segregante, dentro de cada grupo de ligação estudado.

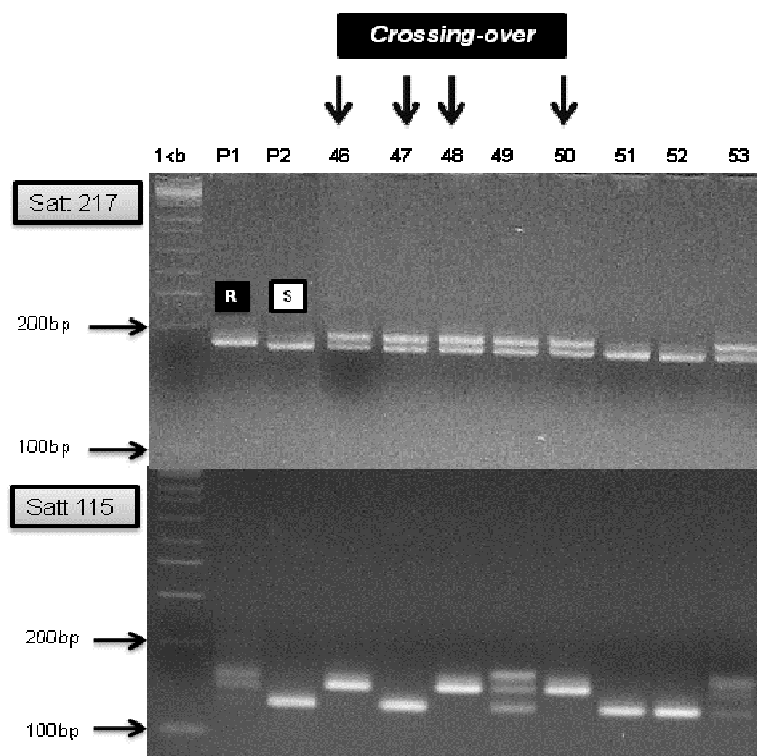


Figura 4. Amplificação com os microssatélites Satt 217 e Satt 115 em gel de agarose (metaphor 3%), caracterizando a ocorrência de *crossing-over*, no cruzamento G1 (Hartwig (R) – P1 e BRS-134 (S) – P2), em oito genótipos segregantes (46 a 53).

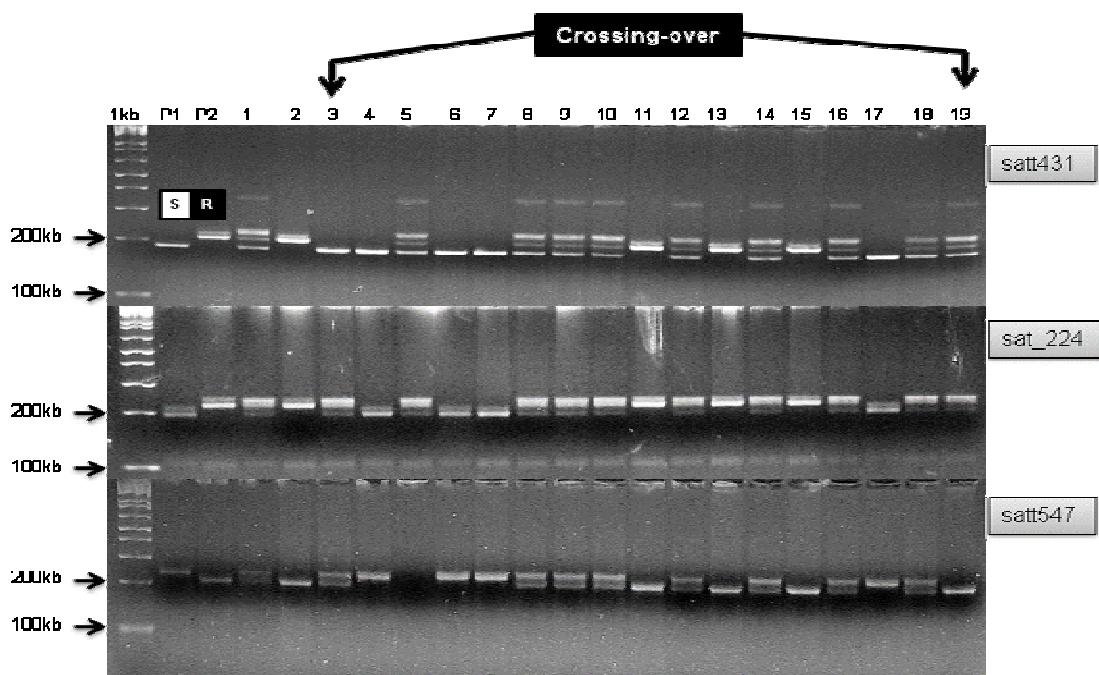


Figura 5. Amplificação com os microssatélites Satt 431, Sat_224 e Satt 547 em gel de agarose (metaphor 3%), caracterizando a ocorrência de *crossing-over*, no cruzamento J2 (BR-16 (S) – P1 e Tainung 3 (R) – P2), em 19 genótipos segregantes (01 a 19).

3.2. Grupo de ligação G

Na análise do grupo G foram encontrados 107 *crossing-overs* para o cruzamento biparental (G2), 212 *crossing-over* para o cruzamento quádruplo (G4) e 72 *crossing-over* para o cruzamento óctuplo (G8). Na Tabela 4, podem ser visualizados os resultados da média de *crossing-overs* por genótipo, erro-padrão e variância para os diferentes tipos de cruzamentos estudados, destacando-se o G4 com a maior média de

crossing-over por genótipo ($\bar{X} = 4,0$). Além do baixo polimorfismo encontrado entre os parentais, outra justificativa para o baixo número de crossing-overs detectados em G8, pode estar relacionado à utilização de apenas um parental (Hartwig) como fonte de resistência ao NCS-3, o que pode ter restringido a ocorrência de multialelismo. É importante enfatizar que a possibilidade de ocorrência de crossing-over varia para cada tipo de cruzamento, sendo a média encontrada de 2,02 para G2, 2,00 em G4 e 0,45 para G8 (Tabela 4).

Tabela 4. Estimativa dos parâmetros descritivos, média aritmética (\bar{X}), erro-padrão (σ), variância (σ^2) e média da possibilidade de ocorrência de *crossing-over* para cada tipo de cruzamento (\bar{X}').

[¶] GLM G	\bar{X} e σ	σ^2	\bar{X}'
Cruzamento			
G2	2,02 ± 1,53	2,33	2,02
G4	4,00 ± 1,00	2,15	2,00
G8	1,36 ± 0,47	2,89	0,45
[¶] GLM J			
Cruzamento			
J2	0,91 ± 0,77	0,59	0,91
J4	1,17 ± 0,98	0,95	0,59
J8	2,91 ± 1,16	1,36	0,97

[¶]grupo de ligação molecular (CREGAN et al., 1999)

Neste grupo, destaca-se também o elevado número de duplos *crossing-over*, isto pode ser justificado pelo fato dos mesmos terem ocorrido em intervalos entre marcadores mais distantes, Sat_315, Satt 324 e Satt 394 (Figura 2). Desta forma, a probabilidade de ocorrer *crossing-over* entre dois marcadores é menor, quanto menor for a distância entre eles, ou seja, a sua ocorrência reflete a distância genética entre os locos. Adicionalmente, pode-se considerar que marcadores mais próximos tendem a ter maior confiabilidade na detecção de genótipos resistentes. Entretanto, a distância de cada marcador em relação ao gene de resistência é um fator a ser considerado quando se observa a frequência de recombinação entre eles (RAMALHO, SANTOS & PINTO, 1996).

A frequência do número de genótipos pelo número de ocorrências de *crossing-overs*, foi estimada para cada cruzamento (Figura 6). No cruzamento G2, destaca-se a ocorrência de dois *crossing-over* em 30% dos genótipos, com menos de 2% apresentando 6 *crossing-overs*. Para o cruzamento G4, mais de 35% dos genótipos apresentaram 5 *crossing-overs*, enquanto em 1,89% dos genótipos não ocorreu *crossing-over*. Com relação ao G8, pode ser destacado que a maioria dos genótipos (56,60%) não apresentaram *crossing-over*, tendo o restante dos genótipos apresentando dois ou quatro *crossing-overs*. Deve-se ressaltar que as análises de *crossing-over* foram baseadas apenas no caráter de resistência ao patógeno. Assim, mesmo que o cruzamento G8 não tenha obtido bons resultados na ocorrência de *crossing-over* para esse caráter, o mesmo pode ser usado como fonte de grande variabilidade, devido à conjugação de genes de diversos cultivares (BONETTI, 1983; VELLO, 1985; HIROMOTO & VELLO, 1986).

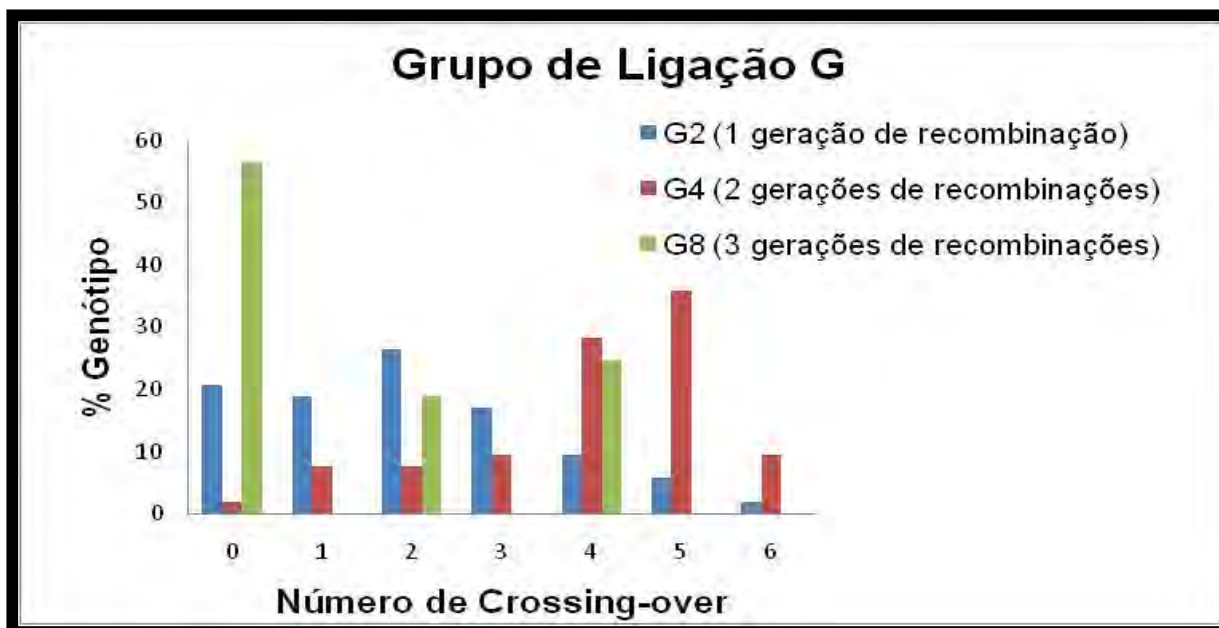


Figura 6. Freqüência de genótipos pelo número de *crossing-over* ocorridos nas três populações em estudo, no grupo de ligação G.

3.3. Grupo de ligação J

No grupo J, 53 genótipos foram analisados nos cruzamentos J4 e J8, e 33 no J2, conforme citado anteriormente. No cruzamento biparental (J2) foram encontrados 30 *crossing-overs*, no cruzamento quádruplo (J4) detectou-se 62 *crossing-overs* e no cruzamento óctuplo (J8) 154 *crossing-overs* foram constatados.

Na Tabela 4, verifica-se que a maior média de *crossing-over* por genótipo ocorreu para o cruzamento J8 (2,91), podendo ser observados também os dados de desvio-padrão e variância para todos os cruzamentos. Com relação à média de possibilidade de ocorrência de *crossing-over* em função do tipo de cruzamento, destaca-se que a chance de ocorrência em cruzamentos simples é de apenas uma

geração, sendo a média para J2 de 0,91. Em cruzamentos quádruplos, a chance para ocorrência é de duas gerações de cruzamento, sendo a média calculada para J4 de 0,59. Nos cruzamentos óctuplos, a chance de ocorrência de crossing-over é considerada para três gerações, sendo a média de J8 de 0,97.

Na Figura 7, está representada a freqüência do número de genótipos pelo número de ocorrências de crossing-over, para cada tipo de cruzamento. Destaca-se, nesse caso, o cruzamento J2 apresentando a maioria dos genótipos (60,61%) com apenas um crossing-over. No cruzamento J4, em 49% dos genótipos ocorreu apenas um crossing-over, enquanto em 1,89% do total o número de crossing-over encontrado foi cinco. Já no cruzamento J8, observou-se a maior parte dos genótipos apresentando dois e três crossing-overs (37,7 e 26,4%, respectivamente), sendo que em menos 2% não ocorreu crossing-over.

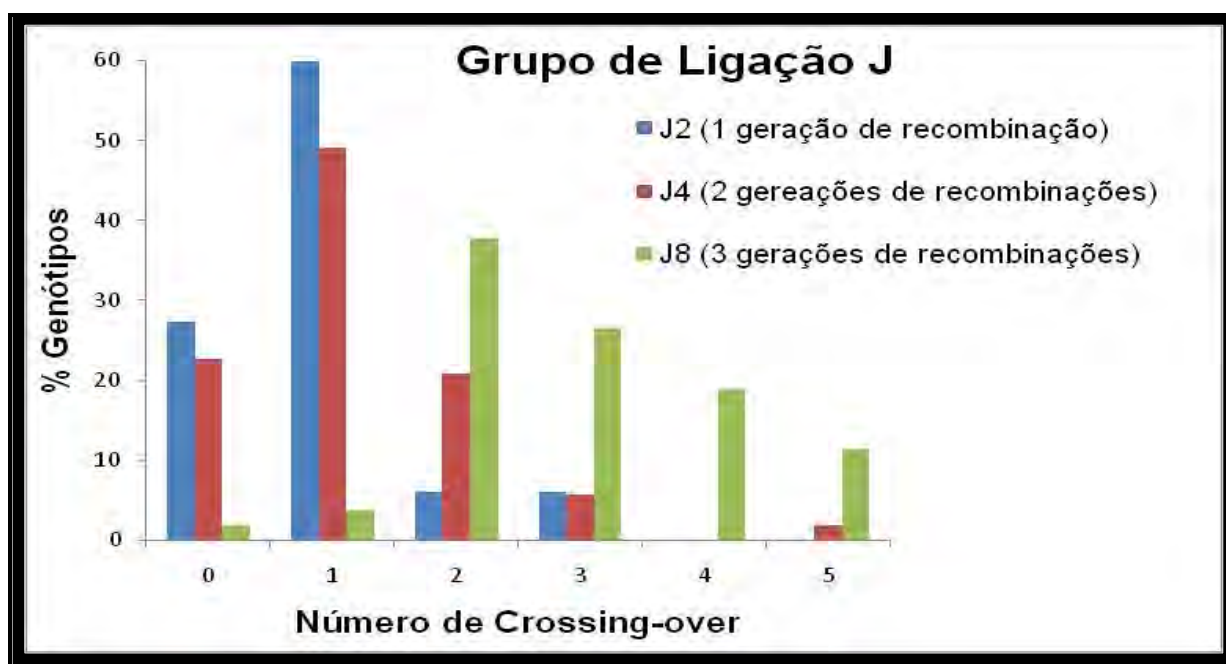


Figura 7. Freqüência de genótipos pelo número de *crossing-over* ocorridos nas três populações em estudo, no grupo de ligação J.

4. Discussão

Todos os marcadores apresentaram baixo polimorfismo, variando entre dois e quatro alelos. Os alelos foram caracterizados em ordem alfabética crescente, para os valores do peso molecular (Tabela 5). Esse resultado pode ser atribuído à base genética estreita da soja e ao fato dos cultivares utilizados neste estudo possuírem em suas genealogias genótipos ancestrais comuns, concordando com resultados relatados por HIROMOTO & VELLO (1986) e BONATO & BONATO (1987).

Os cultivares utilizados como parentais na formação das populações G2, G4 e G8, apresentaram 30 alelos distribuídos em 6 loci, variando de dois (Satt217, Satt324 e Satt115) a três alelos (Sat_210, Sat_315 e Satt394). Enquanto que, na formação das populações J2, J4 e J8, os parentais apresentaram 36 alelos distribuídos em 7 loci, com dois (Sat_366, Satt215, Satt380 e Sat_165), três (Sat_224 e Satt547) e quatro alelos (Satt431).

Nesse ponto, destaca-se que o comprimento dos alelos amplificados de um locus simples dependerá do “motif” e do número de seqüências repetitivas em tandem. O número de alelos por locus também é influenciado pelas características do material utilizado (STEPIÉN et al., 2006). A variabilidade dos loci de microssatélites está ligada à distância relativa do centrômero e a frequência de recombinações (HUANG et al., 2002).

Tabela 5. Polimorfismo entre os parentais, com os valores aproximados do peso molecular por alelo, para cada microssatélite.

Parental [§]	Sat_210	Satt217	Sat_315	Satt324	Satt394	Satt115	
[¶] GLM	A(220kb)	A(250kb)	A(230kb)	A(200kb)	A(290kb)	A(120kb)	
G	B(250kb)	B(260kb)	B(250kb)	B(220kb)	B(300kb)	B(150kb)	
	C(260kb)		C(260KB)		C(310kb)		
1	B	B	C	B	B	B	
2	C	A	B	A	A	A	
3	C	A	A	A	C	B	
4	A	A	B	A	B	B	
5	C	A	B	B	C	B	
6	B	A	B	A	B	B	
7	B	A	B	B	B	B	
8	B	A	A	A	A	A	
9	C	A	B	B	A	B	
Parental [§]	Satt431	Sat_224	Satt547	Sat_366	Satt215	Satt380	Sat_165
[¶] GLM	A(190kb)	A(200kb)	A(230kb)	A(190kb)	A(130kb)	A(130kb)	A(230kb)
J	B(200kb)	B(210kb)	B(220kb)	B(210kb)	B(140kb)	B(140kb)	B(250kb)
	C(210kb)	C(220kb)	C(210kb)				
	D(240kb)						
4	B	C	C	B	B	B	A
5	D	A	B	A	B	B	B
6	A	A	C	B	B	B	A
7	A	A	C	A	B	B	A
10	A	A	C	A	B	B	B
11	C	C	A	B	A	A	A
12	D	A	C	B	A	B	A
13	B	B	A	A	B	A	A

[¶]grupo de ligação molecular (CREGAN et al., 1999). [§]ver tabela 1

Os microssatélites utilizados permitiram discriminar, em F_2 , se houve incremento nas frequências de crossing-over ocasionado pela realização dos cruzamentos múltiplos, devido à maior chance de quebra dos blocos gênicos e surgimento de novas combinações alélicas. Estes tipos de marcadores, segundo STEPIÉN et al., (2006), são os melhores na detecção de polimorfismo intervarietal, sendo muito utilizados em estudos de diversidade genética em cultivares de soja brasileiras (PRIOLLI et al., 2004), americanas (CORNELIOUS & SNELLER, 2002; BURNHAM et al., 2002) e chinesas (WANG et al., 2006). Outros resultados também foram alcançados na utilização de marcadores do grupo G e J, associando o locus de resistência ao nematóide de cisto com o caráter produção em soja (KOPISCH-OBUCH et al., 2005).

Em adição, foi observada a presença de alguns marcadores monomórficos nas populações segregantes, tais como o marcador Satt217 em G4 e G8, e Satt380 em J8. A ocorrência desse monomorfismo pode ser justificada, pelo fato desses marcadores terem apresentado baixo polimorfismo entre os parentais ou pelo baixo número de sementes F_1 's, que originaram as populações F_2 , esta justificativa concorda com BORÉM & MIRANDA (2005), que relatam as dificuldades de realização dos cruzamentos em soja, inviabilizando as vezes, estudos em populações iniciais, como em F_2 .

Nos dois grupos de ligação estudados (Tabela 4), com exceção do cruzamento G8 (média de 1,36), os resultados mostraram tendência do aumento na ocorrência de *crossing-over* por genótipos, à medida que se aumenta o número de genitores constituintes da população.

Entretanto, no grupo G, a média, em função das chances de ocorrência de crossing-over, foi maior em G2 (2,02), seguido de G4 (2,00) e G8 (0,45). Esse fato pode ser devido ao baixo polimorfismo encontrado entre os marcadores, o que dificultou a constatação de *crossing-over*. Por outro lado, no grupo J a média por geração foi superior em J8 (0,97), seguido de J2 (0,91) e J4 (0,59). Duas considerações devem ser notadas para esse grupo; a primeira em função do baixo polimorfismo entre os marcadores, como no grupo G, e a segunda pelo reduzido número de genótipos analisados em J2 (33).

O alto nível de recombinação gênica detectada nos cruzamentos com quatro (grupo G) e oito (grupo J) parentais, tende a confirmar a eficiência na criação de variabilidade genética através de cruzamentos múltiplos, conforme sugerido por VELLO (1985), através da incorporação gradativa de germoplasmas exóticos em cultivares elites. ALLIPRANDINI (1996) e ININDA et al., (1996), também relataram a importância dos cruzamentos múltiplos quando se objetiva estudar os mesmos em programas de seleção recorrente, bem como na ampliação da base genética do germoplasma utilizado.

Estudos realizados por HAMAWAKI et al., (2000) e HAMAWAKI et al., (2002), comprovaram a eficiência de cruzamentos óctuplos no aumento da variabilidade genética, selecionando genótipos superiores para caracteres de importância agrônômica. Resultados importantes no estudo da frequência de recombinação gênica no melhoramento de plantas foram alcançados por PFEIFFER & VOGT (1990), TULSIERAM et al., (1992), FATMI et al., (1993) e STEFANIAK et al., (2006), em populações criadas pela recombinação entre dois parentais.

As recombinações criadas através de intercruzamentos já haviam sido propostas como estratégia de melhoramento (HANSON, 1959), entretanto, a seleção favorecendo a máxima recombinação não tem sido encarada como suporte prévio em programas de melhoramento. Como exemplo, estudos realizados por PIPER & FEHR, (1987), demonstraram a redução no ganho genético de progênies com intercruzamentos, porém, aumentando as oportunidades para recombinação.

No presente trabalho, a detecção de recombinação gênica nas populações oriundas do cruzamento óctuplo no grupo G não foi satisfatória, entretanto, deve-se levar em consideração como fator limitante a utilização de marcadores pouco polimórficos entre os parentais. Dessa forma, pode-se sugerir que a recombinação gênica em populações criadas a partir de quatro ou oito parentais, apesar do maior tempo necessário para sua obtenção, tende a proporcionar maior variabilidade genética em programas de melhoramento.

5. Conclusões

1. A maior ocorrência de crossing-over foi verificada nos cruzamentos biparental G2 e quádruplo G4 do grupo de ligação G, e, no cruzamento óctuplo J8 do grupo de ligação J.
2. A maior quantidade de crossing-over por genótipo foi detectada nos cruzamentos quádruplo G4 e óctuplo J8.
3. Os marcadores testados apresentaram baixo polimorfismo com os parentais utilizados nos cruzamentos.
4. Pode-se sugerir que a recombinação gênica em populações criadas a partir de quatro ou oito parentais, apesar do maior tempo necessário para sua obtenção, tende a proporcionar maior variabilidade genética em programas de melhoramento.

6. Referências

ALLIPRANDINI, L. F. **Potencialidade de cruzamentos quádruplos de soja com ênfase na produtividade de grãos**. 1996. 174 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1996.

APUYA, N.; FRAZIER, B.; KEIM, P.; ROTH, E. J.; LARK, K. G. Restriction length polymorphisms as genetic markers in soybean, *Glycine max* (L.) Merr. **Theor. Appl. Genet.**, v. 75, p. 889–901, 1988.

BAENZIGER, P. S.; RUSSELL, W. K.; GRAEF, G. L.; CAMPBELL, B. T. Improving lives: 50 years of crop breeding, genetics, and cytology (C-1). **Crop Sci.**, v. 46, p. 2230-2244, 2006.

BONATO, E. R.; BONATO, A.L.V. **A soja no Brasil: historia e estatística**. Londrina: EMBRAPA/CNPSo, 1987. 61 p. (Documentos, 21).

BONETTI, L. P. Cultivares e seu melhoramento genético. In: FUNDAÇÃO CARGILL. **Soja genética e melhoramento**, v. 2, p. 741–800. 1983.

BORÉM, A.; ALMEIDA, L. A.; KIIHL, R. A. S. Hibridização em soja. In: BORÉM, A. **Hibridização artificial de plantas**. Viçosa: UFV, 1999, p. 443-462.

BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de Plantas**. 4. ed. Viçosa: UFV, 2005, p. 525.

BURNHAM, K. D.; FRANCIS, D. M.; DORRANCE, A. E.; FIORITTO, R. J.; St. MARTIN, S. K. Genetic diversity patterns among phytophthora resistant soybean plant introductions based on SSR markers. **Crop Sci.**, v. 42, p. :338-343, 2002.

CORNELIOUS, B. K.; SNELLER, C. H. Yield and molecular diversity of soybean lines derived from crosses of northern and southern elite parents. **Crop Sci.**, v. 42, p. 642-647, 2002.

CREGAN, P. B; JARVIK, T; BUSH, A. L; SHOEMAKER, R. C; LARK, K. G; KAHLER, A. L; KAYA, N; VANTOAI, T. T; LOHNES, D. G; CHUNG, J.; SPECHT, J. E. An integrated genetic linkage map of the soybean genome. **Crop Sci**, v. 39, p.1464-1490, 1999.

DELANNEY, X. RODGERS, D. M.; OALMER, R. G. Relative contribution among ancestral lines to North American soybean cultivars. **Crop Sci.**, v. 23, p. 944-949, 1983.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa de Soja. **Tecnologia de producao de soja - regio central do Brasil 2007**. Londrina: Embrapa Soja - Embrapa Cerrados - Embrapa Agropecuaria Oeste, 2006, 225 p.

FATMI, A.; PONELEIT, C.; PFEIFFER, T. W. Variability of recombination frequencies in the Iowa Stiff Stalk synthetic. **Theor. Appl. Genet.**, v. 86, p. 859-866, 1993.

GIZLICE, Z.; CARTER Jr, T.E.; BURTON, J. W. Genetic base for North American public soybean cultivars released between 1947 and 1988. **Crop Sci.**, v. 34, n. 5, p. 1143 – 1151, 1994.

HAMAWAKI, O. T.; VELLO, N. A.; DIDONE, C. A. Improvement in genetic characteristics and oil yield of selected soybean progenies from octuple crosses. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 4, p. 855-864, 2000.

HAMAWAKI, O. T.; VELLO, N. A.; HAMAWAKI, R. L. Seleção de progenies superiores em cruzamentos óctuplos de soja. **Biosci Journal.**, v. 18, n. 2, p. 49-58, 2002.

HANSON, W. D. The breakup of initial linkage blocks under selected mating systems. **Genetics.**, v. 44, p. 857-868, 1959.

HIROMOTO, D. M.; VELLO, N. A. The genetic base of Brazilian soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) cultivars. **Revista Brasileira de Genética**, v. 9, p. 295-306, 1986.

HUANG, X. Q.; BÖRNER, A.; RÖDER, M. S.; GANAL, M. W. Assessing genetic diversity of wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm using microsatellite markers. **Theor Appl Genet.**, v. 105, p. 699–707, 2002.

ININDA, J.; FEHR, W. R.; CIANZIO, S. R.; SCHNEBLY, S. R. Genetic gain in soybean population with different percentages of plant introductions parentage. **Crop Sci.**, v. 36, p. 1470-1472, 1996.

KEIM, P.; SHOEMAKER, R. C.; PALMER, R. G. Restriction fragment length polymorphism diversity in soybean. **Theor. Appl. Genet.**, v. 77, p. 786–792, 1989.

KOPISCH-OBUCH, F. J.; MCBROOM, R. L.; DIERS, B. W. Association between soybean cyst nematode resistance loci and yield in soybean. **Crop Sci.**, v. 45, p. 956-965, 2005.

MILACH, S. C. K. Marcadores de DNA. **Biotechnologia Ciência e Desenvolvimento**. Brasília, v. 1, n. 5, p. 14 – 17, 1998.

PFEIFFER, T. W.; VOGT, S. D. Variability for recombination frequencies in the AP12 soybean population. **Crop Sci.**, v. 30, p. 545-549, 1990.

PINTO, L. R.; VIEIRA, M. L. C.; SOUZA, A. P.; SOUZA JUNIOR, C. L. Isoenzimas e microssatélites em plantas. **Biotecnologia Ciencia & Desenvolvimento**. Brasília, n. 20, p. 16-19, 2001.

PIPER, T. E.; FEHR, W. R. Yield improvement in a soybean population by utilizing alternative strategies of recurrent selection. **Crop Sci.**, v. 27, p. 172-178, 1987.

PRIOLLI, R. H. G.; MENDES-JUNIOR, C. T.; ARANTES, N. E.; CONTEL, E. P. B. Characterization of brazilian soybean cultivars using microsatellite markers. **Genetic and Molecular Biology**, v. 25, n. 2, p. 185-193, 2002.

PRIOLLI, R. H. G.; MENDES-JÚNIOR, C. T.; SOUSA, S. M. B.; SOUSA, N. E. A.; CONTEL, E. P. B. Diversidade genética da soja entre períodos e entre programas de melhoramento no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 10, p. 967-975, 2004.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B. dos; PINTO, C. B. **Genética na agropecuária**. 5. ed. São Paulo: Globo, 1996.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd. Ed. Cold Spring Harbor: Laboratory Press, 1989, 653 p.

SOYBASE. 1995. **A genome database for Glycine**. Disponível em: <<http://soybase.com>> acesso em: 30 de agosto, 2006.

STEFANIAK, T. R.; HYTEN, D. L.; PANTALONE, V. R.; KLARER, A.; PFEIFFER, T. W. Soybean cultivars resulted from more recombination events than unselected lines in the same population. **Crop Sci.**, v. 46, p. 43-51, 2006.

STEPIÉN, L.; MOHLER, V.; BOCIANOWSKI, J.; KOCZYK, G. Assessing genetic diversity of polish wheat (*Triticum aestivum*) varieties using microsatellite markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**. Nov., 2006, publicação on-line..

TULSIERAM, L.; COMPTON, W.; MORRIS, R.; THOMASCOMPTON, M.; ESKRIDGE, K. Analysis of genetic-recombination in maize populations using molecular markers. **Theor. Appl. Genet.**, v. 84, p. 65-72, 1992.

VELLO, N. A. Ampliação da base genética do germoplasma e melhoramento de soja na ESALQ/USP. In: CÂMARA, G. M. S., MARCOS FILHO, J.; OLIVEIRA, E. A. M., (Ed.) **Simpósio sobre cultura e produtividade da soja**. Piracicaba, FEALQ, 1992, p. 60-81.

VELLO, N.A. **Efeitos da Introdução de Germoplasma Exótico Sobre a Produtividade e Relações com a Base Genética das Cultivares de Soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. 1985. 91f. Tese (Livre-Docência) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracocaba, 1985.

WANG, L.; GUAN, R.; ZHANXIONG, L.; CHANG, R.; QIU, L. Genetic diversity of chinese cultivated soybean revealed by SSR markers. **Crop Sci.**, v. 46, p. 1032-1038, 2006.

ZHANG, W. K.; WANG, Y. J.; LUO, G. Z.; ZHANG, J. S.; HE, C. Y.; WU, X. L.; GAI, J. Y.; CHEN, S. Y. QTL mapping of ten agronomic traits on the soybean genetic map and their association with EST markers. **Theor. Appl. Genet.**, v. 108, p. 1131-1139, 2004.

CAPÍTULO 3 - VARIABILIDADE GENÉTICA EM SOJA EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE GENITORES

RESUMO

A estimativa da herdabilidade (h^2) permite prever a possibilidade de sucesso com a seleção, uma vez que reflete a proporção da variância fenotípica que pode ser herdada. Desta forma, os objetivos deste trabalho consistem em analisar a variabilidade genética de cruzamentos múltiplos de soja, em geração F_2 , através dos parâmetros de herdabilidade (h^2) e ganho genético (ΔG) para os caracteres agronômicos: altura de planta na maturação (APM), altura de inserção da primeira vagem (AIV), produção de grãos (PG) e número de sementes (NS). Os genótipos F_2 originados dos cruzamentos biparentais (B), quádruplos (Q) e óctuplos (OC), foram semeados no campo, com testemunhas intercalares (MSOY 8001 e Coodetec 216), dando origem às populações analisadas F_3 . Todos os cruzamentos apresentaram os caracteres APM e AIV dentro do recomendado, ou seja, entre 60 e 100 cm e acima de 12 cm, respectivamente. Para o caráter PG, apenas o cruzamento OC38 não teve média superior a pelo menos uma das testemunhas. Para NS, esta observação foi verificada nos cruzamentos B6, Q29 e OC38. As maiores estimativas de herdabilidade foram verificadas nos cruzamentos com quatro ou oito parentais, para todos os caracteres analisados. As estimativas de ganho genético foram superiores nos cruzamentos B7 e OC39 para APM, Q29 para AIV, Q29 e OC39 para PG, além de OC38 e OC39 para o caráter NS. Cruzamentos com maior número de parentais, tenderam a apresentar maior variabilidade e, conseqüentemente, maior variância genética.

Palavras-chave: *Glycine max*, cruzamentos múltiplos, parâmetros genéticos

SOYBEAN GENETIC VARIABILITY IN FUNCTION OF THE PARENTS NUMBER

ABSTRACT

The heritability (h^2) estimates allow knowing the possibility of success with selection, as soon as it reflects the proportion of the phenotypic variation that can be inherited. The objective of this work were to analyse the genetic variability from multiple crosses of soybean in F_2 generation, towards the genetics parameters of heritability (h^2) and genetic gain (ΔG) to agronomic traits: plant height at maturity (PHM), first pod insertion height (FPI), grain production (GP) and number of seeds per plant (NS). The experiment was conducted using the family design with common checks (MSOY 8001 and Coodetec 216 cultivars). The plots consisted of 5 meter lines, 0,5 m apart and with 20 to 25 plants per meter. All crosses obtained PHM and FPI inside the recommended economically, between 60 and 100 cm and above 12 cm, respectively. In the character GP, only the OC38 cross had not average higher at least one of the checks. This observation in NS was checked in the B6, Q29 and OC38 crosses. The heritability higher estimates were observed in the crosses with four or eight parents to all analysed traits. The genetic gain estimated was higher in B7 and OC39 crosses to PHM, Q29 to FPI, Q29 and OC39 to PG and OC38 and OC39 to the NS trait. Crosses with high number of parents, have a tendency to present bigger variability and, consequently, higher genetic variance.

Keys Word: *Glycine max*, multiple crosses, genetic parameters

1. Introdução

Para os melhoristas, é de grande interesse a obtenção de variabilidade genética para a imposição de processos seletivos que efetivamente resultem em ganhos genéticos significativos (BERNARDO, 2002). Assim, a estimativa da herdabilidade (h^2) permite antever a possibilidade de sucesso com a seleção, uma vez que reflete a proporção da variação fenotípica que pode ser herdada. A avaliação de famílias sem repetições, intercaladas com testemunhas, possibilitando a estimação do componente ambiental associado à variância fenotípica das populações em estudo, é uma alternativa para a estimação de parâmetros genéticos quando ocorre limitado número de sementes e a possível segregação em gerações iniciais (BACKES et al., 2002).

Estimativas sobre a variabilidade genética da soja têm destacado que o germoplasma brasileiro provém de base genética restrita, tendo se originado de poucas linhagens ancestrais. No Brasil, BONETTI (1983) estimou que cerca de 70% dos cultivares desenvolvidos para o Rio Grande do Sul, na década de 60, descendiam dos cultivares americanos Hill, Hood ou ambas.

HIROMOTO & VELLO (1986), discorreram sobre a necessidade de ampliar a base genética dos cultivares brasileiros para evitar que ocorra a vulnerabilidade do germoplasma e o estabelecimento de patamares de produção difíceis de serem rompidos. Os mesmos autores relataram que 100% do conjunto gênico da soja existente no Brasil, é, oriundo da contribuição de 26 ancestrais, tendo 11 linhagens asiáticas ancestrais contribuído com mais de 90%. Outros resultados também foram constatados por PRIOLLI et al., (2004), indicando alta similaridade genética entre 186 cultivares de soja no Brasil.

A ampliação da base genética dos cultivares de soja é de extrema importância para diminuir os riscos de vulnerabilidade genética e para elevar os patamares de produção. A base genética estreita é decorrente do reduzido número de parentais empregados no desenvolvimento de cultivares, bem como do cultivo de grandes áreas

com genótipos uniformes (VELLO, 1992). Alguns resultados já foram alcançados com a incorporação de germoplasmas exóticos em programas de melhoramento e a realização de cruzamentos múltiplos (TANKSLEY & MCCOUCH, 1997; HAMAWAKI, VELLO & DIDONE, 2000 e HAMAWAKI, VELLO & HAMAWAKI, 2002).

No Brasil, os cruzamentos múltiplos ainda são pouco estudados, mas ALLIPRANDINI (1996) considera que a avaliação correta de parâmetros inerentes a cruzamentos múltiplos é de fundamental importância quando se objetiva estudar os mesmos em programas de seleção recorrente, bem como na ampliação da base genética do germoplasma utilizado. Desta forma, este trabalho teve como objetivo analisar a variabilidade genética através dos parâmetros de herdabilidade (h^2) e ganho genético (ΔG), para os caracteres agrônômicos: altura de planta na maturação (APM), altura de inserção da primeira vagem (AIV), produção de grãos (PG) e número de sementes (NS), em populações segregantes F_2 de soja, desenvolvidas através de cruzamentos biparentais e múltiplos.

2. Material e Métodos

2.1. Local e ambiente experimental

O presente trabalho foi desenvolvido na área experimental do Departamento de Produção Vegetal da FCAV/UNESP – Campus de Jaboticabal/SP. Os cultivares utilizados nos cruzamentos foram contrastantes às doenças nematóide do cisto da soja, raça 3 – *Heterodera glycines* e ao oídio – *Erysiphe diffusa* (Tabela 1). Inicialmente, 269 genótipos F_2 originados dos cruzamentos biparentais (B), quádruplos (Q) e ócuplos (OC), foram semeados em linhas de 5 m no campo, com testemunhas intercalares

(MSOY 8001 e Coodetec 216) e colhidos manualmente de acordo com o índice de maturação para cada linha. O número de genótipos avaliados por linha variou com a densidade de semeio, pelo número de sementes disponíveis. A seleção dos genótipos avaliados seguiu alguns aspectos fenotípicos, tais como: arquitetura da planta (boa ramificação), porte ereto, altura adequada e espessura do caule, perfazendo um total de 1830 genótipos F_3 , distribuídos em seis famílias (Tabela 2). A condução do ensaio foi realizada seguindo recomendações técnicas para a cultura da soja, principalmente em relação ao controle de plantas daninhas, através de herbicidas e capinas manuais e ao controle de pragas e doenças (EMBRAPA, 2006). A colheita foi realizada manualmente quando as plantas apresentaram-se no estágio R_8 de desenvolvimento (FEHR & CAVINESS, 1981). Foram avaliados os caracteres altura da planta na maturação (APM) medida da superfície do solo até o ápice das plantas; altura de inserção da primeira vagem (AIV) medida da superfície do solo até a inserção da primeira vagem, ambas expressas em cm; número de sementes (NS) contagem após a colheita do número de sementes em cada planta, e produção de grãos (PG), sendo o peso total das sementes produzidas, expresso em gramas/planta.

Tabela 1. Genealogia dos parentais envolvidos nos cruzamentos e reação às doenças nematóide do cisto da soja, raça 3 (NCS-3) e oídio (O).

Código	Parentais	Genealogia	Reação à doença ^{1/}	
			NCS-3	O
1	Hartwig	Forrest x PI 437654	R	SA
2	BRS – 134	BR 83-147 x BR 84-8309	S	S
3	FT – Estrela	M – 2 x FT – 1	S	S
4	Conquista	Lo 75-4484 x Numabaira	S	R
5	Coodetec – 204	Soc 81-216 x Ocepar 3	S	S
6	Cac – 1	Seleção em IAC-8	S	S
7	BRS – 137	Dourados-1 x Ocepar 9	S	MR
8	Coodetec – 201	Ocepar 4 (iguaçu-5) x W 20	S	R
9	BRSMS – Bacuri	FT – 2 x Braxton	S	SA
10	Renascença	[F81-2129 x (Kirby x Tracy M)] x Forrest	R	R
11	Tainung – 4	Nungshih h-11 x PI 200492	SA	R

^{1/} R – resistente; S – suscetível; MR – moderadamente resistente; SA – sem avaliação

Tabela 2. Cruzamentos realizados com as respectivas genealogias e número de genótipos iniciais obtidos na geração F₂ e avaliados em F₃.

Cruzamentos	Genealogia [§]	Gerações	
		F ₂	F ₃
B6	(6 x 7)	55	341
B7	(1 x 2)	54	420
Q29	[(1 x 2) x (1 x 3)]	35	297
Q30	[(4 x 5) x (6 x 7)]	43	294
OC38	{[(4 x 5)(6 x 7)] x [(1 x 2)(8 x 9)]}	46	291
OC39	{[(11 x 10)(2 x 3)] x [(4 x 9)(6 x 7)]}	36	187
Total		269	1830

2.2. Análise Estatística

A análise de variância para cada testemunha e para a geração segregante, seguiu o modelo estatístico: $Y_{ij} = \bar{X} + f_i + e_i + p_{ij} + \delta_{ij}$, onde Y_{ij} é a observação da j-ésima planta da i-ésima família; \bar{X} é a média geral da geração (testemunha ou linha segregante); f_i é o efeito genético atribuído à i-ésima família; e_i é o efeito ambiental entre fileiras (das testemunhas ou de linhas segregantes); p_{ij} é o efeito genético atribuído à j-ésima planta da i-ésima família; δ_{ij} é o efeito entre plantas dentro de fileiras (das testemunhas ou de linhas segregantes). As análises estatísticas foram realizadas através do programa GENES versão 2007 (CRUZ, REGAZZI & CARNEIRO, 2004). Os

dados originais de NS foram transformados para \sqrt{x} , visando um melhor ajuste na curva de distribuição normal.

Na Tabela 3, foi apresentado um esquema da análise de variância para cada testemunha e geração segregante. No qual: $k_f = \frac{N - \left(\frac{1}{N} \sum_{i=1}^f n_i^2 \right)}{f - 1}$; $k_1 = \frac{N_1 - \left(\frac{1}{N_1} \sum_{i=1}^{p_1} n_i^2 \right)}{p_1 - 1}$;

$k_2 = \frac{N_2 - \left(\frac{1}{N_2} \sum_{i=1}^{p_2} n_i^2 \right)}{p_2 - 1}$; $\hat{\sigma}_{fd}^2 = \hat{\sigma}_{gd}^2 + \hat{\sigma}_{ed}^2$; $\hat{\sigma}_{fe}^2 = \hat{\sigma}_{ge}^2 + \hat{\sigma}_{ee}^2$, onde: k_f , k_1 e k_2 é a média ponderada

do número de plantas por ponto para cada família, testemunhas 1 e 2 respectivamente; $\hat{\sigma}_{fd}^2$ é a variância fenotípica entre plantas dentro de famílias; $\hat{\sigma}_{gd}^2$ é a variância genotípica entre plantas dentro de famílias; $\hat{\sigma}_{ed}^2$ é a variância ambiental entre plantas dentro de famílias; $\hat{\sigma}_{fe}^2$ é a variância fenotípica entre famílias; $\hat{\sigma}_{ge}^2$ é a variância genotípica entre famílias; e $\hat{\sigma}_{ee}^2$ é a variância ambiental entre famílias.

Os cultivares usados como testemunhas, por serem totalmente endogâmicos, podem ser utilizados para as estimativas da variância ambiental, onde: $\sigma_{edt1}^2 = \sigma_{ed(test1)}^2$ é a variância ambiental entre plantas dentro da testemunha 1; $\sigma_{eet1}^2 = \sigma_{ee(test1)}^2$ é a variância ambiental entre pontos da testemunha 1; $\sigma_{edt2}^2 = \sigma_{ed(test2)}^2$ é a variância ambiental entre plantas dentro da testemunha 2; e $\sigma_{eet2}^2 = \sigma_{ee(test2)}^2$ é a variância ambiental entre pontos da testemunha 2.

2.3. Estimativa dos Componentes de Variância

Através dos dados obtidos para as testemunhas e linhas segregantes, os componentes de variância foram estimados como segue:

Variância fenotípica

$$\hat{\sigma}_{fe}^2 = \frac{MSfe - MSfd}{k_f};$$

$$\hat{\sigma}_{fd}^2 = MSfd$$

Variância Ambiental

$$\sigma_{ee}^2 = \frac{1}{2}(\hat{\sigma}_{ee(test1)}^2 + \hat{\sigma}_{ee(test2)}^2) = \frac{1}{2} \left(\frac{MSEp1 - MSDp1}{k_2} + \frac{MSEp2 - MSDp2}{k_2} \right)$$

$$\sigma_{ed}^2 = \frac{1}{2}(\hat{\sigma}_{ed(test1)}^2 + \hat{\sigma}_{ed(test2)}^2) = \frac{1}{2}(MSDp1 + MSDp2)$$

Variância Genotípica

$$\hat{\sigma}_{ge}^2 = \hat{\sigma}_{fe}^2 - \hat{\sigma}_{ee}^2$$

$$\hat{\sigma}_{gd}^2 = \hat{\sigma}_{fd}^2 - \hat{\sigma}_{ed}^2$$

Variância Genética Aditiva e Variância devido à Dominância

Na Tabela 3, encontra-se a variância genotípica total ($\hat{\sigma}_{gt}^2$), separada entre variância aditiva ($\hat{\sigma}_a^2$) e variância devido aos desvios de dominância ($\hat{\sigma}_d^2$), considerando o coeficiente de endogamia na geração F_3 de $\frac{1}{2}$ (CRUZ, REGAZZI & CARNEIRO, 2004).

Tabela 3. Variância genotípica total separada entre os componentes de variância aditiva ($\hat{\sigma}_a^2$) e devido aos desvios de dominância ($\hat{\sigma}_d^2$).

Fonte de variação	Variância genotípica	Componentes
Entre famílias	$\hat{\sigma}_{ge}^2$	$2F\hat{\sigma}_a^2 + F(1-F)\hat{\sigma}_d^2$
Dentro de famílias	$\hat{\sigma}_{gd}^2$	$(1-F)\hat{\sigma}_a^2 + (1-F)\hat{\sigma}_d^2$
Total	$\hat{\sigma}_{gt}^2$	$(1+F)\hat{\sigma}_a^2 + (1-F^2)\hat{\sigma}_d^2$

Esta separação foi possível por causa da auto-fertilização das famílias, derivadas das populações dos cruzamentos entre dois, quatro e oito parentais contrastantes utilizados. A equação para a estimativa foi:

$$\hat{\sigma}_a^2 = \frac{\hat{\sigma}_{ge}^2 - F\hat{\sigma}_{gd}^2}{F(1+F)}; \quad \hat{\sigma}_d^2 = \frac{2F\hat{\sigma}_{gd}^2 - (1-F)\hat{\sigma}_{ge}^2}{F(1-F^2)}$$

2.4. Estimativa do coeficiente de herdabilidade

Herdabilidade de Sentido Amplo

- Entre famílias:
$$h_{ae}^2 = \frac{\hat{\sigma}_{ge}^2}{\hat{\sigma}_{fe}^2}$$

- Dentro de famílias:
$$h_{ad}^2 = \frac{\hat{\sigma}_{gd}^2}{\hat{\sigma}_{fd}^2}$$

Herdabilidade de Sentido Restrito

- Entre famílias:
$$h_{re}^2 = \frac{\hat{\sigma}_{a\text{ entre}}^2}{\hat{\sigma}_{fe}^2} = \frac{2F\hat{\sigma}_a^2}{\hat{\sigma}_{fe}^2}$$

- Dentro de famílias:
$$h_{rd}^2 = \frac{\hat{\sigma}_{a\text{ dentro}}^2}{\hat{\sigma}_{fd}^2} = \frac{(1-F)\hat{\sigma}_a^2}{\hat{\sigma}_{fd}^2}$$

- Total:
$$h_{N\text{ total}}^2 = \frac{\hat{\sigma}_{a\text{ total}}^2}{\hat{\sigma}_{f\text{ total}}^2} = \frac{(1+F)\hat{\sigma}_a^2}{\hat{\sigma}_{f\text{ total}}^2}$$

2.5. Estimativa do ganho genético (ΔG)

Para a estimativa do ganho genético predito em F_4 , considerou-se 40% ($i = 0,97$) de seleção em F_3 , seguindo o modelo (CRUZ, REGAZZI & CARNEIRO, 2004) onde: $\Delta G = h^2 \times S$, sendo: ΔG = ganho genético predito; h^2 = herdabilidade estimada; S = diferencial de seleção. O diferencial de seleção é estimado por $S = i\sigma_p$, sendo i = intensidade de seleção e σ_p = Desvio-padrão.

3. Resultados e Discussão

Na Tabela 4, estão apresentados os resultados de herdabilidade (h^2) e ganho genético (ΔG) para cada caracter avaliado, assim como, a média geral (\bar{X}) e a variância fenotípica entre σ^2_{pe} e dentro σ^2_{pd} das famílias, para cada cruzamento (B6, B7, Q29, Q30, 0C38 e 0C39) e testemunhas 1 (Coodetec 216) e 2 (MSOY 8001).

Altura da Planta na Maturação (APM)

As médias gerais para as testemunhas 1 e 2, variaram entre 71,08 cm e 88,62 cm. Em geral, todos os cruzamentos apresentaram médias inferiores às testemunhas, com exceção do cruzamento B6 (88,25 cm) relativo às testemunhas 1 (80,58 cm) e 2

(79,25 cm). Entretanto, os seis cruzamentos analisados na geração F_3 , apresentaram média superior à altura mínima de 60 cm, exigida para cultivo econômico, sendo os de maior porte os cruzamentos B6 (88,25 cm) e B7 (75,50 cm). As menores médias foram encontradas nos cruzamentos OC38 e OC39, ambos com aproximadamente 66 cm. O cruzamento B6 foi o que apresentou a maior variância fenotípica para esse caráter, com 170,76 cm entre as famílias e 107,93 cm dentro das famílias, seguido do cruzamento óctuplo OC39 com 137,56 e 68,32 cm, respectivamente. O desvio-padrão oscilou entre 7,50 e 16,16 cm, para B6 e B7, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4. Estimativa da herdabilidade no sentido amplo entre (h^2_{Ae}) e dentro de famílias (h^2_{Ad}), no sentido restrito entre (h^2_{Re}) e dentro de famílias (h^2_{Rd}), ganho genético (ΔG), média total da população (\bar{X}), média das testemunhas 1 e 2 (\bar{X}_1 e \bar{X}_2) e a variância fenotípica entre δ_{Fe}^2 e dentro de famílias δ_{Fd}^2 , para o caráter altura da planta na maturação (APM), em populações F₃.

Parâmetros	B6	B7	Q29	Q30	OC38	OC39
h^2_{Ae}	0,41	0,77	0,94	0,75	0,95	0,82
ΔG	2,50	9,76	5,63	6,82	5,94	9,33
h^2_{Ad}	0,63	0,79	0,96	0,97	0,94	0,97
ΔG	0,53	7,96	4,40	6,13	4,28	7,78
h^2_{Re}	0,33	0,69	0,87	0,69	0,94	0,77
ΔG	1,25	7,67	5,11	5,44	5,73	7,94
h^2_{Rd}	0,31	0,54	0,75	0,71	0,88	0,78
ΔG	1,09	4,94	3,36	4,43	3,88	6,16
\bar{X}	88,25 ± 7,50	75,50 ± 16,16	71,46 ± 7,53	70,34 ± 11,05	66,43 ± 7,69	66,27 ± 13,76
\bar{X}_1	80,58	88,62	71,08	76,75	80,92	87,58
\bar{X}_2	79,25	72,81	79,58	75,50	79,75	75,00
δ_{Fe}^2	39,57	170,76	38,19	87,85	41,57	137,56
δ_{Fd}^2	20,75	107,93	22,33	42,50	22,06	68,32

Comparando as herdabilidades no sentido amplo, entre e dentro de famílias, observa-se que a fração genética é mais importante na determinação das diferenças fenotípicas entre indivíduos de uma mesma família do que entre as famílias. Esta consideração está baseada na superioridade dos coeficientes de herdabilidade dentro de famílias, se comparado à herdabilidade entre famílias. Apenas no cruzamento OC38 a herdabilidade para plantas entre famílias superou a herdabilidade dentro de famílias, com diferença mínima de 0,95 para 0,94, respectivamente. Os valores de herdabilidade no sentido amplo entre e dentro de famílias foram elevados e próximos, os quais, em alguns cruzamentos foram superiores aos observados por COSTA et al., (2004). Apenas o cruzamento B6 apresentou estimativa de herdabilidade entre famílias inferior a 50%. Resultados similares foram encontrados por BACKES et al., (2002) e REIS et al., (2002), porém, com estimativas de herdabilidade no sentido amplo entre famílias superiores aos coeficientes obtidos dentro de famílias. Tais resultados apontam que o desempenho médio da família é um bom indicador do seu valor genotípico. Assim como a superioridade fenotípica entre os indivíduos de uma mesma família, indica uma certa superioridade genotípica, como é evidenciado pelas altas estimativas de herdabilidade dentro de famílias, na maioria dos cruzamentos.

Em geral, as herdabilidades no sentido restrito entre famílias foram elevadas, acima de 50%, exceto para o cruzamento B6 (0,33). Dentre as estimativas superiores a 50%, destaca-se o cruzamento OC38 com 0,94. Da mesma forma, as herdabilidades no sentido restrito dentro de famílias, apresentaram estimativas superiores a 50%, com exceção também para o cruzamento B6 (0,31). Constatou-se para essa característica que apenas nos cruzamentos Q30 (0,69 - 0,71) e OC39 (0,77 - 0,78) a herdabilidade restrita entre famílias foi inferior à estimativa dentro de famílias. Resultados similares para essa característica foram encontrados por COSTA et al., (2004), com estimativas de herdabilidade restrita entre famílias superiores a 50%, e estimativas de herdabilidade restrita dentro de famílias inferiores a 50%, discordando dos resultados desse trabalho (Tabela 4). O mesmo ocorreu em relação aos resultados encontrados por ALLIPRANDINI & VELLO (2004) com estimativas de baixa magnitude.

Os maiores valores de ganho genético, considerando as herdabilidades tanto em sentido amplo quanto em sentido restrito, para média de família e indivíduo dentro de família, foram verificados nos cruzamentos B7 e OC39 (Tabela 4). As menores estimativas foram encontradas no cruzamento B6. Merecem destaque os cruzamentos quádruplos (Q29 e Q30) e óctuplos (OC38 e OC39), que obtiveram as menores médias para esse caráter, entretanto, ambos apresentaram bons indicativos de ganho genético em gerações futuras. Esse potencial também foi observado no cruzamento B7.

Altura de Inserção da Primeira Vagem (AIV)

Com relação a este caráter, todos os cruzamentos apresentaram médias superiores ao recomendado (Tabela 5) para colheita mecanizada, cujo valor está acima de 12 cm (BONETTI, 1983). É importante ressaltar que as médias em todos os cruzamentos foram superiores às testemunhas 1 e 2, com exceção do cruzamento OC38, onde a média populacional (13,96 cm) foi inferior às testemunhas 1 (16,25 cm) e 2 (20,67 cm). Por outro lado, o cruzamento OC38 destacou-se com as maiores estimativas de variância fenotípica tanto entre quanto dentro de famílias, com, 29,47 cm e 19,03 cm, respectivamente. A seguir, vieram os cruzamentos quádruplos Q29 com variância fenotípica entre famílias de 22,52 cm e o Q30 com variância fenotípica dentro de famílias de 14,97 cm. O desvio-padrão oscilou entre 1,79 cm e 6,70 cm, nos cruzamentos B7 e OC38, respectivamente.

Todos os cruzamentos apresentaram coeficientes de herdabilidade ampla entre e dentro de famílias superiores a 50%, exceto os cruzamentos B7 (0,29 - entre) e Q30 (0,41 - dentro). Ressalta-se também que apenas nos cruzamentos B7 e OC39 as estimativas entre famílias foram inferiores àquelas dentro de famílias. Em relação às herdabilidades de sentido restrito entre famílias, três cruzamentos apresentaram

coeficientes superiores a 50%, Q29 (0,97), Q30 (0,59) e OC38 (0,74), já as estimativas dentro de famílias foram em geral baixas, com exceção para os cruzamentos Q29 (0,77) e OC38 (0,58). Nessa característica, a tendência de alta variabilidade genética ficou evidente nos cruzamentos quádruplos e óctuplos, onde foram obtidas as maiores estimativas de ganho genético com destaque para Q29 e OC38 (Tabela 5).

Tabela 5. Estimativa da herdabilidade no sentido amplo entre (h^2_{Ae}) e dentro de famílias (h^2_{Ad}), no sentido restrito entre (h^2_{Re}) e dentro de famílias (h^2_{Rd}), ganho genético (ΔG), média total da população (\bar{X}), média das testemunhas 1 e 2 (\bar{X}_1 e \bar{X}_2) e a variância fenotípica entre δ_{Fe}^2 e dentro de famílias δ_{Fd}^2 , para o caráter altura de inserção da primeira vagem (AIV), em populações F₃.

Parâmetros	B6	B7	Q29	Q30	OC38	OC39
h^2_{Ae}	0,92	0,29	0,99	0,73	0,78	0,92
ΔG	2,13	0,40	4,56	2,34	4,11	2,50
h^2_{Ad}	0,81	0,76	0,82	0,41	0,68	0,95
ΔG	2,53	0,87	3,01	1,58	2,88	2,93
h^2_{Re}	0,25	0,04	0,97	0,59	0,74	0,42
ΔG	0,56	0,03	4,50	1,60	3,44	1,09
h^2_{Rd}	0,07	0,03	0,77	0,21	0,58	0,17
ΔG	0,20	0,03	2,60	0,51	2,02	0,51
\bar{X}	17,38 ± 3,78	17,50 ± 1,79	14,15 ± 5,87	17,85 ± 4,82	13,96 ± 6,70	16,25 ± 3,96
\bar{X}_1	16,17	16,25	11,50	13,42	16,25	15,50
\bar{X}_2	10,08	16,50	11,75	14,50	20,67	16,08
δ_{Fe}^2	5,69	2,04	22,52	10,65	29,47	7,84
δ_{Fd}^2	10,37	1,40	14,34	14,97	19,03	9,87

Produção de Grãos (PG)

Na Tabela 6, observa-se que as médias para esse caráter nos cruzamentos Q30 (14,42 g), OC39 (13,31 g) e B7 (12,62 g), superaram as médias da testemunha 1, que variou entre 5,91 g e 10,67 g e da testemunha 2 que oscilou entre 8,26 g e 13,14 g. Os mesmos cruzamentos foram aqueles que apresentaram as maiores estimativas para a variância fenotípica, com 22,47 para variância entre as famílias no cruzamento óctuplo OC39, seguido do cruzamento biparental B7 com 22,39. Para variância dentro de famílias, destaque para B7 com 28,60, seguido do cruzamento quádruplo Q30 com 26,33 (Tabela 6). Merecem destaque, os cruzamentos com maior número de parentais envolvidos, confirmando estudos realizados por HAMAWAKI, VELLO & HAMAWAKI, (2002). O excesso de chuvas ocorridas no período reprodutivo (FEHR & CAVINESS, 1981), assim como o vigor das sementes e a alta segregação na geração em estudo (F_3), podem ter contribuído para o baixo rendimento. Os seis cruzamentos analisados apresentaram estimativas de herdabilidade no sentido amplo de alta magnitude, tanto entre quanto dentro de famílias, sendo estas acima de 50%, exceto para o cruzamento B6 (0,49). Tal comportamento está de acordo com o observado por SANTOS et al., (1995). Verifica-se também que os coeficientes de herdabilidades entre famílias foram superiores aos valores dentro de famílias, nos cruzamentos B7, Q29 e Q30 e inferiores nos demais cruzamentos (Tabela 6). Tal constatação está de acordo com os resultados obtidos por BACKES et al., (2002), que obtiveram estimativas de herdabilidade no sentido amplo entre família variando de 36,37 a 87,87%. Por outro lado, as estimativas de herdabilidade no sentido restrito entre e dentro de famílias foram baixas, sendo estas inferiores a 50%, exceto para o cruzamento Q29 (0,87 entre famílias). HAMAWAKI, VELLO & DIDONÉ, (2000), analisando diversos cruzamentos óctuplos, obtiveram estimativas de herdabilidade que variaram de 1,53% a 61,06%.

Tabela 6. Estimativa da herdabilidade no sentido amplo entre (h^2_{Ae}) e dentro de famílias (h^2_{Ad}), no sentido restrito entre (h^2_{Re}) e dentro de famílias (h^2_{Rd}), ganho genético (ΔG), média total da população (\bar{X}), média das testemunhas 1 e 2 (\bar{X}_1 e \bar{X}_2) e a variância fenotípica entre δ_{Fe}^2 e dentro de famílias δ_{Fd}^2 , para o caráter produção de grãos (PG), em populações F₃.

Parâmetros	B6	B7	Q29	Q30	OC38	OC39
h^2_{Ae}	0,49	0,82	0,97	0,91	0,52	0,74
ΔG	1,68	3,78	3,90	3,39	1,87	3,40
h^2_{Ad}	0,84	0,72	0,61	0,80	0,96	0,98
ΔG	2,94	3,73	2,49	3,98	2,82	4,21
h^2_{Re}	0,08	0,49	0,87	0,26	0,28	0,41
ΔG	0,17	2,04	3,44	0,92	0,73	1,62
h^2_{Rd}	0,04	0,19	0,42	0,07	0,21	0,23
ΔG	0,13	0,84	1,34	0,31	0,60	0,98
\bar{X}	9,59 ± 4,82	12,62 ± 6,86	9,18 ± 5,68	14,42 ± 6,08	6,44 ± 4,58	13,31 ± 6,15
\bar{X}_1	9,56	5,91	7,74	10,67	8,26	8,23
\bar{X}_2	11,85	8,26	13,14	12,30	12,54	12,38
δ_{Fe}^2	12,49	22,39	17,14	14,72	13,71	22,47
δ_{Fd}^2	13,00	28,60	17,68	26,33	9,00	19,59

Esta baixa estimativa está relacionada ao fato da herdabilidade no sentido restrito ser expressa em função da variância genética aditiva em relação a variabilidade fenotípica, sendo isolados os efeitos de dominância e das interações. A produção, tratando-se de um caráter quantitativo, controlado por muitos genes, sofre maior influência ambiental, resultando normalmente em menores valores de herdabilidade quando comparada aos demais caracteres agrônômicos estudados. Neste caráter, destaca-se também a ausência da variância devido a dominância, que assim contribui para a obtenção de baixas estimativas de herdabilidade no sentido restrito. Resultados similares foram reportados por DI MAURO et al., (2000); BACKES et al., (2002); MUNIZ et al., (2002) e ALLIPRANDINI & VELLO, (2004).

Com base nas herdabilidades restritas dentro de famílias, torna-se evidente que a eficiência da seleção dentro das famílias será baixa em quase todos os cruzamentos analisados. Neste caso, apenas parte das diferenças fenotípicas entre indivíduos de uma mesma família é de natureza herdável, constatando que as diferenças entre as plantas de mesma família se devem, predominantemente, a diferenças ambientais e desvios devido à dominância, sendo estas de natureza não herdável. Desta forma, a seleção entre famílias será primordial, pois é nelas que se encontra disponível a maior parte da variância genética aditiva (BACKES et al., 2002).

Com relação ao ganho genético em função da herdabilidade de sentido amplo, merecem destaque os cruzamentos Q29 com 3,90 g de ganho entre famílias e o cruzamento OC39 com 4,21 g de ganho dentro de famílias (Tabela 6). Nas estimativas de ganho genético considerando a herdabilidade restrita, o cruzamento Q29 despontou com os maiores valores entre famílias (3,44 g) e dentro de famílias (1,34 g). Desta forma, torna-se evidente a tendência de maior ganho genético no caráter produção, nos cruzamentos com maior número de parentais, ou seja, nos quádruplos e óctuplos. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por HAMAWAKI, VELLO & DIDONÉ (2000), em estudo com cruzamentos óctuplos.

Número de sementes (NS)

Na Tabela 7, verifica-se que as maiores médias para o caráter número de sementes foram observadas nos cruzamentos Q30 (105,65) e OC39 (100,37), sendo ambos superiores à testemunha 1 (88,17 e 86,67) e inferiores a testemunha 2 (106,50 e 113,08). A variabilidade fenotípica de maiores magnitudes entre famílias, foram observadas nos cruzamentos óctuplos OC38 (3,92) e OC39 (3,78) e dentro de famílias no cruzamento biparental B7 (3,00) e no OC39 (2,75). Resultados importantes na criação de variabilidade genética foram observados por NAOE et al., (2001), em estudos entre famílias na geração F_3 , para o caráter número de sementes na cultura da soja. O desvio-padrão variou entre 30,82 no cruzamento B6 à 54,15 no cruzamento OC39. Novamente, os cruzamentos com maior número de parentais envolvidos destacaram-se com as maiores médias e maior variabilidade fenotípica (Tabela 7).

Esta superioridade foi verificada também nas estimativas de herdabilidade no sentido amplo entre e dentro de famílias (Tabela 7). Os maiores coeficientes foram observados em Q29 (0,87 entre família) e OC39 (0,98 dentro de família). Observa-se também que o valor genético é mais importante na determinação das diferenças fenotípicas dentro de famílias do que entre famílias, visto a superioridade das estimativas de herdabilidade dentro de famílias comparando aos valores entre famílias, exceto para o cruzamento B7. Estes resultados estão de acordo com COSTA et al., (2004), que obtiveram valores para herdabilidade no sentido amplo de magnitude elevada, porém, não concordam com os resultados obtidos por REIS et al., (2002), que obtiveram estimativas inferiores a 50%. Com relação às herdabilidades de sentido restrito, apenas o cruzamento Q30 com 0,36 e 0,16, entre e dentro, respectivamente, foi inferior aos cruzamentos biparentais. Merece destaque o cruzamento OC38 com as maiores estimativas: 0,76 entre e 0,73 dentro de famílias.

Tabela 7. Estimativa da herdabilidade no sentido amplo entre (h^2_{Ae}) e dentro de famílias (h^2_{Ad}), no sentido restrito entre (h^2_{Re}) e dentro de famílias (h^2_{Rd}), ganho genético (ΔG), média total da população (\bar{X}), média das testemunhas 1 e 2 (\bar{X}_1 e \bar{X}_2) e a variância fenotípica entre δ_{Fe}^2 e dentro de famílias δ_{Fd}^2 , para o caráter número de sementes (NS), em populações F₃.

Parâmetros	B6	B7	Q29	Q30	OC38	OC39
h^2_{Ae}	0,68	0,59	0,87	0,79	0,82	0,85
ΔG	0,94	0,95	1,38	1,11	1,57	1,61
h^2_{Ad}	0,84	0,38	0,88	0,97	0,97	0,98
ΔG	1,09	0,64	1,32	1,41	1,34	1,58
h^2_{Re}	0,41	0,51	0,63	0,36	0,76	0,61
ΔG	0,47	0,63	0,93	0,44	1,32	1,05
h^2_{Rd}	0,23	0,23	0,35	0,16	0,73	0,37
ΔG	0,27	0,24	0,49	0,23	1,00	0,59
\bar{X}	63,10 ± 30,82	78,59 ± 44,45	60,40 ± 35,05	105,65 ± 42,12	50,55 ± 33,16	100,37 ± 54,15
\bar{X}_1	78,50	56,94	76,33	88,17	83,33	86,67
\bar{X}_2	106,50	65,87	108,17	106,50	114,75	113,08
δ_{Fe}^2	2,01	2,77	2,66	2,08	3,92	3,78
δ_{Fd}^2	1,80	3,00	2,40	2,25	2,04	2,75

† Transformados por \sqrt{x}

No geral, apenas dois cruzamentos tiveram estimativas inferiores a 50% entre família, precisamente o B6 (0,41) e o Q30 (0,36). Por outro lado, as estimativas dentro de famílias, foram inferiores a esse percentual em quase todos os cruzamentos, exceto para OC38 (0,73). Tais resultados concordam com aqueles obtidos por REIS et al., (2002), que relataram herdabilidade restrita de baixa magnitude em cruzamentos simples de soja. A maior predição de ganho genético foi constatada nos cruzamentos óctuplos OC38 e OC39 (Tabela 7). Este resultado indica que o cruzamento OC38 mesmo com a menor média de NS, também pode ser considerado um cruzamento promissor, como o Q29 e o OC39, com tendência a ganhos futuros com a seleção. Assim, torna-se evidente uma tendência de superioridade dos cruzamentos com maior número de parentais (quádruplos e óctuplos), em comparação aos cruzamentos simples (biparentais) nos caracteres analisados, quando se propõe a obtenção de variabilidade genética na cultura da soja.

4. Conclusões

1. A maior média para os caracteres AIV, PG e NS, foram observadas no cruzamento quádruplo Q30, e, para o caráter APM no cruzamento biparental B6.
2. As herdabilidades de maiores magnitudes foram verificadas nos cruzamentos quádruplos e óctuplos, para todos os caracteres analisados.
3. Em todos os caracteres agronômicos analisados, o ganho genético foi superior para os cruzamentos quádruplos e óctuplos, com excessão para o caráter APM no cruzamento biparental B7.
4. A existência de grande variabilidade genética nas famílias F_3 , permite antever a possibilidade de se obter ganhos adicionais em ciclos mais avançados de seleção.
5. Cruzamentos com maior número de parentais envolvidos, tendem a apresentar maior variabilidade e, conseqüentemente, maior variância genética.

5. Referências

ALLIPRANDINI, L. F. **Potencialidade de cruzamentos quádruplos de soja com ênfase na produtividade de grãos**. 1996. 174 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1996.

ALLIPRANDINI, L. F.; VELLO, N. A. Heritability and correlations among traits in four-way soybean crosses. **Euphytica**, v. 136, p. 81-91, 2004.

BACKES, R. L.; REIS, M. S.; SEDIYAMA, T.; CRUZ, C. D.; TEIXEIRA, R. C. de. Estimativas de parâmetros genéticos em populações F₅ e F₆ de soja. **Rev. Ceres**, Viçosa, v. 49, n. 282, p. 201-216, 2002.

BERNARDO, R. *Breeding for Quantitative Traits in Plants*. **Woodbury: Stemma Press**, 2002, 360 p.

BONETTI, L. P. Cultivares e seu melhoramento genético. In: FUNDAÇÃO CARGILL. **Soja genética e melhoramento**, v. 2, p. 741–800, 1983.

COSTA, M. M.; DI MAURO, A. O.; UNÊDA-TREVIZOLI, S. H.; ARRIEL, N. H. C.; BÁRBARO, I. M.; MUNIZ, F. R. S. Ganho genético por diferentes critérios de seleção em populações segregantes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.11, p.1095-1102, 2004.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 3ed. Editora UFV, Viçosa, v. 1, 2004, 480 p.

DI MAURO, A. O.; OLIVEIRA, R. C.; MARCONDES, A. F.; SEDIYAMA, T. Ganho genético por seleção em linhagens de soja. **Revista Ceres**, v. 47, n. 270, p. 135-144, 2000.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa de Soja. **Tecnologia de produção de soja - região central do Brasil 2007**. Londrina: Embrapa Soja - Embrapa Cerrados - Embrapa Agropecuária Oeste, 2006, 225 p.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stages of soybean development**. Ames: Iowa State University. Iowa Cooperative Extensive Service, 1981, 12 p. (Special Report, 80).

HAMAWAKI, O. T.; VELLO, N. A.; DIDONE, C. A. Improvement in genetic characteristics and oil yield of selected soybean progenies from octuple crosses. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 4, p. 855-864, 2000.

HAMAWAKI, O. T.; VELLO, N. A.; HAMAWAKI, R. L. Seleção de progenies superiores em cruzamentos óctuplos de soja. **Biosci Journal**, v. 18, n. 2, p. 49-58, 2002.

HIROMOTO, D. M.; VELLO, N. A. The genetic base of Brazilian soybean (*Glycine Max* (L.) Merrill) cultivars. **Revista Brasileira de Genética**, v. 9, p. 295-306, 1986.

MUNIZ, F. R. S.; MAURO, A. O. DI.; UNÊDA-TREVISOLI, S. H.; OLIVEIRA, J. A.; BÁRBARO, I. M.; ARRIEL, N. H. C.; COSTA, M. M. Parâmetros genéticos e fenotípicos em populações segregantes de soja. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, v. 6, n. 3, p. 609-616, 2002.

NAOE, L. K.; SEDIYAMA, C. S.; MIRANDA, G. V.; CRUZ, C. D.; MOREIRA, M. A. Divergência entre progenitores e variabilidade das populações segregantes de soja. **Revista Ceres**, v. 48, n. 276, p. 223-237, 2001.

PRIOLLI, R. H. G.; MENDES-JÚNIOR, C. T.; SOUSA, S. M. B.; SOUSA, N. E. A.; CONTEL, E. P. B. Diversidade genética da soja entre períodos e entre programas de melhoramento no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.10, p.967-975, 2004.

REIS, E. F.; REIS, M. S.; SEDIYAMA, T.; CRUZ, C. D. Estimativa de variância e herdabilidades de algumas características primárias e secundárias da produção de grãos em soja (*Glycine max* (L.) Merrill). **Ciência Agrotécnica**. Lavras, v.26, n.4, p. 749-761, 2002.

SANTOS, C. A. F.; REIS, M. S.; SEDIYAMA, C. S.; CRUZ, C. D.; SEDIYAMA, T. Parâmetros genéticos e seleção indireta em progênies F₆ de um cruzamento de soja (*Glycine max* (L.) ,Merril). **Revista Ceres**, v. 42, n. 240, p. 155-166, 1995.

TANKSLEY, S. D.; MCCOUCH, S. R. Seed banks and molecular maps: Unlocking genetic potential from the wild. **Science**, v. 277, p. 1063–1066, 1997.

VELLO, N. A. Ampliação da base genética do germoplasma e melhoramento de soja na ESALQ/USP. In: CÂMARA, G. M. S., MARCOS FILHO, J.; OLIVEIRA, E. A. M., (Ed.) **Simpósio sobre cultura e produtividade da soja**. Piracicaba, FEALQ, 1992, p. 60-81.